

ЛИТЕРАТУРА

1. Казаков Д., Кемпф В., Самцов А., Бург Г. // Вестн. дерматол. венерол. – 2002. – №1. – С.23-33.
2. Кохан М.М. Т-клеточные злокачественные лимфомы кожи: клинические и иммунологические аспекты диагностики, стадийного течения и терапии / Автореф. дис. ...докт. мед. наук. – М., 2002.
3. Ralfkier E.R., Wolf-Sneedorff A., Thomsen K. et al. // Brit. J. Dermatol. – 1993. – V.129. – P.655-659.

ДИАГНОСТИКА ЭРИТРОДЕРМИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ КОЖИ

О.Ю. Олисова, Е.А. Никитин

ММА им. И.М.Сеченова, ГНЦ РАМН

Дифференциальный диагноз между доброкачественными и злокачественными лимфоидными инфильтратами в коже довольно труден и требует использования совокупности различных методов обследования. Особенно сложным является отличие Т-клеточных лимфом кожи и Т-клеточных псевдолимфом, которые чрезвычайно похожи клинически и гистологически [1, 3].

В последнее время отмечается рост лимфопролиферативных заболеваний, поэтому нет необходимости доказывать, насколько важны современные методы диагностики для разграничения реактивных и опухолевых процессов. До сих пор не существует решающих морфологических и иммуногистохимических критериев для разграничения между доброкачественными и злокачественными Т-клеточными пролиферациями, поэтому неоценимую помощь в дифференцировании между истинной псевдолимфомой и лимфомой кожи оказывают такие современные методы молекулярной генетики, как Southern blot и полимеразная цепная реакция (ПЦР), позволяющие выявить перестройки в генной структуре лимфоцитов [2]. Считается, что для доброкачественных лимфоидных инфильтратов характерна поликлональность.

Под нашим наблюдением находилось 18 больных с эритродермией в возрасте от 34 до 69 лет, среди которых было 14 мужчин и 4 женщины. Давность заболевания составляла от 3 недель до 4 лет.

Клинически кожные покровы у больных были утолщены, инфильтрированы, с подчеркнутым кожным рисунком, застойно гиперемированы, с сероватым, буроватым или синюшным оттенком. Поверхность очагов поражения была шероховатая, горячая на ощупь, покрытая мелко-, средне- и крупнопластинчатыми чешуйками, многочисленными эскориациями и серозно-геморрагическими корочками. У всех больных рост пушковых волос местами отсутствовал. Больных беспокоили чувство стянутости кожи и постоянный зуд – от умеренного до выраженного. У 6 пациентов отмечался гиперкератоз ладоней и подошв. У 10 больных эритродермией выявлено увеличение лимфатических узлов. Чаще всего увеличивались подмышечные, шейные, кубитальные и паховые лимфатические узлы: они были плотноэластической консистенции, под-

вижные, не спаянные между собой и окружающими тканями, размером от 1,5 до 2,5 см в диаметре.

В 6 наблюдениях отмечались гепатомегалия, ухудшение общего состояния, слабость, потеря аппетита, озноб, субфебрильная температура. Таким образом, клиническая картина больных была подозрительна в отношении Т-клеточной лимфомы кожи.

У 12 больных нами были установлены причины, вызвавшие состояние эритродермии, среди которых встречались лекарственные препараты, пищевые продукты, в том числе алкоголь, различные химические вещества и инфекционные агенты. У 6 больных выявить причину нам не удалось.

Для патоморфологической оценки изменений в коже изучались биоптаты очагов поражения, которые были получены под местной анестезией (0,5% раствор новокаина). Материал фиксировали в 10% формалине, забуференном по Лилли, после чего готовили парафиновые срезы и окрашивали гематоксилином и эозином и по Ван Гизону.

У всех больных проводился иммуногистохимический анализ на серийных парафиновых срезах биотин-авидиновым методом с использованием в качестве хромогена диаминобензидина. Изучалась экспрессия антигенов CD20, CD45RA, CD45RO, CD4, CD8, CD30 (Кельнский институт гемопатологии, Германия; Дако, Германия). Определялась Т-клеточная клональность методом полимеразной цепной реакции. Материалом служили парафиновые блоки биоптатов и свежезамороженные биоптаты наблюдаемых больных.

Выделение ДНК из биоптатов кожи осуществлялось следующим образом. Непосредственно после получения биоптаты кожи замораживали в жидком азоте. Выделение ДНК начинали с дробления кожи вместе с Nuclei Lysis Solution с использованием Wizard genomic DNA purification system (Promega) с охлаждением в жидком азоте. Размельченную смесь оттаивали и смешивали с protein precipitation solution. Далее следовали по инструкции Wizard genomic DNA purification system (Promega).

Выделение ДНК из парафиновых блоков: срезы толщиной 10-20 мкм депарафинизировали ксилолом и спиртом, к осадку ткани добавляли 50-100 мкл буфера для ПЦР и кипятили в течение 5 минут. Для ПЦР использовали 5 – 10 мкл смеси.

Определение клональности проводили методом ПЦР на основе анализа перестроек вариабельного региона гамма-цепи Т-клеточного рецептора. ПЦР проводили в конечном объеме 25 мкл в буфере, включавшем 50 ммоль KCl, 10 ммоль Трис-HCl, pH 8,3, 200 ммоль dNTP, 2 ммоль MgCl₂, 1,5 Ед TAQ-полимеразы и 5 пмоль каждого праймера. В одну реакцию брали 100-1000 нг ДНК, в случае парафиновых блоков – 5-10 мкл смеси. Амплификацию проводили с горячим стартом по протоколу 94 – 1', 55 – 1', 72 – 1'. Ряд образцов амплифицировали с использованием протокола touch down. Условия денатурации и синтеза во всех циклах были одинаковы: 94° – 1 мин. 15 с, 72° – 1 мин. Температура

отжига в первых двух циклах составляла 66°. Далее в течение 16 циклов температуру снижали на 1 градус в каждом цикле, после чего продолжали реакцию при температуре отжига 50° – 20-30 циклов. Время отжига всегда было постоянным: 1 мин. 15 с. Результаты реакции выявляли в 2% агарозном геле, окрашенном этидием бромидом. Клональный характер перестройки устанавливали, анализируя конформационный полиморфизм одноцепочечных фрагментов ДНК. В связи с ограниченным комбинаториальным разнообразием гамма цепи Т-клеточного рецептора перестроенный вариабельный регион гамма цепи во всех Т-лимфоцитах имеет примерно одинаковую длину. Соответственно, двухцепочечные ПЦР-продукты одинаковой длины практически не отличаются по электрофоретической подвижности и образуют в агарозном геле одну полосу как в случае клональной, так и в случае поликлональной популяции. Чтобы отличить клональную пролиферацию от поликлональной, мы использовали анализ конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК. Денатурацию ДНК проводили в растворе с низкой ионной силой. Перед нанесением на гель ПЦР-продукты разводили в 5 раз в растворе 20% сахарозы и в течение 5 минут инкубировали при температуре 97°.

Группу положительного контроля составили пациенты с доказанными Т-клеточными опухолями (20 больных). Диагноз Т-клеточной лимфомы в этих случаях устанавливали на основании комплексного обследования, включающего клинику, морфологию и иммунофенотипирование. Во всех этих случаях наличие опухоли было абсолютно очевидно (поражение лимфоидных органов и кожи, стирание нормального гистологического рисунка в лимфоидных органах, цитологический атипизм, поражение костного мозга, угнетение кроветворения при температуре 97°. На гель наносили по 10 мкл подготовленных таким образом ПЦР-продуктов.

Электрофорез проводили в 5% акриламидном геле размером 20 см × 20 см × 0,5 мм в 0,5 × TBE буфере при 600 V. Гель окрашивали серебром с помощью набора Silver staining kit (Promega) в соответствии с инструкцией производителя.

В клиническом анализе крови у 8 пациентов выявлены незначительные отклонения от нормы в виде эозинофилии, у 4 пациентов – увеличение СОЭ, у 2 – лейкоцитоз с нейтрофилией. Биохимические и иммунологические показатели крови были в пределах допустимых отклонений в зависимости от сопутствующей патологии.

Морфологическое исследование биоптатов определило два характерных типа инфильтрата: полосовидный и очаговый. Изменения в эпидермисе носили непостоянный характер и были представлены акантозом – от незначительного до выраженного. В 7 биоптатах встречался спонгиоз, часто наблюдался гиперкератоз. В 14 биоптатах наблюдался слабый эпидермотропизм визуально доброкачественных малых лимфоцитов, причем в 4 наблюдениях – с образованием скоплений небольших по размеру лимфоцитов по типу микроабсцессов Потрие.

Первый вариант инфильтрата наблюдался в 13 биоптатах: определялись субэпидермальные плотные полосовидные инфильтраты, состоящие из лимфоцитов малых размеров. В 4 наблюдениях лимфоциты имели церебриформные ядра. Кроме того, в инфильтратах встречалось умеренное количество гистиоцитов, единичные плазматические клетки и эозинофилы. В 2 биоптатах эозинофилы были представлены в довольно большом количестве.

Второй тип инфильтрата наблюдался в 5 биоптатах. Это был очаговый инфильтрат, который локализовался периваскулярно или был приурочен к придаткам кожи. В его состав входили, в основном, небольшие округлые лимфоциты и лимфоциты средних размеров с церебриформными ядрами, а также в двух наблюдениях – единичные крупные бластоподобные лимфоциты. В этих двух биоптатах наблюдалось множество гистиоцитов – рассеянных или в виде небольших скоплений.

В 13 наблюдениях отмечена сосудистая пролиферация, в 5 биоптатах в стенке сосудов наблюдались морфологические проявления васкулита. У больных с наличием множественных эскориаций в клинической картине васкулиты были более выражены и сочетались с экстравазатами эритроцитов. Придаточные структуры во всех случаях были сохранены.

К сожалению, несмотря на некоторые морфологические признаки, свидетельствующие о реактивном характере поражения (полиморфизм инфильтрата, расположение его в верхних слоях дермы, чаще слабый эпидермотропизм малыми лимфоцитами без признаков атипии, выраженный гистиоцитарный компонент в тех случаях, когда встречались бластные клетки, визуально доброкачественные лимфоциты в инфильтрате и спонгиоз), однозначно исключить по этим признакам лимфому кожи нельзя.

Гистологическое сходство истинной псевдолимфомы с лимфомой кожи возникало не только в связи с плотностью инфильтрата, но также из-за присутствия клеток с гиперхромными ядрами, а также проникновения клеток инфильтрата в эпидермис, где они формировали очаговые скопления, аналогичные микроабсцессам Потрие.

При иммуногистохимическом исследовании биоптатов в инфильтрате отмечалось во всех наблюдениях преобладание Т-лимфоцитов (CD45RO+) с различным фенотипом. Соотношение CD4+ и CD8+ лимфоцитов было различным. В трети биоптатов отмечалось 2/3 CD4+ и 1/3 CD8+. В половине наблюдений количество цитотоксических лимфоцитов (CD8+) достигало 80%. Наряду с Т-клетками в 7 наблюдениях присутствовали в достаточном количестве В-клетки (CD45RA+). Таким образом, данные иммуногистохимического исследования также не позволяют с абсолютной уверенностью проводить дифференциальный диагноз с Т-клеточными лимфомами кожи.

При определении Т-клеточной клональности у 14 из 18 больных клональность не определялась, а в 4 наблюдениях она была выявлена.

Эти больные были направлены на дообследование (компьютерная томография органов грудной и брюшной полостей, пункция костного мозга и лимфатического узла, иммунофенотипирование с помощью проточной цитофлюориметрии) и в последующем, при сопоставлении всех результатов обследования, им был выставлен окончательный диагноз Т-клеточной лимфомы кожи.

При изучении катамнестических данных обследованных больных мы отметили, что, несмотря на клиническую картину, очень напоминающую лимфому кожи, при радикальном устранении провоцирующего фактора все проявления (кожные и общие) полностью исчезали, несмотря на (иногда) длительное существование. При этом у всех этих больных при ПЦР-диагностике клональность не определялась. Из 12 больных с выявленной причиной, спровоцировавшей заболевание, в 7 наблюдениях после исключения причинного фактора наступил регресс высыпаний без всякого лечения, в остальных случаях проводились детоксикационные методы лечения (плазмаферез, гемодез, энтеросорбенты).

В заключение можно сделать следующий вывод: ни один из методов не должен оцениваться изолированно от других, необходимо учитывать все диагностические критерии. На сегодняшний день методом выбора можно считать определение Т-клеточной клональности с помощью молекулярно-биологических методов. Вместе с тем, самый точный дифференциально-диагностический критерий псевдолимфомы – исчезновение кожных высыпаний и отсутствие рецидива после устранения провоцирующего фактора заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Burg G. Atlas of Canzer of the Skin. – N.Y., London, Tokyo, 2000.
2. Landa N.G., Zelickson B.D., Peters M.S. et al. // Sem. Diag. Paphol. – 1993. – V. 29, No. 6. – P. 945-953.
3. Rijlaarsdam U., Willemze R. // Sem. Diag. Pathol. – 1991. – P. 102-108.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ МЕТОДОВ ЛЕЧЕНИЯ БАЗАЛЬНО-КЛЕТОЧНОГО РАКА КОЖИ

Т.П. Пискалова

Челябинская ГМА

В настоящее время для лечения базально-клеточного рака кожи (БКРК) применяют различные методики: хирургическое лечение; химиодеструкцию; лучевую терапию; криотерапию; лазеродеструкцию; фотодинамическую терапию, иммунотерапию; комбинированную терапию (сочетанное воздействие двух методов на одну опухоль); комплексную терапию, включающую, наряду с местными методами, системное введение препаратов из группы цитостатиков, ретиноидов или иммуностропных средств.

Для оптимизации выбора метода лечения базально-клеточного рака кожи была проведена сравнительная оценка характеристик существующих