

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «ПРИВОЛЖСКИЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи



Потапов Арсений Леонидович

**Морфологические варианты и возможности оптических методов в
диагностике склероатрофического лишена вульвы**

3.3.2. Патологическая анатомия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор
Раденска-Лоповок Стефка Господинова

Нижний Новгород – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Терминология, эпидемиология, этиология и патогенез склероатрофического лишена вульвы.....	14
1.2 Морфологическая характеристика склероатрофического лишена вульвы	23
1.2.1 Современные ограничения морфологической диагностики склероатрофического лишена вульвы.....	28
1.3 Морфологические классификации склероатрофического лишена вульвы	29
1.4 Многофотонная микроскопия как метод изучения соединительной ткани при заболеваниях кожи	34
1.5 Оптические методы неинвазивной диагностики склероатрофического лишена вульвы	37
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	45
2.1 Объекты исследования	45
2.2 Методы исследования.....	48
2.3 Методики исследования	52
2.4 Количественная оценка иммуногистохимических данных	53
2.5 Анализ данных многофотонной микроскопии.....	56
2.6 Визуальный и количественный анализ данных оптической когерентной томографии	60
2.7 Статистическая обработка полученных данных.....	63
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	66
3.1 Гистологическое, иммуногистохимическое исследование и многофотонная микроскопия для диагностики морфологических вариантов склероатрофического лишена вульвы.....	67
3.1.1 Изучение патологических изменений эпидермиса.....	67

3.1.2 Изучение патологических изменений коллагеновых волокон дермы	70
3.1.3 Количественная оценка структуры и состава коллагеновых волокон по данным многофотонной микроскопии и иммуногистохимического исследования.....	79
3.1.4 Изучение патологических изменений эластических волокон дермы	82
3.1.5 Ассоциация морфологических характеристик склероатрофического лихена вульвы с вариантами поражения дермы	84
3.2 Оптическая когерентная томография для неинвазивной диагностики морфологических вариантов склероатрофического лихена вульвы.....	88
3.2.1 Использование структурных изображений и карт коэффициента затухания сигнала оптической когерентной томографии для оценки эпидермиса.....	88
3.2.2 Использование структурных изображений и карт коэффициента затухания сигнала оптической когерентной томографии для оценки дермы.....	92
3.2.3 Количественная оценка коэффициента затухания сигнала оптической когерентной томографии для диагностики вариантов склероатрофического лихена вульвы	100
3.3 Диагностическая точность использования коэффициента затухания сигнала оптической когерентной томографии для идентификации морфологических вариантов склероатрофического лихена вульвы.....	103
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	105
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	114
ВЫВОДЫ	117
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	119
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	120
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	121

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Склероатрофический лишай вульвы (СЛВ) – иммуноопосредованный дерматоз, связанный с лихеноидной Т-клеточной воспалительной реакцией, повреждением базальной мембраны эпидермиса и сосудов, избыточным синтезом коллагена в дерме. Заболевание имеет хроническое, рецидивирующее течение, сопровождается изнуряющими и стойкими симптомами, которые значительно снижают качество жизни женщин [1]. СЛВ является основной причиной структурных нарушений тканей вульвы, которые приводят к анатомической, сексуальной, мочевой дисфункции, а также увеличивает риск развития плоскоклеточной карциномы вульвы в 16 раз по сравнению со здоровыми женщинами [2; 3].

Заболевание может поражать женщин всех возрастных групп, однако чаще поражает девочек в препубертатном периоде (средний возраст 7,6 лет) и женщин в пери- и постменопаузу (средний возраст 52,6 лет [4]), что связано с дефицитом эстрогена [5]. Был зафиксирован значительный рост уровня заболеваемости с начала 2000 годов в Нидерландах [3], Финляндии [6], Дании [2] и США [7], что, вероятно, связано с увеличивающейся продолжительностью жизни женщин. Данные о заболеваемости СЛВ в России недоступны, однако существует единичное сообщение о росте заболеваемости среди девочек [8].

Золотым стандартом диагностики дерматозов является биопсия с последующим гистологическим исследованием материала. Биопсия вульвы показана при клинически неясном диагнозе или подозрении на дисплазию/карциному, а также при неэффективности лечения СЛВ препаратами первой линии. Несмотря на то, что врачи достаточно часто прибегают к проведению диагностической биопсии - около 60% всех случаев [9], в настоящее

время СЛВ считается несвоевременно диагностируемым заболеванием, особенно у женщин репродуктивного возраста [7]. Задержка в диагностике может составлять от 3 до 5 лет [10; 11]. Это, вероятно, связано с высоким количеством (около трети) неинформативных результатов биопсий [10], а также с отсутствием неинвазивных методов диагностики СЛВ. Важным ограничением при гистологическом исследовании остается недостаточное описание критериев раннего СЛВ, когда отсутствует патогномоничная зона склероза в дерме [12].

Решение проблемы своевременной диагностики СЛВ возможно путем применения неинвазивных оптических методов, так называемых методов «оптической биопсии». Наиболее перспективным из них является оптическая когерентная томография (ОКТ) кожи. ОКТ обеспечивает формирование трехмерных изображений микроструктуры ткани путем измерения обратно рассеянного и обратно отраженного инфракрасного света способом, аналогичным ультразвуку [13]. ОКТ-приборы, используемые в клинике, имеют разрешающую способность от 3 до 10 мкм, что недостаточно для визуализации отдельных клеток, достаточно для визуализации групп клеток и тканей. Глубина исследования кожи составляет порядка 1,2 мм что обеспечивает надежную визуализацию эпидермиса и верхнего слоя дермы [14]. Метод ОКТ позволяет проводить оценку структуры коллагеновых пучков, поэтому эффективен в диагностике системного склероза, локализованной склеродермии и при оценке различных видов рубцов [15].

Степень разработанности темы исследования

Одной из главных проблем на пути ранней гистологической диагностики и внедрения оптической биопсии при СЛВ является отсутствие четких представлений о морфологических изменениях ткани в процессе развития СЛВ, систематизации полиморфизма данных изменений, а также общепринятых критериев постановки диагноза. Предложенные ранее классификации [16; 17] СЛВ

некорректно описывают изменения соединительной ткани и в настоящее время не используются. Попытку изменить подход к диагностике предприняло международное общество по изучению вульвагинальных заболеваний (ISSVD), которым было предложено использовать термин несклеротический СЛВ, в случае, когда имеются микроскопические признаки СЛВ без патогномичной зоны склероза [12]. Однако в таком случае для подтверждения диагноза СЛВ требуется согласованность с клиническими данными, что ограничивает диагностику и своевременность лечения.

Ранее были проведены пробные исследования неинвазивной диагностики СЛВ методом ОКТ, которые продемонстрировали возможность идентифицировать такие морфологические признаки СЛВ как гиперкератоз, атрофия эпидермиса с потерей эпидермальных сосочков, склероз дермы [19; 20]. Однако эти исследования рассматривают только классический гистологический вариант СЛВ, исключая другие изменения дермы, характерные для СЛВ.

Многофотонная микроскопия, основанная на регистрации сигнала генерации второй гармоники (ГВГ-микроскопия), занимает особое место среди современных методов исследования соединительной ткани. В отличие от традиционных гистологических подходов, требующих окрашивания, ГВГ-микроскопия позволяет визуализировать коллагеновые волокна I типа непосредственно, без каких-либо дополнительных меток. Такая прямая регистрация структурного сигнала обеспечивает высокую специфичность и субмикронное разрешение, что существенно расширяет возможности анализа. ГВГ-микроскопия стала «золотым стандартом» для исследования архитектуры коллагена и широко применялась для исследования стромы рака, заболеваний соединительной ткани, атеросклероза, фиброза печени и почек [18].

Цель и задачи исследования

Цель исследования: выявить морфологические варианты и установить возможности оптических методов в диагностике склероатрофического лишена вульвы.

Задачи исследования:

1) Изучить морфологические изменения кожи вульвы при склероатрофическом лишене с использованием стандартных гистологических методов исследования и высокоразрешающей ГВГ микроскопии, выделить варианты поражения соединительной ткани.

2) Установить взаимосвязь структурных изменений коллагеновых волокон, детектируемых с помощью ГВГ микроскопии, с изменением состава коллагеновых волокон, детектируемых ИГХ исследованием, в зоне поражения дермы при СЛВ.

3) Установить возможность диагностики морфологических вариантов СЛВ с помощью ОКТ, установить диагностическую точность использования коэффициента затухания ОКТ сигнала.

4) Установить взаимосвязь коэффициента затухания ОКТ сигнала и морфологических изменений, наблюдаемых при вариантах СЛВ.

Научная новизна

Впервые описаны варианты поражения соединительной ткани кожи при СЛВ на основании ИГХ исследования содержания коллагена I, III, V типов и ГВГ-микроскопии.

Впервые продемонстрирована корреляция изменений формы и расположения коллагеновых волокон при ГВГ микроскопии с изменением содержания коллагена I, III, V типов.

Впервые продемонстрировано, что цветокодированные карты коэффициента затухания ОКТ сигнала позволяют визуально идентифицировать каждый вариант поражения соединительной ткани при СЛВ.

Впервые определена диагностическая точность коэффициента затухания ОКТ сигнала для диагностики как раннего и классического СЛВ, так и описанных вариантов поражения дермы.

Впервые установлена взаимосвязь коэффициента затухания ОКТ сигнала и морфологических изменений, наблюдаемых при вариантах СЛВ.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведенное исследование описывает полиморфизм изменений соединительной ткани дермы при СЛВ, включая структуру и состав коллагеновых волокон, что важно учитывать при исследовании биопсийного материала вульвы в клинической практике. Использование цветокодированных карт коэффициента затухания ОКТ сигнала и расчёт коэффициента затухания в дерме продемонстрировало высокую диагностическую значимость для неинвазивной диагностики СЛВ. Дальнейшее изучение взаимосвязи морфологических изменений кожи вульвы при СЛВ с оптическими характеристиками потенциально создаёт основу для интеграции неинвазивного метода ОКТ в практику гинекологов и дерматовенерологов.

Основные результаты исследования и сформулированные практические рекомендации могут быть использованы при подготовке соответствующих разделов лекционных курсов и спецкурсов по патологической анатомии.

Методология и методы исследования

В рамках исследования использован комплекс методик: гистологические, гистохимические и иммуногистохимические методы, многофотонная микроскопия с субмикронным разрешением, а также неинвазивная прижизненная оптическая когерентная томография, позволяющая оценивать морфологические изменения кожи *in vivo*. Обработка и интерпретация данных осуществлялись с применением морфометрических методов и текстурного анализа изображений.

Личный вклад автора

Автором сформулированы цели и задачи исследования. Все гистологические препараты оценены, отсканированы и сформирована база данных материалов диссертации, включающая гистологические сканы, трехмерные наборы ОКТ данных, гистологический диагноз, результаты многофотонной микроскопии.

Самостоятельно проведен гистологический анализ с описанием и количественной оценкой биопсийного и архивного материала кожи вульвы с окрашиванием гематоксилином-эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону, ШИК-реакцией. Проведен количественный и качественный анализ результатов многофотонной микроскопии. Сформулированы диагностические критерии рассматриваемой патологии.

Автором сформулированы выводы и положения, выносимые на защиту диссертационного исследования.

Автор принимал непосредственное участие в исследованиях, написании манускриптов, оформлении рисунков и таблиц, формулировании выводов всех представленных публикаций.

Планирование исследований, обобщение полученных результатов осуществлялось с участием научного руководителя работы профессора С.Г. Раденской-Лоповок.

Положения, выносимые на защиту

1) Выделены три варианта поражения дермы при СЛВ: умеренный – выраженный – тяжелый, определены их качественные и количественные морфологические критерии.

2) Основное патогенетическое звено в формировании патогномичных морфологических признаков заключается в изменении структуры и состава коллагеновых волокон, что было установлено иммуногистохимическим методом и высокоразрешающей ГВГ-микроскопией.

3) Коэффициент затухания ОКТ сигнала позволяет неинвазивно, прижизненно идентифицировать умеренный – выраженный – тяжелый морфологические варианты СЛВ с диагностической точностью 56,6 – 97,5 – 100% соответственно. Метод ОКТ может быть предложен для клинического использования с целью уточнения диагноза СЛВ в условиях, когда выполнение биопсии затруднено или нежелательно.

4) Коэффициент затухания ОКТ сигнала имеет высокую корреляцию с составом ($\rho = 0,58-0,8$, $p < 0,0001$) и структурой ($\rho = 0,31-0,71$, $p < 0,0001$) коллагеновых волокон, изучаемых с помощью иммуногистохимического исследования и высокоразрешающей ГВГ-микроскопии.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.3.2. Патологическая анатомия, по направлениям исследований: пункт 2 «Научный анализ патологических процессов, лежащих в основе заболевания, прижизненная диагностика и прогнозная оценка болезней на основе исследований биопсийных материалов»; пункт 4 «Исследование морфо- и танатогенеза заболеваний, роли различных органных, тканевых систем в становлении основного заболевания (полиорганность патологии) и его исходах»; пункт 5 «Совершенствование клинико-морфологических классификаций болезней с их симптомами и синдромами, определяемыми спецификой этиологических факторов. Разработка теории диагноза»; пункт 6 «Разработка и совершенствование теоретических, методических и организационных принципов прижизненного и посмертного патологоанатомических исследований с позиций запросов общественного здравоохранения и медицинской практики».

Степень достоверности и апробация результатов

Научные положения и выводы, представленные в исследовании, опираются на массив данных, достаточный для обеспечения статистической достоверности. Их обоснованность подтверждается фактическими результатами, визуализированными в виде рисунков и таблиц. Статистические методы для анализа были выбраны с учетом типа данных (количественные, качественные), распределения данных (нормальное, не нормальное), при множественной проверке гипотез была введена поправка Бонферрони.

Результаты диссертационного исследования представлены на 4 международных и 5 всероссийских конференциях; 3 доклада отмечены дипломами.

Результаты работы диссертационного исследования обсуждались в рамках Алмазовского молодежного медицинского форума на VII Петербургском медицинском инновационном форуме (Санкт-Петербург, 2024), научно-практической конференции «Абрикосовские чтения» (Москва, 2023 год), где доклады отмечены дипломом II степени; на Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Флуоресценция для биомедицины» (Нижний Новгород, 2024); на VIII Международном симпозиуме по оптике и биофотонике “Saratov Fall Meeting” (Саратов, 2023); международных форумах “SPIE Photonics West” (онлайн-форум, Сан-Франциско, США, 2022, 2023); VII Съезде биофизиков России (г. Краснодар, 2023); 29й Международной конференции Advanced Laser Technologies (ALT’22) (г. Москва, 2022); на VI Всероссийской конференции молодых ученых и студентов с международным участием “VolgaMedScience” (Нижний Новгород, 2020), где доклад отмечен дипломом II степени.

Результаты диссертационного исследования внедрены в научно-исследовательскую работу научной лаборатории оптической когерентной томографии НИИ Экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России.

Диссертация была апробирована 15.04.2025 на заседании проблемной комиссии «Биомедицинские науки» ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 12 работ, в том числе 2 научных статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России, в

которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 3 статьи в изданиях, индексируемых в международной базе Scopus, 3 – иные публикации, 4 – публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Конкурсная поддержка работы

Проведенные исследования поддержаны грантом Российского научного фонда «Разработка неинвазивного прижизненного способа оценки тяжести дистрофических заболеваний вульвы и мониторинга эффективности лечения по состоянию микроструктуры ткани» (проект №18-75-10084, 2019–2024 гг.).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 141 странице, включает 9 таблиц и 32 рисунка. Список литературы содержит 192 источника, из них 180 зарубежных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Терминология, эпидемиология, этиология и патогенез склероатрофического лишена вульвы

СЛВ как нозологическая единица. Склероатрофический лишень вульвы был независимо описан несколькими исследователями-гинекологами, в результате чего ранее был известен под множеством названий, которые длительное время считались разными заболеваниями [21; 22]. Впервые как самостоятельное заболевание СЛВ описан в 1885 году Breisky и назван краурозом вульвы (*kraurosis vulvae*, на греческом *krauros* означает сухой или ломкий). Darier в 1892 году описал классическую гистопатологию заболевания и на основе видимых микроскопических изменений предложил название склероатрофический лишень (*lichen sclerosus et atrophicus*). Дополнительную путаницу внесли Berkeley и Bonney которые в 1909 году описали крауроз и лейкоплакию вульвы как разные заболевания и такая концепция существовала длительно в отечественной литературе [23]. В дальнейшем Oberfield продемонстрировал, что все термины употребляются к идентичному по гистологическим проявлениям заболеванию [24]. В 1976 Friedrich продемонстрировал, что заболевание не всегда сопровождается атрофией эпидермиса и описал состояние как дистрофическое, а не атрофическое в связи с чем консенсус экспертов комитета по терминологии ISSVD постановил использовать термин склеротический лишень (*lichen sclerosus*), другие термины использовать не рекомендуется [25].

К сожалению, в отечественной литературе до сих пор сохраняется путаница как в научных, так и в клинических публикациях и взаимозаменяемо используются термины: Крауроз вульвы, лейкоплакия вульвы, склероатрофический лишень, склеротический лишень, склерозирующий лишень. В Российских федеральных клинических рекомендациях СЛВ рассматривается в разделе «Локализованная

склеродермия», также утверждены методические рекомендации департамента здравоохранения города Москва «Аногенитальный склеротический и атрофический лишай: клиника, диагностика, лечение, профилактика». Подготовлен проект федеральных клинических рекомендаций «Лишай склеротический и атрофический» Российским обществом дерматовенерологов и косметологов совместно с Российским обществом акушеров-гинекологов. Однако данный документ пока не прошёл процедуру утверждения.

Согласно официально используемой в Российской Федерации международной классификации болезней 10 пересмотра заболевание кодируется в разделе N90 «Другие невоспалительные болезни вульвы и промежности», подразделе N90.4 «Лейкоплакия вульвы: дистрофия/крауроз вульвы». В данной работе будет использовано название — склероатрофический лихен как наиболее употребимый вариант в отечественной литературе.

Эпидемиология. Заболевание может поражать женщин всех возрастных групп и имеет два пика повышенной заболеваемости: в препубертатном периоде (средний возраст 7,6 лет) и в пери- и постменопаузе (средний возраст 52,6 лет [4]), что связано с дефицитом половых гормонов (эстрогена) [5]. Был зафиксирован значительный рост уровня заболеваемости с начала 2000-х годов в Нидерландах [3], Финляндии [6], Дании [2] и США [7], что вероятно связано с растущей настороженностью врачей гинекологов и осведомлённостью женщин, появлением центров, специализирующихся на заболеваниях вульвы, а также увеличивающейся продолжительностью жизни женщин. Так, среди женщин после 80 лет распространенность составляет 0,29%, а в домах престарелых страдают 3% всех женщин [26]. По данным Датского реестра патологии средняя годовая заболеваемость СЛВ увеличилась с 5 случаев (1997–1998 год) до 35,7 случаев (2021–2022 год) на 100 000 женщин в год [2]. Данные о заболеваемости СЛВ в России недоступны, однако существует единичное сообщение о росте заболеваемости среди девочек [8].

Этиология и патогенез. На настоящее время этиология и патогенез СЛВ изучены лишь частично и фрагментарно, известны отдельные этиологические

факторы и патогенетические звенья заболевания, установлена генетическая предрасположенность, а также ассоциация с другими аутоиммунными заболеваниями.

Пусковыми факторами являются повторяющееся химическое и механическое раздражение кожи (недержание мочи [27], средства гигиены с агрессивными компонентами, трение одежды) [11], сниженный уровень эстрогена, инфекция *Borrelia burgdorferi* [28], такие лекарственные препараты как карбамазепин [29], иматиниб [30] и ингибиторы контрольных точек [4], высокий индекс массы тела [31]. Было зафиксировано возникновение очагов СЛВ в рубцах после хирургических вмешательств (например, эпизиотомии), что описывается как феномен Кебнера [32].

Генетическая предрасположенность была установлена при анализе семейных и близнецовых случаев заболевания, так 12% женщин имеют положительный семейный анамнез СЛВ [33]. Описаны случаи возникновения СЛВ у монозиготных близнецов как в детском [34] так и взрослом возрасте [35; 36], причем во всех случаях возраст манифестации заболевания и степень поражения кожи между близнецами были схожи.

Не вызывает сомнения ассоциация СЛВ с другими аутоиммунными заболеваниями, в первую очередь с заболеваниями щитовидной железы [37], так установлено что у пациентов с СЛВ увеличен шанс наличия аутоиммунного тиреоидита в 2,88 раз, гипотиреоза в 2,34 раз и гипертиреоза в 2,05 раз [38]. Вероятно, такая ассоциация связана с тем, что в обоих случаях одним из патогенетических звеньев является активации Т-клеточного ответа [39]. Продемонстрирована ассоциация с такими аутоиммунными кожными заболеваниями как склеродермия, красный плоский лишай, алопеция, витилиго [27]. Также в литературе описаны единичные случаи сосуществования СЛВ с ревматоидным артритом, пернициозной анемией [37].

Два пика заболеваемости СЛВ у женщин в препубертате и постменопаузе предполагает связь заболевания с низким уровнем эстрогена. Так же у части девочек с препубертатным СЛВ часть симптомов может ослабнуть после менархе,

а заболевание принять латентную форму [40]. Вероятно, высокий уровень половых гормонов в репродуктивный период является защитным фактором, так известно, что эстроген может подавлять воспаление в псориатических бляшках, а также предотвращать атрофию, связанную с возрастным или фотостарением кожи [41]. Отсутствие значительной пользы топического эстрогена, прогестерона, тестостерона и дигидротестостерона при лечении СЛВ говорит о вторичной роли половых гормонов в этиологии и патогенезе СЛВ [42].

Выделяют четыре патогенетических звена при СЛВ (Рисунок 1): генетическое, иммунологическое, избыточный синтез коллагена и окислительный стресс [4].

Генетическое звено патогенеза. К генетическому звену относят полиморфизм белков системы человеческого лейкоцитарного антигена (HLA), которая является частью главного комплекса гистосовместимости человека. Продемонстрировано, что полиморфизм антигенов HLA II класса, располагающихся на поверхности профессиональных иммунных клеток и выполняющих функцию презентирования антигена Т-клеткам, могут быть ассоциированы с СЛВ. Так установлена положительная ассоциация у пациентов с СЛВ с генотипом DRB1*12 (11,2% против 2,5% в контрольной группе) и отрицательная ассоциация с генотипом DRB1*0301/04 (11,8% против 25,8% в контрольной группе) [43]. Полноэкзомное секвенирование у пациентов с семейным СЛВ продемонстрировало, что гены, кодирующие белки с иммуномодулирующей или опухолесупрессирующей активностью (CD177, CD200, ANKRD18A, LATS2), имеют неоднократные герминальные (врожденные) мутации [44]. Также зафиксированы эпигенетические модификации в таких онкогенах как CDKN2a, TP53, KRAS, DAPK1, RAR β , p16INKa, что связано с развитием плоскоклеточной карциномы на фоне СЛВ [45–47]. В целом на данный момент считается, что накопительный эффект вариаций экспрессии генов приводит к восприимчивости человека к СЛВ, однако для развития заболевания необходимы экзогенные факторы [48].

Иммунологическое звено. Иммунологическое звено включает аномальную активацию Т-хелперов 1 типа (Th1), снижение активности Т-регуляторных клеток (Treg), образование аутоантител к белку внеклеточного матрикса 1 (ЕСМ-1), белкам базальной мембраны – коллагену 17 типа (BP180) и десмоплакину (BP230). При СЛВ наблюдается инфильтрация Т-клеток в поверхностной дерме, состоящая в основном из CD8⁺ и Т-регуляторных клеток, и в меньшей степени CD4⁺ Т-клеток. Установлено, что Т-клетки представляют собой Th1, которые продуцируют IFN γ (интерферон γ), что привлекает и стимулирует различные иммунные и эпителиальные клетки. Также установлено повышенное содержание провоспалительных цитокинов (IL-1 α , IL-7, IL-15, IL-17) и TNF- α в ткани и снижение противовоспалительного интерлейкина (IL-10) [45; 49; 50]. Также при СЛВ наблюдается системная дисфункция Т-регуляторных клеток, которые играют ключевую роль в поддержании иммунной толерантности. Этот иммунный дисбаланс приводит к Т-клеточно опосредованной атаке на аутоантигены, путем экспрессии перфорина, Т-клеточного внутриклеточного антигена-1 и гранзима В [51].

Продемонстрировано что 74% пациентов с СЛВ имеют аутоантитела к белкам ЕСМ-1 [52], а также компонентам базальной мембраны BP180 и BP230 [53]. ЕСМ1 представляет собой гликопротеин, играющий ключевую роль в поддержании структурной организации и функциональной целостности кожного матрикса. Он обеспечивает взаимодействие между компонентами базальной мембраны и подлежащей соединительной ткани, формируя важные связи с коллагеном IV типа и перлеканом. Появление аутоантител к ЕСМ1 нарушает эти взаимодействия, что приводит к локальному повреждению базальной мембраны у пациентов с СЛВ [54]. Дополнительные экспериментальные данные показывают, что снижение экспрессии гена ЕСМ1 в фибробластах приводит к дезорганизации процессов регуляции и деградации внеклеточного матрикса, сопровождаясь морфологическими изменениями кожи, сходными с клинко-морфологическими проявлениями СЛВ [55].

Избыточный синтез коллагена является ключевым звеном патогенеза СЛВ. Усиление пролиферативной активности фибробластов сопровождается нарушением механизмов регуляции коллагенообразования, что приводит к прогрессирующему накоплению плотного склеротического матрикса и формированию характерных морфологических изменений дермы. Эти процессы приводят к стойкой перестройке соединительнотканного матрикса и, как следствие, к выраженным изменениям анатомической организации и структурной целостности вульвы. Склероз, развивающийся под базальной мембраной эпидермиса и распространяющийся вглубь дермы, по мере прогрессирования заболевания является единственным патогномичным морфологическим признаком СЛВ.

Существует ряд предполагаемых молекулярных механизмов, лежащих в основе нарушенного коллагенообразования при СЛВ. К ключевым факторам относят сверхэкспрессию микроРНК-155, дисрегуляцию цитокиновой оси TGF- β , изменение баланса между матриксными металлопротеиназами и их тканевыми ингибиторами, а также участие галектина-7. Повышенная экспрессия микроРНК-155 — некодирующей РНК, регулирующей транскрипционную активность множества генов, — приводит к подавлению опухолевых супрессоров FOXO3 и CDKN1B, что инициирует усиленную пролиферацию и функциональную активацию фибробластов [56]. Дополнительно микроРНК-155 способствует развитию аутоиммунного компонента заболевания за счёт снижения активности регуляторных Т-клеток, что усиливает воспалительный каскад и поддерживает патологическую перестройку соединительной ткани. Например, ранее продемонстрирована центральная роль микроРНК-155 в модуляции иммунных реакций при атопическом дерматите [57]. В ряде исследований продемонстрировано повышение экспрессии TGF- β , цитокина, известного своей ключевой ролью в индукции фиброза и стимуляции отложения компонентов внеклеточного матрикса. Несмотря на то, что TGF- β является центральным медиатором фибротических процессов при склеродермии, убедительных

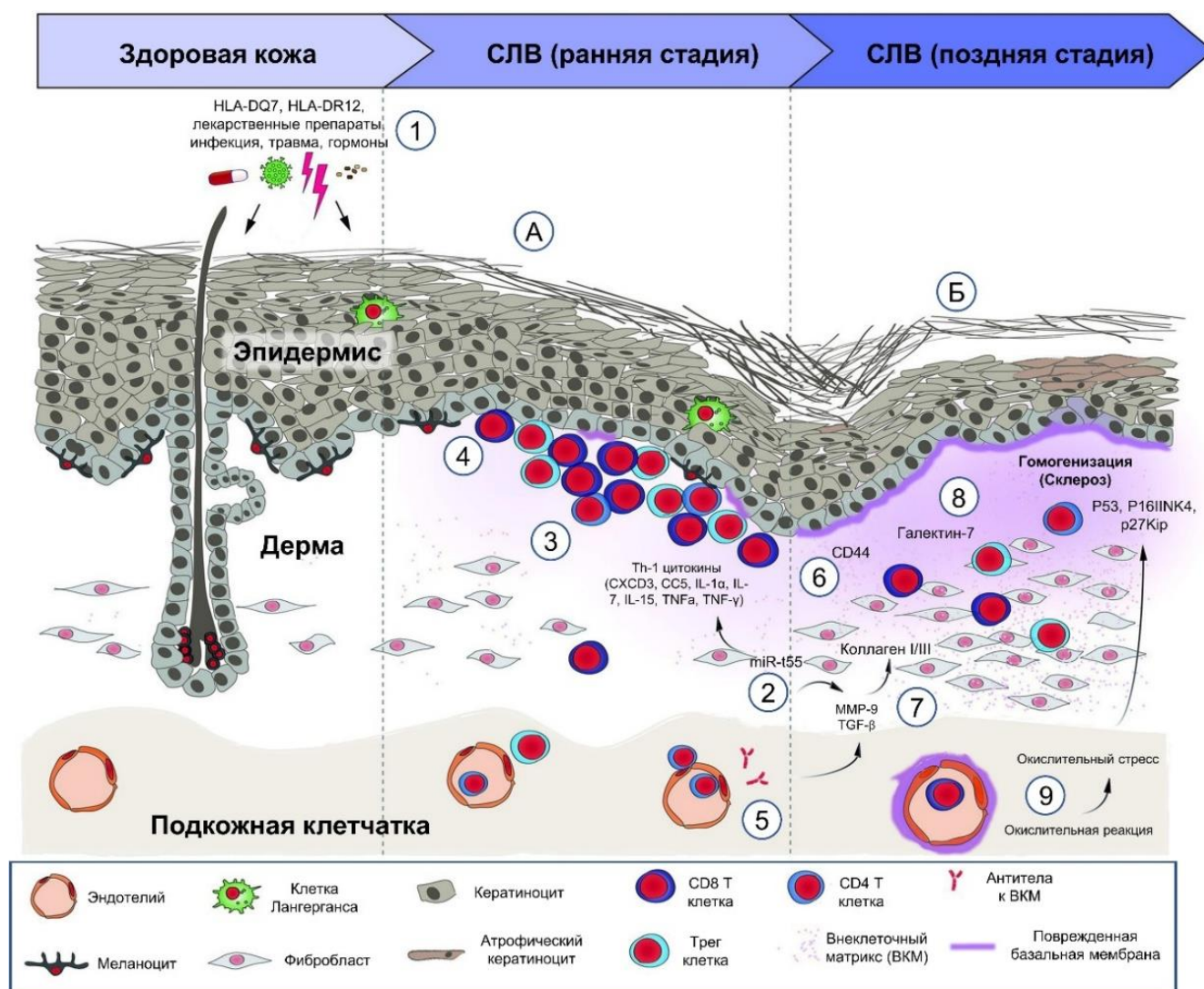
доказательств его прямого участия в патогенезе СЛВ на сегодняшний день не получено.

В развитие СЛВ также вовлечена система ремоделирования матрикса, что отражается в дисбалансе между деградацией и накоплением соединительнотканых структур, в результате нарушения соотношения матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов. Сверхэкспрессия ММР-2 и ММР-9 может объяснить повреждение базальной мембраны при СЛВ, так как данные протеиназы эффективно разрушают ламинин и коллаген IV типа [58]. При СЛВ отмечена увеличенная активность галектина-7, проапоптотического белка в эпидермисе, что вероятно является одной из главных причин гибели кератиноцитов и эпидермальной атрофии. Галектин-7 обладает паракринным действием на фибробласты, усиливая их синтетическую активность, но снижает жизнеспособность клеток [59]. Снижение количества фибробластов в области склероза при СЛВ неоднократно описывалось в литературе [17].

В исходе процессов аномального синтеза коллагена наблюдается избыточное накопление структурных коллагенов I и III типов [60], а также регуляторного коллагена V типа в дерме [61], которые образуют гетеротипические (состоящие из нескольких типов) коллагеновые волокна, объединённые в пучки разной толщины. Так же зафиксировано аномальное отложение и других компонентов внеклеточного матрикса: декорина и хондроитин сульфата [62], гиалуроновой кислоты, фибронектина [63] и тенасцина [64]. Данная многокомпонентная внеклеточная матрица морфологически представляет собой зону склероза при СЛВ.

Окислительный стресс. Окислительный стресс рассматривается как один из факторов патогенеза СЛВ и может способствовать поддержанию хронического воспаления [65]. Показано, что перекисное окисление липидов в кератиноцитах, а также окислительное повреждение ДНК и белков при СЛВ ассоциированы со снижением уровня антиоксидантных ферментов, включая супероксиддисмутазу, в зонах склероза и воспаления [66]. Окислительное повреждение ДНК в кератиноцитах при СЛВ снижает экспрессию ингибиторов циклинзависимой

киназы (p16^{INK4} и p27^{Kip1}) – опухолевых супрессоров, и, как следствие, высвобождает клеточный цикл, тем самым увеличивая риск развития злокачественного новообразования [67]. Окислительный стресс, хроническая воспалительная реакция способны вызывать сверхэкспрессию p53 дикого типа в базальных кератиноцитах при СЛВ. Кроме того, снижение количества сосудов и склероз сосудистой стенки в очагах поражения СЛВ приводит к плохой оксигенации и ишемическому стрессу, что, так же усиливает экспрессию p53 [68].



Примечание: А – ранняя стадия СЛВ, морфологически проявляется инфильтрацией Т-клеток на в области дермо-эпидермальной границы, очаговым утолщением базальной мембраны (фиолетовая линия): (1) факторы риска развития СЛВ; (2) сверхэкспрессия miR-155 стимулирует Th1 лимфоциты и приводит к склеротическим изменениям дермы; (3) Цитокины синтезируемые Th1-клетками, участвующие в патогенезе СЛВ; (4) Лихеноидный воспалительный инфильтрат из клеток TCD4+, TCD8+ и Tregs в верхней части дермы; (5) аномальная экспрессия CD44 в эпидермисе и лихеноидный инфильтрат; (6) аутоантитела против EMC1 способны активировать синтез MMP9, который впоследствии активирует TGF-β. Б – Поздняя, склеротическая стадия СЛВ характеризуется выраженной атрофией эпидермиса, утолщением базальной мембраны, дермальным склерозом со сниженным количеством фибробластов, уменьшением числа и эктазией сосудов, а также редукцией кожных придатков. На молекулярном уровне: (7) TGF-β и BMP2 стимулируют фибробласты к продукции коллагена I и III типов, усиливая формирование склеротического матрикса; (8) галектин-7 приводит к гибели кератиноцитов и фибробластов; (9) развитие плоскоклеточной карциномы при СЛВ во многом связано с нарушением контроля клеточной пролиферации, что проявляется снижением экспрессии генов-супрессоров опухолевого роста и усиленной экспрессией p53 в эпидермисе. Эти молекулярные изменения формируются на фоне выраженного окислительного стресса, возникающего вследствие хронического воспаления и склероза сосудистых стенок. Последовательность патогенетических событий и их взаимодействие остаются недостаточно изученными

Рисунок 1 — Схема патогенеза и основных морфологических изменений при СЛВ (адаптировано из Luca et al., 2023) [4]

1.2 Морфологическая характеристика склероатрофического лишена вульвы

Несмотря на то, что СЛВ является клинически диагностируемым заболеванием [42], врачи достаточно часто прибегают к проведению диагностической биопсии – около 60% всех случаев, а в 15–30% случаев – проводится повторная биопсия [9; 10]. Это связано с тем, что у пациентов не всегда имеется яркая клиническая картина заболевания, особенно на ранних этапах развития СЛВ, часть пациентов может иметь нетипические клинические проявления [69], также биопсия показана при неэффективности первой линии терапии. Это свидетельствует об ограниченных возможностях клинической диагностики, ряд авторов утверждает о необходимости проведения совместного консилиума между лечащим врачом-гинекологом и патологоанатомом [12]. Такой подход особенно важен при недостаточном количестве патогномичных критериев СЛВ при гистологическом исследовании.

Последние данные об «окне возможностей» в Европейском руководстве по лечению СЛВ («EuroGuiDerm») требуют безотлагательного подхода к диагностике заболевания [70], это определяет необходимость развития представлений о микроскопической характеристике СЛВ на наиболее ранних стадиях, поскольку своевременное лечение имеет решающее значение для полной ремиссии СЛВ, особенно склероза, рубцевания и атрофии кожи.

Морфологические изменения кожи при СЛВ. СЛВ является интерфейсным дерматитом, то есть патогенетические факторы, запускающие заболевание локализуются в области дермо-эпидермального соединения. Таким образом, поражение начинает развиваться с первичных неспецифических проявлений, затрагивающих базальную мембрану и базальные кератиноциты, с последующим вторичным поражением эпидермиса, сосочкового и верхнего ретикулярного слоя дермы. Классическая гистологическая картина, характерная для СЛВ, включает выраженную атрофию эпидермиса, вакуолярную дистрофию базального слоя кератиноцитов, склероз сосочкового и верхнего ретикулярного слоёв дермы с

уменьшением числа фибробластов и сосудов, а также лентообразный лимфоцитарный инфильтрат, расположенный под зоной склероза [71]. Однако существует значительная вариабельность гистологически изменений каждого слоя кожи (Таблица 1).

Таблица 1 — Диапазон морфологических изменений кожи при СЛВ [17; 72]

	Диапазон морфологических изменения при СЛВ
Эпидермис	Гиперкератоз или паракератоз; Атрофия или гиперплазия; Акантоз с выраженным гипергранулёзом может наблюдаться при наложении картины хронического простого лишая.; Утрата эпидермальных гребней; Гидропическая дистрофия базальных кератиноцитов; Потеря меланоцитов; Отслоение эпидермиса или образование булл.
Базальная мембрана	Диффузное или фокальное утолщение базальной мембраны выявляемое при ШИК-реакции; Фрагментация базальной мембраны с образованием ШИК-позитивных масс в подлежащей дерме.
Дерма	Фиброз, склероз или их сочетания в одном биоптате; Разная степень выраженности отека дермы; Воспалительный инфильтрат разной интенсивности, располагающийся под зоной фиброза, склероза или на границе дермо-эпидермального соединения, если изменения соединительной ткани отсутствуют; Деструкция эластических волокон; Наличие меланофагов.
Воспалительный инфильтрат	Внутриэпидермальный лимфоцитарный экзоцитоз, сочетающийся со спонгиозом и вакуолизацией кератиноцитов; Разнообразные типы дермальных инфильтратов: от лишеноидных с внутриэпидермальным распространением до интерстициальных и фокальных периваскулярных скоплений; Воспалительный инфильтрат располагается под зоной фиброза или склероза, по мере прогрессирования процесса внутриэпидермальный компонент, как правило, исчезает.
Сосуды	Эктатические капилляры в сосочковом слое дермы, часто расположенные непосредственно под базальной мембраной; В зоне склероза отмечается уменьшение количества сосудов; оставшиеся единичные сосуды, как правило, резко расширены; Гиалинизированные, ригидные и утолщённые сосудистые стенки; Кровоизлияния, возникающие вследствие разрыва хрупких сосудистых стенок; Периваскулярные лимфогистиоцитарные инфильтраты; Васкулит различного типа: лимфоцитарный или лимфогистиоцитарный; крайне редко — лейкоцитокластический.

Продолжение Таблицы 1

Придатки кожи	Расширение выводных отверстий эккринных желёз и устьев волосяных фолликулов, возникающее вследствие их закупорки роговыми массами; Акантоз эпителия устьев фолликула и перешейка сальных желёз; Люминальный гиперкератоз и выраженный гипергранулёз; Утолщение перифолликулярной базальной мембраны и склероз сосудов, питающих фолликул; Гипер- или паракератоз в области волосяных фолликулов; Перифолликулярный склероз.
--------------------------	--

Эпидермис чаще атрофичен, однако нередко встречается акантоз и гипертрофия [73]. При атрофическом варианте эпидермальные гребни отсутствуют или сильно сглажены. Роговой слой может быть компактным либо демонстрировать признаки паракератоза или гиперкератоза. В случаях эпидермальной гипертрофии архитектура гребней становится непостоянной: они могут отсутствовать, быть укороченными, неравномерно удлинёнными или приобретать псориазиформный характер. Для СЛВ также характерен спонгиоз, который связывают с повреждением гемидесмосом и якорных филаментов [74]. Может наблюдаться эпидермальный экзоцитоз лимфоцитов [75].

Повреждение базального слоя кератиноцитов сопровождается развитием вакуолизации и формированием апоптотических телец; при этом клетки базального ряда нередко приобретают морфологию, характерную для супрабазальных кератиноцитов [75]. Эти так называемые «скваматизированные» клетки ориентированы преимущественно горизонтально, увеличены в размерах, содержат обильную эозинофильную цитоплазму и везикулярные ядра. Скваматизация, вероятно, отражает реакцию эпидермиса на формирование дермального рубца, и при её наличии патологоанатому следует искать дополнительные признаки, характерные для СЛВ. Состояние базальной мембраны также имеет диагностическое значение: в ряде случаев при проведении ШИК-реакции выявляется её утолщение [53].

Изменения соединительной ткани являются наиболее характерным морфологическим признаком СЛВ. Предполагается, что даже минимальное

поражение сосочкового слоя дермы обладает высокой диагностической значимостью и может рассматриваться как патогномоничный признак заболевания [16; 49]. В литературе для описания зоны поражения использовались различные термины — фиброз, склероз, гиалиноз, гомогенизация, однако нередко эти понятия применялись как взаимозаменяемые, что приводило к терминологической путанице [12]. Позднее ISSVD предложила чёткие определения и гистологические критерии для разграничения фиброза и склероза.

Фиброз – образование аномальной волокнистой соединительной ткани, обычно характеризующаяся увеличением количества коллагена и изменением его структуры. Фиброз сопровождается снижением количества эластических волокон на ранних стадиях и наличием тонких и нежными эластичными волокнами на поздних стадиях.

Склероз – это образование аномальной волокнистой ткани, характеризующийся стертыми границами между пучками коллагена, в результате чего пучки становятся смешанными («гомогенизированными»), а также часто, но не всегда, заметным снижением количества фибробластов [76]. В отличие от фиброза, при склерозе отсутствуют эластические волокна (Таблица 2). Согласно Т. Day, термины гиалиноз и гомогенизация по сути соответствуют склерозу и могут рассматриваться как его синонимы [12].

Таблица 2 — Морфологические характеристики фиброза и склероза кожи, по данным ISSVD [12; 76]

	Фиброз	Склероз
Коллагеновые волокна	Утолщенные эозинофильные волокна; Индивидуальные волокна идентифицируются, отграничены свободным пространством.	Тонкие волокна сплетены вместе; Индивидуальные волокна не идентифицируются; Область склероза имеет вид «матового стекла».
Эластические волокна	Количество снижено	Обычно отсутствуют

Продолжение Таблицы 2

Фибробласты	Количество увеличено	Количество снижено
Отек дермы	Увеличение промежутков между коллагеновыми волокнами	Области светлого цвета внутри зоны склероза
Синонимы	Отсутствуют	Гиалинизация Гомогенизация
Дифференциальный диагноз	Склероатрофический лихен; Простой хронический лихен; Mycosis fungoides; Рубец.	Склероатрофический лихен; Вестибуловагинальный склероз; Локализованная и системная склеродермия;

Зона поражения дермы при СЛВ всегда располагается под базальной мембраной, может быть лентовидной или иметь очаговую форму. В одном и том же биоптате, а также в разных образцах одного пациента, нередко одновременно выявляются признаки склероза и фиброза. Чётко установленного минимального объёма склеротической ткани, необходимого для подтверждения диагноза СЛВ, не существует. В дерме часто наблюдаются кровоизлияния, за счет хрупкости телеангиэктатических сосудов. Диагностика основывается на комплексной оценке препарата, включающей анализ эпидермальных изменений, состояния базальной мембраны, характера воспалительного инфильтрата и особенностей перестройки соединительной ткани [12].

Лимфоцитарный инфильтрат при СЛВ может варьировать по выраженности — от плотного до умеренного или минимального. Помимо характерного лентообразного расположения, нередко выявляются поверхностные и/или глубокие периваскулярные, а также периневральные скопления лимфоцитов. В различной степени могут присутствовать и другие клетки воспалительного ряда: гистиоциты, плазматические клетки, нейтрофилы и эозинофилы [72].

На сегодняшний день не существует иммуногистохимических маркеров, которые могли бы надёжно использоваться для диагностики СЛВ. Отмечено, что маркеры пролиферации Ki-67 и MCM3 могут демонстрировать повышенную

экспрессию по сравнению с нормальной кожей [77]. Экспрессия p53 отличается значительной вариабельностью: от слабого, прерывистого окрашивания базальных ядер до почти сплошного умеренного или интенсивного окрашивания клеток базального и супрабазального слоёв [68]. Интеграция онкогенных типов вируса папилломы человека приводит к фокальному положительному окрашиванию p16, независимо от наличия дерматоза [78].

1.2.1 Современные ограничения морфологической диагностики склероатрофического лишена вульвы

Как и для многих рутинных клинических процедур, для биопсии вульвы существует ограниченный объём исследований, посвящённых технике выполнения, срокам, месту проведения, диагностической точности метода. Несмотря на консенсус, что точка биопсии должна располагаться в участке наибольшего поражения вульвы, визуальная и вульвоскопическая/дерматоскопическая характеристика таких участков поражения четко не определена.

Так же ряд ключевых вопросов, касающихся гистологических признаков СЛВ, остаётся нерешённым. Во-первых, в настоящее время нет четко определенных минимальных гистологических критериев для диагностики СЛВ, а эволюция гистологических изменений в зависимости от времени течения заболевания достоверно не описана. С учетом вариабельности гистологических проявлений, возможно неоптимальной локализации биопсии и требований к раннему началу лечения делает возможности гистологического исследования сильно ограниченными. Так поражения СЛВ гистологически трудно диагностировать до тех пор, пока отличительный признак заболевания, склероз папиллярной дермы, не станет видимым в гистологических срезах. В таких случаях

ряд авторов рекомендует проводить консилиум с обсуждением между клиницистом и патологоанатомом для уточнения диагноза [79; 80].

Во-вторых, неясно, возможна ли спонтанная ремиссия заболевания или ремиссия под действием топических стероидов, при которой гистопатологические изменения полностью исчезают и не позволяют выявить признаки перенесённой патологии. Нет и ответа на важный клинический вопрос о том, на какой срок следует прекратить применение топических стероидов перед выполнением биопсии для повышения вероятности получения диагностически значимого материала.

Наконец, перспективная цель — разработка панели иммуногистохимических маркеров, способной достоверно дифференцировать СЛВ, красный плоский лишай и дифференцированный вариант вульварной интраэпителиальной неоплазии (ВИН), не связанный с ВПЧ, — остаётся недостигнутой [80].

1.3 Морфологические классификации склероатрофического лишая вульвы

В настоящее время не существует единой, общепринятой морфологической классификации СЛВ, которая была бы одобрена экспертами и применима в рутинной практике. Основная причина заключается в отсутствии чёткой корреляции между клинической картиной и морфологическими изменениями. Повседневная клиническая практика показывает, что внешний вид кожи вульвы и промежности не всегда отражает наличие и выраженность симптомов: примерно у 15 % пациентов заболевание протекает бессимптомно, тогда как у другой части больных выраженные клинические проявления могут сочетаться с отсутствием патогномичных морфологических признаков [81]. Кроме того, мировые эксперты не смогли прийти к единому мнению относительно каких-либо клинических визуальных критериев, архитектурных изменений, которые позволяли бы надёжно оценивать тяжесть СЛВ [82].

Несмотря на предпринимаемые усилия, предложенные на сегодняшний день три системы классификации СЛВ, не получили широкого распространения (Таблица 3). Это связано прежде всего с отсутствием чёткого понимания взаимосвязи между тяжестью клинических проявлений, особенностями течения заболевания, скоростью формирования архитектурных нарушений и морфологической картиной СЛВ. В результате практическая ценность любой из существующих классификаций остаётся ограниченной.

Первая классификация, предложенная J. Hewitt [16], полагалась только на морфологические особенности поражения дермы: толщины зоны склероза, а также наличия или отсутствия воспалительного клеточного инфильтрата. И являлась попыткой упорядочить разнородную (гетерогенную) морфологическую картину, которая наблюдается при исследовании биоптатов СЛВ. Однако, классификация J. Hewitt использовалась лишь в нескольких научных публикациях [58; 62].

Вторая классификация делит СЛВ на ранний и поздний вариант и имеет несколько интерпретаций. Выделение и описание раннего СЛВ тесно связано с попыткой интерпретировать биопсии, которые не содержат патогномоничную зону склероза, что значительно затрудняет дифференциальную диагностику СЛВ. Впервые ранний СЛВ как самостоятельный вариант заболевания упоминается в работе M. Fung [83], автор выдвигает гипотезу и рассматривает воспалительные изменения на периферии классического поражения как изменения характерные для раннего варианта заболевания. Такое же предположение используется в работе J. Carlson [84], однако представление о том, что СЛВ демонстрирует латеральное распространение поражения по коже, то есть в центре поражения оказывается картина позднего СЛВ, а на периферии картина раннего СЛВ до сих пор не подтверждено [85].

Другой подход продемонстрировал S. Regauer [17], подробно описав гистологические изменения в коже у женщин с СЛВ, которые имели клиническую картину раннего заболевания (Таблица 3). Данная классификация предполагала деление на ранний и поздний вариант в зависимости от длительности симптомов и клинической картины заболевания. Однако в дальнейшем было

продемонстрировано что картина раннего поражения может наблюдаться и у пациентов страдающих СЛВ десятилетиями [86], а анализ гистологических особенностей у детей (от 2 до 18 лет) продемонстрировал наличие классической картины позднего СЛВ даже у девочек в очень молодом возрасте [75]. Так же продолжительность заболевания трудно определить в клинических условиях из-за задержки в диагностике, а также вариативности выраженности, характера и начала симптомов. Можно сделать вывод, что надежная связь между особенностями кожи и продолжительностью или активностью заболевания отсутствует [85], ISSVD в настоящее время не рекомендует использовать термин ранний СЛВ[80].

Актуальная на сегодняшний день классификация была разработана Комитетом по сложным патологоанатомическим диагнозам ISSVD в 2023 году. Она направлена на решение клинко-патологической проблемы, возникающей при подозрении на СЛВ в ситуациях, когда биопсия оказывается недостаточно информативной из-за отсутствия дермального склероза. В этой связи был предложен термин «несклеротический СЛВ», который не является самостоятельным диагнозом, а описывает клинически очевидный СЛВ при отсутствии характерного склероза в гистологическом препарате. В рамках этой концепции выделено четыре варианта несклеротического СЛВ: лихеноидный дерматит, гипертрофический лихеноидный дерматит, дермальный фиброз с нормальным эпидермисом и дермальный фиброз с гипертрофическим эпидермисом (Таблица 4) [12; 80].

Таблица 3 — Морфологические классификации СЛВ [12; 16; 17]

J. Hewitt, 1986 [16]	Regauer, 2005 [17]	T. Day, 2023 [12]
<p>Грейд II. Узкая субэпидермальная зона склероза.</p> <p>1. Поверхностный склероз с образованием субэпидермальной полосы.</p> <p>2. Поверхностный склероз, ограниченная участком, прилегающим к эпителию:</p> <p>а. Гиалиновое утолщение базальной мембраны</p> <p>б. Внутрипапиллярная гиалинизация</p>	<p>Ранний СЛВ</p> <p>Утолщение базальной мембраны, легкий неравномерный акантоз, склероз подслизистой оболочки и эктатические субэпителиальные кровеносные сосуды, при этом в некоторых случаях наблюдается «нерегулярный, иногда псориазоформный акантоз с переменными гиперкератоз межфолликулярного эпидермиса»</p>	<p>Несклеротический СЛВ</p> <p>1. Фиброз дермы с акантозом эпидермиса</p> <p>2. Фиброз дермы без акантоза эпидермиса</p> <p>3. Гипертрофический лихеноидный дерматит</p> <p>4. Лихеноидный дерматит</p>
<p>Грейд I. Классическая картина: широкая субэпидермальная полоса гомогенизированного коллагена, которая может быть отечной или плотной, с поверхностным дермальным эластолизом.</p> <p>1. С подлежащим воспалительным инфильтратом.</p> <p>2. Без воспалительного инфильтрата.</p>	<p>Поздний СЛВ</p> <p>Тяжелый диффузный склероз. Воспалительная инфильтрация отсутствует. Разрушенные волокна эластина. Разрыв сосудов, кровоизлияния. Кистозная дегенерация.</p>	<p>Классический СЛВ</p> <p>Характерная картина с зоной склероза в сосочковой и верхней ретикулярной дерме.</p>

Таблица 4 — Варианты «Несклеротического» СЛВ

	Лихеноидный дерматит	Гипертрофический лихеноидный дерматит	Фиброз дермы без акантоза эпидермиса	Фиброз дермы с акантозом эпидермиса
Эпидермис	Атрофический или умеренно акантотический эпителий, дистрофия базального слоя кератиноцитов, лимфоцитоз.	Акантоз; Гиперкератоз и/или паракератоз; Дистрофия базальных кератиноцитов; Спонгиоз; Супрабазальные апоптотические кератиноциты; Лихеноидная воспалительная реакция может ограничиваться кончиками или вершинами эпидермальных гребней.	Атрофичный или Нормальный эпидермис.	Акантоз; Гиперкератоз; Лихеноидная воспалительная реакция может ограничиваться кончиками или вершинами эпидермальных гребней.
Дерма	Нормальные коллагеновые волокна; Воспалительный инфильтрат варьирует от скудного до плотного.	Нормальные коллагеновые волокна или минимальные фибротические изменения; Воспалительный инфильтрат умеренный или плотный, что затрудняет оценку базального слоя.	Фиброз дермы с горизонтальными пучками коллагена; Воспалительный инфильтрат не выражен или отсутствует.	Фиброз дермы с горизонтальными пучками коллагена; Одиночные лимфоциты между коллагеновым и волокнами;
Дифференциальная диагностика	Красный плоский лишай; Меланома 1-й степени; Применение имиквимода; Реакция «трансплантат против хозяина».	Гипертрофический красный плоский лишай; Псориаз; Кандидоз.	Рубец: акушерский, хирургический или травматический	Хронический простой лишай.

Продолжение Таблицы 4

Распространение	Наиболее распространенный вариант	Редко	Редко	Часто встречается у пожилых людей и/или на коже, прилегающей к новообразованию
Комментарий	В большинстве случаев клинически проявляется СЛВ		Иногда описывается как «неактивная» форма СЛВ	Горизонтальные коллагеновые волокна с зажатыми между ними лимфоцитами, указывают на СЛВ.

1.4 Многофотонная микроскопия как метод изучения соединительной ткани при заболеваниях кожи

Многофотонная микроскопия (МФМ) в последние годы привлекла значительное внимание как высокоинформативный оптический метод, не требующий окрашивания. В кратком сообщении Nature Methods (2016) она была отмечена как одно из ключевых достижений современной патоморфологии [87]. Такое признание обусловлено сочетанием высокой пространственной разрешающей способности, проникающей способностью до 200 мкм в ткани и наличием нескольких контрастных модальностей. Эти особенности позволяют исследовать не только традиционные гистологические срезы, но и нативные, нефиксированные образцы *ex vivo*, а также ткани человека *in vivo* на глубину до нескольких сотен микрон [88]. Возможность неинвазивной модификации методики делает МФМ особенно перспективной для клинических исследований кожи.

Одним из наиболее ценных направлений применения МФМ является исследование структуры внеклеточного матрикса, прежде всего коллагеновых и эластических волокон. В основе визуализации лежат две ключевые модальности: генерация второй гармоники (ГВГ) и двухфотонно возбуждаемая аутофлуоресценция (ДВАФ). Их сочетание обеспечивает эндогенный контраст, что выгодно отличает МФМ от стандартных морфологических методов, основанных на окрашивании или иммуногистохимии.

ГВГ представляет собой когерентный нелинейный процесс второго порядка, при котором два фотона низкой энергии преобразуются в один фотон с удвоенной частотой (половиной длины волны возбуждающего лазера). Эта модальность позволяет селективно визуализировать коллагеновые волокна, преимущественно I и II типов, как гомотипические, так и гетеротипические. Коллаген III типа, как и не фибриллярные коллагены, не генерирует достаточно интенсивных сигналов ГВГ для визуализации [18].

ГВГ обладает рядом преимуществ перед традиционными методами окрашивания. Сигнал ГВГ напрямую связан с фибриллярной организацией коллагена, что делает его чувствительным к изменениям структуры, плотности упаковки и ориентации волокон. В отличие от экзогенных красителей, ГВГ отражает реальную архитектуру ткани, поскольку контраст создаётся исключительно эндогенными молекулами. Благодаря этому ГВГ-микроскопия стала «золотым стандартом» для исследования организации фибрилл коллагена I типа и их количественной оценки [89].

Молекула коллагена представляет собой тройную спираль из α -цепей, связанных водородными связями. Эти молекулы самоорганизуются в фибриллы диаметром 20–250 нм, которые далее формируют волокна диаметром от 500 нм до нескольких микрон [90; 91]. Контраст ГВГ обусловлен когерентным усилением сигнала от пептидных связей вдоль α -спиралей. Денатурация коллагена приводит к исчезновению ГВГ-сигнала [92]. Хотя латеральное разрешение МФМ не позволяет визуализировать отдельные фибриллы, коллагеновые волокна дермы уверенно идентифицируются и являются основным объектом анализа [93].

Генетические и структурные изменения, влияющие на шаг спирали или межцепочечное сшивание, отражаются на характеристиках ГВГ-сигнала, что делает метод чувствительным к патологиям соединительной ткани.

ДВАФ обеспечивает визуализацию эластических волокон и других компонентов внеклеточного матрикса. В отличие от ГВГ, ДВАФ не является строго специфичной для эластина, поскольку многие структуры кожи обладают аутофлуоресценцией. Наибольшую сложность представляет перекрытие спектров коллагена и эластина [98]. Однако использование спектрального разделения и селективной регистрации флуоресценции позволяет получать изображения с высоким контрастом эластических волокон на фоне других компонентов соединительной ткани [99]. Совместное применение ГВГ и ДВАФ делает МФМ особенно ценной для изучения заболеваний, сопровождающихся атрофией, ремоделированием или фиброзом дермы [94].

МФМ широко применяется для исследования изменений внеклеточного матрикса при злокачественных новообразованиях кожи. Метод позволяет дифференцировать строму базальноклеточного рака от нормальной дермы и рассматривается как потенциальная альтернатива хирургии Мооса для более точного определения границ опухоли [95]. Исследования показали, что коллагеновые волокна более выровнены вокруг очагов базальноклеточного рака (БКР) по сравнению с нормальной кожей и доброкачественными поражениями. При индолентных подтипах БКР (поверхностных и узловых) волокна ориентированы более параллельно, чем при агрессивных формах, таких как инфильтративный БКР. Таким образом, ГВГ может быть полезна не только для диагностики, но и для прогнозирования течения рака [96]. Кроме того, продемонстрировано что увеличение количества и однородности коллагеновых волокон, ассоциированных с плоскоклеточным раком вульвы, коррелирует с наличием метастазов в лимфатических узлах, что подчёркивает прогностическую значимость этих параметров ГВГ сигнала [97].

Помимо онкологии, МФМ применялась для изучения фотостарения кожи [98], экстрамаммарной болезни Педжета [99] склеродермии [100], лимфедемы

[101], келоидных рубцов [102], а также предпринимались попытки изучения СЛВ [103; 104] и дифференциальной диагностики СЛВ и локализованной склеродермии с использованием нейросетевой модели [105]. В данных работах исследователи продемонстрировали лишь возможности метода МФМ, были сосредоточены на количественном анализе и не показали новых значимых морфологических характеристик заболеваний.

Так, количественная оценка организации коллагеновых волокон с использованием ГВГ показала увеличенное содержание, меньшую однородность и выраженную дезорганизацию волокон в уретре и крайней плоти у мужчин при склероатрофическом лихене по сравнению с интактными тканями. Эти результаты позволяют предположить, что изменения физических свойств тканей при склероатрофическом лихене могут быть обусловлены не только увеличением количества коллагена, но и нарушением его структуры [104]. В рамках дифференциальной диагностики склероатрофического лихена и локализованной склеродермии было показано, что при склеродермии наблюдается большее количество коллагеновых волокон, тогда как для СЛВ характерно значительное снижение содержания эластических волокон [105]. Эти данные хорошо согласуются с ранее известными результатами гистологических исследований и подтверждают, что МФМ способна воспроизводить ключевые морфологические признаки заболеваний соединительной ткани. Однако более детальных исследований СЛВ с использованием МФМ на данный момент не проводилось.

1.5 Оптические методы неинвазивной диагностики склероатрофического лихена вульвы

В настоящее время среди множества методов оптической неинвазивной диагностики можно выделить: (1) дерматоскопию как общепринятый клинический метод исследования заболеваний кожи, (2) ОКТ и отражательную конфокальную

микроскопию (ОКМ) как два новых метода которые получили сертификацию в ряде стран и уже используются в клинической практике и (3) МФТ как мощный, но на данном этапе лишь научный метод изучения кожи (Таблица 5). В настоящее время ни один из этих методов не является устоявшимся для изучения кожи вульвы.

Дерматоскопия — это метод визуализации, использующий иммерсионную среду или падающий поляризованный свет для преодоления отражения рогового слоя кожи, обеспечивает увеличение от $\times 10$ до $\times 100$ и глубину исследования до 100 мкм [106], что позволяет идентифицировать некоторые особенности эпидермиса и дермы, которые не видны невооруженным глазом [107; 108]. Дерматоскопия используется как дерматологами, так и широким кругом врачей других специальностей [109] и является неотъемлемой частью оценки потенциально злокачественных кожных поражений, где показывает высокую чувствительность и специфичность в диагностике меланомы, базальноклеточной карциномы, кератиноцитарных новообразований [109]. Это связано с тем, что некоторые дерматоскопические структуры кожных новообразований имеют высокую степень соответствия с патогномоничными гистопатологическими признаками [110; 111], что позволяет значительно повысить точность по сравнению с осмотром невооруженным глазом [112].

Клиническое применение дерматоскопии распространяется и на воспалительные заболевания кожи, однако на данном этапе 95% исследования ограничены описательными отчетами о случаях или серии случаев, что делает исследования низкодоказательными [113].

В целом наиболее постоянным дерматоскопическим признаком классического СЛВ является наличие бесструктурных участков белого, желтоватого или молочно-розового цвета на коже, которая так же имеет белесый оттенок (Рисунок 2) [40; 114–117]. В ряде случаев наблюдаются белые треугольной или ланцетной формы структуры с контрастными границами в виде «крошек льда» [117], а также серо-голубые точки, равномерно распределенные в ткани [115; 116]. Дерматоскопическая морфология сосудов при СЛВ является разнообразной,

сосуды нерегулярно распределены по площади поражения, присутствуют линейные телеангиэктатические сосуды разного размера, сосуды шпильки, сосуды в виде точек. Большинство исследований наблюдают снижение количества сосудов в области поражения [40; 114–117], однако в одном исследовании продемонстрировано увеличенное количество сосудов [19]. Стоит отметить, что дерматоскопия не позволяет оценить истинное количество сосудов в дерме, а анализирует лишь видимые сосуды через патологически измененный эпидермис, который при атрофии становится более прозрачным. В ряде случаев отмечаются пятна, от красных до пурпурных, которые являются кровоизлияниями [116]. Дерматоскопическая картина раннего СЛВ не описана.

Важнейшим этапом в становлении нового оптического диагностического метода является интерпретация визуализируемых проявлений заболевания и поиск соответствующих им гистологических проявлений. Однако корреляция дермоскопических структур с гистологией при СЛВ описана плохо, ни одно из исследований не включает параллельного гистологического исследования из области дерматоскопии. Предположительно, побеление кожи связано со снижением количества меланоцитов [118; 119] и ортокератозом [120], белые или желтоватые бесструктурные области соответствуют зонам склероза [114; 120]. Серо-голубые точки являются следствием воспалительного процесса и представляют собой скопление меланофагов в папиллярном и ретикулярном слое дермы [120; 121], «крошки льда» соответствуют гиперкератозу придаточных структур [117]. Снижение количества кровеносных сосудов, кровоизлияния и присутствие телеангиэктатических сосудов наблюдалось ранее в гистологических работах [17, 83-85].

Существуют единичные попытки применения дерматоскопии для дифференциальной диагностики СЛВ. Продемонстрирован некоторый потенциал для дифференциации СЛВ с красным плоским лихеном [116], однако ВИН высокой степени демонстрирует похожие характеристики с СЛВ и имеет лишь один отличительный признак — бородавчатые структуры [19].

Несмотря на широкое распространение дерматоскопии, до сих пор как в зарубежной, так и в российской гинекологической практике метод крайне редко используется, а устоявшийся и структурированный подход к проведению исследования и оформлению заключений отсутствует [19].

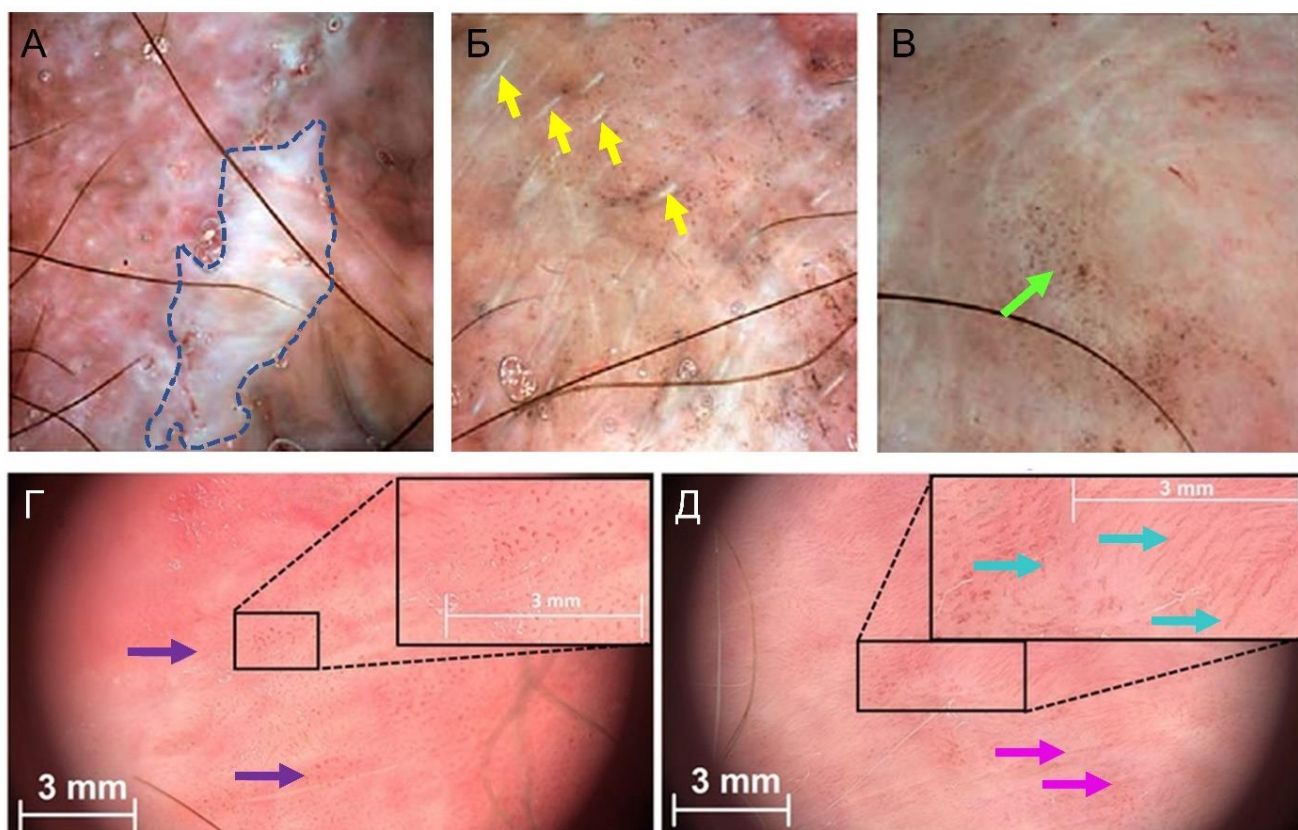


Рисунок 2 — Дерматоскопическое исследование кожи вульвы при СЛВ при увеличении $\times 10$: А – типичные для СЛВ бесструктурные белые участки (пунктирная линия), Б – структуры в виде «крошек льда» (желтые стрелки) расположены на беловатом фоне, В – серо-голубые точки (зеленая стрелка) на беловатом фоне, сосуды отсутствуют, Г – сосуды в виде точек (фиолетовые стрелки), Д – линейные сосуды (розовые стрелки) и сосуды в виде шпилек (бирюзовые стрелки), (адаптировано из Borghi A et al. 2015 и Huisman B. et al., 2023) [19; 115]

Отражательная конфокальная микроскопия (ОКМ) представляет собой современный, клинически одобренный метод визуализации кожи, позволяющий получать изображения с высоким пространственным разрешением (порядка 1 мкм).

Благодаря возможности визуализировать отдельные клетки, ОКМ была предложена как инструмент для диагностики и мониторинга терапии СЛВ у детей [122]. Этот метод особенно ценен для оценки выраженности воспалительного инфильтрата при СЛВ [122; 123].

Главным ограничением ОКМ остаётся малая глубина проникновения — около 200–250 мкм. Такая глубина достаточна для визуализации субэпидермальной дермы лишь при выраженной атрофии эпидермиса или в отдельных случаях нормы, учитывая, что толщина эпидермиса в области вульвы обычно составляет 150–200 мкм. Важно учитывать, что эпидермальные изменения при СЛВ весьма вариабельны и далеко не всегда сопровождаются атрофией. Напротив, нередко наблюдаются гиперкератоз и гипергранулёз, которые дополнительно ограничивают проникновение зондирующего излучения и затрудняют оценку дермальных структур. Так же громоздкий контактный датчик не позволяет исследовать труднодоступные области, в том числе вульвы [124].

Многофотонная томография (МФТ) основана на тех же физических принципах, что и рассматриваемая ранее МФМ. МФТ использует эндогенные флуорофоры для визуализации структур *in vivo*, в режиме ДВАФ. Это могут быть коферменты, кератин, меланин, порфирины и эластин. В режиме ГВГ возможна визуализация коллагеновых волокон. МФТ обладает субмикронным разрешением, однако серьёзным лимитирующим фактором в изучении заболеваний кожи является глубина визуализации, которая ограничена 200 мкм [125].

В отличие от ОКМ и МФТ, *оптическая когерентная томография* (ОКТ) обеспечивает существенно большую глубину исследования — до 800 мкм, что позволяет детально визуализировать дермальные структуры (Таблица 5). ОКТ — это интерферометрический метод: изображения создаются путем сканирования пучка инфракрасного света с низкой когерентностью по образцу и интерференции собранного обратно рассеянного света с опорным лучом, согласованным по длине пути. Основными преимуществами метода ОКТ является высокая адаптивность и компактные зонды, широкие возможности численной обработки регистрируемого сигнала [126]. Так интенсивность ОКТ можно использовать для оценки

коэффициента затухания сигнала, что дает представление об оптических свойствах изучаемых морфологических структур [127].

Были проведены пилотные исследования использования ОКТ для диагностики СЛВ, так структурные ОКТ изображения продемонстрировали тонкий эпидермис с роговым слоем на поверхности, и подлежащую дерму. При этом ядерные и клеточные детали методом ОКТ не визуализируются. Особенно хорошо определяется дезорганизация внеклеточного матрикса, соответствующая дермальному склерозу. Однако в ряде случаев наблюдалось снижение качества изображения под участками выраженного гиперкератоза или в зоне интенсивно отражающего склероза, что ограничивает глубину и чёткость визуализации [19; 20]. Методика обеспечивает возможность визуализации и количественного анализа кровеносных и лимфатических сосудов. Уменьшение их числа служит значимым индикатором дермального поражения при СЛВ и связано с выраженностью патологического процесса [128]. Исходя из этого, ОКТ может рассматриваться как более перспективный подход для изучения кожи при СЛВ и других дерматологических заболеваниях, сопровождающихся нарушением структуры дермы.

На рисунке 3 представлено сравнение трех методов визуализации на примере рецидивирующего меланоцитарного невуса. Стоит обратить внимание, что ОКМ и МФТ имеют клеточное разрешение, но только МФТ позволяет надежно визуализировать отдельные коллагеновые волокна (Рисунок 3, белые стрелки). ОКТ позволяет оценить структуру кожи на тканевом уровне, визуализируя эпидермис и дерму как отдельные слои, а также кровеносные и лимфатические сосуды.

Таблица 5 — Сравнение методов неинвазивной диагностики СЛВ [129]

Ключевые параметры	Дерматоскопия	ОКМ (на примере VivaScope)	МФТ (на примере MPT flex)	ОКТ (на примере ОКТ 1300)
Физический контраст	Преломление, отражение, поглощение.	На основе отражения (коэффициента преломления)	Молекулярный контраст (многофотонное возбуждение ДВАФ и ГВГ)	Рассеяние
Разрешение (латеральное)	~25 мкм	~ 1 мкм	< 1 мкм	10 мкм
Глубина визуализации структур в коже	60–100 мкм	до 200 мкм	100–200 мкм	1–1,2 мм
Поле зрения (один кадр)	От 20×20 до 0,75×0,75 мм ²	0,5×0,5 мм ²	0,25×0,25 мм ²	3,4×3,4 мм ²
Время получения изображения	Моментально	10 секунд – 1 кадр; 1 минута - панорама	10–20 минут – 1 кадр	26 секунд – 3D объем ткани
Модальности (режимы)	Контактная неполяризационная, контактная и бесконтактная поляризационная.	Отсутствуют.	ГВГ, ДВАФ и др.	Кросс-поляризация, коэффициент затухания сигнала, ангиография, лимфангиография, эластография.
Ключевые особенности	Большое поле зрения, компактные устройства, возможно использовать «у постели больного». Дешевое оборудование.	Субклеточное разрешение. Дорогостоящее оборудование.	Субмикронное разрешение, молекулярный контраст. Дорогостоящее оборудование.	Глубокое проникновение сигнала, визуализация ткани в поперечном сечении, модальности, адаптация зонда к любой анатомической области. Оптимальная цена оборудования.

Продолжение Таблицы 5

Ограничения	Визуализация только крупных субэпидермальных структур.	Малое поле зрения и глубина визуализации, нет режима визуализации поперечного сечения ткани, громоздкий зонд.	Малое поле зрения и глубина визуализации, длительное сканирование, нет режима визуализации поперечного сечения ткани, громоздкий зонд.	Недостаточное разрешение для визуализации отдельных клеток.
Степень корреляции с гистологией	Низкая	Очень высокая	Высокая	Умеренная
Клиническое значение для визуализации кожи	Устоявшийся метод для диагностики невусов и меланомы.	Приборы VivaScope 1500/3000 одобрены для клинического применения. Одобрено FDA.	Только исследовательское применение.	Приборы VivoSight, UHR-OCT одобрены для клинического применения.

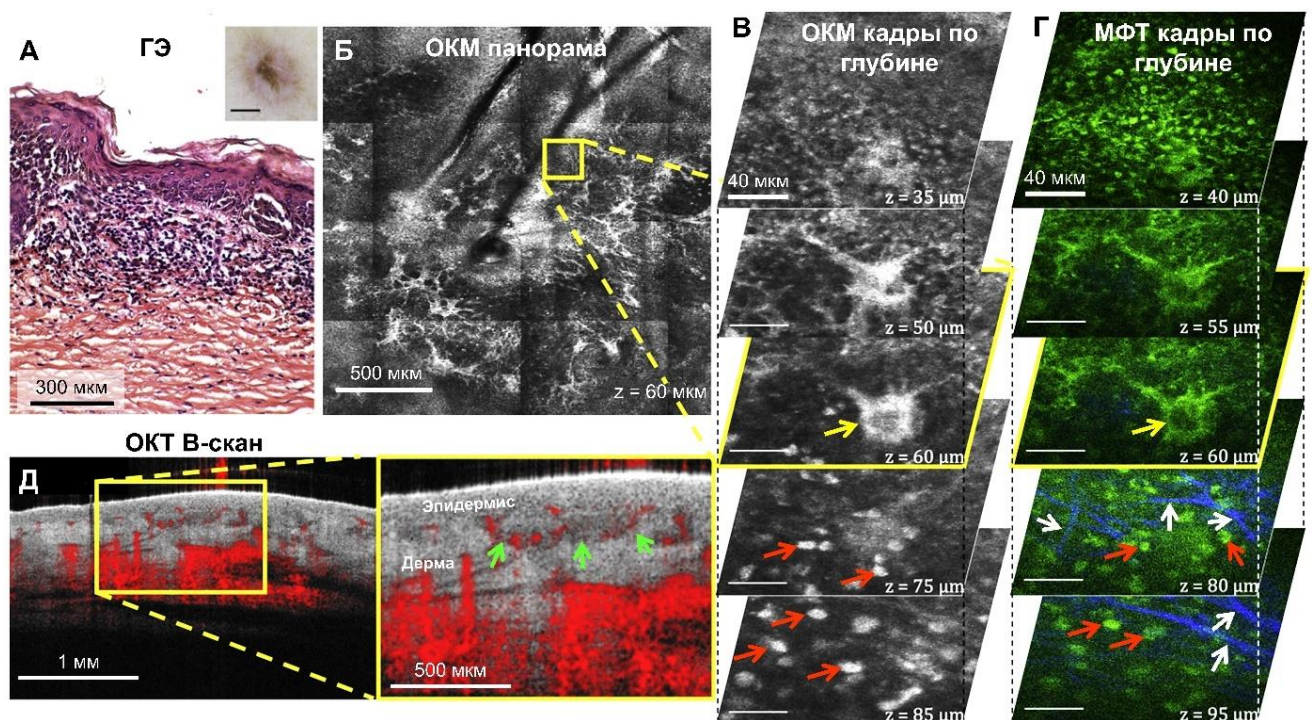


Рисунок 3 — Сравнение методов визуализации ОКТ, ОКМ, МФТ кожи на примере рецидивирующего меланоцитарного невуса. Желтая стрелка – клетка лангерганса, оранжевые стрелки – воспалительные клетки, белые стрелки – коллагеновые волокна, зеленые стрелки – область поражения (воспалительного инфильтрата) в дерме (адаптировано из Lentsch G et al., 2022) [130]

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

Объектами исследований являлись биопсийные образцы (n=103), полученные из архива 1-го патологоанатомического отделения ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова»; биопсийные образцы (n = 113), которые получены непосредственно после проведения ОКТ исследования, на базе I гинекологического отделения ГБУЗ НО Нижегородская областная клиническая больница им. Н. А. Семашко; пациенты с клинически и гистологически подтвержденным диагнозом СЛВ (n=82) и пациенты без вульварных дерматозов (n=31) (Рисунок 4). Критериями включения являлись: возраст пациентов старше 18 лет, клиническая картина СЛВ, наличие гистологической картины классического СЛВ и/или несклеротического СЛВ (перечислены в таблице 1 и 4). Критерии исключения: наличие ВИН, плоскоклеточного рака в образцах, гистологическая картина красного плоского лишая, клиническая картина генитоуринарного менопаузального синдрома. Такой подход позволил включить в выборку широкий спектр случаев СЛВ с различными вариантами повреждения соединительной ткани дермы.

Проведенные исследования одобрены локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России (выписка из протокола №17 от 11 октября 2019) и комиссией по этике биомедицинских исследований ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (выписка из протокола № 08 от 21 сентября 2023 г.).



Рисунок 4 — Схема объектов, методов исследования по отношению к поставленным задачам. * — пациенты проходили обследование в рамках заболеваний вульвы, биопсия была выполнена по показаниям, однако полученные образцы не продемонстрировали патологических изменений

Архивные биопсийные образцы. Для решения 1-й и 2-й задач данного исследования были отобраны биопсийные образцы вульвы из архива ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» с патологоанатомическим заключением «склероатрофический лихен вульвы», «лейкоплакия вульвы», «морфологические признаки начального этапа формирования склероатрофического лихена», «плоскоклеточная гиперплазия», «хронический вульвит», «неспецифическая морфологическая картина», «фрагмент кожи обычного строения». Гистологические препараты совместно с сопроводительными клиническими данными повторно оценивались двумя патологоанатомами из ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» и ФГБОУ ВО «ПИМУ» на соответствие критериям включения и исключения.

Всего было отобрано 103 образца, из которых 65 случаев продемонстрировали классическую морфологическую картину, 5 случаев картину гипертрофического СЛВ и 33 случая можно было классифицировать как

несклеротический вариант СЛВ. Средний возраст пациентов составил 48 ± 15 лет, диапазон возраста 23–73 года.

Биопсийные образцы, полученные из области ОКТ сканирования. Для интерпретации данных ОКТ требуется проведение прецизионного сравнения результатов неинвазивного ОКТ исследования с гистологическим анализом кожи вульвы. Таким образом, биопсийные образцы, полученные из точек ОКТ-сканирования, непосредственно после проведения исследования, использовались для решения 1, 2, 4 задачи. Гистологический диагноз был установлен двумя независимыми патологоанатомами (из ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» и ФГБОУ ВО «ПИМУ») на основе критериев классического СЛВ и несклеротического СЛВ (перечислены в таблице 1, 4). Гистологические и клинические данные оценивались на соответствие критериям включения и исключения. Всего было получено 82 образца кожи с СЛВ и 31 образец без патологических изменений кожи вульвы.

Пациенты с подтвержденным диагнозом СЛВ и без дерматозов вульвы. Для решения 3-й и 4-й задачи, поставленной в рамках данного исследования, объектом исследования служили пациенты с клиническим диагнозом СЛВ, который впоследствии подтверждался гистологически. ОКТ исследование является безболезненной, неинвазивной процедурой, не требующей местной анестезии, и хорошо переносится пациентами. Пациенты были обследованы в рамках амбулаторного приема во 2-м гинекологическом отделении НОКБ им Н. А. Семашко (Нижний Новгород) и в отделении эстетической гинекологии и реабилитации НМИЦ им. В. И. Кулакова (Москва). Проводилось неинвазивное ОКТ исследование с последующим выполнением прицельной биопсии из зоны максимального поражения. По результатам гистологического исследования было отобрано 82 пациента с СЛВ и 31 пациент без патологических изменений кожи вульвы на основании критериев включения и исключения. Средний возраст пациентов с СЛВ составил 51 ± 12 лет, диапазон возраста 25–71 год, средний возраст пациентов без патологических изменений составил 55 ± 10 лет, диапазон возраста

41–73 года. Информированные согласия на проведение ОКТ исследования и биопсию были получены от каждого пациента.

2.2 Методы исследования

Гистология и иммуногистохимия. Для изготовления гистологических препаратов использована стандартная процедура проводки с изопропиловым спиртом с дальнейшим изготовлением срезов толщиной 4 мкм. Окрашивание гематоксилином и эозином применяли для первичного морфологического анализа и установления диагноза. Для изучения структуры дермы проводили окрашивание пикрофуксином по Ван Гизону, а состояние эластических волокон оценивали с использованием окрашивания орсеином. Гистохимическая ШИК-реакция использовалась для оценки состояния базальной мембраны, выявления отложений гликопротеинов и исключения кандидоза.

Иммуногистохимическое исследование включало определение коллагена I, III и V типов, Подопланина. Использовались моноклональные антитела к коллагену I типа (ab90395, клон Col 1; Abcam, Кембридж, Великобритания), коллагену III типа (ab23445, клон 1E7-D7/Col3; Abcam, Кембридж, Великобритания), коллагену V типа альфа 1 (ab112551, клон 1E2-E4/Col5; Abcam, Кембридж, Великобритания) с разведением антител 1:500, антитела к Подопланину (ab236529, клон EPR22182; Abcam, Кембридж, Великобритания) с разведением 1:2000.

Депарафинированные срезы на адгезивных стеклах помещали в цитратный буфер (pH=6) и нагревали на водяной бане для термического извлечения эпитопа (98 °C, 40 минут), затем выполнена процедура инактивации эндогенной пероксидазы с помощью 3% пероксида водорода. Далее следовал этап инкубации с 5% бычьим сывороточным альбумином в течение 10 мин для снижения фонового окрашивания. Срезы инкубированы с первичным антителом в концентрации 1:500 в течение 12 часов при комнатной температуре во влажной камере. Далее после

промывки срезы инкубированы со вторичным антителом, конъюгированным с пероксидазой хрена в течение 45 мин при комнатной температуре. В качестве хромогена (субстрата) использован 3,3'-диаминобензидин. В заключении выполнено контрастное окрашивание с использованием гематоксилина.

Гистологические препараты были оцифрованы и проанализированы с помощью сканера EVOS M7000 (Thermo Fisher Scientific, США) в проходящем свете.

Многофотонная микроскопия. Структура коллагеновых и эластических волокон дермы изучалась с помощью многофотонной микроскопии (МФМ), которая включает микроскопию генерации второй гармоники (ГВГ) для оценки коллагеновых волокон и двухфотонную возбуждаемую автофлуоресценцию (ДВАФ) для оценки эластических волокон.

В данной работе использовался лазерный сканирующий микроскоп Carl Zeiss LSM 880 (Йена, Германия) в многофотонном режиме. Перестраиваемый титан-сапфировый фемтосекундный лазер Mai Tai HP (Spectra Physics, Милпитас, США) использован в качестве источника возбуждающего излучения, длина волны составляла 820 нм, при средней мощности на образце 2,7 мВт. Детекция осуществлялась методом спектральной селекции на дифракционной решетке в диапазоне 370–420 нм для ГВГ и 500–550 нм для ДВАФ. Изображения построены с использованием 32-канального спектрального детектора GaAsP с системой обнаружения Airyscan FAST. Использовался объектив «С Plan-Apochromat» 40х, числовая апертура 1,3 с масляной иммерсией, размер одного кадра составлял 212 × 212 мкм (1024×1024 пикселей). Сигнал ГВГ и ДВАФ регистрировали с помощью эпи-детекции, то есть возбуждающее излучение и обратно регистрируемый сигнал проходил через один объектив в прямом и обратном направлении соответственно. Исследовали депарафинизированные неокрашенные срезы кожи вульвы толщиной 7 мкм.

Оптическая когерентная томография. В данном исследовании использовалась скоростная спектральная ОКТ-система «ОКТ 1300-Е» (ООО «Биомедтех», Нижний Новгород, Россия; Регистрационное удостоверение ФСР

2012/13479) разработанная в Институте прикладной физики имени А. В. Гапонова-Грехова РАН (Нижний Новгород, Россия). Система оснащена гибким волоконно-оптическим зондом контактного типа, длина контактной части зонда - 5 см, диаметр – 1 см. Зонд позиционируется вручную и крепится с помощью держателя эндоскопа к гинекологическому креслу. ОКТ система имеет интерферометрическую схему и работает на центральной длине волны 1310 нм с шириной спектра 100 нм. Данная длинна волны обеспечивает оптимальное соотношение проникновения сигнала и разрешения системы для кожи и слизистой. Скорость сканирования составляет 20000 А-сканов/с, разрешение по глубине - 10 мкм, поперечное разрешением - 15 мкм. Таким образом, ОКТ система создает набор 3D данных за 26 с, который состоит по глубине из 256 пикселей (2 мм в воздухе) и 512×512 пикселей в горизонтали ($3,4 \times 3,4$ мм).

В режиме реального времени на мониторе персонального компьютера строится 3D объем данных, структурные ОКТ изображения поперечного сечения (В-скан) в ко- и кросс- поляризации, ОКТ-ангиографическое изображение в проекции *en face* (Рисунок 5 А). Несмотря на то, что особенностью кросс- канала ОКТ является чувствительность к анизотропным (изменяющим направление поляризации света) структурам, таких как коллагеновые пучки дермы и кератинизированный (роговой) слой эпидермиса, мы не нашли значительного преимущества в использовании кросс-канала при диагностике СЛВ. Вероятно, это связано с тем, что при СЛВ коллагеновые пучки претерпевают значительные изменения, что не требует использования более чувствительного, но дорогого и редкого метода кросс-поляризационной ОКТ.

Таким образом, в данной работе рассматривается ко-поляризация как эффективный и наиболее широко используемый метод ОКТ.

Для количественного анализа дополнительно формировались цветокодированные карты распределения коэффициента затухания ОКТ-сигнала в ткани в проекции В-скана (Рисунок 5 Б). Такое представление коэффициента затухания ОКТ сигнала повышает контрастность и улучшает визуализацию структур кожи, по сравнению со структурными ОКТ изображениями. Расчет

коэффициента затухания ОКТ сигнала отражает потерю сигнала с глубиной из-за рассеяния и поглощения зондирующего излучения, что в свою очередь характеризует морфологическое строение изучаемого органа или ткани [131].

Цветовая шкала структурных ОКТ изображений варьируется от черного до желтого, который мы называем «темным» или «низкой интенсивностью» и «ярким» или «высокой интенсивностью», что соответствует величине света, возвращаемого тканью (обычно из-за обратного рассеяния). Цветовая шкала коэффициентов затухания имеет «радужную» палитру и принимает значения от 0 до 12 мм^{-1} (Рисунок 5 Б).

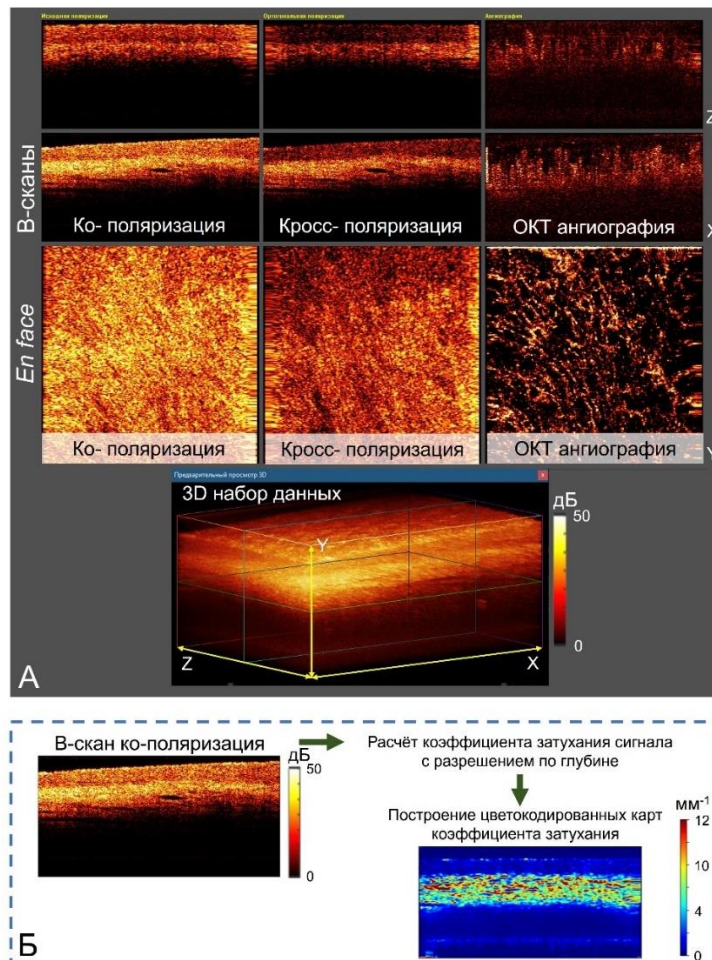


Рисунок 5 — Совокупность данных, получаемых в результате ОКТ исследования. А – изображения поперечного сечения ткани (В-сканы) и «вид сверху» (en face) кожи вульвы без патологии. Изображения получены из трехмерного набора данных. Б – цветочисловые карты коэффициента затухания ОКТ сигнала, формируются при постобработке исходного набора данных

2.3 Методики исследования

Методика ОКТ исследования кожи вульвы. При проведении ОКТ исследования пациенты находились в положении литотомии. Контактный ОКТ зонд был закреплен в шарнирном подвижном держателе (стойка-держатель инструментов для эндоскопов, Karl Storz), фиксированном к гинекологическому креслу, чтобы исключить движения и тремор рук врача в процессе исследования.

Предварительно гинекологом при вульвоскопии оценивалась область поражения вульвы и выбирались точки, в которых будет проведено ОКТ исследование. Точки исследования локализовались в зонах максимального поражения кожи и могли включать клиторальный капюшон, большие и малые половые губы, преддверие влагалища, спайка больших и малых половых губ. Вульвоскопические критерии выбора точек интереса включали: блестящие плоские папулы цвета слоновой кости или белого цвета, сливающиеся в бляшки различного размера, лихенизированные белые фарфоровые папулы и бляшки с атрофией кожи в виде «сигаретной бумаги».

Зондирование одной точки с получением ОКТ-данных занимало 26 с, в течение которых пациентка должна была сохранять неподвижность во избежание появления артефактов движения.

Для защиты предотвращение передачи инфекций исследование проводилось с использованием одноразового презерватива для УЗИ, который надевался на контактный ОКТ датчик. Латекс пропускает ОКТ сигнал, и не препятствует визуализации подлежащих структур кожи вульвы.

2.4 Количественная оценка иммуногистохимических данных

Количественная оценка иммуногистохимических препаратов окрашенных с использованием антител к Коллагену I, III, V типов включала расчет интенсивности окрашивания 3,3'-Диаминобензидином (DAB). Количественный анализ включал несколько этапов. Первоначально с каждого окрашенного образца были получены 3 изображения размером 695 x 1045 мкм² (увеличение 200x) с разрешением 0,2 мкм/пиксель, затем изображения подвергались цветовой деконволюции. Цветовая деконволюция – метод позволяющий определить, в какой степени структуры окрашены тем или иным красителем, а также разделить изображение на каналы, представляющие поглощение (или коэффициент пропускания) исследуемых красителей или меток [132]. Для этого использовался плагин ImageJ «Colour Deconvolution 2.0» [132] (метод, описанный Ruifrok и Johnston [133]), векторы окрашивания необходимые для обработки определены на срезах, окрашенных только одним красителем (только DAB и только гематоксилином). Таким образом, после цветовой деконволюции получали 8-битные изображения, содержащие информацию только о положительном DAB окрашивании (Рисунок 6).

Второй этап включал оценку интенсивности ИГХ окрашивания, которая может быть проведена только полуколичественно, из-за следующих ограничений: ИГХ метод не является стехиометричным (т.е. увеличение интенсивности окрашивания нелинейно связано с увеличением концентрации исследуемого антигена в ткани, это обусловлено рядом этапов амплификации в процессе окрашивания, которые невозможно контролировать), DAB как используемый хромоген является рассеивателем, а не поглотителем света, это означает что DAB не подчиняется закону Бугера-Ламберта-Бера, который описывает линейную зависимость между концентрацией соединения и его оптической плотностью [132; 134]. Несмотря на это, полуколичественный метод определения интенсивности окрашивания DAB широко используется в патологической анатомии [134]. Для оценки интенсивности окрашивания использован стандартный инструмент «mean

grey value» ImageJ для изображений оптической плотности, где 0 у.е. – минимальная интенсивность, 255 у.е. – максимальная интенсивность. Полученные значения были преобразованы в баллы интенсивности окрашивания: 0+ (отрицательное), 0–33 у.е.; 1+ (слабо положительное), 34–107 у.е.; 2+ (умеренно положительное), 108–181 у.е.; 3+ (сильно положительное), 182–255 у.е. Первый диапазон оттенков серого был получен в результате оценки изображения отрицательного контроля, где максимальный уровень серого составил 33 у.е., а остальная часть преобразования осуществлена путем деления диапазона оттенков серого на три равные части.

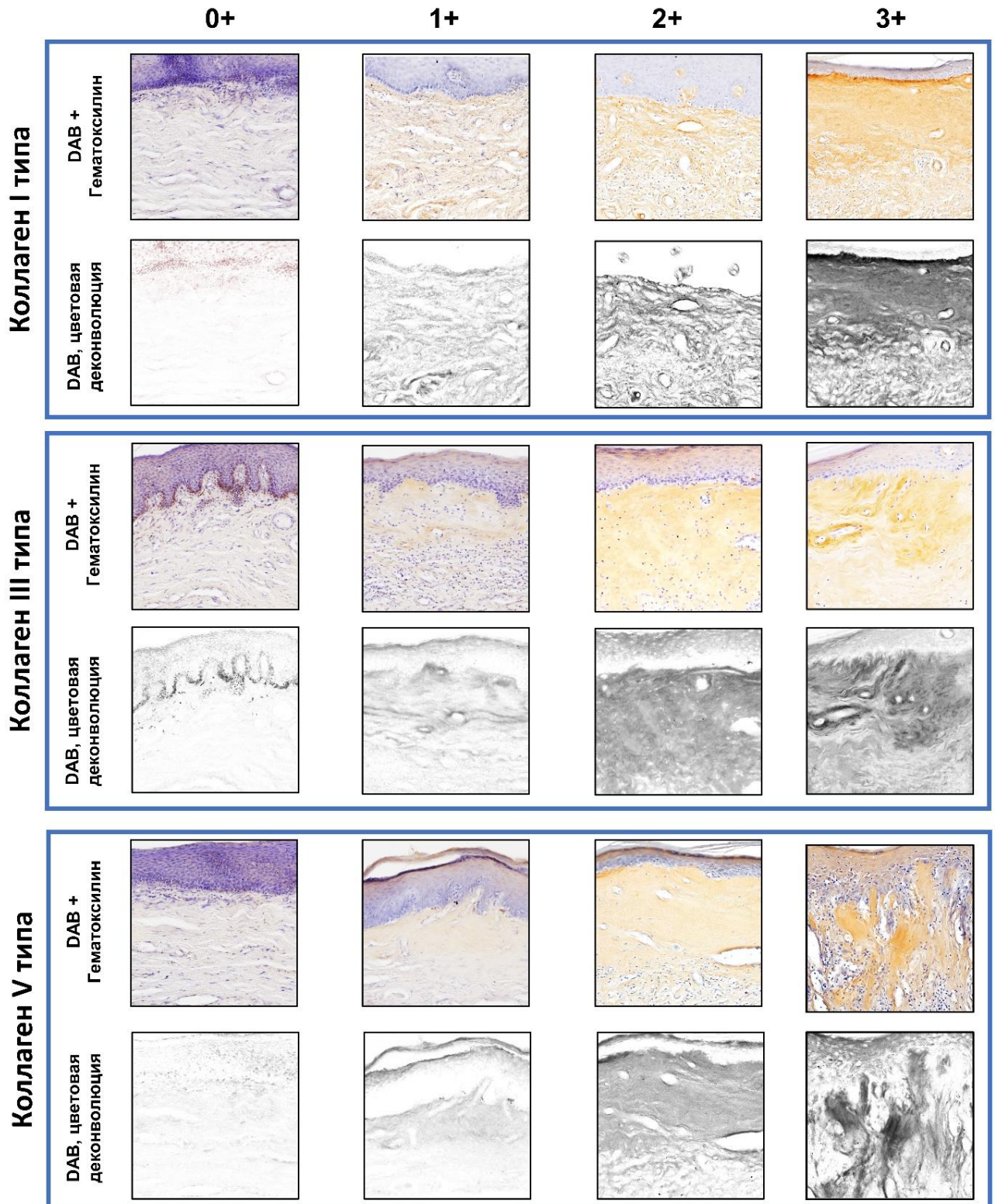


Рисунок 6 — Полуколичественная оценка интенсивности иммуногистохимического окрашивания коллагена I, III, V типов: 0+ (окрашивание отсутствует), 1+ (слабо положительное), 2+ (умеренно положительное), 3+ (сильно положительное). Уровень фонового окрашивания, соответствующий 0+ баллов, был установлен по отрицательному контролю, что позволило исключить вклад неспецифического связывания. Цветовая деконволюция обеспечивает селективное отделение структур, окрашенных DAB, от структур, окрашенных гематоксилином

Идентификация и изучение лимфатических сосудов слизистой вульвы осуществлялась иммуногистохимически с помощью антител на маркёры эндотелиоцитов лимфатических сосудов Подопланин. После окрашивания выполняли количественный подсчёт как лимфатических, так и кровеносных сосудов. Структуры, демонстрировавшие положительную реакцию на Подопланин, классифицировали как лимфатические; сосуды, не содержащие данного маркёра и отчётливо визуализирующиеся при контрастном окрашивании гематоксилином, относили к кровеносным. Подсчёт сосудов осуществляли в подэпителиальной зоне, которая включала дерму на глубину до 350 мкм, в шести полях зрения для каждого препарата. Результаты выражали как количество сосудов на 1 мм².

2.5 Анализ данных многофотонной микроскопии

Количественная оценка сигнала ГВГ и ДВАФ проводилась в субэпидермальной дерме (область интереса включала 350 мкм от дермо-эпидермального соединения), так как именно в данной области начинается поражение соединительной ткани при СЛВ. Участки выраженного воспалительного инфильтрата, отека или кровоизлияния исключались из анализа, так как изменения в них мешают анализу коллагеновых и эластических волокон.

Во-первых, каждый депарафинированный срез был отсканирован в многофотонном режиме в областях, пригодных для анализа, исключались зоны с артефактами, складками или нарушением структуры ткани. Толщина и длина коллагеновых волокон определялись вручную на сканах с использованием инструмента «Сегментированная линия» в программе ImageJ; для каждого образца выполняли не менее 15 измерений, равномерно распределённых по всей области интереса, после чего рассчитывали медианное значение, отражающее типичные характеристики волокон в данном образце.

Для количественной оценки состояния волокон коллагена I типа и эластина применялись методы статистики первого порядка (средняя интенсивность сигнала, асимметрия сигнала) и текстурного анализа (когерентность сигнала) многофотонных изображений. Эти методы позволяют количественно оценить изменения в текстуре коллагеновых волокон, вызванные различными патологическими состояниями [135] и широко используются при анализе изображений ГВГ [136]. Для этого на каждом скане было выбрано 10 областей интереса, каждая размером 20×20 мкм², в которых проведены измерения и рассчитаны медианные значения.

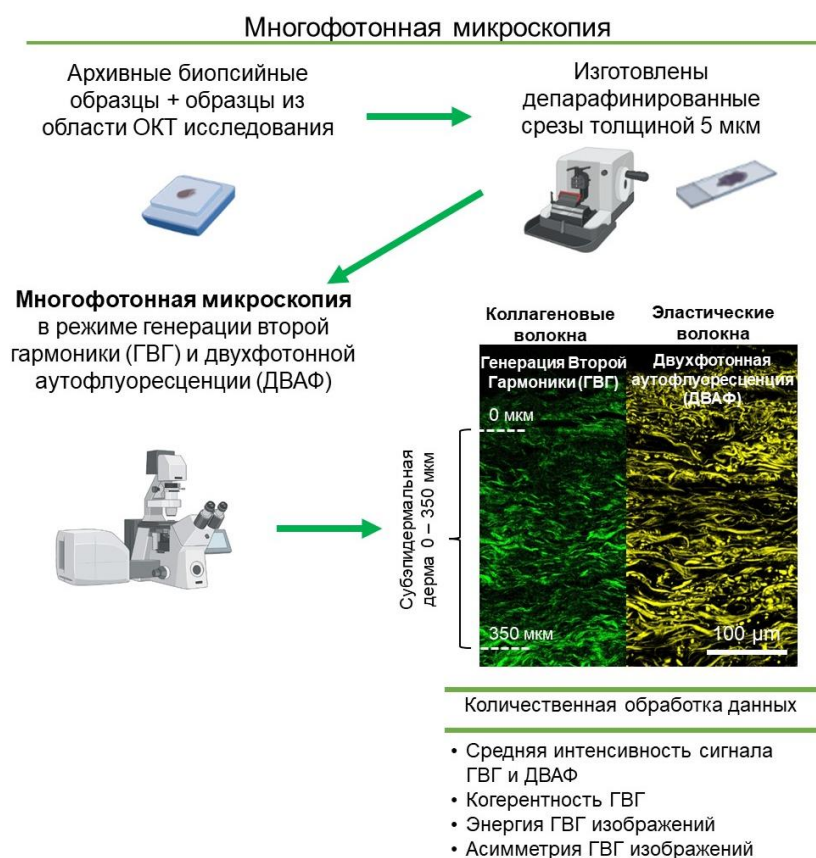


Рисунок 7 — Схема протокола исследования состояния коллагеновых и эластических волокон дермы вульвы при склероатрофическом лихене методом МФМ и сопоставление с ОКТ сигналом. Изучение структуры коллагеновых и эластических волокон дермы проводится в субэпидермальном слое толщиной 350 мкм, отсчет начинается от дермо-эпидермального соединения. Сопоставление параметров МФМ (в режиме ГВГ) и коэффициентов затухания ОКТ сигнала в дерме проводится с использованием корреляционного анализа (коэффициент ранговой корреляции Спирмена)

Средняя интенсивность сигнала — это простой момент первого порядка, используемый для оценки интенсивности сигналов ГВГ и ДВАФ. Средняя интенсивность сигнала ГВГ [137] в большей степени зависит от относительного количества коллагеновых волокон в области интереса [138] и частично от изменений в молекулярной упаковке фибрилл [139]. Так, ранее продемонстрировано, что интенсивность сигнала увеличивается с увеличением относительного количества коллагеновых волокон и увеличением их молекулярной спиральности [140] и уменьшается с уменьшением относительного числа коллагеновых волокон, потерей упорядоченной фибриллярной структуры [138; 141], неферментативным гликированием и термической денатурацией [139]. Несмотря на большое количество факторов, которые потенциально могут повлиять на сигнал, взаимосвязь между увеличением средней интенсивностью сигнала и избыточной выработкой коллагена является доминирующей и фиксируется, например, при прогрессировании фиброза печени [142; 143].

Асимметрия сигнала — это мера асимметрии распределения сигнала в исследуемой области интереса относительно среднего значения и фактически характеризует наклон гистограммы (т.е. графика распределения значений яркости в области интереса) относительно центральной линии. Параметр асимметрии сигнала [135] демонстрирует дисбаланс в размерах областей (или количестве пикселей), которые темнее или ярче среднего значения.

Асимметрия не зависит от извилистости или выравненности волокон, однако чувствительна к количеству коллагеновых волокон (Рисунок 8). Области с большим количеством отдельных ярких волокон на темном фоновом сигнале будут иметь более низкую асимметрию.

Когерентность сигнала — прямо пропорциональна степени упорядоченности упаковки коллагеновых волокон [135]. Параметр отражает степень выравнивания (или извилистости), доминирующее направление волокон. Значение когерентности находится в диапазоне 0-1, где 1 соответствует высоко ориентированной структуре коллагеновых волокон, а 0 соответствует областям с хаотическим расположением волокон.

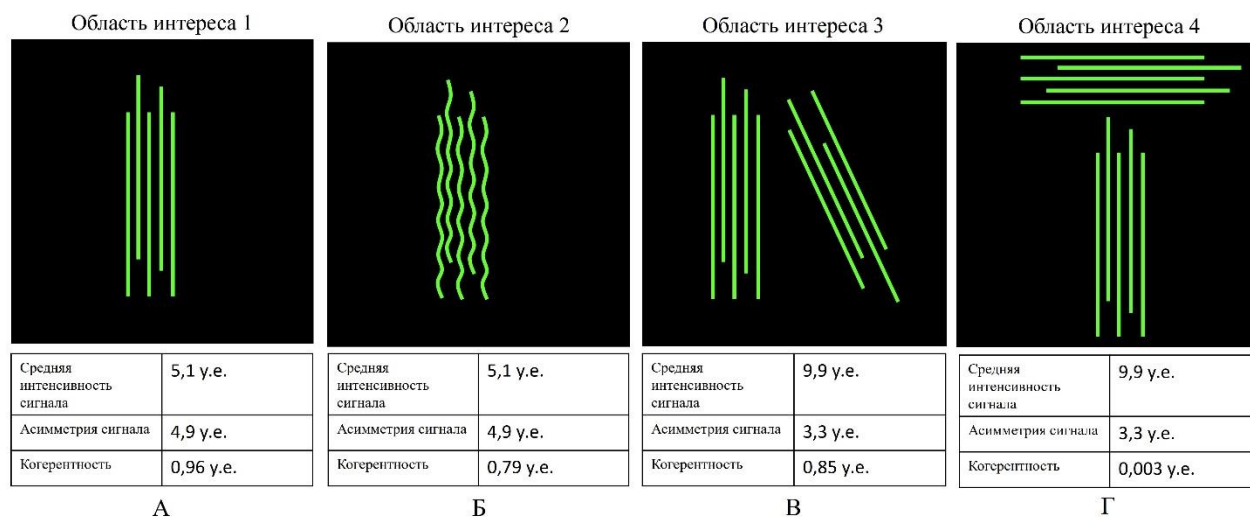


Рисунок 8 — Зависимость количественных параметров от расположения волокон коллагена (зеленый цвет) в области интереса

Когерентность достигает наибольших значений, если в области интереса лежат линейные волокна, выравненные вдоль доминирующего направления (Рисунок 8 А), извилистость волокон (Рисунок 8 Б) или отклонение их ориентации от доминирующего направления (Рисунок 8 В) приводит к снижению параметра когерентности. Когерентность имеет наименьшие значения в случае равного количества взаимно перпендикулярно направленных волокон в области интереса (Рисунок 8 Г).

Средняя интенсивность сигнала ДВАФ в диапазоне регистрации 500-550 нм зависит главным образом от эластичных волокон. Указанный диапазон включает пик излучения эластических волокон (510–525 нм) [144], но он не обеспечивает избирательность сигнала из-за того, что коллагеновые волокна также имеют излучение в этом диапазоне [144; 145]. Продемонстрировано, что селективность сигнала ДВАФ зависит от исследуемой ткани [94]. Так, пик двухфотонной автофлуоресценции эластина находится в диапазоне 510–525 нм (Рисунок 9 А), коллаген имеет пик около 500 нм (Рисунок 9 Б).

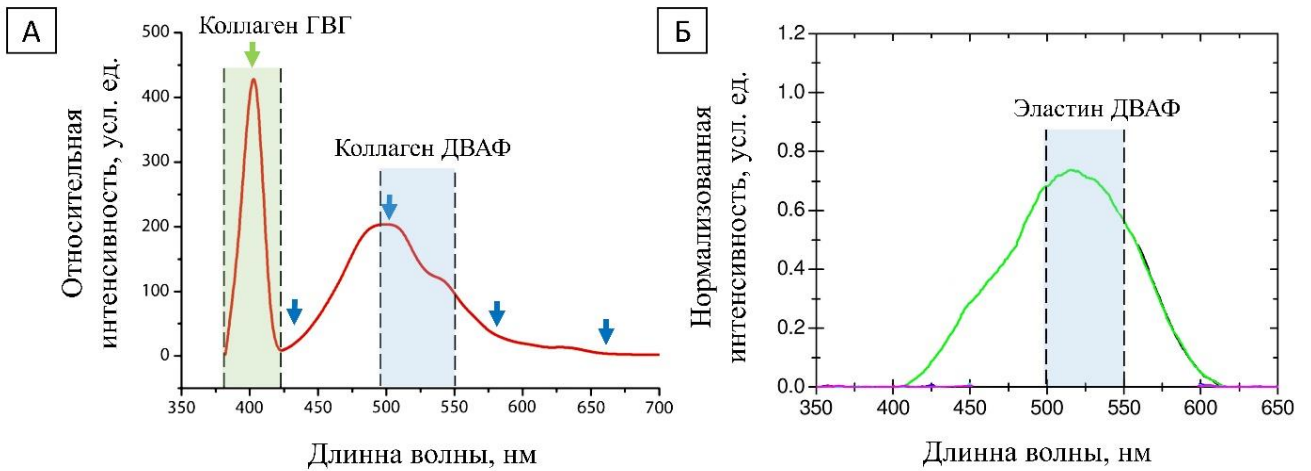


Рисунок 9 — Спектр эмиссии генерации второй гармоники и аутофлуоресценции коллагена (А), аутофлуоресценции эластина (Б) при двухфотонном возбуждении 800 нм. Зеленая стрелка – пик ГВГ коллагена, синие стрелки – спектр ДВАФ коллагена. Зеленая область – диапазон регистрации ГВГ, синяя область – диапазон регистрации ДВАФ (адаптировано из J. Chen et al., 2009; J. Chen et al. 2011) [144; 145]

Параметры статистики первого порядка (средняя интенсивность сигнала, асимметрия) были рассчитаны с использованием инструментария анализа гистограмм ImageJ [146]. Параметр когерентность рассчитывался с использованием плагина OrientationJ [147].

2.6 Визуальный и количественный анализ данных оптической когерентной томографии

При анализе структурных ОКТ-изображений и карт коэффициента затухания отчётливо визуализировалась двухслойная архитектура кожи, представляемая на ОКТ первым (поверхностным) слоем — эпидермисом и вторым слоем — дермой (Рисунок 10). На основе этих данных нам удалось выделить ряд характеристик, отражающих морфологические изменения в коже:

1) Толщина первого слоя (эпидермиса). Толщина эпидермиса может быть увеличена при гипертрофии или акантозе и снижена при атрофии. Эпидермальные гребни не визуализируются на ОКТ-изображениях и картах коэффициента затухания ОКТ-сигнала.

2) Наличие тонкого слоя с высоким сигналом (высокими значениями коэффициента затухания) на поверхности эпидермиса. Данная структура соответствует роговому слою. Он становится более выраженным при гиперкератозе (ортокератозе или паракератозе).

3) Высокий сигнал в верхней трети эпидермиса. Повышенный сигнал (высокие значения коэффициента затухания) в верхней 1/3 эпидермиса соответствует гипергранулёзу — накоплению гранул кератогиалина, которые активно рассеивают излучение (Рисунок 10, зелёная стрелка).

4) Контрастность границы между первым и вторым слоем (эпидермисом и дермой). Данный параметр зависит от совокупного состояния эпидермиса и дермы. Контраст формируется за счет более низкого уровня ОКТ сигнала от эпидермиса и более высокого уровня ОКТ сигнала от дермы (Рисунок 10, желтая стрелка). Контрастность может значительно варьировать при различных патологических изменениях.

5) Уровень сигнала (значения коэффициента затухания) от дермы. В норме дерма обладает высоким сигналом (высокими значениями коэффициента затухания ОКТ-сигнала) благодаря плотным пучкам коллагеновых и эластических волокон. При склерозе и/или отёке уровень сигнала снижается (Рисунок 10, розовые стрелки).

6) Наличие щелевидных структур с низким уровнем ОКТ-сигнала в дерме. Данные структуры соответствуют лимфатическим сосудам. Их количество и выраженность могут изменяться при различных состояниях (Рисунок 10, белые стрелки).

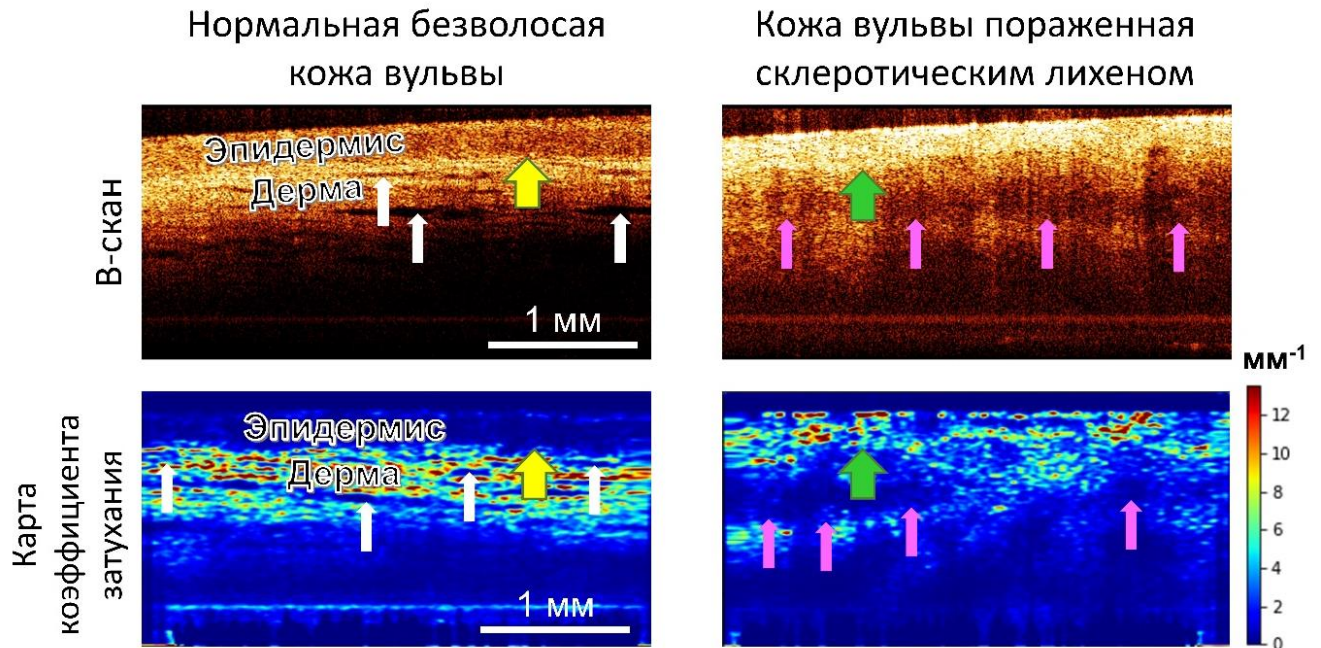


Рисунок 10 — Пример структурных ОКТ изображений и цветочислованных карт, полученных на основе расчёта коэффициента затухания ОКТ-сигнала. На изображениях нормальной кожи визуализируется чёткая эпидермально-дермальная граница (жёлтая стрелка), а также щелевидные структуры в дерме с низким ОКТ-сигналом и низкими значениями коэффициента затухания, соответствующие лимфатическим сосудам (белые стрелки). На изображении кожи при СЛВ поражённый эпидермис характеризуется высоким ОКТ-сигналом и повышенными значениями коэффициента затухания (зелёная стрелка), тогда как патологически изменённая дерма демонстрирует низкий сигнал и сниженные значения коэффициента затухания (розовые стрелки)

Количественная оценка ОКТ изображений. После получения 3D ОКТ исходных данных было использовано программное обеспечение, разработанное в Институте прикладной физики Российской Академии наук (Нижний Новгород), которое позволяет получить параметрические изображения коэффициента затухания (цветочислованные карты) и рассчитать среднее значения в области интереса [131].

Для расчета коэффициента затухания применялся метод с разрешением по глубине, первоначально предложенный в работе К. Vermeer [127]. Этот алгоритм хорошо подходит для анализа тканей со сложной многослойной организацией, включая кожу. Однако в исходной версии метода присутствуют систематические искажения, связанные с аддитивным шумом и изменением чувствительности

ОКТ-системы по мере увеличения глубины сканирования. Поэтому в работе применялась модифицированная версия, предложенная в работах Moiseev A. и др. [131; 148], которая учитывает оба этих фактора.

Для каждого набора ОКТ-данных распределение коэффициента затухания визуализировалось в виде цветокодированных карт, соответствующих поперечным сечениям (В-сканам). Диапазон цветовой шкалы — от минимальных значений (синий цвет) до максимальных (красный цвет) — подбирался таким образом, чтобы обеспечить оптимальную визуальную дифференциацию структур кожи; итоговый рабочий диапазон составлял $0\text{--}12\text{ мм}^{-1}$. Средние значения коэффициента затухания определялись по всей толщине дермы — от её границы с эпидермисом до уровня, на котором сигнал полностью затухал. Такой подход позволял получать воспроизводимые количественные характеристики состояния дермы.

Измерение толщины эпидермиса выполняли на цветокодированных картах коэффициента затухания ОКТ сигнала, определяя расстояние от поверхности кожи до чётко визуализируемой дермо-эпидермальной границы. Для каждого 3D-набора данных проводили три измерения на трёх различных В-сканах, что в сумме давало девять значений. Линейные измерения выполнялись строго перпендикулярно поверхности эпидермиса, после чего рассчитывалось среднее значение по всем девяти анализируемым точкам. Случаи, в которых дермо-эпидермальная граница визуализировалась недостаточно контрастно, исключали из анализа. Для работы использовали стандартный инструмент измерения длины в программе ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, USA).

2.7 Статистическая обработка полученных данных

Перед выбором методов статистического сравнения проверяли характер распределения данных с помощью критерия Шапиро–Уилка. Поскольку сравниваемые выборки были независимыми, для межгрупповой оценки применяли

непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, позволяющий корректно анализировать более двух групп без предположений о типе распределения данных. Для контроля риска ложноположительных результатов при множественных сравнениях использовали поправку Бонферрони. Статистически значимыми считали различия при уровне $P < 0,05$. Количественные показатели представлены в формате $Me [Q1; Q3]$, где Me обозначает медиану, а $Q1$ и $Q3$ — 25-й и 75-й перцентили соответственно.

Для оценки связи между морфологическими характеристиками и коэффициентом затухания ОКТ-сигнала использовали ранговый коэффициент корреляции Спирмена. Полученные значения r интерпретировали по степени выраженности взаимосвязи между переменными: r от 0,3 до 0,5 расценивали как слабую корреляцию; от 0,5 до 0,7 — как умеренную; от 0,7 до 0,9 — как высокую; значения r от 0,9 до 1 — как очень высокую степень связи.

Для оценки способности коэффициента затухания ОКТ-сигнала различать нормальную кожу вульвы и различные варианты поражения дермы при СЛВ был выполнен ROC-анализ. Для каждого типа дермальных изменений определяли оптимальное значение порога, при котором разделение групп было наиболее эффективным. Дополнительно рассчитывали основные характеристики диагностического теста: площадь под ROC-кривой, чувствительность, специфичность и диагностическую точность. Под пороговым значением понимали такую точку отсечения, которая обеспечивает наилучший баланс между истинно положительными и ложно положительными результатами.

Площадь под кривой - общая точность теста; тест, чьи прогнозы на 100 % неверны, имеет значение площади, равное 0,0; тот, чьи предсказания верны на 100%, имеет площадь 1,0. Чувствительность — доля истинно положительных результатов. Специфичность — доля истинно отрицательных результатов. Диагностическая точность — доля всех правильных результатов. Пороговые значения (порог классификации) определялись исходя из максимально возможных равновесных значений чувствительности и специфичности, с учетом одинаково

негативного вклада как ложно положительных, так и ложно отрицательных результатов.

Для количественной оценки параметров многофотонной микроскопии были рассчитаны 95% прогностические интервалы для разных вариантов поражения дермы при СЛВ. Для этого использовали статистическую модель распределения Вейбулла, а затем применяли метод Монте-Карло, что позволило надёжно учесть разброс данных. Расчёты выполнялись по методике, описанной в работе [149].

Все расчёты статистических показателей, а также построение графиков и визуальных представлений данных выполняли с использованием программных пакетов SPSS Statistics 26 (IBM, США) и OriginPro 2021b (OriginLab Corporation, США).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследование морфологических особенностей и возможностей оптических методов, таких как МФМ и ОКТ, в диагностике склероатрофического лишена вульвы было организовано в три последовательных этапа.

Первый этап (Раздел 3.1) заключался в оценке морфологических изменений эпидермиса, коллагеновых и эластических волокон в дерме с помощью рутинных методов исследования, ИГХ-окрашивания на коллаген I, III, V типов, а также высокоразрешающего метода МФМ. Метод МФМ играет роль референсного метода изучения структуры коллагеновых волокон соединительной ткани. Данный этап выполнен на архивном материале (n=103) и биопсийном материале (n=113).

Второй этап (раздел 3.2) был посвящён интерпретации результатов прижизненного ОКТ-исследования кожи вульвы. Дополнительно проводилась количественная оценка состояния соединительной ткани на основе расчёта коэффициента затухания ОКТ-сигнала. Этот этап проводился на материале прижизненных ОКТ-исследований с последующим выполнением биопсии и морфологической верификацией изменений (n=113).

Третий этап (Раздел 3.3) заключается в расчёте чувствительности, специфичности и диагностической точности коэффициента затухания ОКТ-сигнала при идентификации каждого морфологического варианта СЛВ.

Такой подход позволяет первоначально изучить и выделить морфологические варианты СЛВ, затем на основании знаний об изменении эпидермиса и дермы приступить к интерпретации структурных ОКТ изображений и карт коэффициента затухания, и в заключении продемонстрировать диагностический потенциал неинвазивного метода диагностики.

3.1 Гистологическое, иммуногистохимическое исследование и многофотонная микроскопия для диагностики морфологических вариантов склероатрофического лишена вульвы

Покровные ткани вульвы имеют различное эмбриональное происхождение, что определяет их неоднородное морфологическое строение. Лобок, промежность и большие половые губы покрыты кожей с волосяными фолликулами, сальными железами, эккриновыми и апокриновыми потовыми железами. На медиальной поверхности больших половых губ, межгубной борозде и латеральной поверхности малых половых губ расположена безволосая кожа с сальными железами (гранулы Фордайса). На медиальной поверхности малых половых губ и преддверии вульвы расположена слизистая оболочка, представленная многослойным плоским неороговевающим в разной степени гликогенированным эпителием [150]. В данной работе рассматривается безволосая кожа вульвы, так как локализуется в зоне преимущественного поражения при СЛВ. Слизистая вульвы не рассматривается, так как поражается значительно реже [151]. Далее будут рассмотрена кожа без патологии, а также изменения эпидермиса, коллагеновых и эластических волокон дермы при СЛВ.

3.1.1 Изучение патологических изменений эпидермиса

У изучаемой когорты больных безволосая кожа вульвы была покрыта многослойным плоским ороговевающим эпителием толщиной 162 ± 57 мкм и имела вариации строения. Наблюдался невыраженный орто- или паракератоз (5–20 мкм), эпителиальные сосочки были в разной степени выражены в зависимости от локализации биоптата и возраста пациента. Эпителий содержал до 3х слоев гранулярных клеток. Так у 21 пациента кожа имела ряды эпителиальных сосочков,

у 10 пациентов кожа имела лишь единичные эпителиальные сосочки (Рисунок 11 А, Б). В дерме, под базальной мембраной наблюдался разрозненный лимфоцитарный инфильтрат.

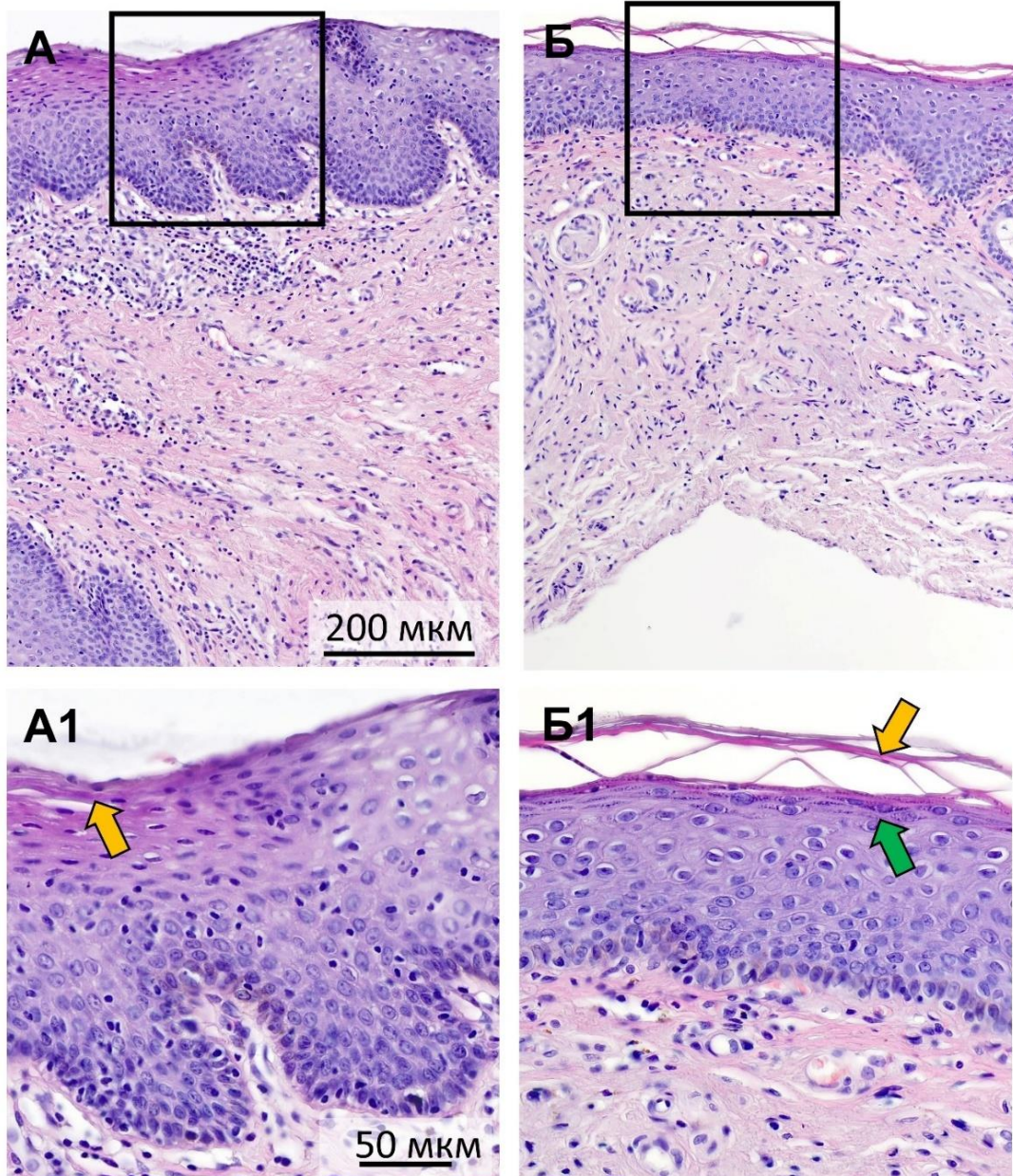


Рисунок 11 — Структура эпидермиса нормальной безволосой кожи вульвы. А – репрезентативный пример строения кожи вульвы с эпителиальными сосочками, пациент Г. 68 лет (ГЭ, $\times 400$), А1 – эпителий содержит участки паракератоза (оранжевая стрелка), гранулярный слой отсутствует ($\times 600$); Б – репрезентативный пример строения кожи вульвы без эпителиальных сосочков, пациент К. 64 года (ГЭ, $\times 400$), Б1 – ортокератоз (оранжевая стрелка), зеленая стрелка – гранулярный слой состоит из 3х слоев клеток ($\times 600$)

При СЛВ наблюдался широкий спектр патологических изменений эпидермиса, из них можно выделить: атрофию, гипертрофию и дистрофические изменения эпидермиса (Рисунок 12).

В исследованном материале атрофия эпидермиса наблюдалась в 117 из 185 образцов (63%) и характеризовалась полной потерей эпидермальных сосочков, уменьшением слоев кератиноцитов, снижением толщины эпидермиса до 79 ± 38 мкм. Клетки базального, шиповатого и гранулярного слоя выглядели уплощенно, со скудной цитоплазмой (Рисунок 12 А, А1). На поверхности обычно присутствовал тонкий роговой слой (ортокератоз).

Основные дистрофические изменения эпидермиса при СЛВ включали гидропическую дистрофию базальных кератиноцитов, акцентуацию межклеточных соединений за счет спонгиоза.

Гипертрофия эпидермиса наблюдалась в 11 из 185 образцов и характеризовалась утолщением эпидермиса до 190 ± 52 мкм с формированием толстого рогового слоя, а также гипергранулезом (увеличение толщины гранулярного слоя эпидермиса до 5–7 клеток). В остальных 57 (30,8%) образцах толщина эпидермиса была в пределах нормального диапазона значений (162 ± 57 мкм).

Дистрофические изменения эпидермиса присутствовали как при атрофии, гипертрофии, так и в случае незначительного изменения толщины эпидермиса. Наиболее характерными изменениями при СЛВ по нашим данным являлись гидропическая дистрофия базальных кератиноцитов и акцентуация межклеточных соединений за счет спонгиоза.

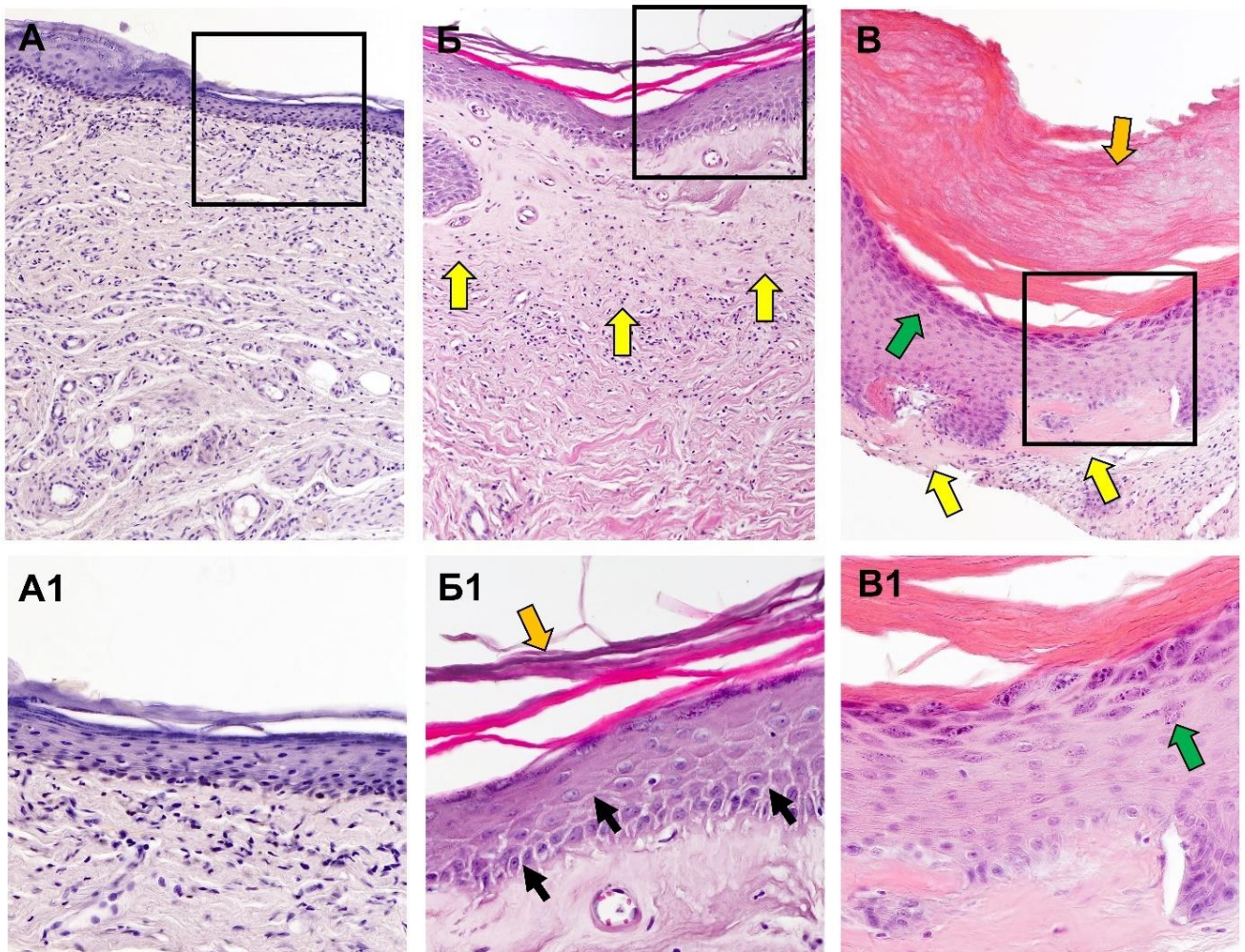


Рисунок 12 — Спектр патологических изменений эпидермиса вульвы при СЛВ. А – репрезентативный пример атрофии эпидермиса при СЛВ, пациент Т. 55 лет, А1 – эпидермис содержит 9 слоев уплощенных кератиноцитов, ортокератоз; Б – репрезентативный пример спонгиоза в эпидермисе при СЛВ, пациент Б., 64 года, Б1 – в эпидермисе наблюдается акцентуация межклеточных пространств и соединений в базальном и шиповатом слое в результате спонгиоза (черные стрелки), гиперкератоз (оранжевая стрелка); В – репрезентативный пример гипертрофии эпидермиса при СЛВ, зеленая стрелка – гипергранулез, желтая стрелка – плотные массы кератина, В1 – гранулярный слой состоит из 6 слоев клеток с крупными гранулами кератогиалина в цитоплазме

3.1.2 Изучение патологических изменений коллагеновых волокон дермы

Известно, что ключевым и патогномичным морфологическим признаком при СЛВ являются патологические изменения коллагеновых волокон. Для изучения структурных изменений было выполнено окрашивание пикрофуксином

по Ван-Гизону и многофотонная микроскопия в режиме генерации второй гармоники (ГВГ-микроскопия). С другой стороны, для изучения изменения состава выполнено ИГХ-исследование на коллагены I, III, V типов, а также ШИК-реакция для идентификации отложения гликопротеинов.

Рутинные гистологические и ИГХ методы исследования, основанные на оптической микроскопии, не позволяют надежно идентифицировать отдельные коллагеновые волокна, из-за недостаточного разрешения. Поэтому далее описывается коллагеновые пучки, которые представляют собой пространственный композит коллагеновых волокон [152].

Нормальная дерма вульвы включает сосочковый слой толщиной от 180 до 250 мкм, за которым следует ретикулярный слой. Граница между сосочковым и ретикулярным слоем не всегда выражена. Короткие коллагеновые пучки хорошо окрашиваются фуксином (Рисунок 13 А, Б). Толщина коллагеновых пучков увеличивается от сосочковой к ретикулярной дерме. ШИК-реакция дермы отрицательная (Рисунок 13 В).

Иммуногистохимическое исследование демонстрирует иммунопозитивность коллагеновых пучков дермы к коллагену I типа, но не к коллагену III и V типов (Рисунок 13 Г-Е).

В отличие от оптической микроскопии, высокоразрешающая ГВГ-микроскопия позволяет идентифицировать единичные коллагеновые волокна, которые содержат коллаген I типа. Это позволяет более точно охарактеризовать изменения соединительной ткани при СЛВ. Так, по данным ГВГ-микроскопии сосочковый слой дермы состоит из тонких 2,2 [1,9; 2,4] мкм и коротких 24 [21; 27] мкм коллагеновых волокон с постепенно увеличивающейся толщиной в нижележащей области дермы.

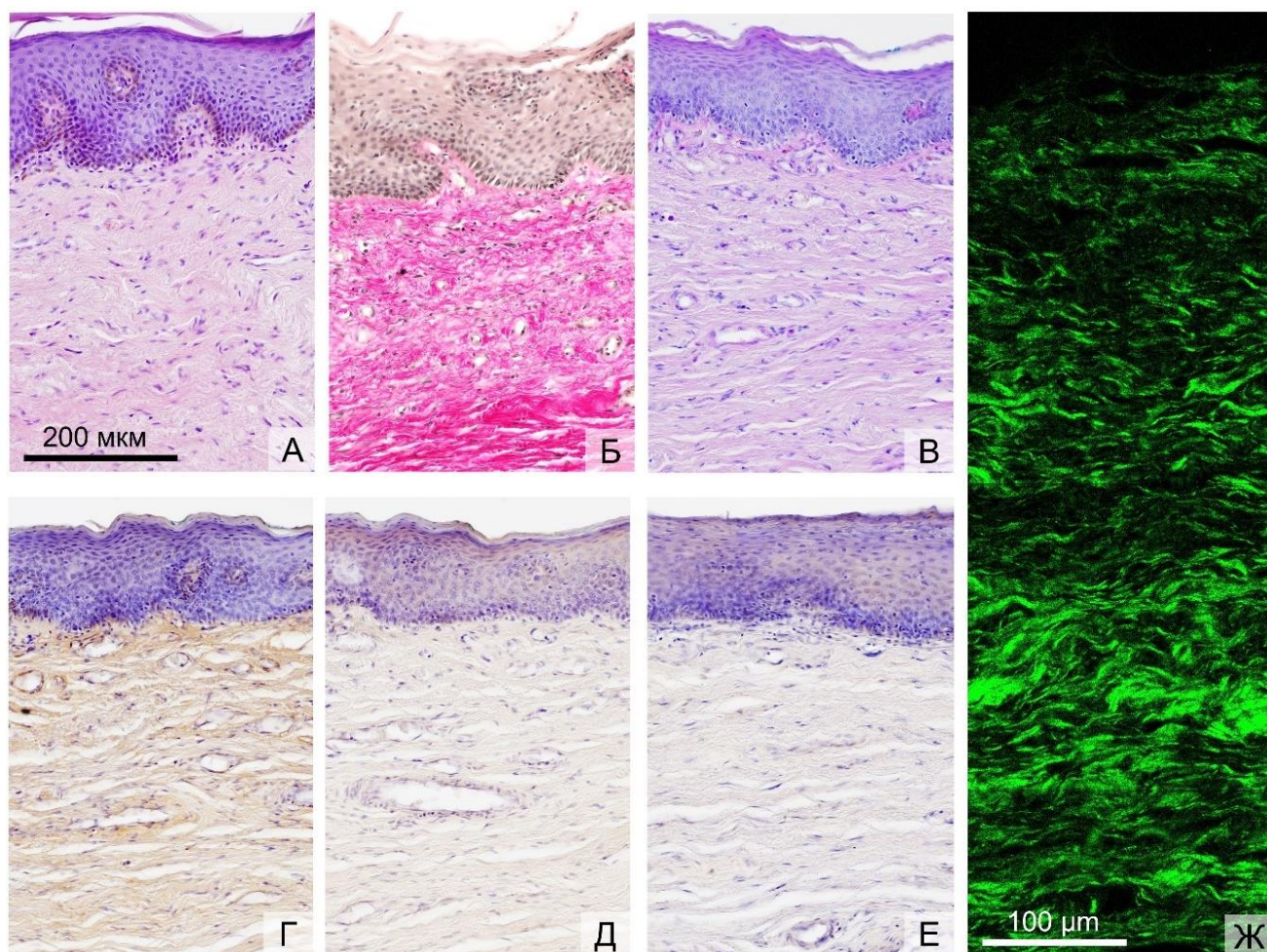


Рисунок 13 — Организация дермы нормальной безволосой кожи вульвы. А - окраска гематоксилином и эозином; Б – окраска пикрофуксином по Ван-Гизону демонстрирует коллагеновые пучки; В – ШИК-реакция отрицательна к коллагеновым волокнам, $\times 400$. Иммуногистохимическая реакция на: Г – Коллаген I типа; Д – Коллаген III типа; Е – Коллаген V типа, $\times 200$. Ж – ГВГ микроскопия участка дермы, $\times 600$

На основании морфологического анализа, выполненного с применением окрашивания пикрофуксином по Ван-Гизону и ГВГ-микроскопии, установлено, что поражённые СЛВ участки кожи отличаются по структуре коллагеновых пучков и волокон. В зависимости от характера деградации соединительной ткани по мере прогрессирования процесса были выделены три варианта повреждения при СЛВ: 1) Умеренный; 2) Выраженный; 3) Тяжелый [153; 154].

Умеренный вариант поражения дермы при СЛВ характеризуется формированием однородной зоны, состоящей из гомогенизирующихся

коллагеновых волокон. Отмечается утолщение базальной мембраны. Пораженный участок расположен непосредственно под эпидермисом, в области сосочковой дермы и не дифференцируется от окружающих не пораженных тканей при окрашивании гематоксилином и эозином (Рисунок 15 А). Глубина поражения дермы составила до 320 мкм. Отмечается утолщение базальной мембраны. При окрашивании пикрофуксином волокнистая структура ткани плохо визуализируется (Рисунок 14 Б). ШИК-реакция выявляет широкую зону отложения гликопротеинов под эпидермисом (Рисунок 14 В).

Иммуногистохимическое исследование демонстрирует выраженное диффузное окрашивание коллагена I, III типа в зоне поражения ткани (Рисунок 3 Г, Д). Коллаген V типа окрашивается в узкой зоне под базальной мембраной (Рисунок 14 Е).

Микроскопия ГВГ при умеренном варианте поражения дермы демонстрирует короткие фрагментированные 28 [22; 37] мкм, плотно расположенные коллагеновые волокна средней толщины 4 [3,4; 4,3] мкм (Рисунок 14 Ж).

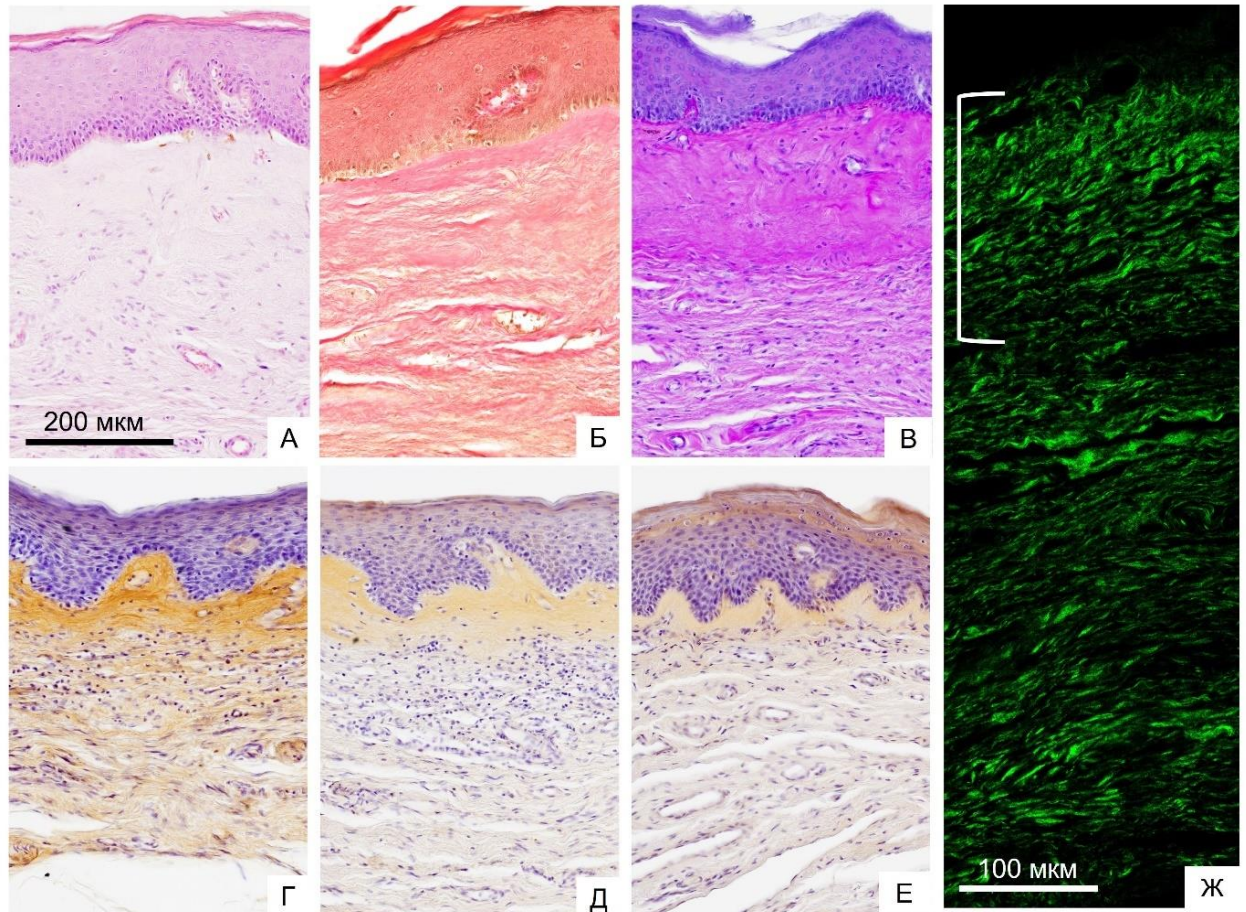


Рисунок 14 — Умеренное поражение кожи вульвы. А – окраска гематоксилином и эозином; Б – окраска по методу Ван-Гизона; В – ШИК-реакция $\times 200$. Иммуногистохимическая реакция на: Г – Коллаген I типа; Д – Коллаген III типа; Е – Коллаген V типа, $\times 200$. Ж – ГВГ микроскопия участка дермы (белая скобка указывает на субэпидермальный участок изменения коллагеновых волокон), $\times 400$

Выраженный вариант поражения дермы характеризуется образованием фокусов склеротических (гомогенных) масс или тонкой полосы склероза, которые расположены под эпидермисом. Зона склероза плохо дифференцируется от окружающих тканей при окраске гематоксилином и эозином (Рисунок 15 А). Однако ярко окрашивается фуксином в розовый цвет, что указывает на наличие коллагеновых волокон, несмотря на отсутствие волокнистой структуры дермы (Рисунок 15 Б). Возникающий в результате отек может раздвигать группы коллагеновых волокон или очаги однородных масс с образованием полостей. Максимальная глубина склероза в исследованном материале, достигала 370 мкм. ШИК-реакция окрашивает позитивно всю область склероза (Рисунок 15 В).

Иммуногистохимическое исследование демонстрирует выраженное окрашивание коллагена I, III и V типа в зоне поражения ткани (Рисунок 15 Г–Е).

Согласно данным ГВГ (Рисунок 15 Ж), зона склероза состоит из плотно расположенных очень тонких 0,8 [0,6; 0,9] мкм и коротких 23 [16; 28] мкм коллагеновых волокон (Рисунок 15 Ж, Рисунок 17 Б, Б1). За счет плотного расположения волокон данная область не имеет классической волокнистой структуры при окраске пикрофуксином. ГВГ-микроскопия позволяет обнаруживать сигналы от коллагеновых фибрилл с разрешением в 15 раз меньшим, чем оптическая микроскопия светлого поля [155]. Глубже зоны склероза лежат разрозненные толстые (5–7 мкм) коллагеновые волокна.

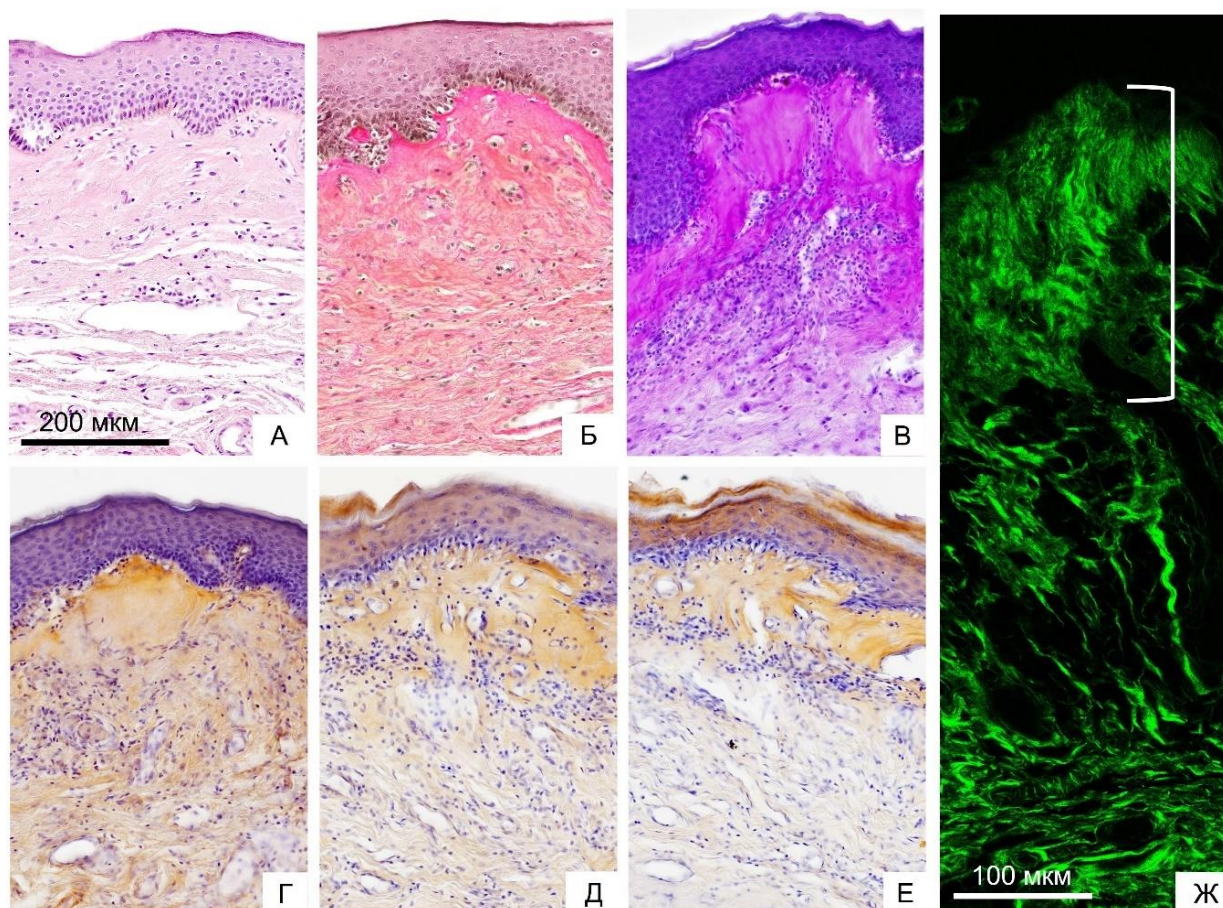


Рисунок 15 — Выраженное поражение кожи вульвы. А – окраска гематоксилином и эозином; Б – окраска по Ван-Гизону; В – ШИК-реакция, $\times 200$. Иммуногистохимическая реакция на: Г – Коллаген I типа; Д – Коллаген III типа; Е – Коллаген V типа; $\times 200$. Ж – ГВГ микроскопия участка дермы (белая скобка указывает на субэпидермальный участок изменения коллагеновых волокон), $\times 400$

Тяжелый вариант поражения кожи связан с наиболее выраженными и распространенными изменениями, в том числе, в глубоких отделах дермы, а также интенсивными деструктивными процессами в соединительной ткани. Отличительной особенностью тяжелого поражения кожи является образование обширной зоны склероза с различной степенью выраженности отека. Склеротическая ткань окрашивается фуксином, что указывает на наличие в этой зоне коллагеновых волокон, однако они не визуализируются при стандартных методах исследования (Рисунок 16 Б). Значительная глубина склероза достигает 800 мкм. ШИК-реакция в зоне склероза отрицательная, однако наблюдается окрашивание базальной мембраны эпидермиса и сосудистых стенок (Рисунок 16 В).

Иммуногистохимическое исследование демонстрирует выраженное окрашивание коллагена I, III и V типа в зоне поражения ткани (Рисунок 16 Г–Е). Наиболее интенсивное ИГХ окрашивание коллагена III типа наблюдалось вокруг кровеносных сосудов и под базальной мембраной эпидермиса.

Согласно сигналу ГВГ, очень тонкие 0,54 [0,45; 0,6] мкм, короткие 12 [10; 14] мкм беспорядочно расположенные волокна коллагена лежат непосредственно под эпидермисом и образуют однородную ткань различной плотности (Рисунок 16 Ж).

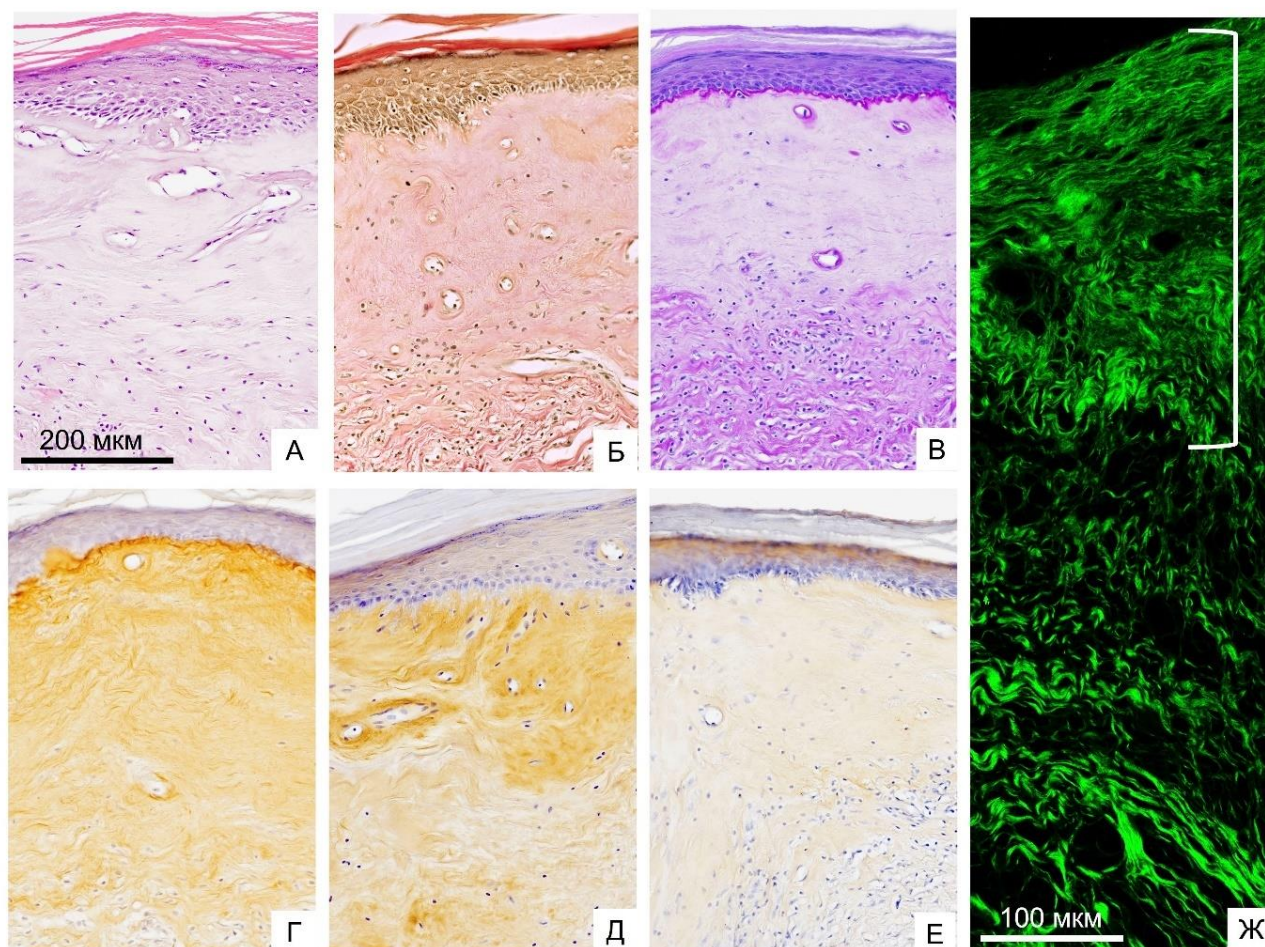


Рисунок 16 — Тяжелое поражение кожи вульвы. А – окраска гематоксилином и эозином; Б – окраска по методу Ван-Гизона; В – ШИК-реакция, $\times 200$. Иммуногистохимическая реакция на: Г – Коллаген I типа; Д – Коллаген III типа; Е – Коллаген V типа, $\times 200$. Ж – ГВГ микроскопия участка дермы (белая скобка указывает на субэпидермальный участок изменения коллагеновых волокон), $\times 400$

Таким образом, ГВГ - микроскопия продемонстрировала, что склеротическая ткань состоит из коллагеновых волокон, которые не визуализируются при оптической микроскопии светлого поля (Рисунок 17 А, Б). Отек при тяжелом СЛВ оттесняет коллаген, с формированием полости (Рисунок 17 В). Окрашивание пикрофуксином и ГВГ-микроскопия демонстрирует отложение коллагеновых волокон под базальной мембраной эпидермиса и вокруг сосудов (Рисунок 17 В, Г) [162, 163, 164].

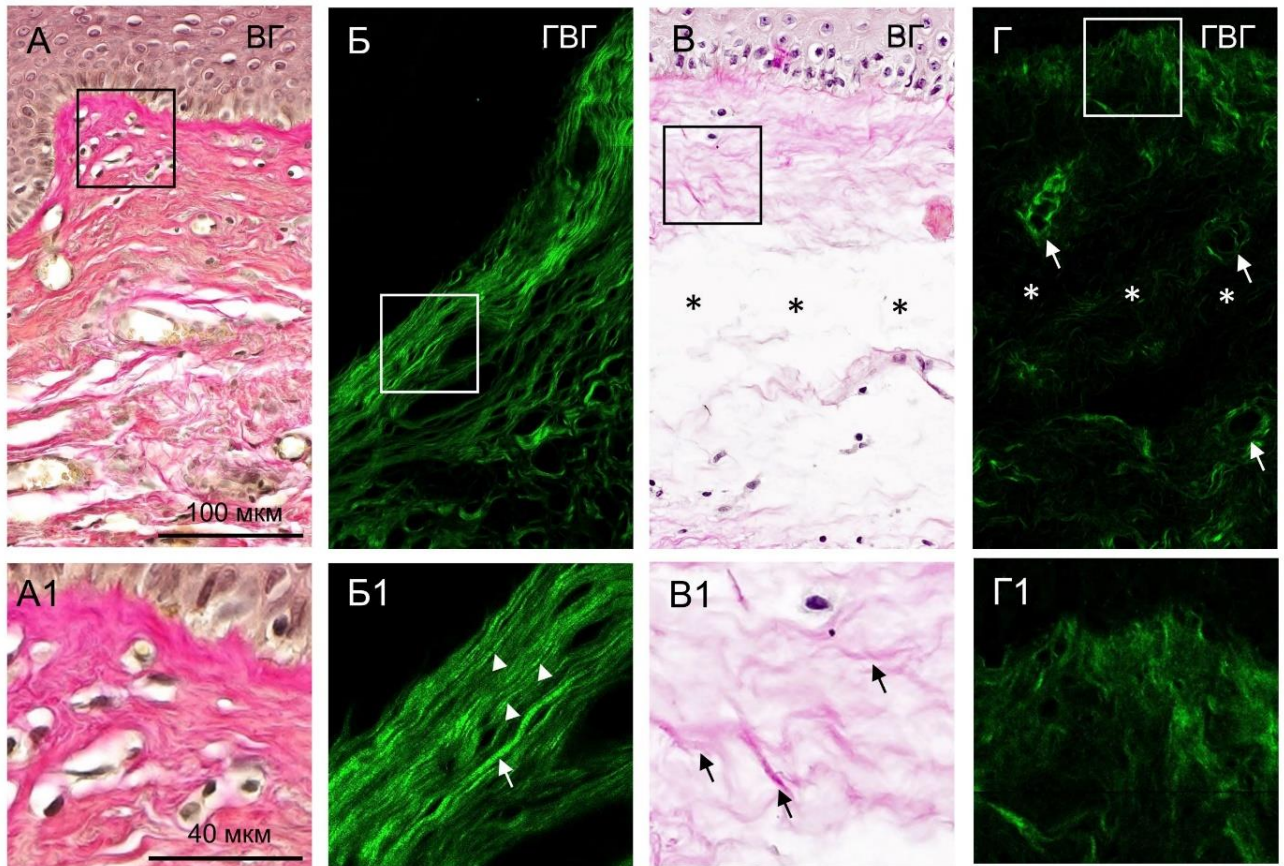


Рисунок 17 — Особенности визуализации коллагеновых волокон при умеренном и тяжелом поражении дермы. А – толстые коллагеновые пучки образуют зону склероза (гомогенизации), которая при умеренном поражении выглядит как субэпидермальную полосу (ВГ, $\times 400$), А1 – толстые, гомогенизированные коллагеновые пучки разделены отеком и воспалительными клетками (ВГ, $\times 800$); Б – ГВГ микроскопия соответствующей области демонстрирует структуру коллагеновых волокон (ГВГ, $\times 400$), Б1 – «гомогенизированные коллагеновые пучки» состоят из сгруппированных очень тонких коллагеновых волокон (толщина 0,4 – 0,75 мкм) (наконечники стрелок) и отдельных утолщенных волокон (толщина 1,5 мкм) (стрелка), ориентированная вдоль дермо-эпидермального соединения (ГВГ, $\times 800$); В – отек в дерме при СЛВ с тяжелым поражением, звездочки – отечная жидкость оттесняет однородную ткань и коллагеновые волокна (ВГ, $\times 400$), В1 – единичные утолщенные коллагеновые пучки (стрелки), на фоне однородных масс (ВГ, $\times 800$); Г – ГВГ-микроскопия соответствующей области демонстрирует полное отсутствие коллагеновых волокон в зоне отека (звездочки), однородные массы оттеснены к периферии, стрелки – отложение коллагеновых волокон вокруг сосудов (МФМ, $\times 400$), Г1 – однородные массы в области базальной мембраны сохранились и представлены тонкими или утолщенными волокнами без определенной ориентации (МФМ, $\times 800$)

3.1.3 Количественная оценка структуры и состава коллагеновых волокон по данным многофотонной микроскопии и иммуногистохимического исследования

Методом ГВГ-микроскопии выполнена количественная характеристика структуры коллагеновых волокон, включающая измерение их толщины, длины, средней интенсивности сигнала (показателя относительного содержания коллагена), а также оценку асимметрии сигнала и когерентности, отражающей степень упорядоченности волокон в заданном направлении (Рисунок 18).

Длина коллагеновых волокон уменьшалась от умеренного к тяжелому поражению, однако этот параметр статистически значимо не отличался от нормальной кожи вульвы (Рисунок 18 А). Толщина коллагеновых волокон была максимальной ($p < 0,05$) при умеренном варианте поражения дермы (Рисунок 6 Б). Самые тонкие волокна регистрировались при выраженном и тяжелом варианте поражения дермы. Они статистически отличаются от нормальной ткани вульвы ($p < 0,05$), но не дифференцируются между собой (Рисунок 18 Б).

Анализ трех параметров сигнала ГВГ (Средней интенсивности, Асимметрии, Когерентности) позволяет статистически достоверно дифференцировать группы СЛВ и количественно оценить изменения, происходящие в дерме.

Установлено, что нормальная кожа вульвы имеет стабильный и низкий уровень средней интенсивности и когерентности сигнала ГВГ ($p < 0,002$) (Рисунок 18 В, Д), а также высокий уровень асимметрии ($p < 0,002$) (Рисунок 18 Г). Это говорит о том, что ткань содержит небольшое количество коллагеновых волокон без определенного направления и с высокой степенью неоднородности.

Все варианты поражения статистически значимо отличаются друг от друга и от нормы ($p < 0,002$) по значению Средней интенсивности сигнала ГВГ (Рисунок 18 В). По мере нарастания степени ремоделирования дермы при СЛВ наблюдается увеличение средней интенсивности ГВГ-сигнала. ($p < 0,002$) (Рисунок 18 В). Это

указывает на увеличение концентрации гомотипических и гетеротипических волокон, содержащих коллаген I типа в области поражения.

Параметр асимметрии также позволяет статистически значимо отличать все группы от нормы (Рисунок 18 Г). По мере усиления деструкции коллагеновых волокон его значение снижается. Этот показатель отражает степень дисбаланса между яркими и тёмными пикселями относительно среднего уровня интенсивности сигнала. Наибольшие значения асимметрии выявлены в нормальной ткани вульвы ($p < 0,002$), где коллагеновые волокна располагаются разрозненно на тёмном фоне, что приводит к выраженному контрасту между яркими и тёмными пикселями. В склеротической зоне (выраженное и тяжёлое поражение) фон практически отсутствует: многочисленные тонкие волокна лежат плотно и формируют однородную структуру, вследствие чего дисбаланс минимален ($p < 0,009$).

Параметр когерентности не позволяет дифференцировать умеренный и выраженный вариант поражения (Рисунок 18 Д). Тяжелый вариант поражения с высокой когерентностью характеризуется наличием тонких, но ориентированных коллагеновых волокон. Варианты поражения с низкой когерентностью (умеренный и выраженный) содержат фрагментированные волокна или однородные структуры без выраженной направленности.

Таким образом, были сформулированы критерии, позволяющие достоверно дифференцировать каждый вариант поражения дермы при СЛВ. Умеренное поражение дермы по сравнению с нормальной кожей проявляется увеличением толщины волокон коллагена I типа (3,4–4,3 мкм; $p < 0,001$), увеличением средней интенсивности сигнала ГВГ (2309–2728 у.е.; $p = 0,002$) и увеличением когерентности сигнала ГВГ (0,04–0,05; $p = 0,002$).

Выраженное поражение дермы по сравнению с умеренным характеризуется уменьшением толщины волокон коллагена I типа (0,6–0,9 мкм; $p < 0,001$), повышением средней интенсивности сигнала ГВГ (6119–6680 у.е.; $p = 0,002$) и снижением асимметрии сигнала ГВГ (1,04–1,25 у.е.; $p = 0,002$).

Тяжёлое поражение дермы по сравнению с выраженным определяется уменьшением длины волокон коллагена I типа (10–14 мкм; $p = 0,03$), значительным

повышением средней интенсивности сигнала ГВГ (11456–13358 у.е.; $p = 0,002$) и увеличением когерентности сигнала ГВГ (0,16–0,20 у.е.; $p = 0,002$).

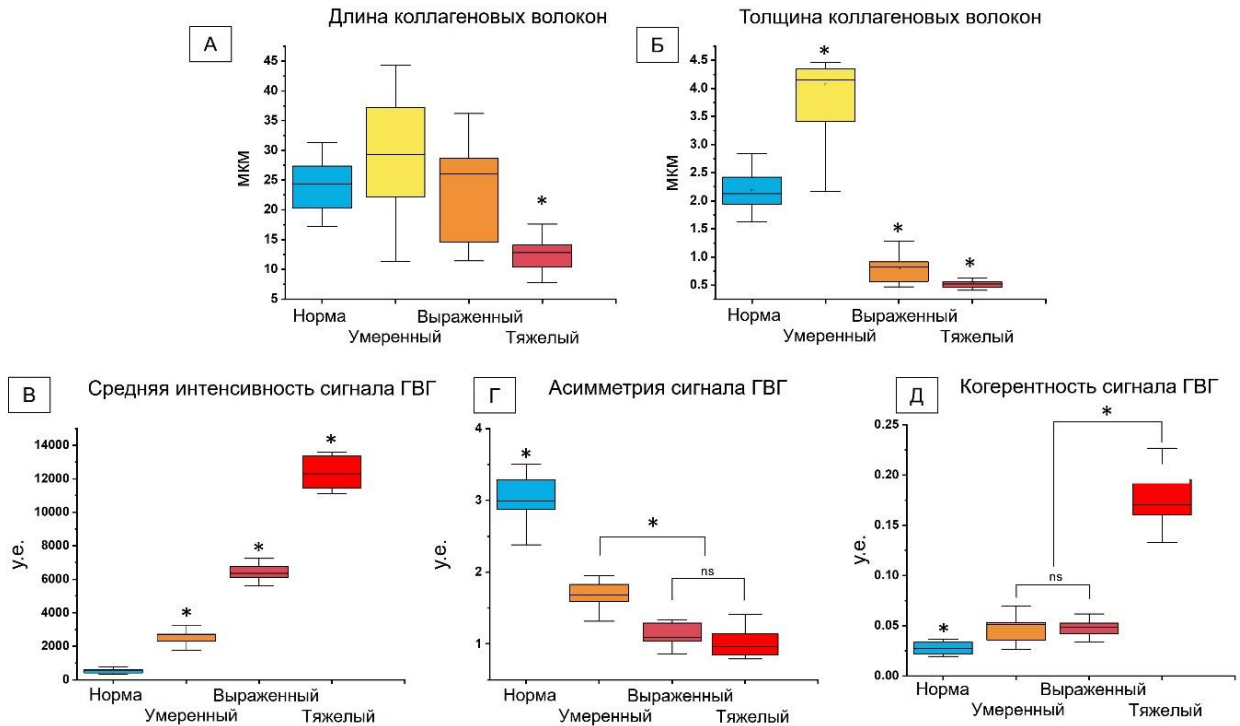


Рисунок 18 — Количественная оценка данных многофотонной микроскопии в режиме генерации второй гармоники. * – достоверное отличие между группами ($p < 0,05$). у.е. – условные единицы

Далее был рассчитан прогностический интервал — диапазон значений, в котором с вероятностью 95% будет находиться новое, вновь полученное наблюдение для соответствующих вариантов поражения СЛВ (Таблица 6). Такой интервал позволяет оценить ожидаемую вариабельность показателя в будущих измерениях и служит дополнительным инструментом для интерпретации клиничко-морфологических данных. Параметр средняя интенсивность ГВГ сигнала имеет наибольший диагностический потенциал, поскольку позволяет с высокой точностью отличать варианты поражения дермы от нормальной ткани вульвы и надежно дифференцировать тяжелый вариант поражения от менее выраженных

изменений. Умеренный и выраженный вариант поражения также можно дифференцировать друг от друга с помощью параметра средняя интенсивность ГВГ сигнала [153].

Таблица 6 — Значения 95% прогностических интервалов для количественной оценки параметров ГВГ сигнала

<i>95% прогностический интервал</i>	Норма	Умеренный	Выраженный	Тяжелый
Средняя интенсивность, у.е.	237–768	1505–3369	5153–7230	10000–13921
Асимметрия ГВГ сигнала, у.е.	2,3–3,6	1,0–2,2	0,8–1,4	0,5–1,5
Когерентность ГВГ сигнала, у.е.	0,02–0,04	0,02–0,07	0,03–0,06	0,07–0,31
Примечание: у.е. – условные единицы.				

3.1.4 Изучение патологических изменений эластических волокон дермы

В настоящее время отсутствует единое представление о характере изменений эластических волокон при СЛВ. Данное исследование показало, что в нормальной безволосой коже вульвы эластические волокна в сосочковом слое дермы представлены многочисленными тонкими, хаотично ориентированными структурами. В ретикулярной дерме их организация иная: волокна становятся более длинными, утолщёнными и располагаются преимущественно горизонтально, параллельно поверхности эпидермиса (Рисунок 19 А). ДВАФ-микроскопия демонстрирует наличие эластических волокон в нормальной коже вульвы и так же надёжно идентифицирует эластические волокна, как и окрашивание Орсеином (Рисунок 19 А1). В отличие от сигнала ГВГ, сигнал ДВАФ не специфичен для эластических волокон, однако было продемонстрировано, что нормальная кожа вульвы имеет преобладающую интенсивность сигнала от эластических волокон в

используемом диапазоне регистрации флуоресценции, данные наблюдения согласуются с результатами Hristu и др. [99], Huang и др. [103].

Суммируя изменения эластического компонента дермы при СЛВ, можно утверждать, что они неоднозначны. С одной стороны, в зоне склероза при выраженном и тяжелом поражении отмечается разрушение эластических волокон – эластолиз (Рисунок 19 Г, Г1, Д, Д1, Таблица 6). В глубокой дерме, вне основного очага поражения при СЛВ, эластические волокна могут претерпевать различные изменения, включая эластоз, эластолиз и разрастание эластических структур. Эластолиз, распространяющийся на всю толщу дермы (Рисунок 19 Г, Г1), выявлен в 36% образцов. Эластоз, характеризующийся формированием тонких, деформированных, извилистых аномальных эластических волокон, плотно заполняющих пространство под зоной поражения (Рисунок 19 В, В1), отмечен в 18% образцов. Разрастание эластических волокон (Рисунок 19 Б, Б1), отличается от эластоза тем, что волокна эластина имеют нормальную структуру. Волокна длинные, вытянуты вдоль дермо-эпидермального соединения. Разрастание эластических волокон наблюдалось в 15% образцов.

Изменение эластических волокон при Склероатрофическом лихене вульвы

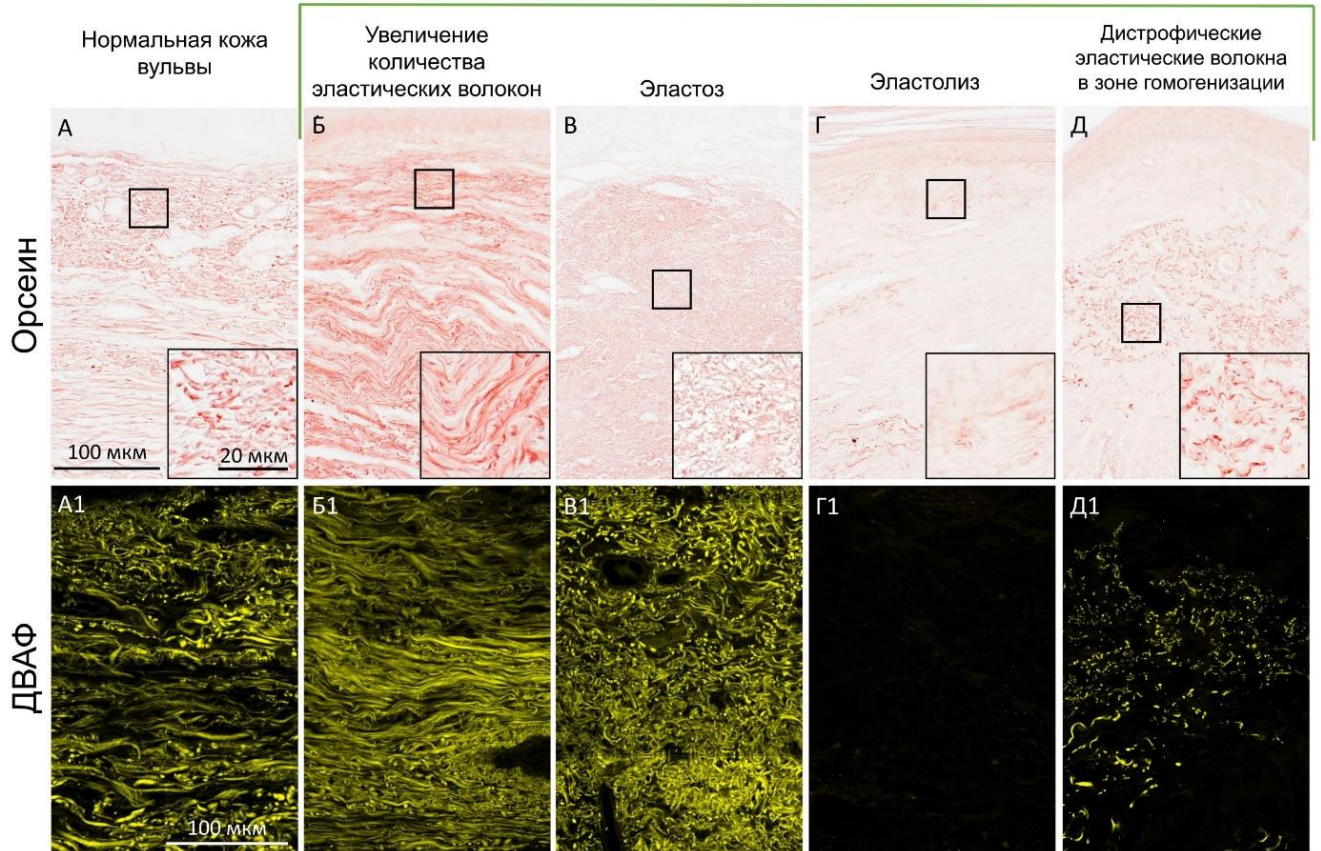


Рисунок 19 — Репрезентативный пример распределения эластических волокон в нормальной коже вульвы (А), а также патологические изменения при СЛВ (Б-Д): увеличение количества эластических волокон (Б, Б1), эластоз (В, В1), эластолиз (Г, Г1) в зоне поражения дермы, остаточные дистрофические эластические волокна в зоне поражения (Д, Д1)

3.1.5 Ассоциация морфологических характеристик склероатрофического лихена вульвы с вариантами поражения дермы

Для описания морфологических особенностей различных вариантов поражения дермы был проанализирован полный спектр структурных изменений, характерных для СЛВ (Таблица 1). В результате были выделены морфологические признаки, ассоциированные с вариантами поражения дермы (Таблица 7).

Морфологический анализ показал, что спектр эпидермальных и дермальных изменений существенно варьировал в зависимости от выраженности поражения

дермы при СЛВ. Несмотря на отсутствие статистически значимых различий в толщине эпидермиса между группами (Рисунок 20), качественные характеристики эпидермиса демонстрировали отчётливую тенденцию к нарастанию патологических изменений по мере утяжеления процесса. Так, спонгиоз отсутствовал в нормальной коже, но выявлялся у большинства образцов с умеренным и выраженным поражением и достигал 100 % при тяжёлом варианте (Таблица 7). Аналогичную динамику демонстрировало утолщение базальной мембраны: если в норме оно не встречалось, то при умеренном и выраженном вариантах наблюдалось в 90–91 % случаев, а при тяжёлом — у всех пациентов. Эти изменения отражают эпидермальную реакцию на дермальный фиброз и сосудистые нарушения, характерные для СЛВ.

В дерме различия между вариантами поражения были более выраженными и структурно значимыми. Склероз дермы отсутствовал в нормальной коже и при умеренном варианте, но становился отчётливо выраженным при переходе к выраженному варианту (144 ± 107 мкм) и достигал максимальных значений при тяжёлом варианте (598 ± 264 мкм) (Рисунок 20). При этом межфибриллярный отёк был характерен преимущественно для умеренного варианта (70 % образцов), тогда как при выраженном и тяжёлом вариантах он практически не встречался, уступая место другим типам дермальных изменений. Для тяжёлого варианта типичным было формирование обширного отёка с оттеснением коллагеновых волокон (100 % случаев), что отражает глубокую перестройку дермального матрикса. Воспалительный инфильтрат, оттесняющий коллаген, наиболее часто наблюдался при выраженном варианте (91 %), тогда как при тяжёлом варианте его частота снижалась, что согласуется с переходом воспалительной фазы в фазу плотного склероза. Лизис эластических волокон был редким при умеренном варианте (4 %), но присутствовал во всех образцах с выраженным и тяжёлым поражением, что подчёркивает необратимость структурных изменений в продвинутых стадиях (Таблица 7).

Изменения сосудистого русла также демонстрировали чёткую градацию. Плотность кровеносных и лимфатических сосудов была значительно снижена уже

при умеренном варианте и продолжала уменьшаться при выраженном и тяжёлом поражении, что подтверждает роль прогрессирующей сосудистой редукции в патогенезе СЛВ [156–158] (Рисунок 20). При тяжёлом варианте наблюдались дополнительные признаки сосудистой перестройки: телеангиоэктазии в зоне склероза (78 %), подэпителиальные кровоизлияния (81 %) и появление лимфангиомоподобных расширенных лимфатических сосудов (67 %). Эти изменения отражают глубокое нарушение микроциркуляции и лимфодренажа, характерное для поздних стадий заболевания.

Таким образом, совокупность эпидермальных, дермальных и сосудистых признаков, представленных в таблице 7, демонстрирует последовательный переход от минимальных структурных изменений к выраженной перестройке дермального матрикса и сосудистого русла. Наиболее информативными для дифференциации вариантов поражения оказались признаки, связанные с состоянием дермы и сосудов, тогда как эпидермальные изменения носили более вариабельный и менее специфичный характер.

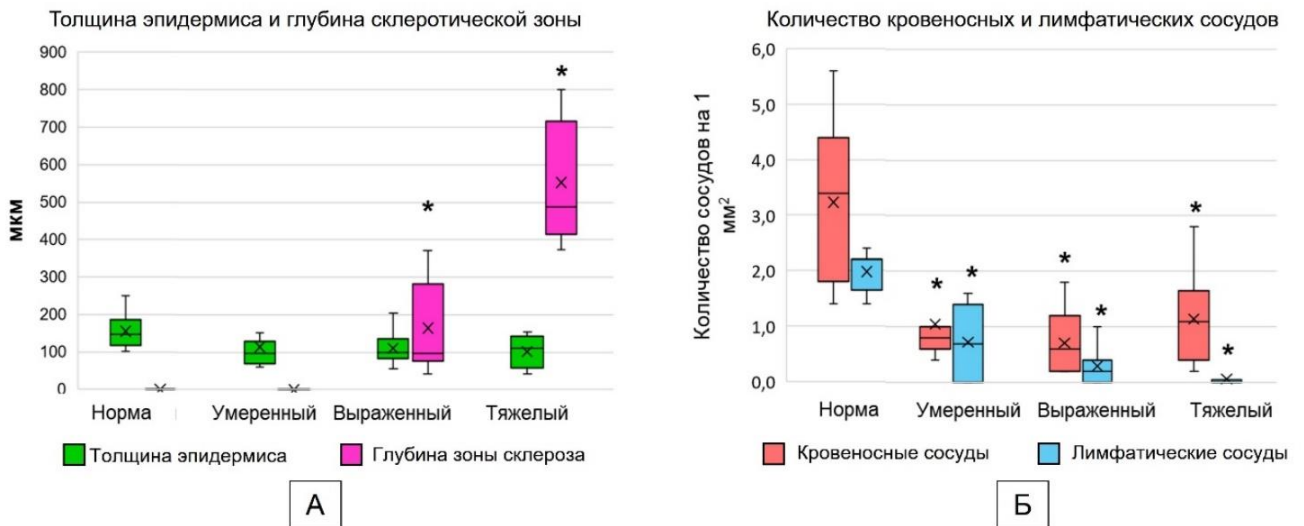


Рисунок 20 — Ассоциация толщины эпидермиса, глубины склеротической зоны и количества кровеносных и лимфатических сосудов в области поражения дермы. Подсчёт сосудов выполнялся в сосочковом слое на глубину до 350 мкм от дермо-эпидермального соединения. * — статистически значимые отличия вариантов поражения от нормальной кожи вульвы ($P < 0,05$)

Таблица 7 — Морфологические характеристики эпидермиса и дермы ассоциированные с вариантами поражения дермы при СЛВ

Важнейшие патологические изменения эпидермиса и дермы	Кожа без патологии	Умеренный вариант	Выраженный вариант	Тяжелый вариант
Эпидермис				
Толщина эпидермиса, мкм ± SD	162±57	114±66	100±36	101±44
Спонгиоз, %	0	70*	82*	100*
Утолщение базальной мембраны, %	0	90*	91*	100*
Дерма				
Глубина склероза (гомогенизации) дермы, мкм±SD	нет	нет	144±107 *	598±264 *
Межфибрилярный отек, %	0	70*	0	0
Обширный отек с оттеснением коллагена, %	0	0	18	100 *
Воспалительный инфильтрат, оттесняющий коллагеновые волокна, %	0	50	91 *	18
Лизис эластических волокон в зоне поражения, %	0	4	100*	100*
Сосудистое русло				
Плотность кровеносных сосудов, шт. на мм ²	32±14	11±9*	7±6*	11±8*
Плотность лимфатических сосудов, шт. на мм ²	20±3	7,3±7,3*	2,9±3,2*	0,6±1,3*
Телеангиоэктазии в зоне склероза, %	0	0	9	78*
Подэпителиальные кровоизлияния, %	0	0	8	81*
Лимфангиомоподобные, расширенные лимфатические сосуды, %	0	0	0	67*
Примечание: * – статистически значимое отличие от нормальной кожи вульвы (P < 0,05); SD – стандартное отклонение, % – процент образцов из общей выборки в которых присутствовали указанные патологические изменения.				

3.2 Оптическая когерентная томография для неинвазивной диагностики морфологических вариантов склероатрофического лишена вульвы

На данном этапе было выполнено прижизненное ОКТ-исследование и оценены эпидермис и дерма нормальной кожи вульвы, а также патологические изменения при СЛВ. Проведено сопоставление ОКТ-картины с морфологическими изменениями тканей. Эпидермис и дерма рассматривались отдельно, поскольку их патологические изменения при СЛВ не всегда коррелируют между собой. Такой подход позволил более точно оценить особенности поражения каждого слоя и выявить различия между ОКТ-картиной и гистологическими изменениями тканей.

3.2.1 Использование структурных изображений и карт коэффициента затухания сигнала оптической когерентной томографии для оценки эпидермиса

Эпидермис нормальной кожи вульвы на ОКТ-изображениях определяется как полоса с низкой интенсивностью сигнала. На цветокодированных картах коэффициента затухания ОКТ сигнала он также характеризуется низкими значениями (синий цвет) (Рисунок 21 А, Б). По поверхности эпидермиса нередко визуализируется тонкий слой с высоким уровнем сигнала, который образуется в результате преломления излучения при переходе из окна зонда в роговой слой. Визуализируется контрастная граница между эпидермисом и папиллярной дермой. Стоит отметить, что эпидермальные и дермальные сосочки не визуализируются, вероятно из-за недостаточного разрешения и схожих оптических свойств. На Рисунок 21 В, Г проводится прицельное сравнение толщины эпидермиса на картах коэффициента затухания ОКТ сигнала и соответствующем гистологическом изображении, масштаб изображений и длина стрелок идентичные [159].

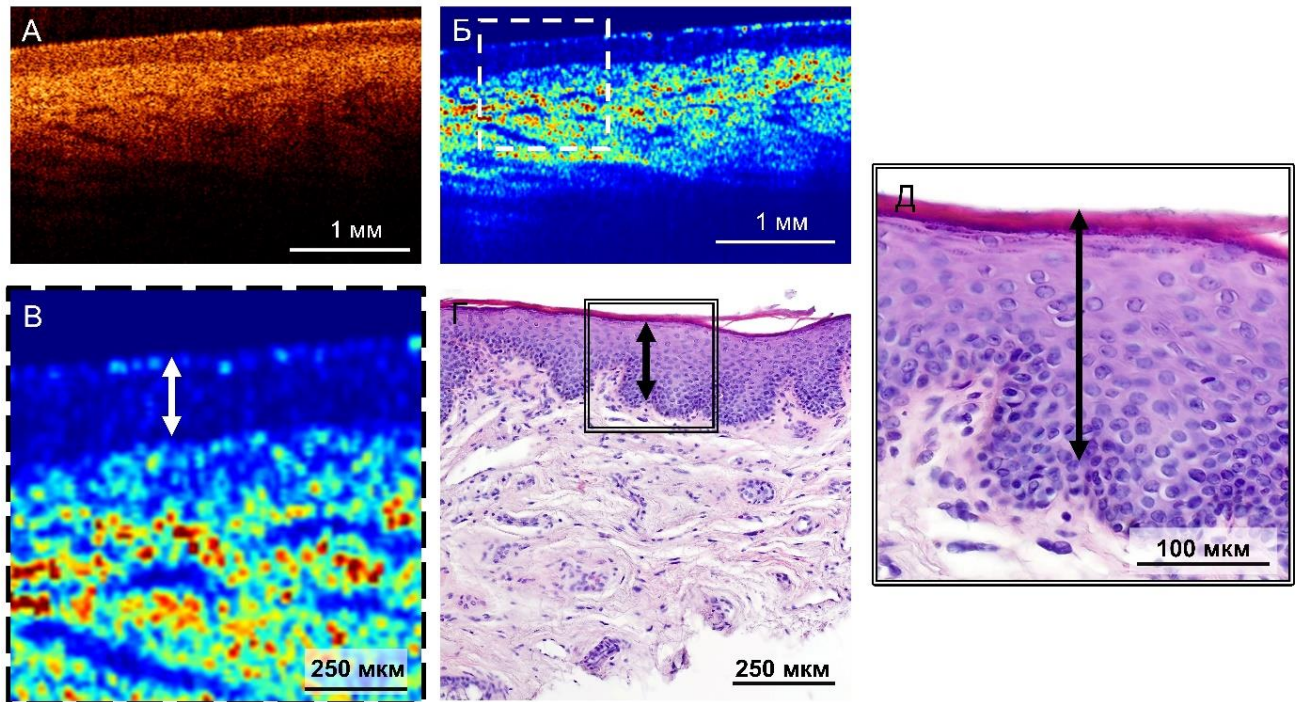


Рисунок 21 — Оптическая когерентная томография (А-В) и гистологическое исследование соответствующего участка нормальной кожи вульвы (Г-Д). А – ОКТ изображение; Б – карта коэффициента затухания ОКТ сигнала; В – увеличенный фрагмент карты затухания, белая стрелка указывает на толщину эпителия, эпителиальные гребни не визуализируются; Г – гистологическое изображение в масштабе, соответствующем фрагменту карты затухания ОКТ сигнала; Д – увеличенный фрагмент гистологического изображения демонстрирует структуру эпителия

Изменения, связанные с атрофией эпидермиса, визуализируются как снижение толщины эпидермиса на ОКТ изображениях и картах коэффициента затухания ОКТ сигнала. При этом уровень сигнала и значения коэффициента затухания ОКТ сигнала от эпителия сохраняются низкими (Рисунок 22).

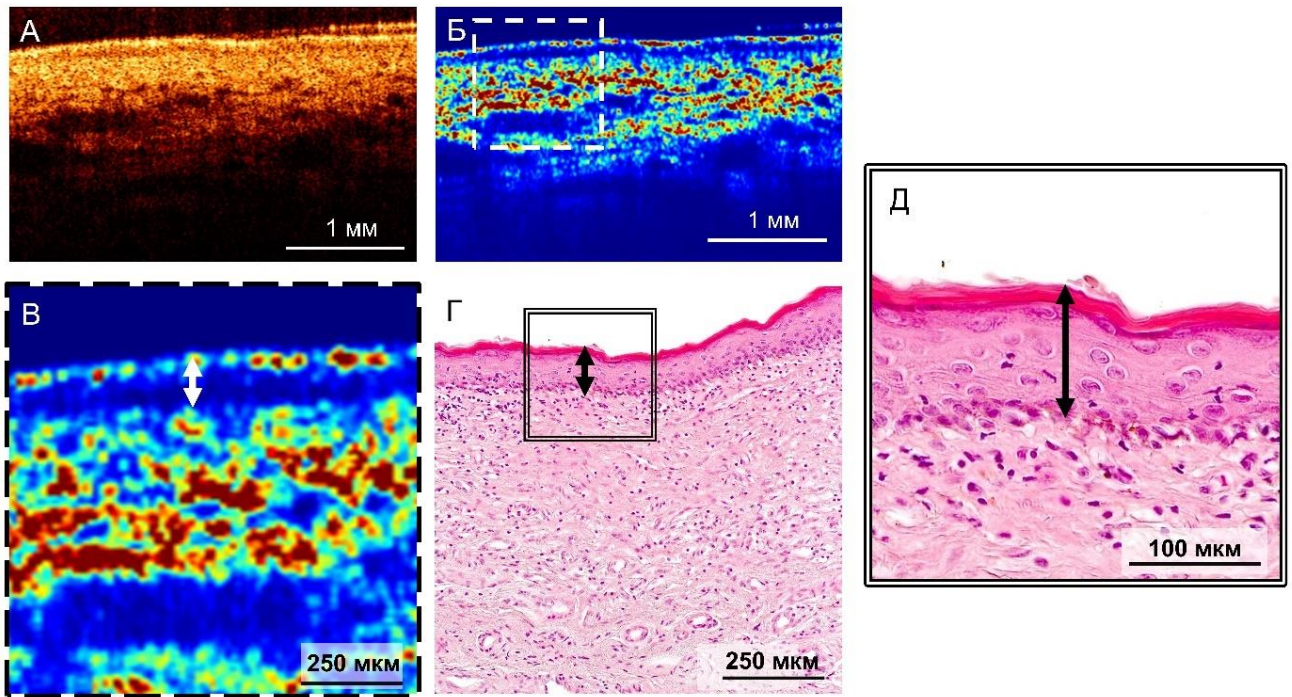


Рисунок 22 — Оптическая когерентная томография (А-В) и гистологическое исследование соответствующего участка кожи СЛВ с атрофией эпидермиса (Г-Д). А – ОКТ-изображение; Б – карта коэффициента затухания ОКТ сигнала; В – увеличенный фрагмент карты затухания, белая стрелка указывает на толщину эпителия; Г – гистологическое изображение в масштабе, соответствующем фрагменту карты затухания ОКТ сигнала; Д – увеличенный фрагмент гистологического изображения демонстрирует структуру атрофичного эпителия

ОКТ исследование кожи с дистрофическими изменениями эпидермиса демонстрирует очень высокие значения коэффициента затухания ОКТ-сигнала от эпидермиса [160]. При сопоставлении с гистологической картиной было продемонстрировано, что слой с высокими значениями коэффициента затухания сигнала соответствует совокупности рыхлого рогового, гранулярного и верхней 2/3 шиповатого слоя (Рис 23 А, Г, Д, большая стрелка). При этом нижняя 1/3 шиповатого слоя и базальный слой эпидермиса соответствовала области с низким сигналом (Рис 23 А, Г, Д, малая стрелка). Такие изменения наблюдались только при тяжелом варианте поражения дермы, таким образом на ОКТ изображениях контрастная граница пролегает в шиповатом слое эпидермиса, а граница эпидермиса и дермы отсутствует. Это делает невозможным точное определение толщины эпидермиса по данным ОКТ. Вероятно, такие значительные изменения

затухания сигнала в верхних слоях эпидермиса связано с нарушением процесса созревания эпителия и накоплением гранул кератогиалина в верхней части шиповатого слоя и гранулярного слоя. Нарушение процесса ороговения также отражается в изменении паттерна экспрессии кератинов при СЛВ [161]. Высокие значения коэффициента затухания ОКТ-сигнала в роговом слое связаны с его рыхлой структурой, что приводит к множественному переходу света между средами с разным коэффициентом преломления [157; 159].

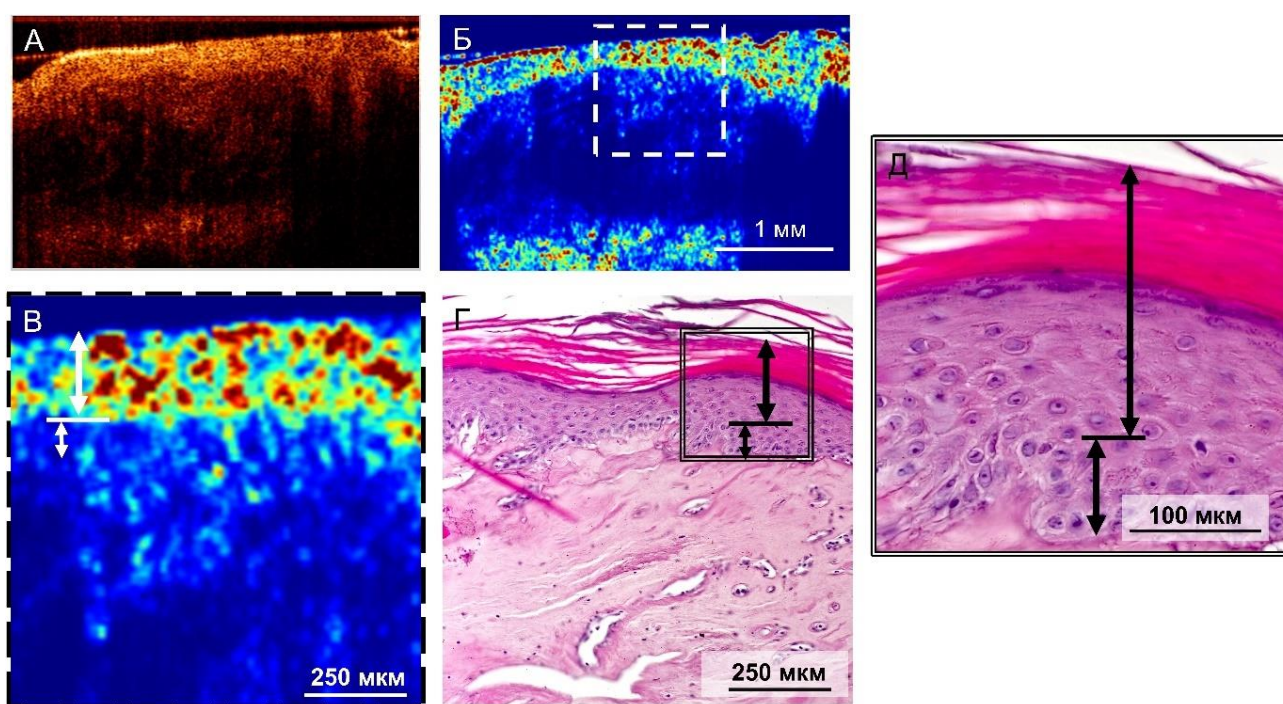


Рисунок 23 — Оптическая когерентная томография (А-В) и гистологическое исследование соответствующего участка кожи СЛВ с дистрофическими изменениями эпидермиса (Г-Д). А – ОКТ-изображение; Б – карта коэффициента затухания ОКТ сигнала; В – увеличенный фрагмент карты затухания, большая белая стрелка указывает на слой эпидермиса с высоким затуханием ОКТ сигнала, малая стрелка указывает на гипотетический слой с низким затуханием ОКТ сигнала; Г – гистологическое изображение в масштабе соответствующем фрагменту карты затухания ОКТ сигнала; Д – увеличенный фрагмент гистологического изображения, длинная стрелка указывает на клеточные слои формирующие высокие значения затухания ОКТ сигнала (роговой, гранулярный, верхняя часть шиповатого), короткая стрелка указывает на слои эпидермиса с низким сигналом (нижняя часть шиповатого слоя со спонгиозом, базальный слой с гидропической дистрофией)

3.2.2 Использование структурных изображений и карт коэффициента затухания сигнала оптической когерентной томографии для оценки дермы

Продемонстрировано, что ОКТ обеспечивает возможность эффективно визуализировать нормальную кожу вульвы на глубину до 1250 мкм, что позволяет оценить сосочковый и ретикулярный слой дермы, а также контрастных включений в виде лимфатических сосудов папиллярного сплетения [162; 163].

На структурных ОКТ изображениях дерма кожи представляет собой единый слой, однако, на картах коэффициента затухания ОКТ сигнала визуализируется папиллярная и ретикулярная дерма. Папиллярная дерма имеет распределение синих и зеленых цветовых значений, толщина составила 189 ± 85 мкм, что примерно соответствует гистологическим данным [163]. Ниже визуализируется ретикулярная дерма, которая имеет распределение зеленых и красных цветовых значений с включением лимфатических сосудов. Значение коэффициента затухания, рассчитанное для папиллярной и ретикулярной дермы, составило $7,95 [7,05; 9,2]$ мм⁻¹.

Кровеносные сосуды в дерме содержат эритроциты, которые обладают выраженной способностью рассеивать ОКТ-излучение. В результате такие сосуды практически не визуализируются ни на ОКТ-изображениях, ни на картах коэффициента затухания ОКТ сигнала, поскольку сигнал от них теряется на фоне сходного сигнала дермы. Лимфатические сосуды, напротив, заполнены лимфой, прозрачной для зондирующего ОКТ-сигнала. Из-за низкого уровня рассеяния они характеризуются минимальными значениями коэффициента затухания, поэтому на ОКТ-изображениях лимфатические сосуды хорошо контрастируются на фоне дермы. Они визуализируются как узкие, щелевидные структуры с пониженной интенсивностью сигнала (Рисунок 24 А), соответствующими низкими значениями коэффициента затухания (Рисунок 24 Б, жёлтые стрелки). Их морфология на ОКТ-изображениях согласуется с гистологической картиной лимфатических сосудов (Рисунок 24 Г) [158].

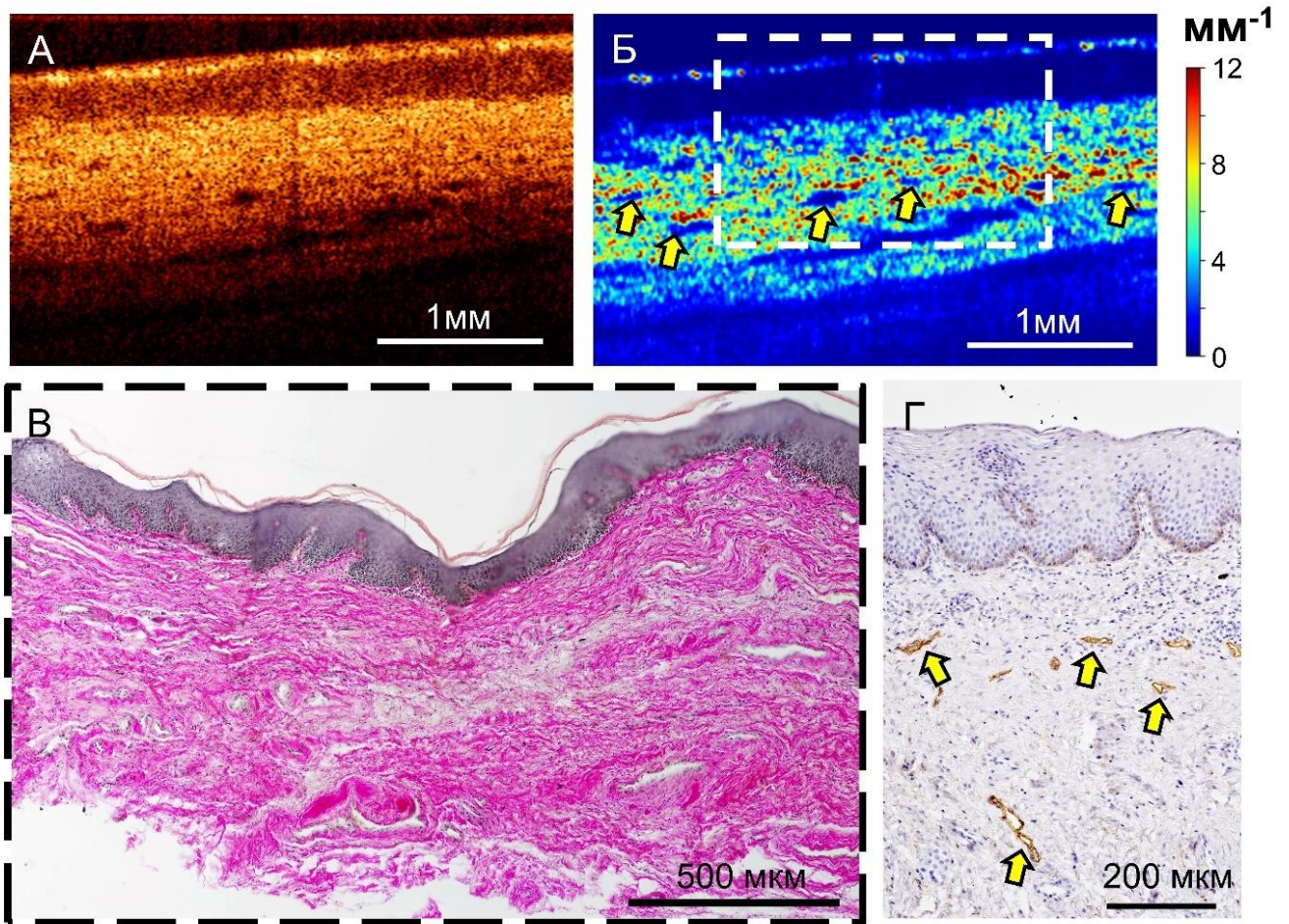


Рисунок 24 — Оптическая когерентная томография (А-Б), гистологическое и иммуногистохимическое исследование соответствующего участка нормальной кожи вульвы (В-Г). А – ОКТ-изображение; Б – карта коэффициента затухания ОКТ сигнала, желтые стрелки указывают на щелевидные включения, соответствующие лимфатическим сосудам, белая рамка соответствует масштабу гистологического изображения; В – соответствующее гистологическое изображение (ВГ, $\times 100$); Г – иммуногистохимическое исследование выявляет группу щелевидных лимфатических сосудов (желтые стрелки) папиллярного сплетения дермы (Подопланин, $\times 400$)

При умеренном варианте поражения кожи на ОКТ изображениях снижена контрастность дермо-эпидермальной границы, а также не визуализируются лимфатические сосуды в дерме. На картах коэффициента затухания ОКТ сигнала граница между папиллярной и ретикулярной дермой отсутствует, присутствует включение мелких лимфатических сосудов в глубоких слоях дермы (Рисунок 25). Значения коэффициента затухания сигнала от дермы составил $6,8 [6,1; 7,80] \text{ мм}^{-1}$.

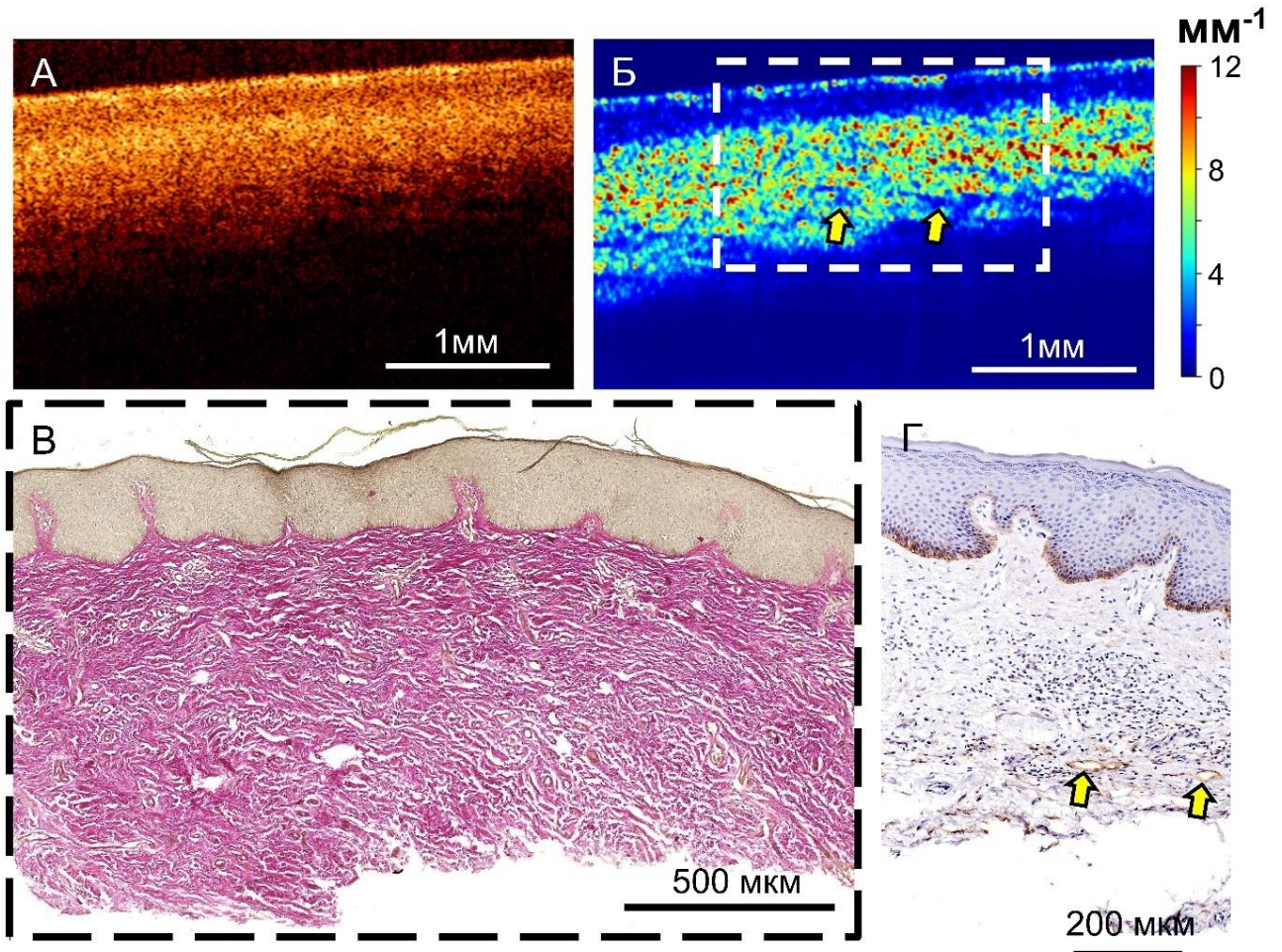


Рисунок 25 — Оптическая когерентная томография (А-Б), гистологическое и иммуногистохимическое исследование соответствующего участка кожи вульвы (В-Г) при умеренном варианте поражении СЛВ. А – ОКТ-изображение; Б – карта коэффициента затухания ОКТ сигнала, единичные лимфатические сосуды лежат в глубоком слое дермы (желтые стрелки), белая рамка соответствует масштабу гистологического изображения; В – соответствующее гистологическое изображение, наблюдается поражение дермы в виде фиброза – утолщения коллагеновых пучков (ВГ, $\times 100$); Г – иммуногистохимическое исследование выявляет единичные щелевидные лимфатические сосуды (желтые стрелки) в глубоких слоях дермы (Подопланин, $\times 400$)

Выраженный вариант поражения характеризуется формированием зоны склероза в субэпидермальном слое дермы. На ОКТ-изображениях зона склероза не визуализируется, граница между эпидермисом и дермой не контрастируется. Однако цветочисленные карты предоставляют больше информации. Во-первых, можно наблюдать слабоконтрастную границу между эпидермисом и подлежащей областью склеротических коллагеновых пучков, во-вторых, данная

область имеет четкую, контрастную границу с подлежащей дермой с сохранной структурой коллагеновых пучков. Значения коэффициента затухания в пораженной части дермы составили $4,47 [3,75; 4,89] \text{ мм}^{-1}$. Глубина склероза дермы по данным ОКТ составляет 456 ± 171 мкм. В пораженном участке дермы лимфатические сосуды не визуализируются ни на ОКТ-изображениях, ни на картах коэффициента затухания ОКТ-сигнала, отсутствие лимфатических сосудов подтверждается ИГХ исследованием (Рисунок 26 Г). В нижележащей дерме с сохранной волокнистой структурой присутствуют единичные лимфатические сосуды, визуализируемые на картах коэффициента затухания ОКТ сигнала (Рисунок 26 Б, желтые стрелки).

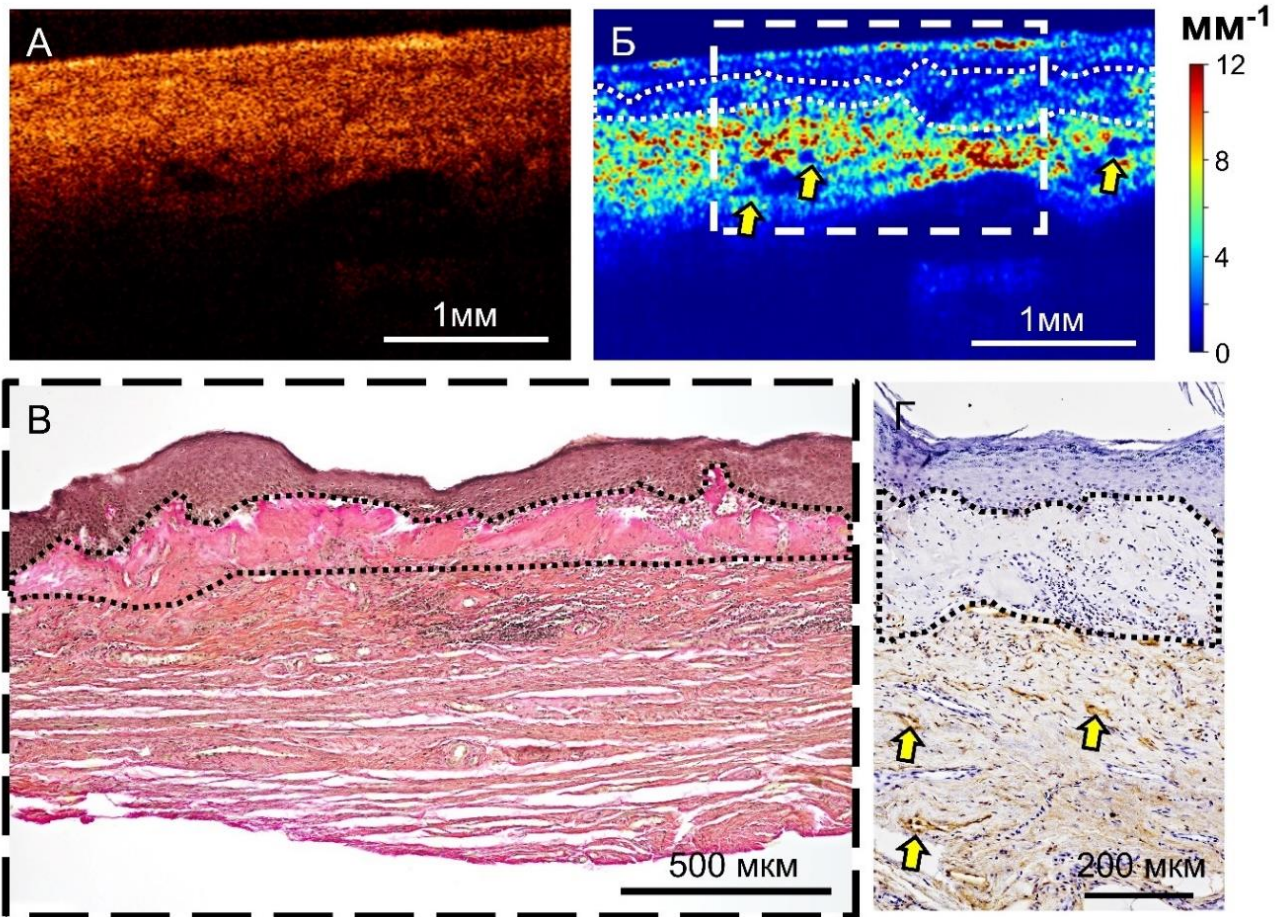


Рисунок 26 — Оптическая когерентная томография (А-Б), гистологическое и иммуногистохимическое исследование соответствующего участка кожи вульвы (В-Г) при выраженном варианте поражении СЛВ. А – ОКТ-изображение; Б – карта коэффициента затухания ОКТ сигнала, белым пунктиром выделена область склероза коллагеновых пучков, единичные лимфатические сосуды лежат в глубоком слое дермы (желтые стрелки), ниже зоны склероза, белая рамка соответствует масштабу гистологического изображения; В – соответствующее гистологическое изображение, наблюдается поражение дермы в виде склероза коллагеновых пучков – черный пунктир (ВГ, $\times 100$); Г – иммуногистохимическое исследование выявляет единичные щелевидные лимфатические сосуды (желтые стрелки) в глубоких слоях дермы (Подопланин, $\times 400$)

При тяжелом варианте поражения кожи вульвы наблюдается формирование обширной склеротической зоны гомогенизации дермы, что приводит к снижению уровня сигнала и значений коэффициента затухания сигнала (Рисунок 27 А, Б). На ОКТ-изображениях отсутствует контрастная дермо-эпидермальна́я граница и в целом, данные изображения мало информативны. На картах коэффициента затухания ОКТ сигнала визуализируется зона склероза, которая окрашена в синий

и голубой цвета, значения коэффициента затухания составили $2,04 [0,8; 2,6] \text{ мм}^{-1}$. Глубина зоны склероза, измеренная на картах коэффициента затухания ОКТ-сигнала, составила $875 \pm 248 \text{ мкм}$. Лимфатические сосуды на ОКТ изображениях не визуализируются. Однако по данным ИГХ исследования сосуды присутствуют ниже зоны поражения дермы, а также единичные сосуды могут находиться в склеротической ткани [158].

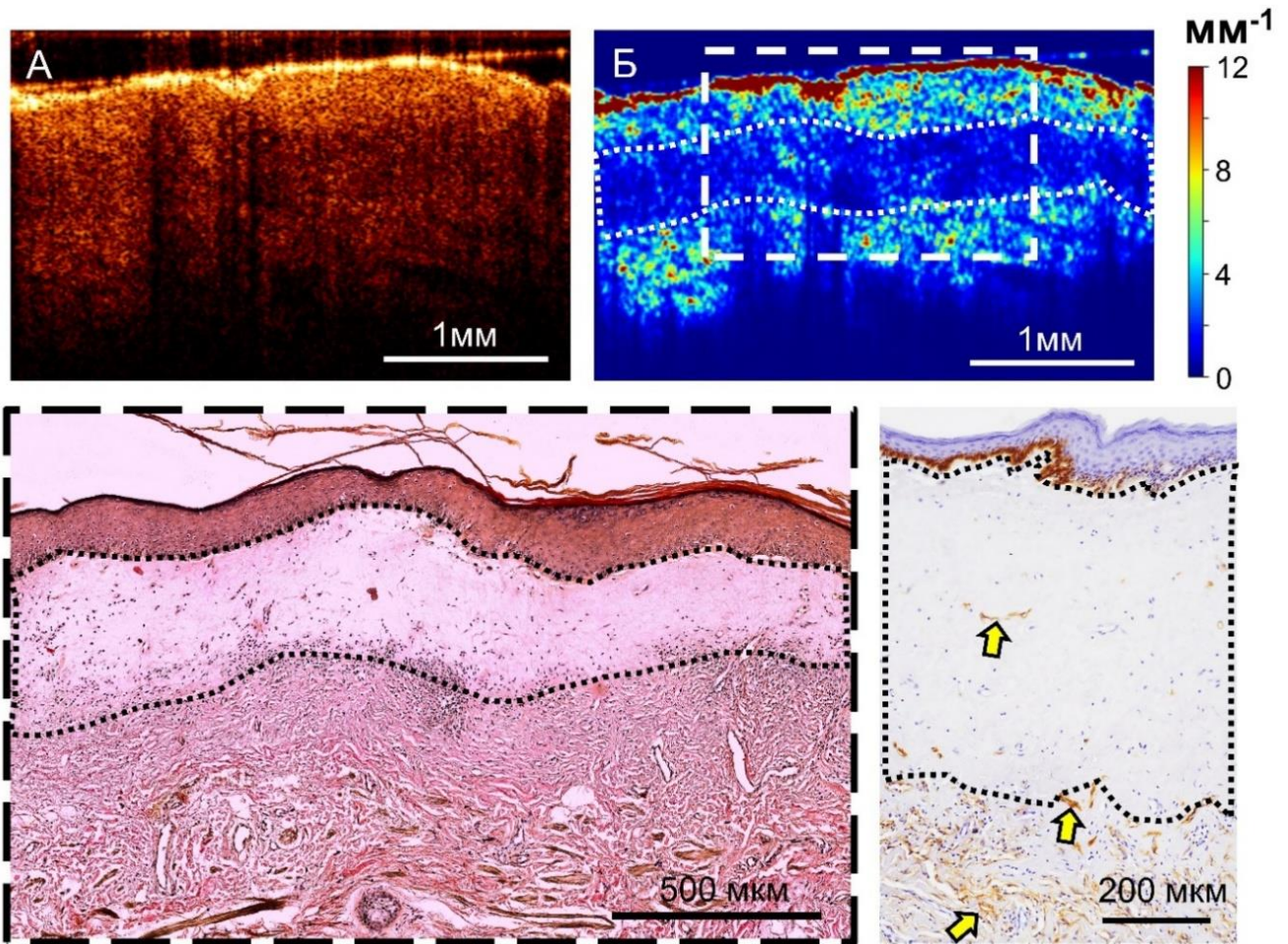


Рисунок 27 — Оптическая когерентная томография (А-Б), гистологическое и иммуногистохимическое исследование соответствующего участка кожи вульвы (В-Г) при тяжелом варианте поражении СЛВ. А – ОКТ-изображение; Б – карта коэффициента затухания ОКТ сигнала, белым пунктиром выделена область склероза коллагеновых пучков, белая рамка соответствует масштабу гистологического изображения; В – соответствующее гистологическое изображение, наблюдается поражение дермы в виде склероза коллагеновых пучков – черный пунктир (ВГ, $\times 100$); Г – иммуногистохимическое исследование выявляет единичные щелевидные лимфатические сосуды (желтые стрелки) в области склероза и глубоких слоях дермы (Подопланин, $\times 400$)

Тяжелый вариант поражения кожи вульвы может сопровождаться выраженными, четко ограниченными областями отека в дерме. Области отека хорошо визуализируются на ОКТ-изображениях, так как имеют крайне низкий, уровень сигнала, соответствующий фоновому. На картах коэффициента затухания ОКТ сигнала области отека окрашены однотонно в темно синий цвет (Рисунок 28 Б, двойные линии), и контрастируют даже на фоне склероза дермы (Рисунок 28 Б, пунктирная линия) [158]. Значения коэффициента затухания сигнала для области отека составило $0,6 [0,35; 1,2] \text{ мм}^{-1}$ [157; 164; 165].

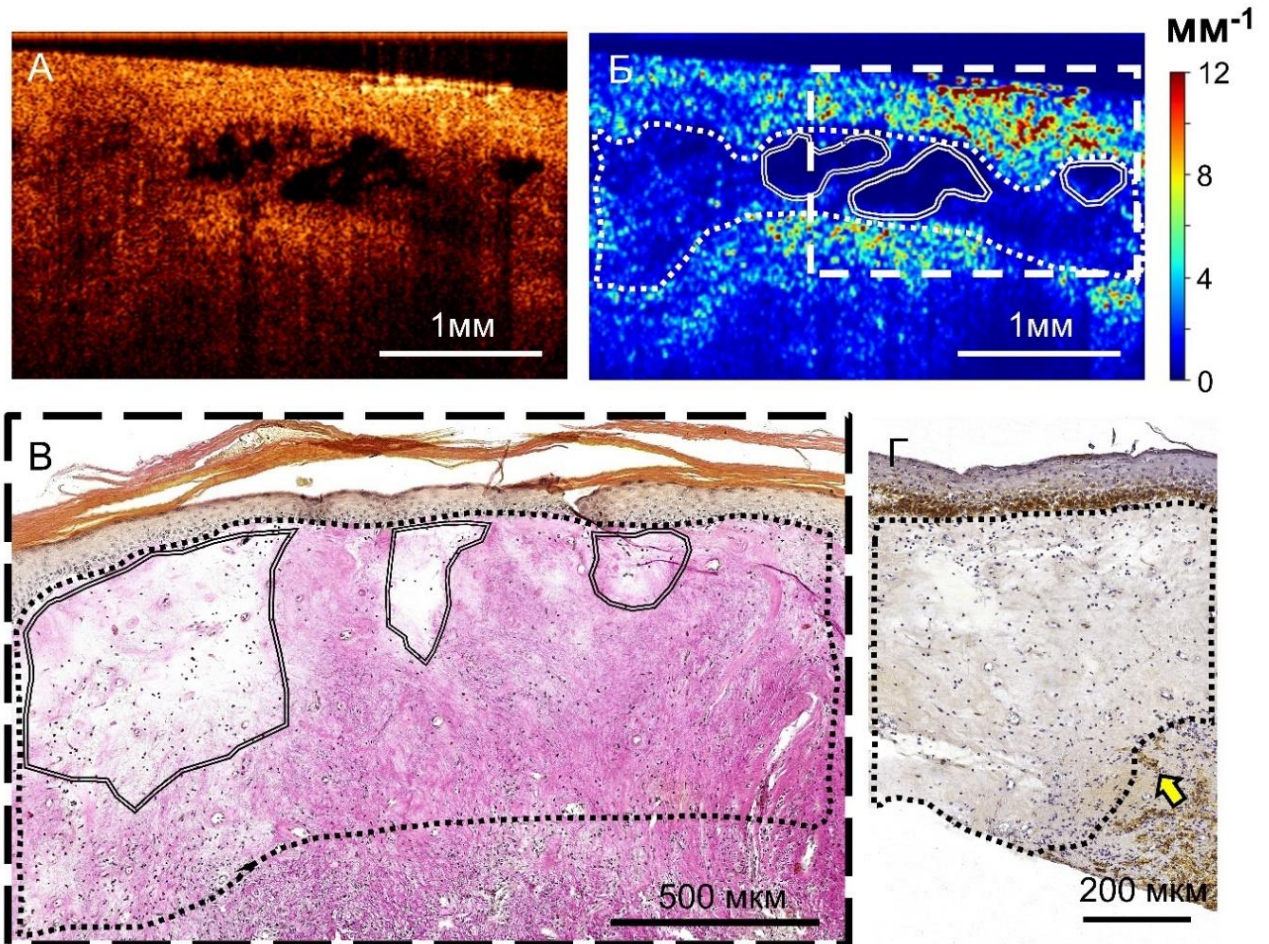


Рисунок 28 — Оптическая когерентная томография (А-Б), гистологическое и иммуногистохимическое исследование соответствующего участка кожи вульвы (В-Г) при тяжелом варианте поражении СЛВ с отеком дермы. А – ОКТ-изображение; Б – карта коэффициента затухания ОКТ сигнала, белым пунктиром выделена область склероза коллагеновых пучков, белой двойной линией обозначены области отека дермы, белая рамка соответствует масштабу гистологического изображения; В – соответствующее гистологическое изображение, наблюдается поражение дермы в виде склероза коллагеновых пучков – черный пунктир, двойные черные линии ограничивают зоны отека дермы (ВГ, $\times 100$); Г – иммуногистохимическое исследование выявляет единичные щелевидные лимфатические сосуды (желтые стрелки) в глубоких слоях дермы (Подопланин, $\times 400$)

3.2.3 Количественная оценка коэффициента затухания сигнала оптической когерентной томографии для диагностики вариантов склероатрофического лишена вульвы

Количественная оценка коэффициента затухания ОКТ-сигнала показала статистически значимые различия для выраженного и тяжёлого варианта поражения дермы (Рисунок 29). Однако для умеренного варианта поражения статистическая значимость выявлена не была. Вероятнее всего, это связано с сочетанием двух противоположно направленных процессов — утолщением коллагеновых пучков и межфибриллярным отёком при умеренном варианте поражения. Межфибриллярный отёк снижает значения коэффициента затухания ОКТ-сигнала, тогда как утолщение и уплотнение коллагеновых структур, напротив, повышают его. В результате эти эффекты частично компенсируют друг друга, и итоговые значения коэффициента затухания остаются близкими к нормальным.

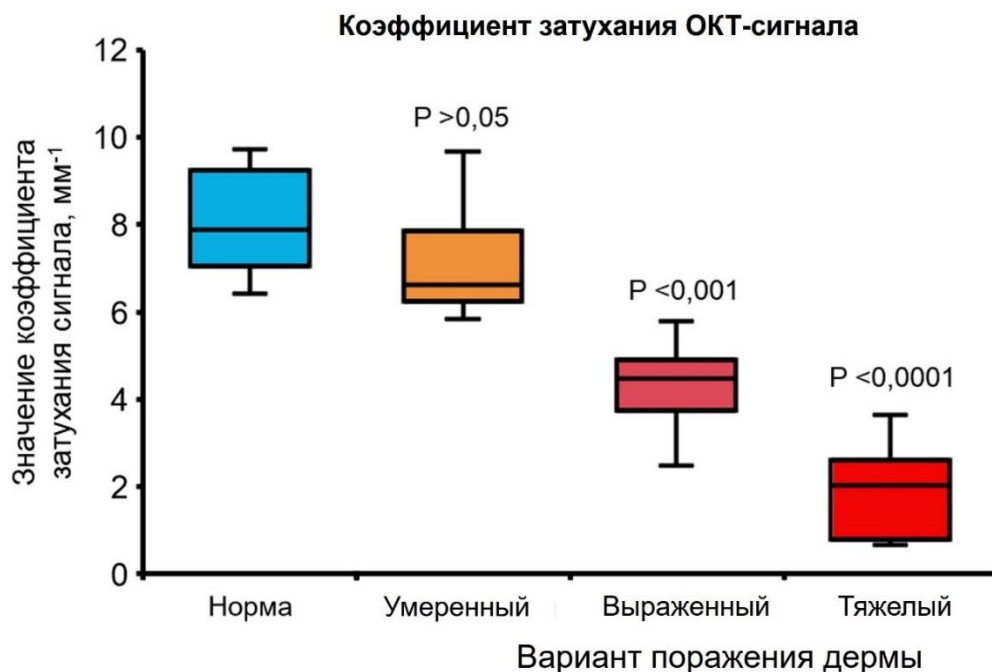


Рисунок 29 — Коэффициент затухания ОКТ-сигнала в сосочковой дерме при разных вариантах поражения

Для сопоставления полуколичественных данных интенсивности ИГХ-окрашивания коллагена I, III и V типов в дерме были построены диаграммы типа «ящик с усами» (Рисунок 30). На них значения коэффициента затухания ОКТ-сигнала распределены в соответствии с полуколичественными категориями экспрессии (0+, 1+, 2+, 3+). Такой формат визуализации позволяет наглядно продемонстрировать, как степень выраженности коллагенового окрашивания соотносится с изменениями коэффициента затухания ОКТ-сигнала и отражает влияние состава межклеточного матрикса на оптические свойства ткани. Таким образом, наблюдается достоверное снижение коэффициента затухания сигнала относительно нормальной дермы (1+ балл) при ИГХ окрашивании коллагена I типа 3+ балла. Достоверное снижение коэффициента затухания сигнала происходит при ИГХ окрашивании коллагена III и V типов относительно нормальной дермы (0+) при 2+ баллах.

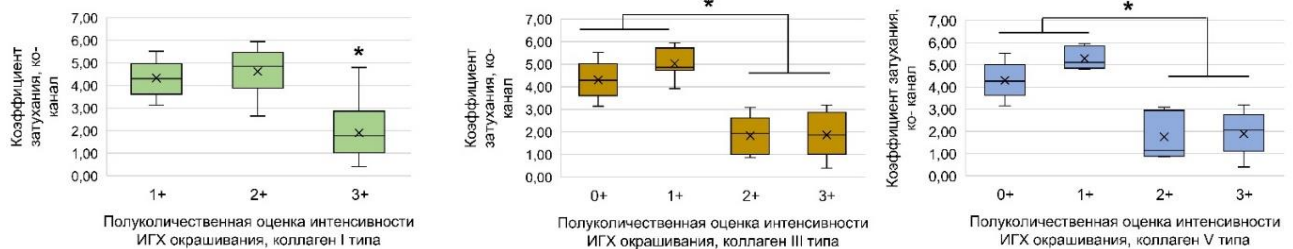


Рисунок 30 — Значения коэффициента затухания ОКТ сигнала в дерме сгруппированные в зависимости от полуколичественной оценки экспрессии коллагена I, III, V типов в зоне поражения дермы. * – статистически достоверные отличия ($P < 0,05$)

Так же был рассчитан коэффициент ранговой корреляции Спирмена (Таблица 8), который продемонстрировал наиболее высокие значения корреляции между коэффициентом затухания сигнала с полуколичественной ИГХ оценкой Коллагена V типа ($\rho = 0,8$). Корреляции между коэффициентом затухания сигнала с полуколичественной ИГХ оценкой Коллагена I типа ($\rho = 0,58$) и III типа ($\rho = 0,55$) имела умеренные положительные значения (Таблица 8). Сильная положительная

корреляция коэффициента затухания с уровнем экспрессии коллагена V типа, вероятно, связана с регуляторной функцией коллагена V типа на толщину гетеротипических коллагеновых волокон (состоящих из коллагена I и V типов) в дерме, что и приводит к склерозу (гомогенизации) дермы.

Таблица 8 — Значения коэффициента корреляции Спирмена для полуколичественной ИГХ оценки экспрессии коллагена I, III, V типов и коэффициента затухания ОКТ сигнала

		Полуколичественная оценка экспрессии		
		Коллагена I типа	Коллагена III типа	Коллагена V типа
Коэффициент затухания ОКТ сигнала	Коэффициент Корреляции Спирмена (ρ)	0,58	0,55	0,8
	P-уровень	<0,0001	<0,0001	<0,0001

В Таблице 9 представлены результаты корреляционного анализа между коэффициентом затухания ОКТ-сигнала и ГВГ-параметрами, характеризующими организацию коллагеновых волокон дермы. Для всех исследованных показателей выявлены статистически значимые связи: выраженная отрицательная корреляция ($\rho = -0,71$) наблюдалась с параметром средней интенсивности сигнала, тогда как асимметрия ГВГ-сигнала демонстрировала высокую положительную корреляцию ($\rho = 0,74$). Такая направленность связей отражает увеличение количества и плотности расположения коллагеновых волокон в зоне склероза, что приводит к формированию более однородной среды с меньшим числом рассеивателей и, как следствие, к снижению затухания ОКТ-сигнала.

Умеренные положительные значения корреляции выявлены для длины и толщины коллагеновых волокон ($\rho = 0,51$ и $0,57$ соответственно). Наименьший уровень корреляции отмечен для показателя когерентности ($\rho = -0,31$), что, по-видимому, указывает на второстепенную роль направленности волокон в формировании коэффициента затухания ОКТ-сигнала.

Таблица 9 — Значения коэффициента корреляции Спирмена для полуколичественной ИГХ оценки экспрессии коллагена I, III, V типов и коэффициента затухания ОКТ сигнала

		Параметры ГВГ сигнала				
		Длина	Толщина	Средняя интенсивность	Асимметрия	Когерентность
Коэффициент затухания ОКТ сигнала	Коэффициент Корреляции Спирмена (ρ)	0,51	0,57	-0,71	0,74	-0,31
	P-уровень	0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,032

3.3 Диагностическая точность использования коэффициента затухания сигнала оптической когерентной томографии для идентификации морфологических вариантов склероатрофического лишена вульвы

На завершающем этапе исследования был проведён ROC-анализ, позволивший дифференцировать нормальную кожу вульвы и различные морфологические варианты СЛВ на основании количественной оценки коэффициента затухания ОКТ-сигнала. По результатам построенных ROC-кривых рассчитывали чувствительность, специфичность, диагностическую точность и пороговые значения коэффициента затухания (Рисунок 31) [166].

Пороговое значение коэффициента затухания для идентификации умеренного варианта поражения дермы от нормальной кожи составило $8,063 \text{ мм}^{-1}$, значения чувствительности, специфичности и диагностическая точности составили 57,9%, 55,3%, 56,6%, что имеет низкие значения.

Пороговое значение для идентификации выраженного варианта поражения дермы от нормальной кожи составило $6,096 \text{ мм}^{-1}$, значения чувствительности, специфичности и диагностическая точности составили 97%, 97,9%, 97,45%.

Пороговое значение для идентификации тяжелого варианта поражения дермы от нормальной кожи составило $3,858 \text{ мм}^{-1}$, значения чувствительности, специфичности и диагностическая точности составили 100% [166; 167].

Наиболее высокие показатели чувствительности, специфичности и диагностической точности были получены для выраженного и тяжёлого вариантов поражения дермы. Это закономерно, поскольку в этих случаях наблюдаются наиболее выраженные изменения соединительной ткани — склероз и обширные зоны отёка, что приводит к существенному снижению коэффициента затухания ОКТ-сигнала. Умеренный вариант поражения является наиболее проблемным для неинвазивной диагностики с использованием ОКТ. Это объясняется комбинацией утолщения коллагеновых волокон с межфибриллярным отеком, которые противоположно влияют на коэффициент затухания. Межфибриллярный отек приводит к снижению коэффициента затухания сигнала, однако утолщение коллагеновых волокон компенсирует данные изменения, таким образом, значение коэффициента затухания слабо отличаются от интактной кожи вульвы и демонстрирует низкую диагностическую точность [158].



	Нормальная кожа вульвы / Умеренный вариант поражения дермы	Нормальная кожа вульвы / Выраженный вариант поражения дермы	Нормальная кожа вульвы / Тяжелый вариант поражения дермы
Площадь под кривой	0,51	0,996	1,0
Пороговое значение коэффициента затухания, мм ⁻¹	8,063	6,096	3,858
Чувствительность, %	57,9	97,0	100
Специфичность, %	55,3	97,9	100
Диагностическая точность, %	56,6	97,45	100

Рисунок 31 — Результаты ROC-анализа коэффициента затухания ОКТ-сигнала в поверхностной дерме (0–350 мкм) для идентификации вариантов СЛВ (умеренный, выраженный, тяжелый)

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В 2019 году международная группа ученых, врачей и приглашенных пациентов (653 респондента из 28 стран) в рамках программы определения приоритетов установила 10 ключевых направлений, требующих первоочередного изучения области СЛВ [168]. Два из них непосредственно затрагиваются в настоящей работе: определение оптимальных диагностических подходов и критериев заболевания, а также выявление клинических признаков, позволяющих объективно оценивать эффективность проводимой терапии. Известно, что клиническая диагностика и мониторинг поражений СЛВ имеет ряд сложностей, во-первых, клиническая диагностика ранних поражений затруднена из-за неспецифических проявлений, во-вторых, отсутствуют методы динамического объективного контроля области поражения в процессе лечения. Таким образом, ОКТ с построением цветокодированных карт коэффициента затухания представляется перспективным неинвазивным инструментом оценки структурно-функциональных характеристик кожи при СЛВ.

Первый этап работы был направлен на анализ изменения эпидермиса, изменения структуры и состава соединительной ткани, а также идентификации морфологических вариантов СЛВ. Данный этап являлся необходимым шагом для дальнейшей интерпретации визуальных и количественных данных, полученных с помощью неинвазивного метода ОКТ. Кроме того, он позволил определить механизм визуальных патологических микроскопических изменений в дерме при СЛВ, особенно при ранних вариантах поражения дермы.

С помощью ГВГ микроскопии были продемонстрированы структурные изменения коллагеновых волокон и описаны морфологические варианты СЛВ, а также установлены варианты изменения эластических волокон в дерме. В нашей работе показано, что в зоне склероза при СЛВ коллагеновые волокна сохраняются, однако рутинные гистологические методы, включая окрашивание пикрофуксином по Ван-Гизону, не позволяют визуализировать отдельные волокна. Нами показано,

что это связано с двумя основными механизмами: (1) фрагментацией коллагеновых волокон и накоплением гликопротеинов при умеренном варианте поражения; (2) глубоким ремоделированием коллагена с формированием крайне тонких волокон, плотно расположенных волокон при выраженном и тяжёлом поражении. Полное отсутствие коллагеновых и эластических волокон наблюдается лишь в участках выраженного отёка при тяжёлом варианте СЛВ.

Результаты, полученные с помощью высокоразрешающей ГВГ-микроскопии, согласуются с литературными данными. Так сканирующая электронная микроскопия участков поражения СЛВ продемонстрировала увеличение плотности расположения коллагеновых волокон [169], а трансмиссионная электронная микроскопия продемонстрировала многочисленные новообразованные, неорганизованные тонкие коллагеновые фибриллы толщиной 45 нм в склеротической зоне поражения [170]. Так же данные об увеличении количества коллагеновых волокон и изменении их организации при СЛВ были подтверждены позднее группой авторов из США с помощью ГВГ микроскопии в образцах вульвы, уретры и крайне плоти [104]. Однако ранее не изучались варианты поражения соединительной ткани с помощью высокоразрешающей микроскопии и ИГХ.

Мы обнаружили, что параметры сигнала ГВГ изменяются однонаправленно при разных вариантах СЛВ. Средняя интенсивность сигнала ГВГ демонстрирует прогрессивное повышение сигнала по мере увеличения степени и глубины деструкции тканей в вариантах умеренный — выраженный — тяжёлый. Резкое увеличение сигнала, примерно в 2 раза для каждого последующего варианта поражения, можно объяснить только увеличением содержания коллагеновых волокон в исследуемой области интереса за счет более интенсивного синтеза и плотного их расположения (на что указывает снижение (параметр асимметрии)). Полученный нами результат опровергает сообщения о снижении биосинтеза коллагена при СЛВ [171] и подтверждает данные о том, что, несмотря на дегенерацию соединительной ткани, в пораженной ткани происходит активный процесс синтеза коллагена [172].

Наблюдаемые короткие и толстые волокна при умеренном варианте поражения вероятно образуются при повышении активности коллагенолитических матриксных металлопротеиназ. Повышенная экспрессия матриксных металлопротеиназ 2 и 9 при СЛВ хорошо документирована [58], хотя неизвестно, какими морфологическими структурными изменениями коллагена сопровождается данный процесс.

Важными параметрами оценки структурной организации коллагеновых волокон являются когерентность и асимметрия ГВГ сигнала. Значение когерентности ГВГ сигнала количественно отражает степень выравнивания волокон. Выравнивание коллагеновых волокон, то есть потеря их извилистой структуры и формирование доминирующего направления, является важной характеристикой, которая проявляется увеличением жесткости и снижением эластичности ткани [173]. Показано, что выравнивание коллагеновых волокон является характерным признаком при системной и локализованной склеродермии [174]. В нашем исследовании утрата извилистой, волнистой конфигурации коллагеновых волокон отмечена во всех вариантах СЛВ. Снижение эластичности кожи вульвы является следствием таких изменений коллагена и представляет собой важную клиническую проблему, приводит к формированию рубцов и разрывов при СЛВ. Наиболее высокая упорядоченность волокон характерна для тяжелого варианта поражения, что объясняется наличием тонких, но однонаправленных волокон коллагена. При умеренном и выраженном варианте поражения направленность волокон теряется за счет образования коротких толстых волокон в первом случае и переплетения тонких коллагеновых волокон во втором случае.

Параметр асимметрии ГВГ сигнала неуклонно уменьшается от умеренного к тяжелому варианту поражения при СЛВ (Рисунок 18), что свидетельствует об уменьшении расстояния между коллагеновыми волокнами. Эти данные согласуются с выводом о том, что по мере увеличения отложения коллагена в дерме происходит уменьшение пространств между волокнами [173].

Иммуногистохимический анализ показал, что в зоне дермального поражения при выраженном и тяжёлом вариантах СЛВ определяется экспрессия коллагена V

типа. Это наблюдение согласуется с характером ремоделирования дермального матрикса: хотя основную массу волокон составляет коллаген I типа, именно коллаген V играет ключевую роль в регуляции фибрилlogenеза. Установлено, что увеличение содержания коллагена V типа в составе гетеротипических фибрилл приводит к уменьшению их диаметра, что отражает перестройку и истончение коллагеновых структур в поражённой дерме [175]. Установлено, что коллаген V типа играет значимую роль в развитии фибротических процессов при ряде заболеваний, включая системную склеродермию, идиопатический лёгочный фиброз и фиброз почек. Его экспрессия тесно связана со степенью активности патологического процесса: при системном склерозе повышение уровня коллагена V типа коррелирует со стадией заболевания и выраженностью утолщения кожи [176]. Иммунизация кроликов коллагеном V типа используется как модель системной склеродермии и приводит к склеродермоподобным морфологическим изменениям в коже и внутренних органах [177], что подчёркивает его важную роль в ремоделировании внеклеточного матрикса.

В биоптатах вульвы мы наблюдали гистопатологические изменения эластичных волокон, такие как эластолиз, эластоз и увеличение количества эластических волокон. Эластоз вульвы морфологически идентичен солнечному эластозу, и является новой диагностической единицей, возникающей в защищенном от солнца месте кожи [178]. Его возникновение вероятно связано с дегенеративными явлениями при СЛВ, однако он может наблюдаться и в коже вульвы с возрастными изменениями.

Одним из характерных изменений дермы при СЛВ, является отек, который при умеренном варианте поражения наблюдается как межфибрилярный отек, а при тяжелом варианте как области отека оттесняющие измененные коллагеновые пучки и склеротические зоны. По литературным данным, отек вызван инфильтрацией гидрофильными гликозаминогликанами и протеогликанами соединительной ткани. Так при СЛВ отмечалось не только нарушение коллагенового матрикса, но и атипичное накопление других компонентов внеклеточного матрикса, включая декорин и хондроитинсульфат [62], а также

гиалуроновую кислоту, фибронектин [47] и тенасцин [64]. Характер распределения этих молекул зависит от морфологии поражения: декорин преимущественно выявлялся в участках с выраженным интерстициальным отёком, тогда как хондроитинсульфат был более характерен для зон с плотным, компактным и склеротическим материалом в дерме [62]. В свою очередь интенсивное накопление тенасцина при СЛВ отмечается в участках дермы, где выражены отёк и активное воспаление. В склеротически изменённых зонах, лишённых отёка, его экспрессия значительно слабее и ограничивается преимущественно периваскулярно, а также областью под базальной мембраной эпидермиса [75]. Наши результаты на основании ШИК-реакции демонстрируют выраженное окрашивание зоны поражения дермы при умеренном и выраженном варианте СЛВ, тогда как при тяжелом варианте наблюдается окрашивание базальной мембраны и стенок кровеносных сосудов. Что частично совпадает с распределением тенасцина, по литературным данным.

В данном исследовании было продемонстрировано уменьшение количества кровеносных и лимфатических сосудов в зоне поражения и склероза дермы [156; 167]. Предположительно, отсутствие капиллярных петель в сосочковом слое дермы является следствием смещения сосудов склеротическими массами, а не их разрушением, как показано в работе [179].

Второй этап работы был направлен на интерпретацию результатов прижизненного исследования кожи вульвы с помощью ОКТ. А также количественной оценки состояния соединительной ткани с помощью расчёта коэффициента затухания ОКТ сигнала.

Одним из важнейших факторов для интерпретации ОКТ картины кожи вульвы является особенности визуализации эпидермиса, дермы и дермо-эпидермального соединения. Отсутствие визуализации эпидермальных сосочков используемой в данной работе системой ОКТ 1300-Е вероятно связано с недостаточным разрешением системы, а также со структурой коллагеновых пучков в сосочковой дерме. Так соединительная ткань в сосочках довольно рыхлая и содержит тонкие коллагеновые пучки, поэтому интенсивность сигнала и значения

коэффициента затухания низкое и мало контрастирует с нормальным эпидермисом. Это можно наблюдать при сравнении системы ОКТ 1300-Е с коммерческими системами Vivosight и сверхразрешающей системой UHR-ОСТ на примере толстой кожи ладони. На рисунке 32 А и Б приведен пример ОКТ-изображения и карты коэффициента затухания сигнала для ОКТ 1300-Е, а на рисунке 32 В и Г пример ОКТ-изображения для системы Vivosight и UHR-ОСТ. На рисунке 32 Д четко продемонстрированы дермальные сосочки (зеленые стрелки), которые имеют низкий уровень сигнала, в отличие от нижележащей папиллярной дермы (желтые стрелки). Такие же закономерности должны сохраняться и для кожи другой локализации.

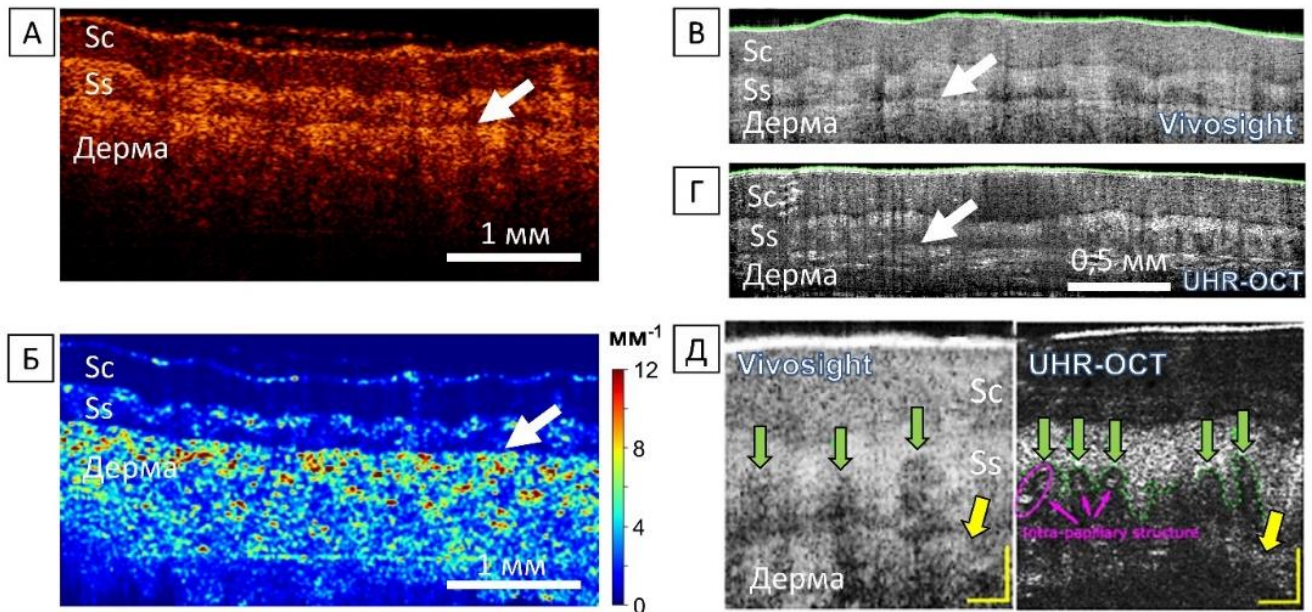


Рисунок 32 — Пример ОКТ картины толстой кожи ладони полученной с помощью системы ОКТ-1300Е (А, Б), коммерческой системы Vivosight (В, Д) и высокоразрешающей системы UHR-OCT (Г, Д). (А) ОКТ-изображение, наблюдается роговой слой (Sc), шиповатый слой эпидермиса (Ss), дерма, граница эпидермиса и сосочковой дермы выглядит как линия с низким уровнем сигнала (белая стрелка); (Б) карта коэффициента затухания ОКТ сигнала, наблюдается роговой слой (Sc), верхняя часть шиповатого слоя эпидермиса имеет повышенные значения коэффициента затухания (Sc), дерма, граница эпидермиса и сосочковой дермы выглядит как линия с низкими значениями затухания ОКТ сигнала (белая стрелка), дермальные сосочки не визуализируются. (В, Г) структурные ОКТ-изображения на системе Vivosight и UHR-OCT демонстрируют схожую картину, визуализируются те же слои, роговой (Sc), верхняя часть шиповатого слоя (SS) эпидермиса, дерма. (Д) Увеличенные фрагменты ОКТ-изображений демонстрируют эпидермальные сосочки (зеленые стрелки) с низким уровнем сигнала относительно папиллярной дермы (желтые стрелки) и тонкую дермо-эпидермальную границу. Адаптировано из Israelsen et al., 2018 [180]

Таким образом, на структурных изображениях и картах коэффициента затухания ОКТ сигнала в данной работе, граница между эпидермисом и дермой включает базальную мембрану, базальный слой кератиноцитов и дермальные сосочки.

В нашем исследовании при выраженном и тяжелом варианте СЛВ продемонстрированы изменения, которые приводят к появлению включений с высоким уровнем сигнала в эпидермисе, это приближает оптические свойства

шиповатого и гранулярного слоя кожи вульвы к толстой коже. Однако в отличие от толстой кожи, свойством высокого уровня рассеяния обладает и рыхлый роговой слой, что кардинально отличается от компактного рогового слоя, который имеет низкие значения коэффициента затухания (синий цвет, Рисунок 31 Б). Такое явление объясняется преждевременной терминальной дифференцировкой и aberrантной дифференцировкой кератиноцитов, а также истощение стволовых, прогениторных и переходных клеток эпидермиса, по данным молекулярно-генетического метода исследования [181]

Ранее коэффициент затухания ОКТ-сигнала в поверхностных слоях дермы применялся для изучения псориаза и контактного дерматита. Исследования показали, что при выраженном воспалении происходит снижение данного показателя, обусловленное клеточной инфильтрацией, расширением сосудов и отёком, что в совокупности приводит к разрежению и снижению плотности коллагеновых пучков [182].

Недавно линейная конфокальная (высокоразрешающая) ОКТ использовалась для оценки перспективного метода раннего лечения склероатрофического лишая с помощью мази 5% циклоспорина. ОКТ позволило наблюдать структурные улучшения, соответствующие клиническим результатам, без проведения биопсии, так как не удавалось получить согласие у пациентов [183].

Ранее были опубликованы клинические отчеты, которые использовали неинвазивную отражательную конфокальную микроскопию (ОКМ) для описания детской вульварной [122], мужской генитальной (пениальной) [124] и экстрагенитальной форм заболевания [184]. В целом во всех исследованиях ОКМ продемонстрировала гиперкератоз и атрофию эпидермиса, а также разрушение дермо-эпидермального соединения, которое проявлялось как деструкция дермальных папиллярных колец. В сосочковом слое дермы наблюдался среднепреломляющий грубый волокнистый материал, который мог быть диффузным и дезорганизованным или формировал толстые волнистые пучки коллагена, пространства между которыми расширены за счет отека.

Обсуждаемые исследования не проводили прицельной гистологической верификации структур, визуализируемых при ОКМ, что существенно затрудняет интерпретацию полученных данных. В этих условиях можно лишь предполагать соответствие наблюдаемых оптических феноменов определённым морфологическим изменениям. Утолщённые коллагеновые волокна, выявляемые при ОКМ в дерме при экстрагенитальном и мужском генитальном склероатрофическом лихене, вероятно, отражают формирование плотных пучков тонких коллагеновых волокон, характерных для стадии тяжёлого поражения при СЛВ. В свою очередь, утолщённые, волнистые коллагеновые пучки, соответствуют умеренной степени поражения дермы. При этом важно отметить, что приведённые публикации не уделяют внимания ранним стадиям СЛВ, которые представляют наибольшую диагностическую сложность как в клинической практике, так и при интерпретации данных ОКМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе применены рутинные гистологические методы и современные оптические методы диагностики, включая высокоразрешающую МФМ и неинвазивную ОКТ для выявления морфологических вариантов СЛВ и оценки возможности их диагностики. Так, впервые были выделены три морфологических варианта СЛВ на основании степени изменения дермы, а именно структуры и состава коллагеновых волокон. Подтверждена возможность диагностики вариантов СЛВ с помощью анализа цветокодированных карт коэффициента затухания ОКТ сигнала.

Морфологические варианты СЛВ были выделены на основании наиболее специфичных изменений: деструкция базальной мембраны, ремоделирование коллагеновых волокон дермы и отложения гликопротеинов. Количественный и качественный анализ МФМ продемонстрировал гетерогенные изменения коллагеновых волокон в коже вульвы при СЛВ. Так, при умеренном варианте поражения отмечается фрагментация коллагеновых волокон с формированием утолщённых, укороченных волокон. При выраженном и тяжелом варианте поражения дермы происходит кардинальное ремоделирование с формированием крайне тонких, плотно расположенных коллагеновых волокон, данные изменения лежат в основе формирования патогномичной зоны склероза дермы. Таким образом, в работе продемонстрировано, что количество и плотность коллагеновых волокон увеличивается при СЛВ, однако они не выявляются рутинными гистологическими методами (в частности, при окрашивании пикрофуксином по Ван-Гизону) в результате: (1) фрагментации коллагеновых волокон и отложение гликопротеинов при умеренном варианте поражения, (2) ремоделирования коллагеновых волокон с образованием очень тонких волокон, сливающихся в единую однородную массу при выраженном и тяжелом варианте поражения.

Впервые был использован параллельный анализ изменений структуры и состава коллагеновых волокон с использованием ГВГ-микроскопии в сочетании с

иммуногистохимическим исследованием коллагена I, III, V типов. Наиболее высокая корреляция отмечена между толщиной и степенью выравненности отдельных коллагеновых волокон, измеренных методом ГВГ-микроскопии, и экспрессией коллагена V типа ($\rho = -0,81$, $p < 0,001$ и $\rho = -0,74$, $p < 0,001$). Такая взаимосвязь объясняется ключевой ролью коллагена V типа в регуляции сборки и пространственной организации коллагеновых волокон.

Для неинвазивной диагностики морфологических вариантов СЛВ впервые был применен подход расчёта коэффициента затухания ОКТ сигнала с разрешением по глубине и построение цветокодированных карт в поперечном сечении для изучения изменений кожи при СЛВ. По сравнению со стандартным анализом ОКТ-изображений, использование карт коэффициента затухания обеспечило более наглядную визуализацию дермо-эпидермальной границы, особенностей эпидермиса и зоны поражения дермы, что существенно повысило информативность метода ОКТ при оценке патологических изменений. Для каждого варианта поражения дермы были предложены пороговые значения коэффициента затухания и определены стандартные статистические параметры диагностического теста (площадь под кривой, чувствительность, специфичность и диагностическая точность). Наиболее высокие значения чувствительности и специфичности были получены для тяжелого и выраженного поражения дермы 100%, 100% и 97%, 97,9% соответственно. Более низкие значения чувствительности и специфичности продемонстрированы для умеренного варианта поражения дермы, 57,9% и 55,3%.

Применение алгоритма полуколичественного анализа состава и количественного анализа структуры коллагеновых волокон с помощью ГВГ-микроскопии позволило провести корреляционный анализ со значениями коэффициента затухания сигнала, рассчитанного в дерме. Наиболее высокие значения корреляции были установлены между значениями коэффициента затухания и экспрессией коллагена V типа ($\rho = 0,8$, $p < 0,0001$) а также средней интенсивностью ($\rho = -0,71$), $p < 0,0001$) и асимметрией ГВГ сигнала ($\rho = 0,74$, $p < 0,0001$).

Таким образом, проведённое исследование демонстрирует, что количественная характеристика коэффициента затухания ОКТ-сигнала в дерме обеспечивает возможность оценки диагностической эффективности метода и расчёта 95% прогностических интервалов для различных вариантов поражения дермы. Полученные результаты создают прочную основу для дальнейшего расширения клинического применения ОКТ в диагностике, контроле терапии и мониторинге рецидивов СЛВ.

ВЫВОДЫ

1. Выделены три варианта поражения дермы при склероатрофическом лихене вульвы: умеренный — выраженный — тяжелый, на основании выраженности изменений структуры и состава коллагеновых волокон дермы при рутинном гистологическом исследовании, иммуногистохимическом исследовании на коллагены I, III, V типов, а также высокоразрешающей микроскопии генерации второй гармоники.

2. В формировании характерных изменений дермы при умеренном варианте склероатрофического лихена вульвы ключевую роль играет перестройка структуры и ориентации коллагеновых волокон, без значительного изменения их состава, а так же повреждение базальной мембраны и отложение гликопротеинов; при выраженном и тяжелом варианте склероатрофического лихена вульвы отмечается образование крайне тонких коллагеновых волокон, не визуализируемых рутинными патоморфологическими методами, что коррелирует с увеличением отложения коллагена V типа, участвующего в регуляции толщины фибрилл.

3. Построение цветокодированных карт коэффициента затухания ОКТ-сигнала позволяет визуально идентифицировать варианты склероатрофического лихена от нормальной кожи вульвы, за счет характерных изменений эпидермиса и дермы.

4. Коэффициент затухания сигнала в дерме достоверно снижается при выраженном и тяжелом, но не при умеренном варианте склероатрофического лихена вульвы. Диагностическая точность идентификации умеренного — выраженного — тяжелого варианта склероатрофического лихена вульвы от нормы составила 57% — 98% — 100% соответственно.

5. Коэффициент затухания ОКТ сигнала в дерме при склероатрофическом лихене вульвы имеет наибольшие значения корреляции с экспрессией коллагена V типа ($\rho = 0,8$), а также средней интенсивностью ($\rho = -0,71$) и асимметрией ($\rho = 0,74$) сигнала генерации второй гармоники, что свидетельствует о

непосредственной зависимости коэффициента затухания сигнала от состава, пространственной организации и структуры коллагеновых волокон.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При исследовании биопсийного материала вульвы следует учитывать полиморфизм изменений соединительной ткани при склероатрофическом лихене, которые не ограничиваются «классической» картиной склероза (гомогенизации) субэпидермальной дермы, особенно при «ранних» вариантах поражения дермы.

2. В случае отсутствия патогномичной «классической» картины поражения дермы при склероатрофическом лихене вульвы следует рассмотреть использование метода окрашивания соединительной ткани (например, пикрофуксин по Ван-Гизону), так как тонкие изменения коллагеновых волокон не всегда хорошо визуализируются при рутинном окрашивании гематоксилином и эозином.

3. Для уточнения диагноза при недостаточно выраженных изменениях дермы следует рассмотреть использование ШИК реакции для визуализации таких ранних морфологических признаков как утолщение эпителиальной базальной мембраны и отложение протеогликанов в сосочковом слое дермы. Иммуногистохимическое исследование на коллаген I, III, V типов не имеет преимуществ для диагностики «ранних» изменений в дерме при склероатрофическом лихене вульвы.

4. Для неинвазивной диагностики, уточнения диагноза склероатрофического лихена вульвы или выбора оптимального места биопсии возможно применение ОКТ с построением цветокодированных карт коэффициента затухания сигнала, при этом высокая точность диагностики достигается для выраженного и тяжелого варианта поражения дермы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

В-скан – структурное изображение поперечного сечения ткани

СЛВ – склероатрофический лишай вульвы

ВИН – вульварная интраэпителиальная неоплазия

ИГХ – иммуногистохимическое исследование

ВПЧ – вирус папилломы человека

МФМ – многофотонная микроскопия

МФТ – многофотонная томография

ГВГ – генерация второй гармоники

ДВАФ – двухфотонно возбуждаемая аутофлуоресценция

ОКМ – отражательная конфокальная микроскопия

ОКТ – оптическая когерентная томография

DAB – диаминобензидин

ISSVD – International society for the study of vulvovaginal disease,
международное общество по изучению вульвовагинальных заболеваний.

ROC-анализ – Receiver Operating Characteristic, анализ рабочей
характеристики приемника

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lawton, S. Vulval Skin Conditions: Disease Activity and Quality of Life / S. Lawton, S. Littlewood // *Journal of Lower Genital Tract Disease*. – 2013. – Vol. 17. – № 2. – P. 117–124.
2. Biopsy-verified vulvar lichen sclerosis: Incidence trends 1997–2022 and increased risk of vulvar squamous precancer and squamous cell carcinoma / L. Baandrup, C. G. Hannibal, R. Hertzum-Larsen, S. K. Kjær // *International Journal of Cancer*. – 2024. – Vol. 155. – № 3. – P. 501–507.
3. Lichen Sclerosis: Incidence and Risk of Vulvar Squamous Cell Carcinoma / M. C. G. Bleeker, P. J. Visser, L. I. H. Overbeek [et al.] // *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. – 2016. – Vol. 25. – № 8. – P. 1224–1230.
4. Lichen sclerosis: The 2023 update / D. A. De Luca, C. Papara, A. Vorobyev [et al.] // *Frontiers in Medicine*. – 2023. – Vol. 10. – P. 1106318.
5. Evidence-based (S3) Guideline on (anogenital) Lichen sclerosis / G. Kirtschig, S. Cooper, W. Aberer [et al.] // *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. – 2017. – Vol. 31. – № 2. – P. e81–e83.
6. Incidence of lichen sclerosis and subsequent causes of death: a nationwide Finnish register study / P. Halonen, M. Jakobsson, O. Heikinheimo [et al.] // *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. – 2020. – Vol. 127. – № 7. – P. 814–819.
7. Lichen sclerosis among women in the United States / L. E. Melnick, A. B. Steuer, A. K. Bieber [et al.] // *International Journal of Women's Dermatology*. – 2020. – Vol. 6. – № 4. – P. 260–262.
8. Честнова, Т. Е. Склероатрофический лишай вульвы у девочек Республики Мордовия. Распространенность. Этиопатогенез. Клинические проявления / Т. Е. Честнова, Н. А. Андреева, Е. И. Науменко // *Научный альманах*. – 2016. – Т. 1. – № 15. – С. 425–430.

9. Vulvar Lichen Sclerosus from Pathophysiology to Therapeutic Approaches: Evidence and Prospects / M. Corazza, N. Schettini, P. Zedde, A. Borghi // *Biomedicines*. – 2021. – Vol. 9. – № 8. – P. 950.
10. Singh, N. Treatment Options in Vulvar Lichen Sclerosus: A Scoping Review / N. Singh, N. Mishra, P. Ghatage // *Cureus*. – 2021. – Vol. 13. – № 2. – P. e13527
11. Brodrick, B. Influence of treatments on prognosis for vulvar lichen sclerosus: Facts and controversies / B. Brodrick, Z. R. Belkin, A. T. Goldstein // *Clinics in Dermatology*. – 2013. – Vol. 31. – № 6. – P. 780–786.
12. Vulvar Lichen Sclerosus: Effect of Long-term Topical Application of a Potent Steroid on the Course of the Disease / C. Renaud-Vilmer, B. Cavelier-Balloy, R. Porcher, L. Dubertret // *Archives of Dermatology*. – 2004. – Vol. 140. – № 6. – P. 709–712.
13. Patients with lichen sclerosus experience moderate satisfaction with treatment and impairment of quality of life: results of a cross-sectional study / O. D. van Cranenburgh, S. B. W. Nijland, R. Lindeboom [et al.] // *British Journal of Dermatology*. – 2017. – Vol. 176. – № 6. – P. 1508–1515.
14. Fistarol, S. K. Diagnosis and Treatment of Lichen Sclerosus / S. K. Fistarol, P. H. Itin // *American Journal of Clinical Dermatology*. – 2013. – Vol. 14. – № 1. – P. 27–47.
15. Searching for a “Window of Opportunity” in the Treatment of Vulvar Lichen Sclerosus: Evidence for Therapeutic Benefits of an Early Corticosteroid Treatment / A. Borghi, M. E. Flacco, N. Schettini [et al.] // *Dermatology*. – 2024. – Vol. 240. – № 2. – P. 195–204.
16. EuroGuiderm guideline on lichen sclerosus—Treatment of lichen sclerosus / G. Kirtschig, M. Kinberger, A. Kreuter [et al.] // *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. – 2024. – Vol. 38. – № 10. – P. 1874–1909.
17. Male and female genital lichen sclerosus. Clinical and functional classification criteria / A. Latini, C. Cota, D. Orsini [et al.] // *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*. – 2018. – Vol. 35. – № 5. – P. 447–453.
18. Regauer, S. Early vulvar lichen sclerosus: a histopathological challenge / S. Regauer, B. Liegl, O. Reich // *Histopathology*. – 2005. – Vol. 47. – № 4. – P. 340–347.

19. Single-cell and spatial transcriptomics of vulvar lichen sclerosis reveal multi-compartmental alterations in gene expression and signaling cross-talk / P. Sun, C. N. Kraus, W. Zhao [et al.] // *The Journal of investigative dermatology*. – 2024. – Vol. 146. – № 3. – P. 678–698.
20. Paediatric and adolescent vulvar lichen sclerosis: delay in diagnosis / V. L. Crofts, D. Moussaoui, V. Shynkarova, M. Yaron // *European Journal of Pediatrics*. – 2025. – Vol. 184. – № 3. – P. 232.
21. Kirtschig, G. Lichen Sclerosis—Presentation, Diagnosis and Management / G. Kirtschig // *Deutsches Ärzteblatt international*. – 2016. – Vol. 113. – № 19. – P. 337–343.
22. Потекаева, Н. Н. Заболевания кожи и инфекции, передаваемые половым путем, в акушерско-гинекологической практике / Н. Н. Потекаева, А. И. Аполихина. – Москва : ГОЭТАР-Медиа, 2023. – 408 с. – ISBN 978-5-9704-8226-1.
23. Research Techniques Made Simple: Emerging Imaging Technologies for Noninvasive Optical Biopsy of Human Skin / G. Lentsch, E. G. Baugh, B. Lee [et al.] // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2022. – Vol. 142. – № 5. – P. 1243–1252.e1.
24. Optical Coherence Tomography: An Emerging Technology for Biomedical Imaging and Optical Biopsy / J. G. Fujimoto, C. Pitris, S. A. Boppart, M. E. Brezinski // *Neoplasia*. – 2000. – Vol. 2. – № 1. – P. 9–25.
25. Tkaczyk, E. Innovations and Developments in Dermatologic Non-invasive Optical Imaging and Potential Clinical Applications / E. Tkaczyk // *Acta Dermato – Venereologica*. – 2017. – Vol. 97. – № 218. – P. 5–13.
26. The skin through reflectance confocal microscopy — Historical background, technical principles, and its correlation with histopathology / N. F. Braghiroli, S. Sugerik, L. A. R. de Freitas [et al.] // *Anais Brasileiros de Dermatologia*. – 2022. – Vol. 97. – № 6. – P. 697–703.
27. Koenig, K. High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution / K. Koenig, I. Riemann // *Journal of Biomedical Optics*. – 2003. – Vol. 8. – № 3. – P. 432–439.
28. Hewitt, J. Histologic criteria for lichen sclerosis of the vulva. / J. Hewitt // *The Journal of reproductive medicine*. – 1986. – Vol. 31. – № 9. – P. 781–787.

29. Regauer, S. Early vulvar lichen sclerosis: a histopathological challenge / S. Regauer, B. Liegl, O. Reich // *Histopathology*. – 2005. – Vol. 47. – № 4. – P. 340–347.
30. Nonsclerotic Lichen Sclerosus: Definition of a Concept and Pathologic Description / T. Day, M. A. Selim, J. I. Allbritton [et al.] // *Journal of Lower Genital Tract Disease*. – 2023. – Vol. 27. – № 4. – P. 358–364.
31. Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure / X. Chen, O. Nadiarynkh, S. Plotnikov, P. J. Campagnola // *Nature Protocols*. – 2012. – Vol. 7. – № 4. – P. 654–669.
32. Dermatoscopy and Optical Coherence Tomography in Vulvar High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions and Lichen Sclerosus: A Prospective Observational Trial / B. W. Huisman, L. Pagan, R. G. C. Naafs [et al.] // *Journal of Lower Genital Tract Disease*. – 2023. – Vol. 27. – № 3. – P. 255–261.
33. Study on the application and imaging characteristics of optical coherence tomography in vulva lesions / L. Xu, Q. Ma, S. Lin [et al.] // *Scientific Reports*. – 2022. – Vol. 12. – № 1. – P. 3659.
34. Powell, J. J. Lichen sclerosis / J. J. Powell, F. Wojnarowska // *The Lancet*. – 1999. – Vol. 353. – № 9166. – P. 1777–1783.
35. Meffert, J. J. Lichen sclerosis / J. J. Meffert, B. M. Davis, R. E. Grimwood // *Journal of the American Academy of Dermatology*. – 1995. – Vol. 32. – № 3. – P. 393–416.
36. Штемберг, М. Крауроз и лейкоплакия вульвы / М. Штемберг. – Кишинев : ШТИИНЦА, 1980. – 200 с.
37. Oberfield, R. A. Lichen Sclerosus et Atrophicus and Kraurosis Vulvae: Are They the Same Disease? / R. A. Oberfield // *Archives of Dermatology*. – 1961. – Vol. 83. – № 5. – P. 806–815.
38. Friedrich, E. International Society for the study of Vulvar disease: new nomenclature for vulvar disease / E. Friedrich // *Obstetrics & Gynecology*. – 1976. – Vol. 47. – № 1. – P. 122–24.

39. Vulvovaginal examinations in elderly nursing home women residents / A. Leibovitz, V. Kaplun, N. Saposhnicov, B. Habet // *Archives of Gerontology and Geriatrics*. – 2000. – Vol. 31. – № 1. – P. 1–4.

40. Risk Factors for Lichen Sclerosus: A Case–Control Study of 43,000 Finnish Women / P. Halonen, O. Heikinheimo, K. Hadkhale [et al.] // *Journal of Lower Genital Tract Disease*. – 2024. – Vol. 28. – № 2. – P. 164–168.

41. Possible Role of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Infection in Lichen Sclerosus / K. Eisendle, T. Grabner, H. Kutzner, B. Zelger // *Archives of Dermatology*. – 2008. – Vol. 144. – № 5. – P. 591–598.

42. Lichen Sclerosus et Atrophicus Induced by Carbamazepine: A Case Report / G. Pranteda, M. Muscianese, M. Grimaldi [et al.] // *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. – 2013. – Vol. 26. – № 3. – P. 791–794.

43. Development of lichen sclerosus et atrophicus while receiving a therapeutic dose of imatinib mesylate for chronic myelogenous leukemia / H. Skupsky, R. Abuav, W. High [et al.] // *Journal of Cutaneous Pathology*. – 2010. – Vol. 37. – № 8. – P. 877–880.

44. Is urinary incontinence associated with vulval lichen sclerosus in women? A cross-sectional study / L. Kirby, S. Gran, F. Orekoya [et al.] // *British Journal of Dermatology*. – 2021. – Vol. 185. – № 5. – P. 1063–1065.

45. The high rate of familial lichen sclerosus suggests a genetic contribution: an observational cohort study / V. Sherman, T. McPherson, M. Baldo [et al.] // *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. – 2010. – Vol. 24. – № 9. – P. 1031–1034.

46. Thomas, R. H. M. The development of lichen sclerosus et atrophicus in monozygotic twin girls / R. H. M. Thomas, C. T. C. Kennedy // *British Journal of Dermatology*. – 1986. – Vol. 114. – № 3. – P. 377–379.

47. Genital Vulvar Lichen Sclerosus in Monozygotic Twin Women: A Case Report and Review of the Literature / G. Doulaveri, K. Armira, A. Kouris [et al.] // *Case Reports in Dermatology*. – 2013. – Vol. 5. – № 3. – P. 321–325.

48. Co–existence of Lichen Sclerosus and Localized Scleroderma in Female Monozygotic Twins / A. Lis–Święty, K. Mierzwińska, K. Wodok–Wieczorek [et al.] //

Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology. – 2014. – Vol. 27. – № 6. – P. e133–e136.

49. The Association of Lichen Sclerosus and Erosive Lichen Planus of the Vulva With Autoimmune Disease: A Case–Control Study / S. M. Cooper, I. Ali, M. Baldo, F. Wojnarowska // Archives of Dermatology. – 2008. – Vol. 144. – № 11. – P. 1432–1435.

50. Thyroid disorders associated with lichen sclerosus: a case–control study in the All of Us Research Program / R. Fan, A. C. Leasure, F. I. Maisha [et al.] // British Journal of Dermatology. – 2022. – Vol. 187. – № 5. – P. 797–799.

51. Role of the T and B lymphocytes in pathogenesis of autoimmune thyroid diseases / M. Rydzewska, M. Jaromin, I. E. Pasierowska [et al.] // Thyroid Research. – 2018. – Vol. 11. – № 1. – P. 2.

52. Vulvar vitiligo and lichen sclerosus in children: A clinical challenge / G. Veronesi, A. Viridi, M. Leuzzi [et al.] // Pediatric Dermatology. – 2021. – Vol. 38. – № 5. – P. 1012–1019.

53. Kanda, N. Regulatory roles of sex hormones in cutaneous biology and immunology / N. Kanda, S. Watanabe // Journal of Dermatological Science. – 2005. – Vol. 38. – № 1. – P. 1–7.

54. The Association Between HLA DR, DQ Antigens, and Vulval Lichen Sclerosus in the UK: HLA DRB1*12 and its Associated DRB1*12/DQB1*0301/04/09/010 Haplotype Confers Susceptibility to Vulval Lichen Sclerosus, and HLA DRB1*0301/04 and its Associated DRB1*0301/04/DQB1*0201/02/03 Haplotype Protects from Vulval Lichen Sclerosus / X. H. Gao, M. C. M. N. Barnardo, S. Winsey [et al.] // Journal of Investigative Dermatology. – 2005. – Vol. 125. – № 5. – P. 895–899.

55. Genomic Profiling of Vulvar Lichen Sclerosus Patients Shows Possible Pathogenetic Disease Mechanisms / H. K. Haefner, K. C. Welch, A. M. Rolston [et al.] // Journal of Lower Genital Tract Disease. – 2019. – Vol. 23. – № 3. – P. 214–219.

56. Lichen Sclerosus: An autoimmunopathogenic and genomic enigma with emerging genetic and immune targets / D. A. Tran, X. Tan, C. J. Macri [et al.] // International Journal of Biological Sciences. – 2019. – Vol. 15. – № 7. – P. 1429–1439.

57. Inactivation of the CDKN2A and the p53 tumour suppressor genes in external genital carcinomas and their precursors / N. Soufir, S. Queille, M. Liboutet [et al.] // *British Journal of Dermatology*. – 2007. – Vol. 156. – № 3. – P. 448–453.

58. Altered global methylation and hydroxymethylation status in vulvar lichen sclerosis: further support for epigenetic mechanisms / T. Gambichler, S. Terras, A. Kreuter, M. Skrygan // *British Journal of Dermatology*. – 2014. – Vol. 170. – № 3. – P. 687–693.

59. Oyama, N. Lichen Sclerosis: A Current Landscape of Autoimmune and Genetic Interplay / N. Oyama, M. Hasegawa // *Diagnostics*. – 2022. – Vol. 12. – № 12. – P. 3070.

60. Cytokine alterations in lichen sclerosis: an immunohistochemical study / A. M. Farrell, D. Dean, P. R. Millard [et al.] // *British Journal of Dermatology*. – 2006. – Vol. 155. – № 5. – P. 931–940.

61. Baran, W. IL-17: a novel player in the pathogenesis of vulvar lichen sclerosis / W. Baran, Z. Woźniak, A. Batycka–Baran // *Advances in Dermatology and Allergology*. – 2024. – Vol. 41. – № 2. – P. 220–225.

62. IP10/CXCL10 – CXCR3 Interaction: a Potential Self-recruiting Mechanism for Cytotoxic Lymphocytes in Lichen Sclerosis et Atrophicus / J. Wenzel, A. Wiechert, C. Merkel [et al.] // *Acta Dermato–Venereologica*. – 2007. – Vol. 87. – № 2. – P. 112–117.

63. Autoantibodies to extracellular matrix protein 1 in lichen sclerosis / N. Oyama, I. Chan, S. M. Neill [et al.] // *The Lancet*. – 2003. – Vol. 362. – № 9378. – P. 118–123.

64. Circulating basement membrane zone antibodies are found in lichen sclerosis of the vulva / A. Howard, D. Dean, S. Cooper [et al.] // *Australasian Journal of Dermatology*. – 2004. – Vol. 45. – № 1. – P. 12–15.

65. Interaction of Extracellular Matrix Protein 1 with Extracellular Matrix Components: ECM1 Is a Basement Membrane Protein of the Skin / S. Sercu, M. Zhang, N. Oyama [et al.] // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2008. – Vol. 128. – № 6. – P. 1397–1408.

66. Gene silencing of extracellular matrix protein 1 (ECM1) results in phenotypic alterations of dermal fibroblasts reminiscent of clinical features of lichen sclerosus / N. Utsunomiya, A. Utsunomiya, T. Chino [et al.] // *Journal of Dermatological Science*. – 2020. – Vol. 100. – № 2. – P. 99–109.

67. MiR–155–5p promotes fibroblast cell proliferation and inhibits FOXO signaling pathway in vulvar lichen sclerosus by targeting FOXO3 and CDKN1B / L. Ren, Y. Zhao, X. Huo, X. Wu // *Gene*. – 2018. – Vol. 653. – P. 43–50.

68. The role of microRNAs in atopic dermatitis / M. Khosrojerdi, F. J. Azad, Y. Yadegari [et al.] // *Non-coding RNA Research*. – 2024. – Vol. 9. – № 4. – P. 1033–1039.

69. Metalloproteinases 2 and 9 and their tissue inhibitors 1 and 2 are increased in vulvar lichen sclerosus / G. A. P. de Oliveira, M. P. de Almeida, F. A. Soares [et al.] // *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. – 2012. – Vol. 161. – № 1. – P. 96–101.

70. Expression of galectin 7 in vulvar lichen sclerosus and its effect on dermal fibroblasts / Y. Zhao, S. Zhao, H. Li [et al.] // *Oncology Letters*. – 2018. – Vol. 16. – № 2. – P. 2559–2564.

71. Alterations in fibrillin as well as collagens I and III and elastin occur in vulval lichen sclerosus / A. M. Farrell, D. Dean, P. R. Millard [et al.] // *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. – 2001. – Vol. 15. – № 3. – P. 212–217.

72. Unusual remodeling of the hyalinization band in vulval lichen sclerosus by type V collagen and ECM 1 protein / C. A. P. Godoy, W. R. Teodoro, A. P. P. Velosa [et al.] // *Clinics*. – 2015. – Vol. 70. – № 5. – P. 356–362.

73. Decorina e Condroitim sulfato na remodelação da matriz extracelular do línquen escleroso vulvar / A. de C. Corrêa, L. M. S. Azevedo, G. L. de Almeida [et al.] // *Anais Brasileiros de Dermatologia*. – 2005. – Vol. 80. – № suppl. 3. – P. S307–S313.

74. Differential expression of connective tissue growth factor and extracellular matrix proteins in lichen sclerosus / T. Gambichler, M. Skrygan, V. Czempiel [et al.] // *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. – 2012. – Vol. 26. – № 2. – P. 207–212.

75. Tenascin Expression in Lichen Sclerosus / Y. Soini, R. Pöllänen, H. Autio–Harmainen, V.–P. Lehto // *International Journal of Gynecological Pathology*. – 1997. – Vol. 16. – № 4. – P. 313–318.

76. Paulis, G. Lichen sclerosus: the role of oxidative stress in the pathogenesis of the disease and its possible transformation into carcinoma / G. Paulis, E. Berardesca // *Research and Reports in Urology*. – 2019. – Vol. 11. – P. 223–232.

77. Oxidative stress is implicated in the pathogenesis of lichen sclerosus / C. Sander, I. Ali, D. Dean [et al.] // *British Journal of Dermatology*. – 2004. – Vol. 151. – № 3. – P. 627–635.

78. Expression of the CDK inhibitor p27kip1 and oxidative DNA damage in non–neoplastic and neoplastic vulvar epithelial lesions / G. Zannoni, B. Faraglia, E. Tarquini [et al.] // *Modern Pathology*. – 2006. – Vol. 19. – № 4. – P. 504–513.

79. Liegl, B. p53 immunostaining in lichen sclerosus is related to ischaemic stress and is not a marker of differentiated vulvar intraepithelial neoplasia (d-VIN) / B. Liegl, S. Regauer // *Histopathology*. – 2006. – Vol. 48. – № 3. – P. 268–274.

80. Should We Always Biopsy in Clinically Evident Lichen Sclerosus? / S. McCarthy, N. MacEoin, M. O’Driscoll [et al.] // *Journal of Lower Genital Tract Disease*. – 2019. – Vol. 23. – № 2. – P. 182–183.

81. Ventolini, G. Lichen sclerosus: a potpourri of misdiagnosed cases based on atypical clinical presentations / G. Ventolini, R. Patel, R. Vasquez // *International Journal of Women’s Health*. – 2015. – Vol. 8. – № 7. – P. 511–515.

82. Leoni, E. Lichen Sclerosus et Atrophicus With Histopathologic Features Mimicking Mycosis Fungoides: A Large Series of Cases Comparing Genital With Extragenital Lichen Sclerosus / E. Leoni, W. Kempf, L. Cerroni // *The American Journal of Surgical Pathology*. – 2022. – Vol. 46. – № 1. – P. 83–88.

83. Regauer, S. Immune dysregulation in lichen sclerosus / S. Regauer // *European Journal of Cell Biology*. – 2005. – Vol. 84. – № 2. – P. 273–277.

84. Weyers, W. Hypertrophic Lichen Sclerosus With Dyskeratosis and Parakeratosis—A Common Presentation of Vulvar Lichen Sclerosus Not Associated

With a Significant Risk of Malignancy / W. Weyers // *The American Journal of Dermatopathology*. – 2013. – Vol. 35. – № 7. – P. 117–124.

85. The basement membrane zone in lichen sclerosis: an immunohistochemical study / P. Marren, D. Dean, M. Charnock, F. Wojnarowska // *British Journal of Dermatology*. – 1997. – Vol. 136. – № 4. – P. 508–514.

86. Structured analysis of histopathological characteristics of vulvar lichen sclerosis in a juvenile population / B. Morrel, P. C. Ewing–Graham, I. A. M. van der Avoort [et al.] // *Human Pathology*. – 2020. – Vol. 106. – P. 23–31.

87. Collagen Anomalies as Clues for Diagnosis: Part 1 / S. Santos–Alarcón, O. F. López–López, M. Á. Flores–Terry [et al.] // *The American Journal of Dermatopathology*. – 2017. – Vol. 39. – № 8. – P. 559–586.

88. Cell cycle regulation and proliferation in lichen sclerosis / T. Gambichler, S. Kammann, C. Tigges [et al.] // *Regulatory Peptides*. – 2011. – Vol. 167. – № 2. – P. 209–214.

89. Clinicopathologic Diagnosis of Differentiated Vulvar Intraepithelial Neoplasia and Vulvar Aberrant Maturation / T. Day, A. Marzol, R. Pagano [et al.] // *Journal of Lower Genital Tract Disease*. – 2020. – Vol. 24. – № 4. – P. 392–398.

90. British Association of Dermatologists guidelines for the management of lichen sclerosis, 2018 / F. M. Lewis, F. M. Tatnall, S. S. Velangi [et al.] // *British Journal of Dermatology*. – 2018. – Vol. 178. – № 4. – P. 839–853.

91. Lichen Sclerosis – ISSVD practical guide to diagnosis and management / O. A. Vaughn, V. Boero, A. Borghi [et al.] ; edited by T. Day, M. Mauskar, A. Selk. – Lisbon : Edition & Pagination, 2024. – 212 p. – ISBN 978-989-53489-8-5

92. What Differentiates Symptomatic from Asymptomatic Women with Lichen Sclerosis? / P. Vieira–Baptista, J. Lima–Silva, J. Cavaco–Gomes [et al.] // *Gynecologic and Obstetric Investigation*. – 2014. – Vol. 79. – № 4. – P. 263–268.

93. Adult Vulvar Lichen Sclerosis: Can Experts Agree on the Assessment of Disease Severity? / M. Sheinis, N. Green, P. Vieira–Baptista [et al.] // *Journal of Lower Genital Tract Disease*. – 2020. – Vol. 24. – № 3. – P. 295–298.

94. Fung, M. A. Light Microscopic Criteria for the Diagnosis of Early Vulvar Lichen Sclerosus: A Comparison With Lichen Planus / M. A. Fung, P. E. LeBoit // *The American Journal of Surgical Pathology*. – 1998. – Vol. 22. – № 4. – P. 473–478.

95. Clinicopathologic comparison of vulvar and extragenital lichen sclerosus: histologic variants, evolving lesions, and etiology of 141 cases. / J. A. Carlson, P. Lamb, J. Malfetano [et al.] // *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* – 1998. – Vol. 11. – № 9. – P. 844–54.

96. Nonsclerotic Lichen Sclerosus: Definition of a Concept and Pathologic Description / T. Day, M. A. Selim, J. I. Allbritton [et al.] // *Journal of Lower Genital Tract Disease*. – 2023. – Vol. 27. – № 4. – P. 117–124.

97. Weyers, W. Hypertrophic lichen sclerosus sine sclerosis: clues to histopathologic diagnosis when presenting as psoriasiform lichenoid dermatitis / W. Weyers // *Journal of Cutaneous Pathology*. – 2015. – Vol. 42. – № 2. – P. 118–129.

98. Mann, K. M. Label-free histopathology / K. M. Mann // *Nature Methods*. – 2016. – Vol. 13. – № 10. – P. 815.

99. Towards next-generation diagnostic pathology: AI-empowered label-free multiphoton microscopy / S. Wang, J. Pan, X. Zhang [et al.] // *Light: Science & Applications*. – 2024. – Vol. 13. – № 1. – P. 254.

100. Comparison of Picrosirius Red Staining With Second Harmonic Generation Imaging for the Quantification of Clinically Relevant Collagen Fiber Features in Histopathology Samples / C. R. Drifka, A. G. Loeffler, K. Mathewson [et al.] // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. – 2016. – Vol. 64. – № 9. – P. 519–529.

101. Ushiki, T. Collagen Fibers, Reticular Fibers and Elastic Fibers. A Comprehensive Understanding from a Morphological Viewpoint / T. Ushiki // *Archives of Histology and Cytology*. – 2002. – Vol. 65. – № 2. – P. 109–126.

102. Омеляненко, Н. П. Соединительная ткань : (гистофизиология и биохимия) / Н. П. Омеляненко, Л. И. Слуцкий ; под ред. С. П. Миронова ; Федеральное гос. учреждение "Центральный ин-т травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова Росмедтехнологий". – Москва : Известия. – 2009 . – 378с. – ISBN 978-5-206-00740-4.

103. Campagnola, P. Second Harmonic Generation Imaging Microscopy: Applications to Diseases Diagnostics / P. Campagnola // *Analytical Chemistry*. – 2011. – Vol. 83. – № 9. – P. 3224–3231.

104. Determination of collagen fibril size via absolute measurements of second-harmonic generation signals / S. Bancelin, C. Aimé, I. Gusachenko [et al.] // *Nature Communications*. – 2014. – Vol. 5. – № 1. – P. 4920.

105. Two-photon fluorescence and second-harmonic generation imaging of collagen in human tissue based on multiphoton microscopy / X. Jiang, J. Zhong, Y. Liu [et al.] // *Scanning*. – 2011. – Vol. 33. – № 1. – P. 53–56.

106. Discrimination of basal cell carcinoma from normal dermal stroma by quantitative multiphoton imaging / S.-J. Lin, S.-H. Jee, C.-J. Kuo [et al.] // *Optics Letters*. – 2006. – Vol. 31. – № 18. – P. 2756–2758.

107. Quantitative collagen analysis using second harmonic generation images for the detection of basal cell carcinoma with ex vivo multiphoton microscopy / M. Sendín-Martín, J. Posner, U. Harris [et al.] // *Experimental Dermatology*. – 2023. – Vol. 32. – № 4. – P. 392–402.

108. Study on collagen parameters in vulvar cancer and preneoplastic lesions by Second Harmonic Generation microscopy / M. das G. de F. C. Castor, L. C. Torres, R. J. V. de Mello [et al.] // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 5568.

109. Evaluating cutaneous photoaging by use of multiphoton fluorescence and second-harmonic generation microscopy / S.-J. Lin, R.-J. Wu, H.-Y. Tan [et al.] // *Optics Letters*. – 2005. – Vol. 30. – № 17. – P. 2275–2277.

110. Assessment of Extramammary Paget Disease by Two-Photon Microscopy / R. Hristu, L. G. Eftimie, S. G. Stanciu [et al.] // *Frontiers in Medicine*. – 2022. – Vol. 9. – P. 839786.

111. Multiphoton laser scanning microscopy of localized scleroderma / K. Lu, J. Chen, S. Zhuo [et al.] // *Skin Research and Technology*. – 2009. – Vol. 15. – № 4. – P. 489–495.

112. Application of multiphoton imaging and machine learning to lymphedema tissue analysis / Y. V Kistenev, V. V Nikolaev, O. S. Kurochkina [et al.] // *Biomedical Optics Express*. – 2019. – Vol. 10. – № 7. – P. 3353–3368.

113. Mapping variation of extracellular matrix in human keloid scar by label-free multiphoton imaging and machine learning / J. Meng, G. Wang, L. Zhou [et al.] // *Journal of Biomedical Optics*. – 2023. – Vol. 28. – № 4. – P. 045001.

114. Diagnosis of lichen sclerosus based on multiphoton microscopy / X. Huang, Y. Huang, L. Zheng [et al.] // *Tenth International Conference on Information Optics and Photonics*. – SPIE, 2018. – Vol. 10964. – P. 571–575.

115. Collagen is More Abundant and Structurally Altered in Lichen Sclerosus / E. M. M. Mora, M. I. Champer, W. Huang [et al.] // *Urology*. – 2023. – Vol. 173. – P. 192–197.

116. Differentiating morphea from lichen Sclerosus by using multiphoton microscopy combined with U-Net model for elastic fiber segmentation / Q. Wang, X. Huang, Y. Tu [et al.] // *Journal of Biophotonics*. – 2023. – Vol. 16. – № 8. – P. e202300078.

117. Polarized and Nonpolarized Dermoscopy: The Explanation for the Observed Differences / Y. Pan, D.S. Gareau, A. Scope [et al.] // *Archives of Dermatology*. – 2008. – Vol. 144. – № 6. – P. 828–829.

118. Micali, G. Dermoscopy: Instrumental Update / G. Micali, F. Lacarrubba // *Dermatologic Clinics*. – 2018. – Vol. 36. – № 4. – P. 345–348.

119. Ankad, B. S. Basic Science of Dermoscopy / B. S. Ankad, S. V Smitha, V. R. Koti // *Clinical Dermatology Review*. – 2020. – Vol. 4. – № 2. – P. 69–73.

120. Ring, C. Dermoscopy / C. Ring, N. Cox, J. B. Lee // *Clinics in Dermatology*. – 2021. – Vol. 39. – № 4. – P. 635–642.

121. Dermoscopy and dermatopathology correlates of cutaneous neoplasms / O. Yélamos, R. P. Braun, K. Liopyris [et al.] // *Journal of the American Academy of Dermatology*. – 2019. – Vol. 80. – № 2. – P. 341–363.

122. Hirokawa, D. Dermoscopy: An overview of subsurface morphology / D. Hirokawa, J. B. Lee // *Clinics in Dermatology*. – 2011. – Vol. 29. – № 5. – P. 557–565.

123. Srivastava, R. Noninvasive imaging tools in dermatology. / R. Srivastava, M. Manfredini, B. K. Rao // *Cutis*. – 2019. – Vol. 104. – № 2. – P. 108–113.

124. Errichetti, E. Dermoscopy in General Dermatology (Non–Neoplastic Dermatoses): The Journey So Far / E. Errichetti // *Dermatology and Therapy*. – 2021. – Vol. 11. – № 6. – P. 1871–1877.

125. Clinical, dermoscopic and histopathologic features of genital and extragenital lichen sclerosus / A. Larre Borges, D. Todorovic–Zivkovic, A. Lallas [et al.] // *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. – 2013. – Vol. 27. – № 11. – P. 1433–1439.

126. Dermoscopic Features of Vulvar Lichen Sclerosus in the Setting of a Prospective Cohort of Patients: New Observations / A. Borghi, M. Corazza, S. Minghetti [et al.] // *Dermatology*. – 2015. – Vol. 232. – № 1. – P. 71–77.

127. Borghi, A. Dermoscopy of Inflammatory Genital Diseases: Practical Insights / A. Borghi, A. Virgili, M. Corazza // *Dermatologic Clinics*. – 2018. – Vol. 36. – № 4. – P. 451–461.

128. Dermoscopic features of vulvar sclerosus and atrophic lichen: About 52 cases / R. Dassouli, H. BayBay, Z. Douhi [et al.] // *Our Dermatology Online*. – 2022. – Vol. 13. – № 3. – P. e9.

129. Possible Mechanisms of Hypopigmentation in Lichen Sclerosus / J. A. Carlson, R. Grabowski, X. C. Mu [et al.] // *The American Journal of Dermatopathology*. – 2002. – Vol. 24. – № 2. – P. 97–107.

130. Study of melanocyte density and epidermal thickness in vulvar lichen sclerosus lesions / Y. Fu, Y. Bao, Z. Li [et al.] // *International Journal of Dermatology*. – 2021. – Vol. 60. – № 8. – P. 991–995.

131. Dermoscopy – Histopathology Correlation / S. L. Beergouder, S. Raghunatha, P.S. Jaju [et al.] ; edited by B. S. Ankad, S. S. Mukherjee, B. P. Nikam. – Singapore : Springer Singapore, 2021. – 437p. – ISBN 981334637X.

132. Preliminary study on dermoscopic features of vulvar lichen planus: new insights for diagnosis / A. Borghi, M. Corazza, S. Minghetti, A. Virgili // *Journal of the*

European Academy of Dermatology and Venereology. – 2016. – Vol. 30. – № 6. – P. 1063–1065.

133. In vivo evaluation of vulvar lichen sclerosus with reflectance confocal microscopy and therapeutic monitoring in children / L. Chen, Y. Wang, X. Gao [et al.] // *Skin Research and Technology*. – 2023. – Vol. 29. – № 1. – P. e13234.

134. Gu, J. Reflectance Confocal Microscopy for Identification of Vulvar Lichen Sclerosus et Atrophicus and Vitiligo / J. Gu, R. Xia, Y. Zou // *The American Journal of Dermatopathology*. – 2022. – Vol. 44. – № 12. – P. 867–873.

135. Exploring reflectance confocal microscopy as a non-invasive diagnostic tool for genital lichen sclerosus / D. Kantere, N. Neittaanmäki, K. Maltese [et al.] // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2022. – Vol. 23. – № 6. – P. 410.

136. König, K. Multiphoton Tomography in Cosmetic Research / K. König, A. König // *Cosmetics*. – 2025. – Vol. 12. – № 2.

137. Drexler, W. Ultrahigh-resolution optical coherence tomography / W. Drexler // *Journal of biomedical optics*. – 2004. – Vol. 9. – № 1. – P. 47–74.

138. Depth-resolved model-based reconstruction of attenuation coefficients in optical coherence tomography / K. A. Vermeer, J. Mo, J. J. A. Weda [et al.] // *Biomedical Optics Express*. – 2014. – Vol. 5. – № 1. – P. 322–337.

139. Кросс-поляризационная оптическая когерентная томография для клинической оценки степени поражения дермы при склеротическом лихене вульвы / А. Л. Потапов, М. М. Логинова, А. А. Моисеев [и др.] // *Современные технологии в медицине*. – 2023. – Т. 15. – № 1. – С. 53–60.

140. Depth-resolved method for attenuation coefficient calculation from optical coherence tomography data for improved biological structure visualization / A. Moiseev, E. Sherstnev, E. Kiseleva [et al.] // *Journal of Biophotonics*. – 2023. – Vol. 16. – № 12. – P. e202100392.

141. Landini, G. Colour deconvolution: stain unmixing in histological imaging / G. Landini, G. Martinelli, F. Piccinini // *Bioinformatics*. – 2021. – Vol. 37. – № 10. – P. 1485–1487.

142. Ruifrok, A. C. Comparison of Quantification of Histochemical Staining By Hue–Saturation–Intensity (HSI) Transformation and Color–Deconvolution / A. C. Ruifrok, R. L. Katz, D. A. Johnston // *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. – 2003. – Vol. 11. – № 1. – P. 85–91.

143. Comparison of Semi–Quantitative Scoring and Artificial Intelligence Aided Digital Image Analysis of Chromogenic Immunohistochemistry / J. Bencze, M. Szarka, B. Kóti [et al.] // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 19.

144. Collagen morphology and texture analysis: from statistics to classification / L. B. Mostaçõ–Guidolin, A. C.–T. Ko, F. Wang [et al.] // *Scientific Reports*. – 2013. – Vol. 3. – № 1. – P. 2190.

145. Quantitative analysis of second harmonic generated images of collagen fibers: a review / Z. Nejm, L. Navarro, C. Morin, P. Badel // *Research on Biomedical Engineering*. – 2023. – Vol. 39. – № 1. – P. 273–295.

146. Investigating mechanisms of collagen thermal denaturation by high resolution second–harmonic generation imaging / Y. Sun, W.–L. Chen, S.–J. Lin [et al.] // *Biophysical journal*. – 2006. – Vol. 91. – № 7. – P. 2620–2625.

147. Noninvasive Assessment of Collagen Gel Microstructure and Mechanics Using Multiphoton Microscopy / C. B. Raub, V. Suresh, T. Krasieva [et al.] // *Biophysical Journal*. – 2007. – Vol. 92. – № 6. – P. 2212–2222.

148. Collagen structure and nonlinear susceptibility: Effects of heat, glycation, and enzymatic cleavage on second harmonic signal intensity / B.–M. Kim, J. Eichler, K. M. Reiser [et al.] // *Lasers in Surgery and Medicine*. – 2000. – Vol. 27. – № 4. – P. 329–335.

149. Katz, E. P. Unique side–chain conformation encoding for chirality and azimuthal orientation in the molecular packing of skin collagen / E. P. Katz, C. W. David // *Journal of Molecular Biology*. – 1992. – Vol. 228. – № 3. – P. 963–969.

150. Altered collagen structure in mouse tail tendon lacking the $\alpha 2(I)$ chain11Edited by M. F. Moody / D. J. McBride, V. Choe, J. R. Shapiro, B. Brodsky // *Journal of Molecular Biology*. – 1997. – Vol. 270. – № 2. – P. 275–284.

151. Fibrillar collagen scoring by second harmonic microscopy: A new tool in the assessment of liver fibrosis / L. Gailhouste, Y. Le Grand, C. Odin [et al.] // *Journal of Hepatology*. – 2010. – Vol. 52. – № 3. – P. 398–406.

152. Continuous Grading of Early Fibrosis in NAFLD Using Label-Free Imaging: A Proof-of-Concept Study / J. Pirhonen, J. Arola, S. Sädevirta [et al.] // *PLOS ONE*. – 2016. – Vol. 11. – № 1. – P. e0147804.

153. Spectroscopic characterization and microscopic imaging of extracted and in situ cutaneous collagen and elastic tissue components under two-photon excitation / J. Chen, A. Lee, J. Zhao [et al.] // *Skin Research and Technology*. – 2009. – Vol. 15. – № 4. – P. 418–426.

154. Establishing diagnostic features for identifying the mucosa and submucosa of normal and cancerous gastric tissues by multiphoton microscopy / J. Chen, S. Zhuo, G. Chen [et al.] // *Gastrointestinal Endoscopy*. – 2011. – Vol. 73. – № 4. – P. 802–807.

155. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis / J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise [et al.] // *Nature Methods*. – 2012. – Vol. 9. – № 7. – P. 676–682.

156. Effect of Aging on Elastin Functionality in Human Cerebral Arteries / E. Fonck, G.G. Feigl, J. Fasel [et al.] // *Stroke*. – 2009. – Vol. 40. – № 7. – P. 2552–2556.

157. Tissue optical properties estimation from cross-polarization OCT data for breast cancer margin assessment / E. V Gubarkova, A. A. Moiseev, E. B. Kiseleva [et al.] // *Laser Physics Letters*. – 2020. – Vol. 17. – № 7. – P. 075602.

158. Tian, Q. Methods to compute prediction intervals: A review and new results / Q. Tian, D. J. Nordman, W. Q. Meeker // *Statistical Science*. – 2022. – Vol. 37. – № 4. – P. 580–597.

159. *Vulvar Pathology* / J. M. Velkey, A. H. S. Hall, S. J. Robboy [et al.] ; edited by M. Hoang, M. Selim. – New York : Springer New York, 2015. – 499 p. – ISBN 978-1-4939-1807-2

160. McPherson, T. Vulval lichen sclerosus and lichen planus / T. McPherson, S. Cooper // *Dermatologic Therapy*. – 2010. – Vol. 23. – № 5. – P. 523–532.

161. Ushiki, T. Collagen Fibers, Reticular Fibers and Elastic Fibers. A Comprehensive Understanding from a Morphological Viewpoint / T. Ushiki // Archives of Histology and Cytology. – 2002. – Vol. 65. – № 2. – P. 109–126.

162. Multiphoton microscopy assessment of the structure and variability changes of dermal connective tissue in vulvar lichen sclerosus: A pilot study / A. L. Potapov, M. A. Sirotkina, L. A. Matveev [et al.] // Journal of Biophotonics. – 2022. – Vol. 15. – № 9. – P. e202200036.

163. Возможности мультифотонной микроскопии для диагностики склеротического лишена вульвы / С. Г. Раденска–Лоповок, А. Л. Потапов, М. М. Логинова [и др.] // Архив патологии. – 2023. – Т. 85. – № 3. – С. 29–39.

164. Determination of collagen fibril size via absolute measurements of second-harmonic generation signals / S. Bancelin, C. Aimé, I. Gusachenko [et al.] // Nature Communications. – 2014. – Vol. 5. – № 1. – P. 4920.

165. Мультимодальная оптическая когерентная томография: возможности визуализации кровеносных и лимфатических сосудов вульвы / М. А. Сироткина, А. Л. Потапов, Н. Н. Вагапова [и др.] // Современные технологии в медицине. – 2019. – Т. 11. – № 4. – С. 26–33.

166. Noninvasive assessment of morphological and vascular features of the normal vulvar skin using multimodal OCT / A. Potapov, A. Bychkova, A. Saidova [et al.] // Photonics in Dermatology and Plastic Surgery 2023. – SPIE, 2023. – Vol. 12352. – P. 100–105.

167. Оценка восстановления кожи после лечения склерозирующего лишена вульвы фракционным CO₂-лазером с использованием мультимодальной оптической когерентной томографии / М. А. Сироткина, А. Л. Потапов, М. М. Логинова [и др.] // Современные технологии в медицине. – 2024. – Т. 16. – № 4. – С. 15–28. [RSCI]

168. Lymph vessels visualization from optical coherence tomography data using depth-resolved attenuation coefficient calculation / A. A. Moiseev, M. A. Sirotkina, A. L. Potapov [et al.] // Journal of Biophotonics. – 2021. – Vol. 14. – № 9. – P. e202100055.

169. Новый метод мультимодальной оптической когерентной томографии для диагностики склеротического лишена вульвы / А. Л. Потапов, Е. А. Коновалова, М. А. Сироткина [и др.] // *Акушерство и гинекология*. – 2020. – № 12. – С. 169–176.

170. Future research priorities for lichen sclerosus – results of a James Lind Alliance Priority Setting Partnership / R. C. Simpson, S. M. Cooper, G. Kirtschig [et al.] // *British Journal of Dermatology*. – 2019. – Vol. 180. – № 5. – P. 1236–1237.

171. Scanning electron microscopy of lichen sclerosus / H. L. de Almeida Jr, E. de B. C. Bicca, J. de A. Breunig [et al.] // *Anais Brasileiros de Dermatologia*. – 2013. – Vol. 88. – № 2. – P. 247–249.

172. Потапов, А. Л. Мультифотонная микроскопия в изучении морфологических особенностей раннего и позднего склеротического лишена вульвы / А. Л. Потапов, М. М. Логинова, В. В. Елагин // *Абрикосовские чтения : Материалы научно-практической конференции*. — Москва: ООО "Практическая Медицина", 2023. — С. 99–101.

173. Lichen sclerosus et atrophicus. A histological, immunohistochemical and electron microscopic study / Y. Mihara, M. Mihara, Y. Hagari, S. Shimaou // *Archives of dermatological research*. – 1994. – Vol. 286. – № 8. – P. 434–442.

174. Multi-omics Analysis Reveals Distinct Changes in the Cellular Composition of Vulvar Lichen Sclerosus / X. Sun, C. Liu, Y. Sun [et al.] // *Journal of Lower Genital Tract Disease*. – 2026. – Vol. 30. – № 1. – P. 9900.

175. Non-invasive diagnosis of early and advanced vulvar lichen sclerosus by multimodal optical coherence tomography / A. L. Potapov, M. Sirotkina, S. Radenska-Lopovok, N. Gladkova // *51st Annual European Society for Dermatological Research Meeting / Journal of Investigative Dermatology*. – 2022 – Vol. 142. – No. 12. – P. S181.

176. Panizzon, R. Collagen biosynthesis and type I and type III procollagen mRNA in lichen sclerosus et atrophicus / R. Panizzon, T. Vuorio, L. Bruckner-Tuderman // *Archives of Dermatological Research*. – 1990. – Vol. 282. – № 7. – P. 480–483.

177. Multimodal OCT Control for Early Histological Signs of Vulvar Lichen Sclerosus Recurrence after Systemic PDT: Pilot Study / A. Potapov, L. Matveev, A.

Moiseev [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, No. 18. – P. 13967.

178. Кросс-поляризационная оптическая когерентная томография для клинической оценки степени поражения дермы при склеротическом лихене вульвы / А. Л. Потапов, М. М. Логинова, А. А. Моисеев [и др.] // *Современные технологии в медицине*. – 2023. – Т. 15. – № 1. – С. 53–62.

179. Oikarinen, A. Collagen biosynthesis in Lichen sclerosus et atrophicus studied by biochemical and in situ hybridization techniques / A. Oikarinen, M. Sandberg, T. Hurskainen // *Acta dermato-venereologica*. – 1991. – Vol. 162. – № 1. – P. 3–12.

180. Неинвазивная диагностика склеротического лихена вульвы на основе морфологических критериев с помощью мультимодальной оптической когерентной томографии / А. Л. Потапов, М. М. Логинова, И. А. Кузнецова, М. А. Сироткина // *Алмазовский молодежный медицинский форум. / Трансляционная медицина*. – 2024. – Т. 11. – прил. 3. – С. 237–238.

181. Fiber alignment drives changes in architectural and mechanical features in collagen matrices / P. V Taufalele, J. A. VanderBurgh, A. Muñoz [et al.] // *PLOS ONE*. – 2019. – Vol. 14. – № 5. – P. e0216537.

182. Мультимодальная оптическая когерентная томография для неинвазивной диагностики морфологических вариантов склеротического лихена вульвы / А. Л. Потапов, М. М. Логинова, И. А. Кузнецова [и др.] // *Абрикосовские чтения : Материалы научно-практической конференции – Москва: ООО "Практическая Медицина", 2024. – С. 114–116.*

183. Cao, L. Increased dermal collagen bundle alignment in systemic sclerosis is associated with a cell migration signature and role of Arhgdib in directed fibroblast migration on aligned ECMs / L. Cao, R. Lafyatis, L. C. Burkly // *PLOS ONE*. – 2017. – Vol. 12. – № 6. – P. e0180751.

184. Type V Collagen Controls the Initiation of Collagen Fibril Assembly* / R. J. Wenstrup, J. B. Florer, E. W. Brunskill [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279. – № 51. – P. 53331–53337.

185. Abnormal collagen V deposition in dermis correlates with skin thickening and disease activity in systemic sclerosis / P. Martin, W. R. Teodoro, A. P. P. Velosa [et al.] // *Autoimmunity Reviews*. – 2012. – Vol. 11. – № 11. – P. 827–835.

186. Pathological pulmonary vascular remodeling is induced by type V collagen in a model of scleroderma / R. G. Marangoni, B. D. Korman, E. R. Parra [et al.] // *Pathology – Research and Practice*. – 2021. – Vol. 220. – P. 153382.

187. Vulvar elastosis: a novel diagnostic entity / S. H. C. See, T. L. Tan, T. A. Kurtzer [et al.] // *The American Journal of Dermatopathology*. – 2021. – Vol. 43. – № 6. – P. 418–422.

188. Three-dimensional imaging reveals major changes in skin microvasculature in lipoid proteinosis and lichen sclerosus / C. Kowalewski, A. Kozłowska, I. Chan [et al.] // *Journal of Dermatological Science*. – 2005. – Vol. 38. – № 3. – P. 215–224.

189. The value of ultrahigh resolution OCT in dermatology – delineating the dermo-epidermal junction, capillaries in the dermal papillae and vellus hairs / N. M. Israelsen, M. Maria, M. Mogensen [et al.] // *Biomedical Optics Express*. – 2018. – Vol. 9. – № 5. – P. 2240–2265.

190. Welzel, J. Optical coherence tomography in contact dermatitis and psoriasis / J. Welzel, M. Bruhns, H. H. Wolff // *Archives of Dermatological Research*. – 2003. – Vol. 295. – № 2. – P. 50–55.

191. Cutting-edge insights: LC-OCT and 5% cyclosporine for early lichen sclerosus treatment / C. M. Giorgio, V. Tancredi, G. Licata [et al.] // *Dermatology Reports*. – 2025. – Vol. 17. – № 4. – P. 10279

192. Extragenital lichen sclerosus: Clinical, dermoscopic, confocal microscopy and histologic correlations / F. Lacarrubba, G. Pellacani, A.E. Verzì [et al.] // *Journal of the American Academy of Dermatology*. – 2015. – Vol. 72. – № 1, Supplement 1. – P. S50–S52.