

АЛЛЕНОВА АНАСТАСИЯ СЕРГЕЕВНА

**Дифференциальная диагностика буллёзных дерматозов на
основе изучения клинико-морфологической картины кожи
неинвазивными методами исследований**

14.01.10 – Кожные и венерические болезни

14.03.03. – Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Теплюк Наталия Павловна

член-корреспондент РАН,

доктор медицинских наук, профессор

Ткаченко Сергей Борисович

Официальные оппоненты:

Махнева Наталия Викторовна – доктор медицинских наук, ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», факультет усовершенствования врачей, кафедра дерматовенерологии и дерматоонкологии, профессор кафедры

Морозов Сергей Георгиевич – чл.-корр. РАН, доктор медицинских наук, профессор, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», лаборатория общей и перинатальной нейроиммунопатологии, заведующий лабораторией

Ведущая организация:

ФГБОУ ВО "Московский государственный медико-стоматологический университет им.А.И. Евдокимова" Минздрава России

Защита диссертации состоится «___» _____ 2018 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д.208.040.10 на базе ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2 и на сайте <http://sechenov.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук, доцент

Чебышева Светлана Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Буллезные дерматозы — группа наследственных или приобретенных заболеваний, среди которых особое место занимают аутоиммунные буллезные дерматозы (АБД), характеризующиеся большим разнообразием форм, сложностью диагностики, крайне тяжелым и упорным течением, а также высокой летальностью при некоторых их вариантах [Потекаев Н.С., 2012; Самцов А.В., 2012].

Несмотря на относительно низкую распространенность, АБД являются серьезной медицинской и социальной проблемой, поскольку их диагностика часто затруднена, они протекают крайне тяжело и значительно ухудшают качество жизни пациентов, могут приводить к инвалидизации, имеют высокую частоту осложнений (в том числе развивающихся вследствие побочных эффектов применяемой лекарственной терапии), а также высокие показатели летальности [Самцов А.В., 2012; Lee J.H., 2014; Penha M.A., 2015]. Общая заболеваемость АБД составляет 4,19 случаев на 100 тыс. населения, смертность 6-40% [Лукиянов А.М., 2012; Marazza G., 2009; Wolff K., 2012].

В основе патогенеза АБД лежит выработка аутоантител к различным структурам кожи, что приводит к появлению характерных высыпаний в виде пузырей. Разнообразные варианты АБД отличаются этиологическими, морфологическими, патофизиологическими и, соответственно, клиническими особенностями и прогнозом [Вольф К., 2012; Самцов А.В., 2012; Kneisel A., 2011]. Наиболее частые формы АБД — различные варианты аутоиммунной пузырчатки (АП), буллезный пемфигоид Левера (БП), пузырчатка хроническая доброкачественная семейная Гужеро-Хейли-Хейли (ПДС), IgA-линейный дерматоз (Linear IgA disease, LAD) [Wolff K., 2012].

В настоящее время существует несколько методов диагностики АБД, «золотым стандартом» являются гистологическое и иммуногистохимическое (прямая реакция иммунофлюоресценции, РИФ) исследования. Однако постановка диагноза может быть затруднена. Прежде всего, это обусловлено не только сходством клинической картины большинства АБД и их форм, но и трудностями в интерпретации результатов указанных исследований [Галлямова Ю.А., 2006; Daniel B.S., 2012; Mokhtari M., 2012; Pavlovsky L., 2008]. Перечисленные стандартные методы диагностики являются инвазивными, что представляет определенные сложности, поскольку повреждение кожи у пациентов с АБД может приводить к появлению новых высыпаний, также проблематично многократное взятие биопсии с одного и того же участка кожи. Кроме того, общее количество биопсий, выполняемых пациенту, даже в диагностически сложных случаях, как правило, ограничено (в связи с риском ухудшения процесса, а также болезненностью), что тоже

может приводить к ошибкам диагностики, поскольку для уточнения диагноза необходимо исследование как пораженного, так и непораженного участка кожи; также может потребоваться повторное проведение биопсии [Лукьянов А.М., 2012; Махнева Н.В., 2005]. Результаты исследований обычно становятся известны только через несколько дней, однако при АДБ быстрая постановка диагноза крайне важна, поскольку процесс может быстро прогрессировать, а своевременная диагностика позволяет раньше начать соответствующую терапию и уменьшить риск осложнений и нежелательных исходов [Miletta N., 2014; Sticherling M., 2012].

В последние годы в дерматологии активно используются неинвазивные диагностические методы, которые помогают быстро в режиме реального времени и без повреждения кожных покровов оценить морфофункциональное состояние кожи, в частности, ультразвуковое дермасканирование (УД) и прижизненная конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ *in vivo*) и другие методы [Потекаев Н.Н., 2008; Ткаченко С.Б., 2014; Schmid-Wendtner M., 2005]. КЛСМ — один из наиболее информативных неинвазивных методов, позволяющий *in vivo* получать изображения эпидермиса и верхнего слоя дермы с разрешением, близким к таковому при гистологическом исследовании [Резайкин А.В., 2009; Штиршнайдер Ю.Ю., 2011; Levi A., 2012]. Ведущие дерматологические клиники мира уделяют большое внимание изучению возможностей КЛСМ при различных заболеваниях и активно используют данный метод для диагностики [Ardigo M., 2015; Hofmann-Wellenhof R., 2009; Ulrich M., 2013]. Возможности этих методов в диагностике АДБ изучены недостаточно. Изучение возможностей КЛСМ и УД представляется актуальным и необходимо для дальнейшего применения данных методов как при первичном обследовании пациентов с подозрением на АДБ, так и для уточняющей дифференциальной диагностики различных форм АДБ. Кроме того, не исследованы возможности УД и КЛСМ для изучения патогенетических механизмов АДБ, что также является актуальным с научной и практической точки зрения.

Цель исследования:

разработка алгоритма дифференциальной диагностики аутоиммунных буллезных дерматозов на основании результатов неинвазивных методов исследования патоморфологических особенностей кожи.

Задачи исследования:

1. Исследовать патоморфологические особенности кожи методом ультразвукового дермасканирования и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии *in vivo* при различных клинических вариантах течения аутоиммунных буллезных дерматозов.

2. Провести сравнительный анализ результатов гистологического исследования патоморфологии кожи при буллезных дерматозах с результатами неинвазивных методов и на его основе определить основные и дополнительные дифференциально-диагностические признаки изучаемой патологии кожи (аутоиммунных буллезных дерматозов).
3. Оценить чувствительность и диагностическую значимость ультразвукового дермасканирования и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии *in vivo* при исследовании кожи для дифференциальной диагностики аутоиммунных буллезных дерматозов.
4. Определить этапы алгоритма диагностики аутоиммунных буллезных дерматозов при использовании неинвазивных методов.
5. Изучить с помощью ультразвукового дермасканирования и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии *in vivo* основные звенья патогенетических механизмов развития АБД.

Научная новизна исследования

Впервые с помощью неинвазивных методов исследования (ультразвукового дермасканирования и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии *in vivo*) выявлены и описаны патоморфологические признаки, характерные для аутоиммунных буллезных дерматозов (аутоиммунной пузырчатки, буллезного пемфигоида Левера, хронической доброкачественной семейной пузырчатки Гужеро-Хейли-Хейли, IgA-линейного дерматоза). Впервые проведено исследование патогенетических механизмов АБД с помощью УД и КЛСМ *in vivo* на основании подробного изучения патоморфологической картины кожи. Проведен сравнительный анализ патоморфологических особенностей структуры кожи, выявленных неинвазивными методами и стандартным инвазивным методом (биопсия с последующим гистологическим исследованием). Впервые разработаны основные и дополнительные (УД- и КЛСМ-) дифференциально-диагностические критерии аутоиммунных буллезных дерматозов с использованием методов ультразвукового дермасканирования и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии *in vivo*. Выявлены преимущества, недостатки и ограничения УД и КЛСМ *in vivo*, на основании чего сформированы практические рекомендации по применению данных методов с учетом выявленных особенностей при диагностике изучаемых АБД. Получены данные о высокой информативности КЛСМ при дифференциальной диагностике АБД и возможности его применения в качестве альтернативы гистологическому и цитологическому методам для дифференциальной диагностики АБД.

Впервые разработан алгоритм для дифференциальной диагностики АБД с применением неинвазивных методов — УД и КЛСМ *in vivo*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в работе новые данные о патоморфологических изменениях кожи и особенностях патофизиологических процессов при аутоиммунных буллезных дерматозах с использованием КЛСМ и УД относятся как к области практической дерматологии, так и к области патофизиологии.

Научная значимость работы определяется новизной полученных данных и актуальностью темы исследования. Решаемая в исследовании задача является обоснованием нового перспективного для теоретической и клинической медицины направления, задача которого состоит в изучении патофизиологических и патоморфологических процессов в коже при АБД неинвазивными методами с целью совершенствования диагностики и лечения этих заболеваний.

Целесообразность развития данного направления обосновывается фактическими данными диссертации, свидетельствующими, что исследуемые неинвазивные методы могут быть достаточно эффективны для дифференциальной диагностики АБД, необходимость совершенствования которой является весьма актуальной.

Результаты проведенных исследований конкретизируют и развивают существующие представления о патоморфологических признаках различных форм АБД и их патогенетических механизмах. Представленные в работе сведения о патоморфологии и патогенезе АБД могут быть основой для понимания и дальнейшего изучения механизмов развития этой группы заболеваний, а также для совершенствования их диагностики и лечения. Результаты исследования могут служить обоснованием возможности применения УД и КЛСМ в практической работе дерматологов, а также содержат конкретные рекомендации по их использованию. Установленные в работе научные факты могут использоваться в лекционных курсах на кафедрах дерматологии и патофизиологии, а также в соответствующих пособиях и руководствах.

Основные положения, выносимые на защиту

1. С помощью УД и КЛСМ можно выявлять дифференциально-диагностические патоморфологические признаки аутоиммунной пузырчатки, буллезного пемфигоида Левера, семейной хронической доброкачественной пузырчатки Гужеро-Хейли-Хейли, IgA-линейного дерматоза.

2. Выявляемые с помощью УД и КЛСМ основные и дополнительные патоморфологические признаки АБД соотносятся с соответствующими ключевыми гистологическими признаками и могут применяться для дифференциальной диагностики

изучаемых заболеваний: аутоиммунной пузырчатки, буллезного пемфигоида Левера, семейной хронической доброкачественной пузырчатки Гужеро-Хейли-Хейли, IgA-линейного дерматоза.

3. КЛСМ в дифференциальной диагностике АБД может применяться в качестве метода, альтернативного инвазивному взятию биопсии с последующим гистологическим исследованием. Метод УД может быть использован в качестве дополнительного метода диагностики АБД.

4. Методы УД и КЛСМ могут быть включены в диагностические алгоритмы дифференциальной диагностики АБД.

5. На основании исследования патоморфологических особенностей кожи при АБД с помощью УД и КЛСМ возможно изучение патогенетических механизмов развития этой группы заболеваний.

Личный вклад автора

Автором проведено углубленное клиническое обследование больных аутоиммунными буллезными дерматозами, полностью выполнен объем заявленных в работе инструментальных исследований, сформирована база данных. Автором определены цели, задачи, методы исследования, осуществлен непосредственный набор материала. Интерпретированы данные лабораторных и клинических исследований, проведена статистическая обработка и анализ полученных результатов, сформулированы выводы и даны практические рекомендации.

Внедрение результатов работы в практическое здравоохранение

Полученные результаты исследования на тему «Дифференциальная диагностика буллезных дерматозов на основе изучения клинико-морфологической картины кожи неинвазивными методами исследований» внедрены в лечебную деятельность клиники кожных и венерических болезней имени В.А. Рахманова УКБ №2 Клинического Центра ГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Медицинского научно-образовательного центра ФГБОУ ВО МГУ им. М.В.Ломоносова, а также в учебный и научный процесс кафедры кожных и венерических болезней им. В.А. Рахманова лечебного факультета ГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Апробация работы

Материалы диссертации доложены и обсуждены на V Московском Форуме «Дерматовенерология и косметология: синтез науки и практики» (14–16 окт. 2015, г. Москва), на Международной конференции по неинвазивным диагностическим методам в дерматологии в г. Ницца, Франция, 24–26 сент. 2015 г., на IX «Санкт-Петербургских

дерматологических чтениях – 2015» (29–31 окт. 2015, г. Санкт-Петербург), на IX Международном форуме дерматовенерологов и косметологов IFDC-2016, 16–18 марта 2016, г. Москва.

Работа заняла первое место на конкурсе молодых ученых, проведенном в рамках IFDC-2016 (Международный форум дерматовенерологов и косметологов) в номинации "Фундаментальные исследования в дерматологии", Москва, 2016 год.

Ценность результатов данной научной работы подтверждается получением стипендии «Michael Hornstein Memorial Scholarship» на XXV Международном конгрессе EADV (Европейской Академии Дерматологии и Венерологии), Вена, Австрия, 28 сентября – 2 октября 2016 года.

Апробация диссертационной работы состоялась на совместной научно-практической конференции Научно-исследовательского отдела иммунозависимых дерматозов и кафедры кожных и венерических болезней имени В.А. Рахманова лечебного факультета ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) 06 июня 2016 года.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, из них 4 в изданиях, утвержденных перечнем ВАК РФ.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует шифру научной специальности: 14.01.10 – кожные и венерические болезни. Кожные и венерические болезни – область медицинской науки, изучающая кожный покров и видимые слизистые оболочки в норме и патологии. Основное внимание уделяется этиологии, эпидемиологии, патогенезу, диагностике, лечению и профилактике дерматозов и инфекций, передаваемых половым путем. Диссертация соответствует формуле специальности и области исследований согласно пунктам 1,3.

Диссертация соответствует шифру научной специальности: 14.03.03 – патологическая физиология. Патологическая физиология – специальность, занимающаяся изучением причин возникновения, механизмов развития и исходов патологических процессов. Значение данной специальности состоит в исследовании ранее неизвестных закономерностей функционирования организма, его органов и систем в условиях болезни и разработке принципов новых эффективных методов лечения заболеваний. Диссертация соответствует формуле специальности и области исследований согласно пунктам 1,2,4,7,8,9.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 145 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, содержащего 202 источника (45 отечественных и 157 зарубежных авторов). Работа иллюстрирована 40 рисунками и 37 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В исследование было включено 52 пациента, проходивших обследование и лечение в клинике кожных и венерических болезней Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова с 2013 по 2016 год. Отбор пациентов осуществлялся на основании критериев включения, невключения и исключения. Критерии включения: в исследовании принимали участие совершеннолетние, дееспособные больные мужского или женского пола в возрасте от 18 лет, с подозрением на один из АБД (АП, БП, LAD и ПДС) и имеющие соответствующие высыпания на коже. Все пациенты были подробно проинформированы о целях и задачах исследования и подписали информированное согласие на участие в исследовании. В исследование не включались больные, не соответствовавшие критериям включения, пациенты с психическими расстройствами, с наличием тяжелой сопутствующей соматической патологии в стадии декомпенсации, имеющие инфекционные заболевания (сифилис, ВИЧ, гепатит В и С, туберкулез), эпилепсию; пациенты, страдающие алкоголизмом, наркоманией и любыми психическими расстройствами; беременные и кормящие женщины, а также пациенты, не желавшие участвовать в исследовании по каким-либо причинам или не соблюдавшие режим и схему обследования.

В процессе исследования пациенты, в зависимости от общего состояния и наличия сопутствующих заболеваний, были консультированы терапевтом, эндокринологом и другими специалистами, в том числе, в ряде случаев, онкологом для исключения паранеопластического характера дерматоза. На первом этапе всем пациентам было выполнено исследование высыпаний (на одних и тех же выбранных участках кожи) с помощью изучаемых неинвазивных методов — ультразвукового дермасканирования (УД) и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ). На основании результатов каждого из методов, а также по их совокупности были поставлены предварительные диагнозы. Затем с того же участка кожи с высыпаниями и с соседнего участка видимо не измененной кожи было выполнено взятие биоптатов и проведены стандартные

диагностические процедуры: гистологическое и иммуногистохимическое исследование (прямая РИФ).

Всем пациентам была проведена клиническая оценка высыпаний с подробным их описанием, а также комплексное обследование, включавшее общий и биохимический анализ крови, анализ крови на инфекции (сифилис, ВИЧ, гепатиты В и С), общий анализ мочи. При наличии показаний были назначены дополнительные исследования, консультации врачей других специальностей (гастроэнтеролог, эндокринолог, оториноларинголог и др.). Был проведен тщательный сбор анамнеза с уточнением времени начала и характера течения заболевания, наследственной отягощенности, сопутствующей патологии. Окончательный диагноз был поставлен на основании гистологического и иммуногистохимического исследований.

После статистической обработки полученных результатов были сопоставлены диагностические возможности изучаемых методов (по отдельности и в совокупности) в сравнении со стандартным методом морфологической диагностики — гистологическим исследованием.

Стандартные диагностические методы

Исследования были проведены на базе клиники кожных и венерических болезней УКБ №2 ГБАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, кафедры патологической анатомии им. А.И. Струкова Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, кафедры трансплантологии и искусственных органов Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, лаборатории патоморфологии и иммунологии Научно-исследовательского клинического института педиатрии РНИМУ им.Н.И.Пирогова, лаборатории иммуногистохимии отдела клинической патологии ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова».

Было проведено гистологическое исследование биоптатов кожи всех больных. У каждого пациента брали 2 образца кожи — с пораженного участка (предпочтение отдавалось участкам с буллезными элементами, если они были у данного пациента) и с участка видимо не пораженной кожи, расположенного вблизи высыпаний. Второй биоптат использовался в ходе иммуногистохимического исследования. Эксцизионная биопсия пораженных участков кожи проводилась под местной анестезией 2% раствором новокаина, размер образцов кожи 0,3x0,5 см. Процедура приготовления препарата была стандартной. Материал помещали в фиксирующую жидкость, затем подготавливали тонкие срезы с помощью микротомы и окрашивали гематоксилином и эозином. Готовые срезы изучали под микроскопом и фотографировали.

Для выявления фиксированных антител (иммуноглобулинов) и иммунных комплексов применяли классический метод иммунофлюоресценции, с использованием IgG и C3 компонента комплемента (а также IgA, IgM). Серийные криостатные срезы после просушивания (30 мин при комнатной температуре) промывали физиологическим раствором с фосфатным буфером для удаления свободных растворимых белков, а затем обрабатывали люминесцирующей сывороткой (метка изотиоцианатом флюоресцеина) против иммуноглобулинов классов G, M, A, C3-компонента комплемента). После этого срезы повторно промывали (3-5 мин) и помещали под покровное стекло в 60% нейтральный глицерин. Затем полученные образцы анализировали и фотографировали. Для контроля одновременно проводили изучение срезов, окрашенных гематоксилином и эозином.

Исследуемые неинвазивные методы

Исследования неинвазивными методами (УД и КЛСМ), а также интерпретация их результатов были выполнены лично автором и проводились на базе НИО иммунозависимых дерматозов и клиники кожных и венерических болезней УКБ №2 ГБАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова.

Ультразвуковое дермасканирование (УД) было проведено методом двухмерного ультразвукового сканирования кожи при помощи аппарата Dermascan C Ver.3 («Cortex Technology», Дания) с частотой ультразвуковой волны 20 МГц, проникающей на глубину 7-8 мм. С помощью УД оценивалась толщина дермы с эпидермисом, интенсивность эхосигнала эпидермиса и дермы в целом, наличие отдельных гипо- и гиперэхогенных участков. Кроме этого, ультразвуковые снимки оценивались по визуальным критериям путем сравнения двух изображений: патологического участка и нормальной кожи (на зеркальном участке тела пациента).

С помощью УД был выявлен и оценен перечень специфических и неспецифических ультразвуковых признаков АБД, а также специальные ультразвуковые феномены, свидетельствующие о неспецифических изменениях в эпидермисе и дерме, но не имеющие прямых гистологических аналогов: степень снижения общей эхогенности дермы и наличие субэпидермальной гипоехогенной зоны (SLEB).

КЛСМ была выполнена на аппарате Vivascope 1500 (Lucid Inc, Rochester NY, USA; Mavig GmbH, München, Germany). Метод позволяет послойно исследовать структуру тканей in vivo в режиме реального времени с высокой разрешающей способностью, сравнимой с гистологическим исследованием. Сканирование осуществляется с помощью волн 830 нм, мощность составляет не более 16 мВт и не вызывает повреждения кожи или поражения глаз. Сканирование производится в горизонтальной плоскости, исследуемый участок — 4×4 мм, максимальная глубина 350-400 мкм, что является достаточным для

изображения эпидермиса и верхней части дермы (сосочковой и верхней ретикулярной). Получение изображений возможно благодаря естественному контрасту и различиям в коэффициенте рефракции компонентов кожи, таких как кератин. При проведении КЛСМ предпочтение отдавалось участкам с буллезными элементами (если они были у данного пациента). С помощью КЛСМ были выявлены и оценены специфические и неспецифические КЛСМ-признаки АД, аналогичные выявляемым при гистологическом исследовании. Перечень этих признаков был тот же, что и при выполнении УД, но при КЛСМ в пузыре дополнительно выявлялись акантолитические клетки (АК).

Методика проведения исследования морфологии кожи неинвазивными методами (УД и КЛСМ)

В соответствии с целью и задачами была разработана методика проведения исследования кожи неинвазивными методами (УД и КЛСМ), состоящая из нескольких этапов. Все полученные данные вносились в протокол исследования больных, а также были систематизированы в форме статистических таблиц.

Для изучения диагностической ценности неинвазивных методов при разных АД пациенты дважды были разделены на группы: 1) в зависимости от диагноза – на 4 группы (АП, БП, ПДС, LAD) 2) в зависимости от наличия буллезных высыпаний — на 2 группы: с буллезными элементами и без них (поскольку при отсутствии буллезных высыпаний гистологическое исследование у пациентов с АД менее информативно, это же можно предположить и в отношении изучаемых методов).

На первом этапе исследования было проведено УД и КЛСМ с выявлением и описанием данного перечня признаков или их прямых аналогов. Специфические признаки: наличие пузыря на исследуемом участке кожи, в случае его обнаружения определяли уровень его расположения (интра- или субэпидермальный) и наличие в его полости клеточного содержимого (при УД) или акантолитических клеток (при КЛСМ). Также определялись неспецифические признаки. Далее была сопоставлена выявляемость гистологическим, УД- и КЛСМ- методами каждого из вышеописанных признаков. Результаты УД и КЛСМ сравнивались с результатами гистологического исследования по ключевым диагностическим критериям: 1) определение локализации пузыря (если есть), 2) выявление клеточного содержимого в полости пузыря, 3) наличие неспецифических признаков (расширенные сосуды и инфильтрация дермы), а также степень совпадения неспецифических признаков. Помимо указанного перечня признаков, каждым из методов (УД и КЛСМ) были выявлены и описаны некоторые дополнительные (аналогичные гистологическим), а также специальные УД- и КЛСМ-признаки, не имеющие прямых гистологических аналогов, но отражающие характерные или неспецифические

структурные и функциональные изменения в коже при различных АБД, определена их частота выявляемости.

На основании результатов, полученных с помощью УД и КЛСМ по отдельности и в совокупности (УД, КЛСМ, УД+КЛСМ), были поставлены предварительные диагнозы. При этом были получены 3 типа ответов: 1) диагноз не поставлен, 2) определена только группа дерматоза (интра- или субэпидермальный), 3) есть точный диагноз. Далее была изучена степень совпадения указанных диагнозов с гистологическими.

Таким образом, была определена выявляемость различных признаков изучаемых АБД с помощью стандартного и неинвазивных методов, определена частота совпадений УД- и КЛСМ-диагнозов с гистологическими для разных групп пациентов.

Статистический анализ проводили с применением пакета прикладных программ Excel (MS Office 2010), Statistica 6.0. При сравнении групп друг с другом использовали критерий Манна-Уитни, также применяли метод Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Клиническая характеристика больных

В исследование было включено 52 пациента: 17 (32,7%) мужчин и 35 (67,3%) женщин. После обследования, в зависимости от окончательного диагноза (основанного на результатах гистологического и ИГХ-исследования), пациенты были разделены на 4 группы. В первую, наиболее многочисленную, группу вошли пациенты с АП — 30 человек (57,7%), во вторую — 14 пациентов с БП (26,9%), в третью — 7 пациентов с ПДС (13,5%), наименьшей группой оказалась группа LAD — 1 пациент (1,9%). Пациенты с АП были распределены на 4 группы в зависимости от формы АП. Наиболее частой оказалась вульгарная пузырчатка (ВП, 21 пациент, 70% от всех пациентов с АП) и себорейная (СП, 7 пациентов, 23,33%), листовидная и паранеопластическая формы были диагностированы у двоих пациентов. Одной из основных характеристик клинической картины больных АБД являлось вовлечение в патологический процесс слизистых оболочек, в первую очередь слизистой полости рта. В исследование были включены только пациенты, имеющие высыпания на коже, пациенты с изолированным поражением слизистых включены не были. При этом высыпания на слизистых наблюдались только у пациентов с АП и БП. Соответственно, изолированное поражение кожи наблюдалось у 34 больных (65,4%), сочетанное поражение кожи и слизистой полости рта — у 18 (34,6%) пациентов. Классические буллезные высыпания наблюдались у 42 (80,8%) пациентов и отсутствовали у 10 (19,2%) пациентов (у 5 пациентов с ВП, у 4 пациентов с СП, у 1 пациента с БП).

Вторичная инфекция кожи является частым осложнением АБД, ее симптомы наблюдались у 11 (21,2%) пациентов, среди них было 5 пациентов с ПДС, 4 – с ВП и 2 – с СП.

Гистологическое исследование было выполнено всем пациентам на втором этапе (после УД и КЛСМ), результаты были оценены в виде выявляемости каждого из признаков во всех нозологических группах. Отдельно была проведена оценка выявляемости признаков среди пациентов без буллезных высыпаний. Аналогичная оценка проводилась методами УД и КЛСМ с последующим сравнением выявляемости каждого признака.

Результаты и их обсуждение

В группе пациентов с буллезными высыпаниями уровень расположения пузыря с помощью УД был определен у 38 (90,5%) пациентов. В интраэпидермальных пузырях содержимое было выявлено в 42,3% случаев, общая частота выявления инфильтрации и расширенных сосудов дермы среди всех пациентов (с буллезными высыпаниями и без них) составила 80,8% и 48,1%, соответственно. Идентифицировать вид клеточного содержимого пузыря, а также состав дермального инфильтрата с помощью УД было невозможно ввиду его недостаточной разрешающей способности. В обеих группах были четко определены области гипохрогенности дермы и субэпидермальная гипохрогенная полоса (SLEB). Гипохрогенность дермы присутствовала в 90-100% случаев, при этом ее выраженность значительно варьировала в зависимости от заболевания: при ПДС у большинства пациентов (6 пациентов, 85,7%) достоверно чаще наблюдалась значительная гипохрогенность дермы, тогда как при АП этот показатель был достоверно ниже — 23,8% ($p<0,05$). Наличие SLEB также выявлялось чаще при ПДС (42,9%) ($p<0,05$), чем при ВП и АП (по 23,1% и 23,8%, соответственно).

При исследовании высыпаний методом КЛСМ у всех больных (100% наблюдений) был выявлен уровень расположения пузырей (при их наличии) и АК (в группе пациентов с АП и ПДС). Кроме того, были точно определены форма и размеры полостей, присутствие в них фибрина, клеток инфильтрата, повреждение нормальной структуры эпидермиса, инфильтрат и пара/дискератоз в эпидермисе, а также специфические изменения в видимо не измененной коже рядом с высыпаниями у пациентов с АП. У пациентов с ПДС был выявлен признак, аналогичный гистологическому симптому «полуразрушенной кирпичной стены» (в 100% случаев). В группах с буллезными высыпаниями и без них частота выявления инфильтрата и расширенных сосудов дермы была сопоставимой: инфильтрат выявлен в 92,9% и 100% случаев, расширение сосудов дермы — в 75% и 92,8%, соответственно. Тип дермального

инфильтрата (клеточный состав) методом КЛСМ определен не был, что связано с недостаточной разрешающей способностью КЛСМ.

Выявляемость уровня расположения пузырей и присутствия клеток в них (у пациентов с интраэпидермальными пузырями) при гистологическом исследовании (100% и 53,6%) достоверно выше ($p < 0,05$), чем при УД (90,5% и 42,3%). Частота выявления АК у пациентов с АП методом КЛСМ (100%) достоверно выше, чем при гистологическом исследовании (38%) ($p < 0,05$). Частота определения уровня расположения пузырей методом КЛСМ сопоставима с таковой при гистологическом исследовании.

Таким образом, в ходе исследования были определены основные специфические диагностические признаки: уровень расположения пузыря и клеточное содержимое (методом УД) или АК (методом КЛСМ); неспецифические признаки: инфильтрат и расширенные сосуды дермы. Дополнительные неспецифические УД-признаки: гипоехогенность дермы и субэпидермальная гипоехогенная полоса (SLEB). Конфокально-микроскопические специфические признаки: симптом «полуразрушенной кирпичной стены», неспецифические: присутствие в пузырях фибрина, клеток инфильтрата, повреждение нормальной структуры эпидермиса, клетки инфильтрата и пара/дискератоз в эпидермисе. Кроме того, была определена выявляемость данных признаков методами УД, КЛСМ и гистологическим методом.

На основании анализа результатов каждого из неинвазивных методов всем пациентам был поставлен предварительный диагноз, при этом были получены 3 варианта ответа: диагноз поставлен, определена только группа дерматоза (интра- или субэпидермальный), диагноз не поставлен.

Точный диагноз с помощью УД в группе пациентов с буллезными высыпаниями был поставлен в 28,6% случаев, при этом только морфологическая группа дерматоза (интра- или субэпидермальный) была определена в 66,7% случаев, таким образом, в целом определение группы дерматоза было возможно в 95,3% случаев. В группе пациентов без буллезных высыпаний точный диагноз поставлен не был ни в одном из случаев.

С помощью КЛСМ точный диагноз в группе с буллезными высыпаниями был поставлен в 78,6% случаев, определен только тип дерматоза в 21,4% случаев; таким образом, тип дерматоза был определен у 100% пациентов с буллезными высыпаниями. В группе без буллезных высыпаний точный диагноз не был поставлен ни в одном случае, в 1 случае (11,1%) определен тип дерматоза на основании косвенных признаков.

На следующем этапе было проведено сопоставление УД- и КЛСМ- диагнозов с гистологическим (оценивалось совпадение диагнозов) (табл. 1 и 2).

Таблица 1 — Количество совпадений ультразвукового и гистологического диагнозов

	С буллезными высыпаниями				Без буллезных высыпаний			
	не совпали	совпали	совпала только группа дерматоза	всего	не совпали	совпали	совпала только группа дерматоза	Всего
АП	1 (4,76%)	8 (38,14%)	12 (57,1%)	21 (100%)	9 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	9(100%)
БП	0 (0%)	1 (7,69%)	12 (92,3%)	13 (100%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1(100%)
ПДС	1 (14,3%)	3 (42,9%)	3 (42,9%)	7 (100%)	-	-	-	-
LAD	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)	-	-	-	-

Таблица 2 — Количество совпадений КЛСМ и гистологического диагнозов

	С буллезными высыпаниями				Без буллезных высыпаний			
	не совпали	совпали	совпала только группа дерматоза	всего	не совпали	совпали	совпала только группа дерматоза	Всего
АП	0	18 (85,7%)	3 (14,3%)	21 (100%)	8 (89,9%)	0	1 (11,1%)	9 (100%)
БП	0	7 (53,8%)	6 (46,2%)	13 (100%)	1 (100%)	0	-	1 (100%)
ПДС	0	7 (100%)	0	7 (100%)	-	-	-	-
LAD	0	0	1 (100%)	1 (100%)	-	-	-	-

Из данных, представленных в Таблицах 1 и 2 следует, что совпадение диагнозов, поставленных с помощью УД и КЛСМ, с гистологическим диагнозом во всех группах пациентов в целом достоверно чаще ($p<0,05$) наблюдалось при использовании метода КЛСМ.

Таким образом, на основании анализа полученных результатов можно сделать вывод о том, что, несмотря на недостаточную чувствительность, УД может применяться при предварительной диагностике буллезных дерматозов с целью ограничения круга заболеваний, в частности определения морфологического типа АД. Кроме того, метод позволяет оценить степень воспалительной реакции в дерме на основании анализа гипозоженности дермы, выявления субэпидермальной гипозоженной полосы (SLEB), а также неспецифических признаков при проведении дифференциальной диагностики АП и ПДС: при ПДС в дерме достоверно чаще выявляются инфильтрат и расширенные сосуды ($p<0,05$). КЛСМ обладает диагностически значимой чувствительностью при буллезных

высыпаниях (78,6%); в 100% случаев определяется группа дерматоза и/или ставится точный диагноз. Достоверно большая (100%, $p<0,05$), чем при гистологическом исследовании (38%) и цитологическом методе частота выявления АК у пациентов с АП, позволяет сделать вывод о возможности замены цитологического метода методом КЛСМ для обнаружения акантолитических клеток, а также расценивать данный факт как преимущество КЛСМ перед гистологическим исследованием. Таким образом, при проведении дифференциальной диагностики АБД у пациентов с буллезными высыпаниями КЛСМ может применяться в качестве метода, альтернативного инвазивному взятию биопсии с последующим гистологическим исследованием. При изучении методом КЛСМ участков видимо не измененной кожи вблизи высыпаний у 57,1% пациентов с АП были обнаружены специфические изменения.

Исходя из приведенных выше данных, можно сделать вывод о высокой диагностической точности КЛСМ, сопоставимой с точностью эталонного метода — гистологического исследования. При проведении КЛСМ была показана высокая выявляемость ключевых дифференциально-диагностических признаков изучаемых дерматозов (АП, БП, ПДС, LAD). Более высокую точность метод показал в определении морфологической группы дерматоза (интра- или субэпидермальный), в дифференциальной диагностике интраэпидермальных АБД, а также в целом в группе пациентов с буллезными высыпаниями. В ходе исследования были выявлены следующие особенности КЛСМ. Метод обладает большей чувствительностью в отношении выявления АК, чем гистологическое исследование, что является его несомненным преимуществом. С помощью КЛСМ такие признаки, как наличие воспалительных клеток в полости пузыря, фибрина, признаки дискератоза и другие специфические и неспецифические признаки определяются с высокой частотой, что также повышает диагностическую ценность изучаемого метода. Ограничением метода является невозможность дифференцировки клеток инфильтрата (определение типа клеток), что может ограничивать диагностическую точность метода. КЛСМ позволяет в режиме реального времени наблюдать в динамике патофизиологические процессы, в частности, изменения кровотока в сосудах дермы, что может быть успешно использовано как в диагностических, так и в научных целях.

При оценке эффективности совместного применения методов УД и КЛСМ было установлено, что диагностическая точность КЛСМ метода такая же, как и в случае совместного использования УД и КЛСМ. Учитывая данный факт, а также приведенные выше результаты о значительно более высокой диагностической точности КЛСМ по сравнению с УД, можно сделать вывод о том, что применение УД совместно с КЛСМ для дифференциальной диагностики АБД нецелесообразно. Метод УД может быть

использован отдельно в случае отсутствия возможности выполнения КЛСМ для определения морфологической группы дерматозов, то есть для предварительной ориентировочной диагностики.

На основании проведенного исследования разработаны следующие диагностические алгоритмы с использованием КЛСМ и УД (рис. 1 и 2).

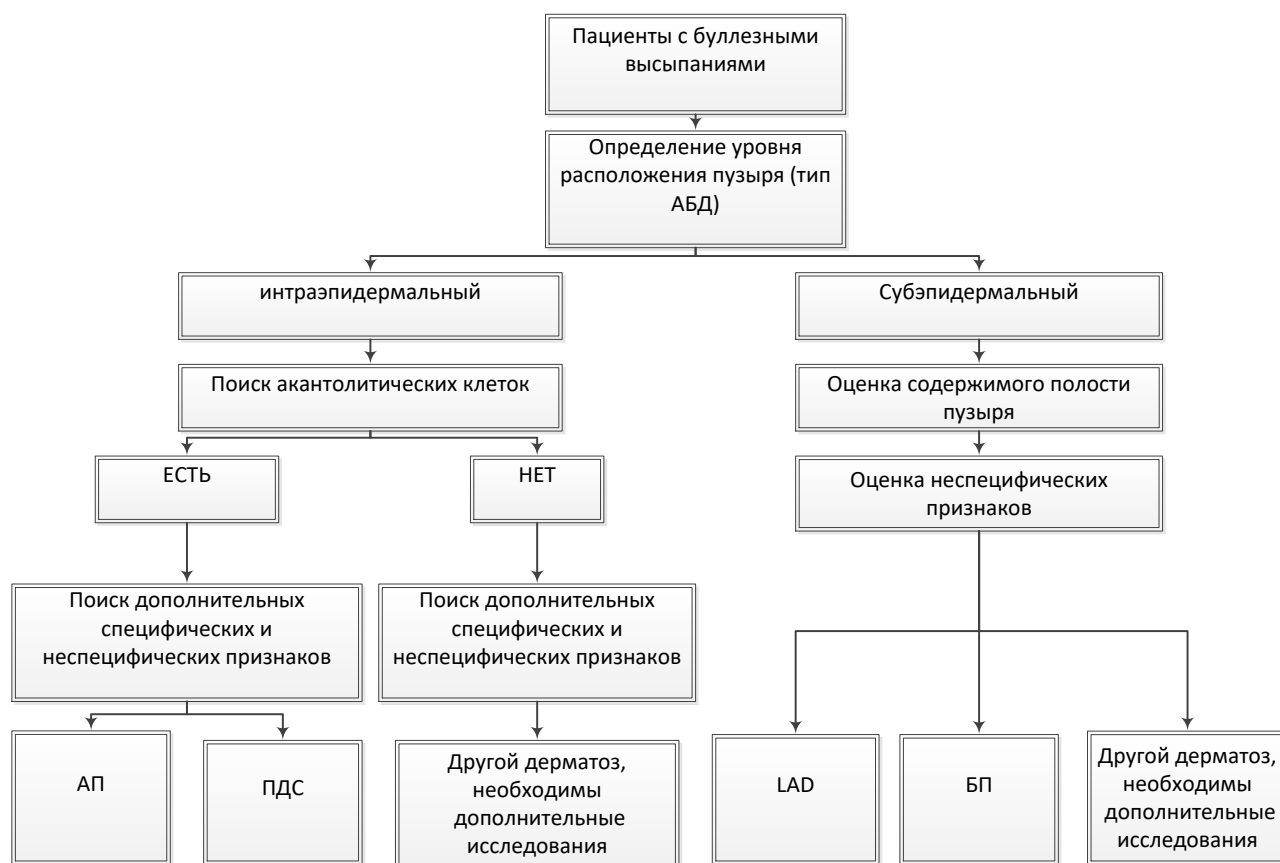


Рисунок 1 — Алгоритм дифференциальной диагностики аутоиммунных буллезных дерматозов с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии



Рисунок 2 — Алгоритм дифференциальной диагностики аутоиммунных буллезных дерматозов с использованием ультразвукового дермасканирования

На основании результатов изучения патоморфологических изменений кожи при АБД методами УД и КЛСМ установлена возможность оценки и наблюдения в динамике таких ключевых патофизиологических процессов, протекающих в ходе прогрессирования ряда АБД, как воспаление и акантолиз. Основанием для такого вывода служат обнаруженные патоморфологические признаки, свидетельствующие о таких компонентах воспаления, как изменения микроциркуляции, наблюдаемые в виде расширения сосудов, отека дермы, а также воспалительной инфильтрации различной степени выраженности как в эпидермисе, так и в дерме. Также указанными методами (в частности, КЛСМ) четко определяются признаки прогрессирования акантолиза, а также возможного наличия вторичной инфекции. Выявление методом УД гипоехогенных участков и SLEB также может служить для оценки степени выраженности воспалительного процесса, например, при присоединении вторичной инфекции. Акантолиз является ключевым патогенетическим процессом и наблюдается при АП и ПДС, но при каждом из данных заболеваний имеет свои особенности. В частности, выявленные признаки неполного акантолиза, а также разные стадии данного процесса, наблюдаемые у разных пациентов с ПДС, свидетельствуют не только об ином механизме образования полостей по сравнению с АП, но и об отсутствии такого быстрого прогрессирования данного заболевания по сравнению с буллезными вариантами АП. Для каждого из изучаемых АБД вышеуказанные признаки были выявлены в разной степени, что подтверждает данные о различном характере течения данных АБД. В частности,

установлено, что более активное воспаление с выраженной инфильтрацией характерно для БП и ПДС. Однако при развитии вторичной инфекции эти признаки также наблюдаются и при АП. Полученные с помощью УД и КЛСМ данные об особенностях патогенеза АБД могут быть использованы для контроля терапии АБД, а также для оптимизации диагностики и терапии. Таким образом, УД и КЛСМ могут быть успешно использованы для изучения патогенетических особенностей АБД, что значимо не только с теоретической, но и с практической точки зрения.

Таким образом, УД и КЛСМ могут быть использованы для дифференциальной диагностики АБД в соответствии с разработанными алгоритмами, а также для изучения основных звеньев патогенеза АБД.

ВЫВОДЫ

1. С помощью неинвазивных методов — ультразвукового дермасканирования (УД) и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии *in vivo* (КЛСМ) — у пациентов с изучаемыми АБД (с аутоиммунной пузырчаткой, буллезным пемфигоидом Левера, хронической доброкачественной семейной пузырчаткой Гужеро-Хейли-Хейли и линейным IgA-дерматозом) выявлены основные специфические патоморфологические признаки: определен уровень расположения пузырей (при их наличии; выявляемость признака 95,3% и 100%, соответственно) и присутствие акантолитических клеток (при их наличии; при использовании УД — выявление содержимого пузырей) (выявляемость признака 42,3% и 100%, соответственно), а также неспецифические признаки: инфильтрат, расширенные сосуды дермы (а также ряд других дополнительных признаков).

2. Сравнительный анализ данных, полученных с помощью УД и КЛСМ, с данными гистологического исследования показал, что в группе пациентов с буллезными высыпаниями выявляемость ключевых диагностических признаков — уровня расположения пузырей и присутствия в интраэпидермальных пузырях АК — при гистологическом исследовании достоверно выше (100% и 53,6%), чем при УД (90,5%; выявление содержимого пузырей — 42,3%) ($p < 0,05$). При использовании КЛСМ уровень расположения пузырей и АК (при их наличии) определялись у 100% пациентов. При этом частота определения уровня расположения пузырей методом КЛСМ (100%) сопоставима с таковой при гистологическом исследовании. Частота выявления АК у пациентов с АП методом КЛСМ (100%) достоверно выше, чем при гистологическом исследовании (38%) ($p < 0,05$). Таким образом, на основании сравнительного анализа данных УД и КЛСМ с результатами гистологического исследования были выделены основные и дополнительные специфические и неспецифические УД- и КЛСМ-признаки (в том числе

не имеющие прямых гистологических аналогов), которые могут быть использованы для дифференциальной диагностики АБД.

3. Точный диагноз методом УД в группе пациентов с буллезными высыпаниями был поставлен в 28,6% случаев, морфологическая группа АБД (включая и случаи постановки диагноза) была определена в 95,3% случаев, в группе пациентов без буллезных высыпаний УД не позволила поставить точный диагноз. Таким образом, УД может применяться для предварительной диагностики буллезных дерматозов у пациентов с буллезными высыпаниями с целью ограничения круга диагностического поиска. КЛСМ обладает достоверно большей чувствительностью при буллезных высыпаниях (78,6% случаев постановки диагноза, $p < 0,05$), чем УД; в 100% случаев определяется группа дерматоза (интра- или субэпидермальный) и/или ставится точный диагноз. Достоверно большая (100%; $p < 0,05$), чем при гистологическом исследовании (38%) и цитологическом методе, частота выявления АК позволяет сделать вывод о возможности и целесообразности замены цитологического исследования методом КЛСМ для обнаружения АК, а также о возможности применения КЛСМ как метода, альтернативного гистологическому исследованию. При сравнении точности диагностики КЛСМ и КЛСМ совместно с УД показано, что добавление УД к КЛСМ не повышает точность диагностики ни для одной из групп пациентов. В связи с этим, совместное использование данных методов нецелесообразно.

4. Составлены дифференциально-диагностические алгоритмы с использованием УД и КЛСМ *in vivo*, состоящие из следующих основных этапов: определение уровня расположения пузырей (при их наличии) и их содержимого (обнаружение АК), выявление и оценка степени выраженности дополнительных признаков: инфильтрации и изменений сосудов дермы. Алгоритмы позволяют дифференцировать изучаемые АБД или определить морфологическую группу дерматоза при наличии буллезных высыпаний (интра- или субэпидермальный).

5. УД и КЛСМ позволяют в динамике наблюдать основные звенья патогенеза АБД, а именно воспаление и акантолиз. Выраженность воспаления может быть оценена данными неинвазивными методами с помощью анализа таких признаков как инфильтрация дермы и эпидермиса, степень расширения сосудов дермы, отек, которые достоверно выявляются методом КЛСМ. Кроме того, оценка ряда ультразвуковых характеристик, таких как изменение общей эхогенности и появление гипоэхогенных субэпидермальных зон, также может помочь в оценке воспаления. Совокупность неспецифических признаков, выявляемых данными методами, может указывать на осложнение АБД, в частности присоединение вторичной инфекции. КЛСМ достоверно

выявляет ключевые признаки акантолиза. Оценка указанных звеньев патогенеза АБД с помощью УД и КЛСМ может не только служить дополнительным источником диагностически значимой информации, но и уточнять некоторые механизмы развития изучаемых АБД, что может дополнить существующие представления об их патогенезе.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Пациентам с подозрением на АБД, имеющим буллезные высыпания, рекомендуется проводить диагностический поиск в начале обследования до проведения биопсии с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в соответствии с разработанным алгоритмом.

При невозможности использования КЛСМ у пациентов с подозрением на АБД (имеющим буллезные высыпания) с целью ориентировочного определения морфологической группы АБД рекомендовано выполнение ультразвукового дермасканирования.

При отсутствии буллезных высыпаний КЛСМ и УД могут быть использованы только в качестве уточняющих методов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. С.Б. Ткаченко, Н.П. Теплюк, **А.С. Алленова** Современные неинвазивные методы дифференциальной диагностики аутоиммунных буллезных дерматозов // Материалы VI Всероссийской конференции «Функциональная диагностика-2014»; Москва, 28-30.05.2014, С.297–298.

2. Теплюк Н.П., Белоусова Т.А, Грабовская О.В., Пятилова П.М., **Алленова А.С.** Линейный IgA-зависимый буллезный дерматоз // **Российский журнал кожных и венерических болезней.** 2015 (1),С. 40-45.

3. Ткаченко С.Б., Теплюк Н.П., **Алленова А.С.**, Лепехова А.А. К вопросу о классификации буллезных дерматозов // Российский журнал кожных и венерических болезней. 2015 (2), С.11–15.

4. Ткаченко С.Б., Теплюк Н.П., **Алленова А.С.**, Куприянова А.Г., Лепехова А.А., Пятилова П.М. Современные методы дифференциальной диагностики истинной акантолитической пузырчатки и буллезного пемфигоида // **Российский журнал кожных и венерических болезней.** 2015 (3), С.17–23.

5. Теплюк Н.П., **Алленова А.С.**, Варшавский В.А., Лепехова А.А., Зайденов В.А. Ошибки в диагностике аутоиммунной пузырчатки // материалы конференции / IX «Санкт-Петербургские дерматологические чтения – 2015», 29-31 окт. 2015. — С.177–179.

6. Ткаченко С.Б. , Теплюк Н.П. , Варшавский В.А., Зайденов В.А., **Алленова А.С.** Прижизненная конфокальная лазерная сканирующая микроскопия в диагностике аутоиммунных буллезных дерматозов // материалы конференции / IX «Санкт-Петербургские дерматологические чтения — 2015», 29–31 окт. 2015. — С.179–180.

7. Теплюк Н.П., Ткаченко С.Б., **Алленова А.С.** Эпидемиологические особенности акантолитической пузырчатки // II Международная научно-практическая конференция «Основные проблемы в современной медицине», сборник тезисов. Волгоград, 10 октября 2015. — С. 92–94.

8. Олисова О.Ю., Теплюк Н.П., Ткаченко С.Б., **Алленова А.С.**, Варшавский В.А., Зайденов В.А. Применение конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в диагностике буллезного пемфигоида Левера // **Альманах клинической медицины.** Москва, 2015. 44(1), С. 33-38.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБД — аутоиммунные буллезные дерматозы

АК — акантолитические клетки

АП — аутоиммунная пузырчатка

БП — буллезный пемфигоид Левера

ВП — вульгарная пузырчатка

КЛСМ in vivo — прижизненная конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

ПДС — пузырчатка хроническая доброкачественная семейная Гужеро-Хейли-Хейли

РИФ прямая/непрямая — реакция прямой/непрямой иммунофлюоресценции

СП — себорейная пузырчатка

УД — ультразвуковое дермасканирование

LAD — Linear IgA disease, IgA-линейный дерматоз

SLEB — субэпидермальная гипэхогенная область (Subepidermal Low Echogenic Band)