https://doi.org/10.17116/patol2019810119

Современные возможности дифференциальной диагностики бляшечного парапсориаза и ранних стадий грибовидного микоза

О.Ю. ОЛИСОВА[1], Е.В. ГРЕКОВА[1], В.А. ВАРШАВСКИЙ[2], Л.Г. ГОРЕНКОВА[3], Е.А. АЛЕКСЕЕВА[4,5], Д.В. ЗАЛЕТАЕВ[4,5], А.А. СЫДИКОВ[6]

[1]Кафедра кожных и венерических болезней им. В.А. Рахманова Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;
[2]кафедра патологической анатомии им. акад. А.И. Струкова Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;
[3]ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Москва, Россия;
[4]лаборатория медицинской генетики Института молекулярной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;
[5]лаборатория эпигенетики Медико-генетического научного центра, Москва, Россия;
[6]ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Грибовидный микоз (ГМ) является наиболее распространенной первичной эпидермотропной Т-клеточной лимфомой кожи (80%). Достоверность диагноза ГМ, подтвержденного только клиническими, гистологическими и иммуногистохимическими признаками, составляет 50—75%.
Цель исследования — изучить генетические маркеры (*FOXP3*, *STAT4*, *IL-12B*) для ранней диагностики ГМ, а также оценить информативность используемых методов диагностики (гистологического, иммунофенотипического) и определить клональности по генам γ-цепи Т-клеточного рецептора. **Материал и методы.** Под наблюдением находились 50 пациентов с ГМ и бляшечным парапсориазом (БП), леченных на базе Клиники кожных и венерических болезней им. В.А. Рахманова и ФГБУ «НМИЦ гематологии». Группу ГМ составили 27 пациентов, группу БП — 23, группу контроля — 10 здоровых лиц. Анализ экспрессии генов *FOXP3*, *STAT4*, *IL-12B* проводили методом TaqMan Real time-ПЦР. Объектами исследования были пораженные участки кожи больных ГМ, БП и здоровых лиц. **Результаты.** В ходе исследования выявлено повышение уровня экспрессии мРНК транскриптов STAT4 у пациентов ГМ в 9 раз по сравнению с больными БП и в 553 раза — со здоровыми лицами.
Также было отмечено статистически значимое преобладание уровня экспрессии мРНК транскриптов STAT4 у пациентов с пятнистой и бляшечной стадиями ГМ по сравнению с больными БП и здоровыми лицами, а также его резкое снижение у пациентов с эритродермической формой ГМ, что является статистически достоверным.
Заключение. Диагностика ГМ невозможна без комплексной оценки клинико-анамнестических, гистологических, иммунофенотипических и молекулярно-генетических данных. Для ранней диагностики ГМ приобретает большое значение уровень экспрессии мРНК транскриптов STAT4. Включение уровня экспрессии STAT4 в список диагностических признаков повышает точность дифференциальной диагностики ГМ и БП с 59,1 до 81,8% соответственно.

Ключевые слова: грибовидный микоз, ранняя диагностика, STAT4, FOXP3, молекулярно-генетический метод диагностики.

Current possibilities of the differential diagnosis of plaque parapsoriasis and the early stages of mycosis fungoides

O.YU. OLISOVA[1], E.V. GREKOVA[1], V.A. VARSHAVSKY[2], L.G. GORENKOVA[3], E.A. ALEKSEEVA[4,5], D.V. ZALETAEV[4,5], A.A. SYDIKOV[6]

[1]V.A. Rakhmanov Department of Skin and Venereal Diseases, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia;
[2]Acad. A.I. Strukov Department of Pathological Anatomy, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia;
[3]National Medical Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia;
[4]Laboratory of Medical Genetics, Institute of Molecular Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia;
[5]Laboratory of Epigenetics, Research Center for Medical Genetics, Moscow, Russia;
[6]Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Health of Russia, Saint Petersburg, Russia

Mycosis fungoides (MF) is the most common primary cutaneous epidermotropic T-cell lymphoma (80%). The accurate diagnosis of MF confirmed only by clinical, histological and immunohistochemical signs amounts to 50—75%.
Objective — to investigate genetic markers (FOXP3, STAT4, IL-12B) for the early diagnosis of MF, to estimate the informative value of used diagnostic techniques (histology, immunophenotyping), and to determine clonality by the T-cell receptor γ-chain genes. **Subject and methods.** Fifty patients with MF and plaque parapsoriasis (PP) who had been treated at the V.A. Rakhmanov Clinic of Skin and Venereal Diseases and at the National Medical Research Center for Hematology were followed up. A MF group

Грекова Екатерина Владимировна — асп. каф. кожных и венерических болезней им. В.А. Рахманова;
e-mail: grekova_kate@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-7968-9829

© Коллектив авторов, 2019

consisted of 27 patients; a PP group included 23 patients, and a control group comprised 10 healthy individuals. The expression of the FOXP3, STAT4, and IL-12B genes was analyzed by TaqMan real time-PCR. The objectives of the study were affected skin portions from patients with MF or PP and healthy individuals. **Results.** The investigation revealed a increase in the expression level of STAT4 mRNA transcripts by 9 times in patients with MF compared with those with PP and by 553 times in healthy individuals. There was also a statistically significant predominance of the expression level of STAT4 mRNA transcripts in patients with spotted and plaque stages of MF (180; 318) compared with those with PP and healthy individuals, as well as a sharp decrease in those with erythrodermic MF, which was statistically significant. **Conclusion.** MF cannot be diagnosed without comprehensively assessing the clinical, anamnestic, histological, immunophenotypic, and molecular genetic data. The expression level of STAT4 mRNA transcripts is of great importance for the early diagnosis of MF. Inclusion of the level of STAT4 expression in the list of diagnostic signs increases the accuracy of differential diagnosis of MF and PP from 59.1 to 81.8%, respectively.

Keywords: mycosis fungoides, early diagnosis, STAT4, FOXP3, molecular genetic method for diagnosis.

Грибовидный микоз (ГМ) является наиболее распространенной первичной эпидермотропной Т-клеточной лимфомой кожи (ТКЛК) (80%) [1], характеризующейся формированием инфильтрата из атипичных Т-лимфоцитов в эпидермисе, дерме и гиподерме с возможностью вторичного внекожного распространения (лимфатические узлы, кровь, селезенка, легкие, печень) [2].

В странах Европы показатель заболеваемости на 2012 г. составил 0,26—1,0 на 100 000 человек [3].

Согласно WHO-EORTC-классификации первичных ТКЛК последнего пересмотра (2016), выделяют следующие подтипы ГМ: фолликулотропный, педжетоидный ретикулез и синдром гранулематозной вялой кожи [4]. Однако в настоящее время описано более 15 атипичных форм ГМ [5].

Классический ГМ имеет хроническое прогредиентное течение, в котором выделяют следующие клинические стадии:

1) пятнистая — единичные или множественные зудящие, чаще несимметричные пятна на коже туловища, конечностей или ягодиц, защищенных от солнечного излучения;

2) бляшечная — возвышающиеся плоские инфильтрированные бляшки обычно красно-коричневого цвета с четкими границами;

3) опухолевая — гладкие опухолевые узлы буровато-красного цвета, похожие на шляпку гриба, часто изъязвляющиеся или некротизирующие с присоединением вторичной инфекции;

4) эритродермическая форма — генерализованное поражение кожного покрова в виде эритродермии с синюшным оттенком и сильным зудом, реактивной лимфаденопатией, возникающими на поздних стадиях ГМ или *de novo* и характеризующимися в отличие от синдрома Сезари отсутствием лейкемических изменений в крови [5, 6].

Высыпания при ГМ настолько разнообразны, что это заболевание называют «великим имитатором» [7]. ГМ может имитировать и распространенные доброкачественные дерматозы (псориаз, экзема, атопический дерматит) и более редкие (бляшечный парапсориаз, псевдолимфома, склеродермия, кольцевидная центробежная эритема Дарье, красный отрубевидный лишай Девержи), а также инфекционные заболевания (микоз гладкой кожи, вторичный сифилис). Наиболее сложной в диагностическом плане является пятнистая стадия ГМ, дифференциальная диагностика которой проводится в первую очередь с мелко- и крупнобляшечным парапсориазом (БП) [5, 6].

По данным J. Wu и соавт. [8], трансформация крупнобляшечного парапсориаза (КБП) в ГМ отмечается в 10—40% случаев, хотя ряд авторов [9] считают КБП изначально ТКЛК с медленной опухолевой прогрессией. Кроме того, абсолютное большинство ученых [10, 11] считают мелкобляшечный парапсориаз (МБП) хроническим доброкачественным воспалительным дерматозом, но существует мнение, что он также может рассматриваться как абортивная форма ТКЛК или начальная стадия ГМ.

Диагноз ГМ устанавливается на основании комплексной оценки клинико-анамнестических данных, гистологического (часто неоднократного), иммунофенотипического исследования опухолевых клеток и молекулярно-генетического (наличие клональности по генам γ- или β-цепей Т-клеточного рецептора —ТКР) исследования [5, 12]. По данным A. Willerslev-Olsen и соавт. [13], средний срок до установления диагноза даже у больных с классической формой ГМ составляет около 5 лет и может значительно удлиняться при других вариантах его течения.

В настоящее время нет единого мнения по поводу гистологических критериев диагностики ГМ.

Основными патоморфологическими критериями, используемыми для диагностики ГМ, являются:

— наличие в инфильтрате плеоморфных лимфоидных клеток малых и средних размеров с гиперхромными увеличенными ядрами или неправильным/церебриформным контуром ядра (клетки Сезари—Лютцнера);

— лимфоидные клетки, располагающиеся цепочкой в базальном ряду эпидермиса (3 и более);

— интраэпидермальные лимфоциты, окруженные светлым перинуклеарным ободком (галолимфоциты);

— повышенное количество интраэпидермальных лимфоцитов при отсутствии спонгиоза («диспропорциональный эпидермотропизм»);

— размер эпидермальных лимфоцитов больше, чем дермальных;

— внутриэпидермальные скопления лимфоцитов (3 и более) (микроабсцессы Потрие);

— фиброз и/или отек сосочковой части дермы [5].

Микроабсцессы Потрие являются высокоспецифичным признаком ГМ (92,1%), однако встречаются лишь в 10% случаев при бляшечной стадии заболевания [6].

По данным G. Burg и W. Kempf [14], достоверность диагноза ГМ, подтвержденного только клиническими и гистологическими признаками, составляет 50—75%. Проведение иммунофенотипического исследования или определение реаранжировки гена *TKP* увеличивает достоверность диагноза до 80%.

Иммунофенотипически можно выявить патологическую популяцию Т-клеток, если опухолевые Т-клетки имеют аберрантный фенотип, т.е. утратили один или несколь-

ко из общих Т-клеточных маркеров, а также в случаях, когда фенотип опухолевых Т-клеток соответствует ранним, внутритимическим стадиям дифференцировки [15].

Согласно алгоритму диагностики ранних форм ГМ, предложенному Международным обществом по лимфомам кожи (ISCL), различают следующие иммуногистохимические признаки:

1) количество CD2+, CD3+, и/или CD5+ Т-клеток менее 50%;

2) количество CD7+ Т-клеток менее 10%;

3) эпидермально/дермальное несоответствие экспрессии CD2, CD3, CD5 и CD7 (дефицит экспрессии в эпидермисе) [16].

По данным C. Keehn и соавт. [17], ГМ характеризуется инфильтратом из α/β Т-хелперов — зрелых клеток памяти, которые имеют следующий иммунофенотип: βF1+ CD3+ CD4+ CD5+ CD7+ CD8- CD45RO+. Реже встречаются Т-цитотоксический (βF1+ CD3+ CD4– CD5+ CD8+) и γ/δ (βF1- CD3+ CD4- CD5+ CD8+) фенотипы. На поздних стадиях ГМ могут наблюдаться полная или частичная потеря экспрессии пан-Т-клеточных антигенов CD3, CD5 и CD7, появление экспрессии цитотоксических протеинов TIA-1, гранзима В и перфорина, а также аберрантный CD4+/CD8+ или CD4–/CD8- фенотип [5, 17].

При ГМ, несмотря на его медленное развитие, также происходит нарушение нормального цикла деления клеток, следствием чего является клональная пролиферация Т-лимфоцитов. Для установления уровня пролиферативной активности клеток с помощью иммуногистохимического исследования используется протеин Ki-67. Согласно данным А.С. Жукова и соавт. [18], индекс пролиферативной активности клеток у пациентов с ГМ бляшечно-опухолевой стадии выше, чем у больных БП.

Одним из вспомогательных методов, подтверждающих наличие опухоли, является определение клональности методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Методы молекулярной диагностики Т-клеточной клональности основаны на наличии одинаково перестроенных генов вариабельного региона *TKP* в опухолевых Т-лимфоцитах. Появление клона Т-лимфоцитов при опухоли сопровождается появлением популяции клеток с одинаковой перестройкой генов *TKP*. Однако наличие клональности по генам γ-цепи *TKP* не обязательно означает наличие опухоли. В ходе нормального иммунного ответа появляется множество клонов Т-клеток, но размеры этих клонов, как правило, невелики и не достигают пределов чувствительности традиционных молекулярных методов [15].

Таким образом, вероятность установления диагноза ГМ молекулярно-биологическим методом на поздних стадиях (IIB—IV) составляет 90%, на ранних (I—IIA) — 50% [19].

Согласно рекомендациям Интернационального общества по лимфомам кожи (ISCL), Европейской организации изучения и лечения рака (EORTC), поиск и изучение диагностических маркеров ГМ являются актуальной проблемой в современной дерматоонкологии [4].

Молекулярно-генетические исследования, проведенные в последние годы, убедительно доказывают, что к возникновению злокачественного новообразования ведут генетические и эпигенетические изменения, накопленные в клетках, а также взаимодействие измененных клеток с микроокружением хозяина — Т-регуляторными клетками (Т-рег), которые поддерживают гомеостаз иммунной системы, подавляя избыточную активность эффекторных Т-клеток в реакциях с чужеродными антигенами; избыточная активность Т-рег часто наблюдается при онкологических новообразованиях [5, 20, 21]. Т-рег экспрессируют транскрипционный фактор FOXP3 (Forkhead Box Protein) [22].

Также установлено, что STAT-сигнальная система (Signal transducers and activators of Transcription — сигнальные передатчики и активаторы транскрипции), в частности STAT4, играет ключевую роль в процессе дифференцировки Th1 вследствие цитокиновой стимуляции (IL-12), а также в последующем переходе от Th1- к Th2-фенотипу ГМ, что можно выявить с помощью ПЦР-РВ [23, 25].

Немаловажное значение имеет цитокиновый профиль: в начале развития ГМ преобладает экспрессия Th1-цитокинов, интерферона (IFN)-γ и интерлейкинов (IL-2, IL-12), а в прогрессирующих стадиях происходит «сдвиг» к Th2-профилю (IL-4, 5, 10, 13) [24].

Таким образом, целью исследования явились изучение генетических маркеров (*FOXP3, STAT4, IL-12B*) для ранней диагностики грибовидного микоза, а также оценка информативности используемых методов диагностики (гистологического, иммунофенотипического, определение клональности по генам γ-цепи Т-клеточного рецептора).

Материал и методы

Под нашим наблюдением находились 50 пациентов с ГМ и БП, получавших терапию на базе Клиники кожных и венерических болезней им. В.А. Рахманова и ФГБУ «НМИЦ гематологии». Группу больных ГМ составили 27 пациентов, группу больных БП — 23.

Средний возраст пациентов группы ГМ составил 52±3,5 года (29—82), из них было 14 (52%) мужчин и 13 (48%) женщин (соотношение 1,1:1). По клиническим стадиям заболевания больных распределили следующим образом: пятнистая у 11 (41%), бляшечная у 8 (30%), опухолевая у 5 (18%), эритродермия у 3 (11%). IA стадия заболевания была у 3 (11%), IB — у 9 (33%), IIA — у 6 (22%), IIB — у 5 (19%), IIIA — у 3 (11%), IVA — у 1 (4%). Стадирование ГМ осуществлялось согласно классификации TNM (tumor—node—metastasis) [16].

Средний возраст пациентов с БП составил 52±2,5 года (от 28 до 68), из них было 10 (44%) мужчин и 13 (56%) женщин (соотношение 1:1,3). В группу БП включены пациенты со следующими диагнозами: МБП 9 (39%) пациентов, КБП 14 (61%).

Диагноз ГМ верифицирован на основании комплексной оценки клинической картины заболевания, результатов гистологического (часто неоднократного) и иммунофенотипического исследований биоптатов из очагов поражения кожи с изучением иммунофенотипов βF1+, CD3+, CD4+, CD5+, CD7+, CD8+, CD45RO+ и индекса пролиферативной активности Ki-67, а также молекулярно-генетического метода с определением клональности по реаранжировке гена γ-цепи *TKP* на базе кафедры патологической анатомии ПМГМУ им. И.М. Сеченова и ФГБУ «НМИЦ гематологии». Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах по схемам, рекомендуемым фирмами-производителями. Оценку результатов осуществляли полуколичественным методом с подсчетом числа клеток. Экспрессия исследуемого маркера расценивалась как слабая (+) при наличии окрашенных гранул в 1—50 клетках, умеренная (++) в 51—100 клетках и резко выра-

женная (+++) в 101 клетке и более в четырех полях зрения при увеличении 400.

Объектами исследования были пораженные участки кожи больных ГМ, БП и здоровых лиц, взятые методом инцизионной биопсии (6 мм).

Определение уровня экспрессии генетических маркеров (*FOXP3, STAT4, IL-12B*) выполняли на базе лаборатории медицинской генетики Института молекулярной медицины ПМГМУ им. И.М. Сеченова. Анализ экспрессии генов проводили методом TaqMan Real time-ПЦР с обратных транскриптов в термоциклере для ПЦР-РВ («Bio-Rad», США) с использованием зондов TaqMan, меченных флюоресцентным красителем FAM. Зонды и праймеры предоставлены фирмой «Applied Biosystems». В качестве эндогенного контроля использовали ген *ACTB,* меченный FAM. Уровень экспрессии измеряли в относительных единицах (о.е.) относительно *ACTB.* Группа контроля включала 10 здоровых лиц (средний возраст 44±2,5 года).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программ Excel 2003 и Statistica 6.0. Для сравнения данных между группами применяли *U*-критерий Манна—Уитни и *t*-критерий Стьюдента. Для всех критериев и тестов различия считали статистически значимыми при $p<0,05$. Данные таблицы частот встречаемости диагностических признаков определены с помощью статистического непараметрического критерия — точного метода Фишера, не зависящего от характера распределения показателя.

Результаты

Средний срок до установления у пациентов диагноза ГМ составил 6,32 года.

Гистологический метод диагностики. В пятнистой стадии ГМ у 4 (36%) пациентов обнаружен выраженный акантоз, у 3 (27%) — паракератоз. В эпидермисе 8 (73%) больных наблюдали лимфоциты по размеру крупнее дермальных, а также у 3 (27%) больных — галолимфоциты, у 6 (55%) — клетки Сезари—Лютцнера. Лимфоциты, расположенные «цепочкой» в базальном слое эпидермиса, обнаружены в 4 (36%) случаях. Микроабсцессы Потрие у всех пациентов с пятнистой стадией ГМ не обнаружены. У 9 (82%) больных поверхностный периваскулярный лимфоцитарный инфильтрат умеренно выражен. Фиброз в дерме выявлен у 3 (27%) пациентов **(рис. 1)**.

Бляшечная стадия ГМ характеризовалась аналогичными пятнистой стадии изменениями, а также у 5 (63%) пациентов обнаружено скопление в эпидермисе атипичных лимфоцитов с формированием микроабсцессов Потрие. У 2 (25%) пациентов в базальном слое эпидермиса выявлены округлые гомогенные эозинофильные образования (тельца Сиватта), являющиеся дистрофически измененными кератиноцитами. «Диспропорциональный эпидермотропизм» отмечен у 4 (50%) пациентов. В верхней части дермы преобладал умеренно выраженный полосовидный инфильтрат, в котором у 7 (87,5%) больных — клетки Сезари—Лютцнера **(рис. 2)**.

У пациентов с опухолевой стадией и эритродермической формой ГМ в эпидермисе на фоне диспропорционального эпидермотропизма отмечались микроабсцессы Потрие, тельца Сиватта, клетки Сезари—Лютцнера. Характерным для опухолевой стадии ГМ являлся плотный очаговый или диффузный интрадермальный инфильтрат, который выявлен у всех больных **(рис. 3)**.

При БП в эпидермисе отмечен паракератоз у 9 (39%) пациентов, выраженный акантоз у 11 (48%), отсутствовали микроабсцессы Потрие и тельца Сиватта. Умеренно выраженный лимфоцитарный инфильтрат наблюдали в верхних слоях дермы. У 19 (83%) пациентов выявлены галолимфоциты. Атипичные лимфоциты с церебриформными ядрами отсутствовали. Отек сосочковой части дермы встречался у 20 (87%) больных. Отмечалось расширение лимфатических капилляров в 14 (61%) случаях, кровеносных сосудов верхней трети дермы в 17 (74%) **(рис. 4)**.

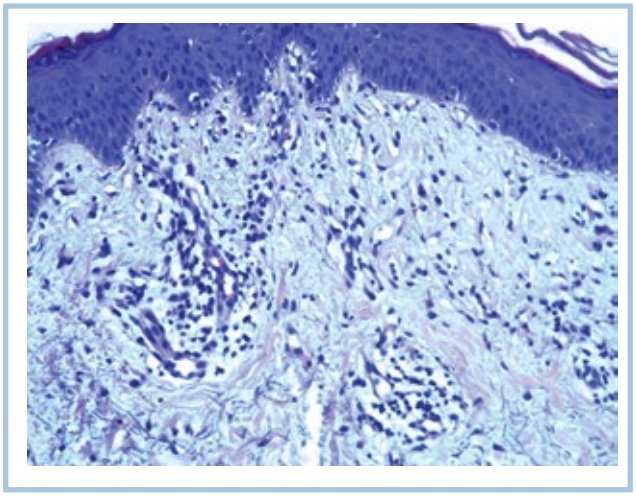


Рис. 1. **Гистологическая картина пятнистой стадии грибовидного микоза.**

В эпидермисе изменений не наблюдается. В дерме выявляется периваскулярный и интерстициальный инфильтрат, преимущественно из лимфоцитов с гиперхромными ядрами и тенденцией к проникновению в эпидермис.
Окраска гематоксилином и эозином, ×200.

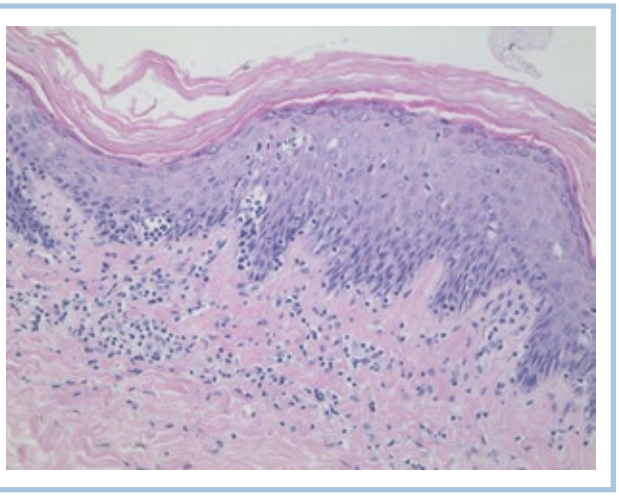


Рис. 2. **Гистологическая картина бляшечной стадии грибовидного микоза.**

В эпидермисе линейно расположены вдоль базальной мембраны клетки Сезари—Лютцнера с тенденцией к формированию микроабсцессов Потрие. В дерме наблюдаются атипичные лимфоциты. Окраска гематоксилином и эозином, ×200.

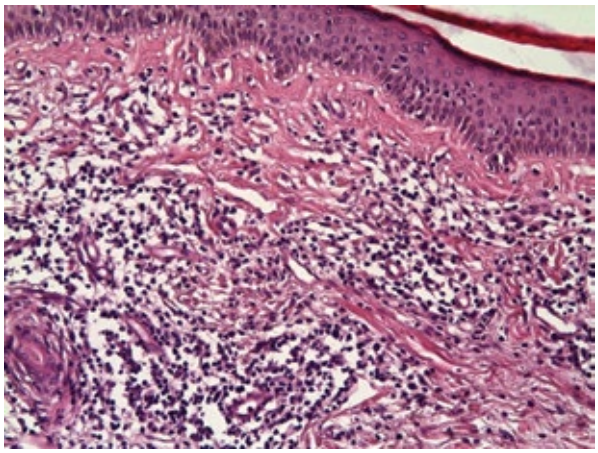


Рис. 3. **Гистологическая картина опухолевой стадии грибовидного микоза.**

Дерма полностью инфильтрирована клетками Сезари—Лютцнера. Характерно отсутствие и/или исчезновение эпидермотропизма. Окраска гематоксилином и эозином, ×200.

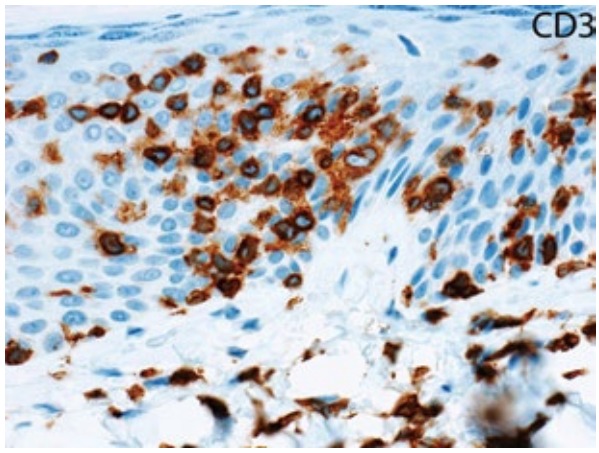


Рис. 5. **Иммуногистохимическая реакция маркера CD3+ у больного бляшечной стадией грибовидного микоза.**

Цитоплазматическая резко выраженная экспрессия отмечается как в эпидермисе, так и в сосочковом слое дермы, ×400.

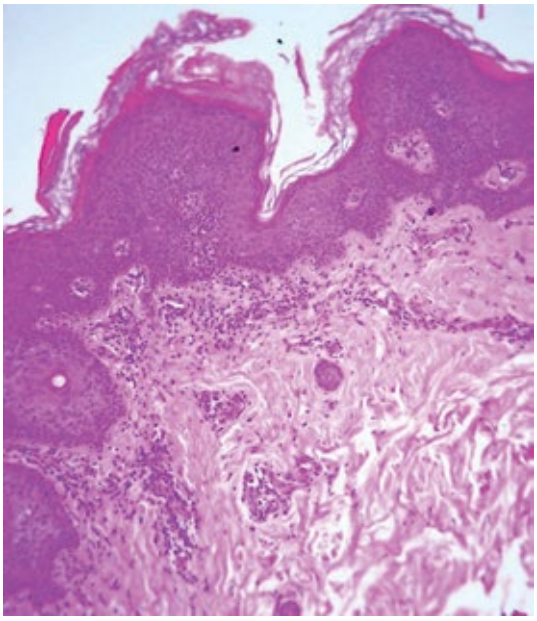


Рис. 4. **Гистологическая картина мелкобляшечного парапсориаза.**

В эпидермисе отмечается ортокератоз, неравномерный акантоз с удлинением эпидермальных сосочков. В сосочковом слое дермы выявляется периваскулярный лимфоцитарно-гистиоцитарный инфильтрат без тенденции к проникновению в эпидермис. Окраска гематоксилином и эозином, ×200.

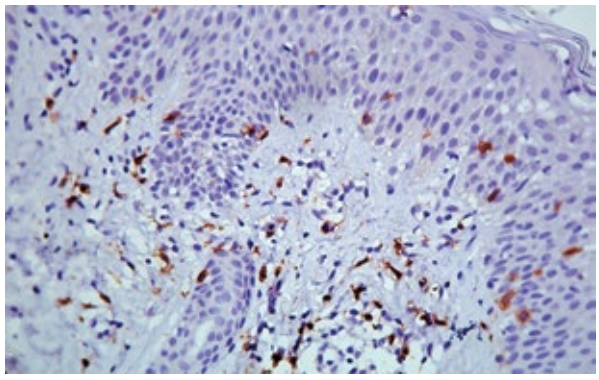


Рис. 6. **Иммуногистохимическая реакция маркера CD8+.**

Умеренно выраженная цитоплазматическая экспрессия маркера CD8+ в эпидермисе и в дерме у больного крупнобляшечным парапсориазом, ×200.

Иммунофенотипический метод диагностики. При иммуногистохимическом исследовании образцов кожи у пациентов с ГМ экспрессия CD3 в дерме была резко выраженная, а в эпидермисе — умеренно выраженная (*n*=27, 100%) **(рис. 5)**, у пациентов БП — слабовыраженная (*n*=4, 17%). У 17 (74%) больных БП во всех слоях кожи определялась значительно выраженная экспрессия CD8 **(рис. 6)** в отличие от больных ГМ (*n*=5, 19%). Во всех слоях кожи выявлялась значительно выраженная экспрессия CD4 у 15 (65%), CD7 у 7 (26%), умеренно выраженная экспрессия CD45RO+ у 8 (30%) пациентов с ГМ.

У больных БП экспрессия CD4 в дерме была резко выраженная у 19 (83%) пациентов, а в эпидермисе — умеренно выраженная у 17 (74%). В то же время при ГМ указанные клетки встречались в эпидермисе и дерме лишь в небольшом количестве (слабовыраженная экспрессия) (*n*=6, 22%).

У больных ГМ преобладающим оказался иммунофенотип α/β Т-хелперов — клеток памяти: βF1+ CD3+ CD4+ CD5+/–CD7+/–CD8– CD45RO+ (*n*=19; 70%). Значительно реже отмечен Т-цитотоксический (βF1+ CD3+ CD4– CD5+ CD8+) (*n*=4; 15%) и γ/δ (βF1– CD3+ CD4– CD5+ CD8+) фенотипы (*n*=2; 7,5%). В поздних стадиях ГМ наблюдалась полная потеря экспрессии пан-Т-клеточных антигенов CD3, CD5 и CD7 (*n*=2; 7,5%).

Индекс пролиферативной активности (Ki-67) у больных ГМ — 47% (15–86%) был почти в 2 раза выше, чем у больных БП — 26% (2—43%).

Молекулярно-генетический метод диагностики. У 5 (19%) больных ГМ IB и IIA стадии реаранжировка гена *TKP* отсутствовала, а у 3 (13%) пациентов с БП присутствовала.

В ходе дальнейшего молекулярно-биологического исследования генетических маркеров методом ПЦР-РВ выявлено, что уровень экспрессии гена *STAT4* показал значительное (в 9 раз) повышение экспрессии мРНК транскриптов у пациентов с ГМ (168 о.е.) по сравнению с больными БП (18,5 о.е.; $p<0,05$) и в 553 раза со здоровыми лицами (0,3 о.е.; $p<0,05$).

Анализ экспрессии гена *FOXP3* показал у пациентов с ГМ повышение экспрессии мРНК транскриптов FOXP3 (15,3 о.е.) в 5 раз по сравнению с группой БП, однако это не является статистически значимым (3,1 о.е.; $p>0,05$), и в 82 раза по сравнению со здоровыми лицами (0,2 о.е.; $p<0,05$).

Выявлена слабая экспрессия IL-12B в трех группах.

Также отмечено статистически значимое преобладание уровня экспрессии мРНК транскриптов STAT4 у пациентов с пятнистой и бляшечной стадиями ГМ (181 , 316 о.е.) по сравнению с больными БП (18,5 о.е.; $p<0,05$) и здоровыми лицами (0,3 о.е.; $p<0,05$), а также его резкое снижение у пациентов с эритродермической формой ГМ (7,19 о.е.) **(табл. 1).**

По результатам проведенного исследования определен список диагностических признаков, статистически значимо чаще встречающихся у больных ГМ по сравнению с больными БП **(табл. 2)**. Оценку проводили на общей выборке без выделения контрольной группы, но с использованием процедуры скользящего экзамена, что позволяет получить оценку информативности, приближающуюся к

***Таблица 1*. Распределение значений уровня экспрессии генетических маркеров (*FOXP3, STAT4, IL-12B*) у пациентов с грибовидным микозом, бляшечным парапсориазом и у здоровых лиц**

Группа	*FOXP3*	*STAT4*	*IL-12B*
Здоровые лица	0,2 (0,01—0,60)	0,3 (0,01—0,70)	0,03 (0,01—0,10)
Бляшечный парапсориаз (БП)	3,1 (0,01—16,50)	18,5 (0,37—88,3)	0,7 (0,08—5,50)
мелкобляшечный парапсориаз	1,59 (0,01—4,86)	5,43 (0,36—26,80)	0,3 (0,16—1,35)
крупнобляшечный парапсориаз	8,93 (4,62—16,52)	56,42 (7,3—88,9)	1,95 (0,09—5,50)
Грибовидный микоз (ГМ)	15,3 (1,0—49,3)	168* (1,1—456)	2,2 (0,02—15)
пятнистая стадия	21,53 (5,25—37,70)	181* (147—240)	5,3 (0,04—150)
бляшечная стадия	25,34 (1,32—49,38)	316* (179—456)	0,54 (0,05—1,02)
опухолевая стадия	25,58 (20,4—30,80)	151 (76,7—225)	0,31 (0,03—0,30)
Эритродермическая форма	0,93 (1,1—1,5)	7,19 (1,0—13)	1,36 (1,0—1,72)

Примечание. * — $p<0,05$ статистически значимые различия между группами больных ГМ и БП. Данные представлены как медиана, 25—75-й процентили. Уровень экспрессии указан в относительных единицах (о.е.) относительно *ACTB*.

***Таблица 2*. Частота встречаемости диагностических признаков, достоверно различающих группы пациентов с грибовидным микозом и бляшечным парапсориазом**

Признак	ГМ (n=27)	БП (n=23)	p
Локализация при поступлении, абс. (%):			
живот	19 (70,4)	5 (33,3)	0,03
нижние конечности	20 (74,1)	6 (40)	0,05
Гистологическое заключение, абс. (%):			
обильный поверхностный лимфоидный инфильтрат	22 (84,6)	3 (25)	0,0006
диспропорциональный эпидермотропизм	20 (75,0)	8 (66,7)	0,007
лимфоидная атипия (клетки Сезари—Лютцнера)	21 (80,0)	2 (16,7)	0,0001
паракератоз	8 (30,8)	10 (8,3)	0,004
акантоз	8 (30,8)	10 (83,3)	0,004
Иммунофенотипирование, абс. (%):			
экспрессия CD3+ менее 50%	11 (73,3)	4 (13)	0,02
Молекулярно-генетическое исследование, абс. (%):			
моноклональность по генам γ-цепи Т-клеточного рецептора	15 (57,7)	2 (16,7)	0,03
Уровень экспрессии, абс. (%):			
STAT4 <1 о.е	2 (22,2)	9 (81,8)	0,02
STAT4 ⩾1 о.е.	16 (66,7)	4 (13,3)	0,002

таковой, полученной на контрольной выборке. При проведении скользящего экзамена на списке диагностических признаков без включения в него уровня экспрессии STAT4 получено 100 и 59,1% правильных диагнозов у больных ГМ и БП соответственно. При проведении скользящего экзамена на списке информативных признаков с включением в него уровня экспрессии STAT4 получено 100 и 81,8% правильных диагнозов у больных ГМ и БП соответственно.

В связи с этим сформированы две группы пациентов согласно уровню экспрессии STAT4: 1-я группа — менее 1 о.е., 2-я группа — 1 о.е. и более. Структура диагнозов в 1-й группе распределилась следующим образом: ГМ — 7,7%, БП — 63,8%, здоровые лица — 28,5%; во 2-й группе: ГМ — 66,7%, БП — 33,3%, здоровые лица — 0%. Это свидетельствует в пользу того, что при уровне экспрессии STAT4 ⩾1 вероятность установления диагноза ГМ увеличивается до 66,7%.

Обсуждение

Выполнено исследование уровня экспрессии генетических маркеров (*FOXP3, STAT4, IL-12B*) методом ПЦР-РВ для ранней диагностики ГМ, а также построение списка диагностических признаков, достоверно различающих группы пациентов с ГМ и БП.

Диагностика ГМ невозможна без комплексной оценки клинико-анамнестических, гистологических, иммунофенотипических и молекулярно-генетических данных.

Необходимость клинического обследования состоит в том, чтобы заподозрить ГМ, а для установления окончательного диагноза необходимо прибегать к дополнительным методам диагностики.

На ранних стадиях ГМ гистологические изменения часто могут оказаться неинформативными. Анализируя данные M. Santucci, B. Smoller и соавт. [26, 27], выявили широкий разброс значений по следующим признакам: микроабсцессы Потрие обнаруживаются в 0—37% случаев, лимфоциты в базальном слое эпидермиса — в 17—67% случаев. По данным А.С. Жукова и соавт. [18], при оценке диагностической значимости гистологических характеристик установили, что наибольшая чувствительность и специфичность характерны для следующих показателей: эпидермальные лимфоциты крупнее дермальных (SE 0,75, SP 0,86), лимфоциты с церебриформными ядрами (SE 0,67, SP 0,85). В нашем исследовании диагностически значимыми для ГМ оказались следующие признаки: обильный поверхностный лимфоидный инфильтрат (84,6%), диспропорциональный эпидермотропизм (75%), клетки Сезари—Лютцнера (80%).

Стоит отметить, что отсутствуют стандартизованные критерии оценки гистологических признаков, что затрудняет их применение для диагностики ранних стадий ГМ, поэтому необходимо проводить иммуногистохимическое и молекулярно-биологическое исследования.

Уровень экспрессии антигенов в лимфоидном инфильтрате также зависит от вида изучаемого конкретного антигена и метода его исследования. В настоящее время определение экспрессии антигенов CD2, CD3 и CD5 является рутинным при проведении иммуногистохимического исследования при ГМ. Снижение экспрессии этих маркеров на Т-клетках более чем на 50% является признаком ГМ [6]. В ходе исследования выявлено статистически значимое снижение экспрессии маркера CD3+ менее 50% в коже больных ГМ по сравнению с БП.

Отмечено, что наличие или отсутствие клональности по генам γ-цепи *TKP* не является эквивалентом злокачественности или доброкачественности наблюдаемых патологических изменений в коже, поскольку возможен как ложноотрицательный результат из-за недостатка опухолевых клеток для амплификации гена *TKP*, так и ложноположительный при доброкачественных воспалительных («клональных») дерматозах (псориаз, красный отрубевидный лишай Девержи, нейродермит, экзема).

Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод, что определение клональности по генам γ-цепи *TKP* при диагностике ранних стадий ГМ можно использовать в качестве вспомогательного диагностического метода в комплексе с гистологическим и иммунофенотипическим.

Полученные данные свидетельствуют о том, что для ранней диагностики ГМ приобретает большое значение уровень экспрессии мРНК транскриптов STAT4, который достоверно преобладает у пациентов с ГМ по сравнению с БП.

I. Litvinov и соавт. [23] установили, что на ранних стадиях ТКЛК отмечается повышенная экспрессия STAT4 по сравнению с кожей здоровых лиц. По данным V. Johnson и соавт. [28], при прогрессировании заболевания, когда начинает преобладать экспрессия Th2-фенотипа, наблюдается уменьшение экспрессии данного маркера, что не противоречит полученным нами результатам. При этом авторы не выявили статистически значимого различия в уровне экспрессии STAT4 у пациентов с БП и ранними стадиями ГМ.

Вместе с тем выявляемая у всех больных экспрессия маркеров Т-рег- клеток FOXP3, а также IL-12B не является диагностически значимой при исследовании БП и ГМ и может интерпретироваться только как вспомогательный диагностический признак в совокупности с другими. По данным А.С. Жукова и соавт. [21], с помощью иммуногистохимического исследования установлено, что доля Т-регуляторных клеток от всех Т-лимфоцитов кожи у больных пятнистой стадией ГМ и БП статистически значимо не различается, что согласуется с полученными нами данными.

Можно предположить, что многократное увеличение количества Т-рег- клеток в коже больных ГМ по сравнению со здоровыми донорами позволяет рассматривать избыточное иммуносупрессивное действие этих клеток с позиции важного патогенетического фактора развития злокачественной пролиферации Т-лимфоцитов [21, 29].

Определение уровня экспрессии STAT4 целесообразно проводить для дифференциальной диагностики БП и ГМ. Практическая значимость исследования у больных ГМ различных стадий может заключаться в прогнозировании прогрессирования заболевания.

Дальнейшие исследования в области молекулярных и эпигенетических механизмов патогенеза JAK/STAT-сигнального пути при ГМ смогут позволить разработать эффективные методы терапии.

Выводы

1. Диагноз грибовидного микоза на ранних стадиях ставили на основании комплексной оценки клинико-анамнестических данных, гистологического (часто неоднократного), иммунофенотипического исследования опухолевых клеток и молекулярно-генетического (наличие клональности по генам γ-цепи Т-клеточного рецептора).

2. У больных грибовидным микозом по сравнению с больными бляшечным парапсориазом отмечается статистически значимое преобладание экспрессии STAT4 (p<0,05). Включение в список диагностических признаков определения уровня экспрессии STAT4 повышает точность дифференциальной диагностики грибовидного микоза и бляшечного парапсориаза с 59,1 до 81,8% соответственно.

3. Выявляемая экспрессия у всех больных маркеров Т-рег-клеток FOXP3 и IL-12B не является диагностически значимой при исследовании бляшечного парапсориаза и грибовидного микоза и может рассматриваться только как вспомогательный диагностический признак в совокупности с другими морфологическими проявлениями.

Благодарности. Авторы выражают благодарность к.б.н. С.П. Олимпиевой за помощь в статистической обработке данных при написании статьи и д.м.н., проф. Н.П. Теплюк за помощь в подготовке микрофотографий.

Участие авторов:
Концепция и дизайн исследования: О.Ю.О., Д.В.З.
Сбор и обработка материала: Е.В.Г., Е.А.А., В.А.В.
Статистическая обработка: Е.В.Г., Е.А.А.
Написание текста: Е.В.Г., А.А.С.
Редактирование: О.Ю.О., Е.А.А., Д.В.З., Л.Г.Г.
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Виноградова Ю.Е., Потекаев Н.С., Виноградов Д.Л. Лимфомы кожи: диагностика и лечение. *Практическая медицина*. 2014. [Vinogradova YuE, Potekaev NS, Vinogradov DL. Cutaneous lymphomas: diagnosis and treatment. *Prakticheskaya meditsina*. 2014. (In Russ).].
2. Willemze R, Meijer CJ. Classification of cutaneous T-cell lymphoma: from Alibert to WHO-EORTC. *J Cutan Pathol.* 2006;33(1):18-26. https://doi.org/10.1111/j.0303-6987.2005.00495.x
3. Rodd AL, Ververis K, Karagiannis TC. Current and emerging therapeutics for cutaneous T-cell lymphoma: histone deacetylase inhibitors. *Lymphoma*. 2012;2012:290685. https://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.0630
4. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-2390. https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-643569
5. Белоусова И.Э., Самцов А.В. *Федеральные клинические рекомендации по ведению больных лимфомами кожи.* М.: Российское общество дерматовенерологов и косметологов; 2015. [Belousova IE, Samtsov AV. *Federal clinical practice guidelines for the management of patients with lymphomas of the skin*. Moscow: Rossiiskoe obschestvo dermatovenerologov i kosmetologov; 2015. (in Russ.)].
6. Братцева Е.В., Ротанов С.В. Современные подходы к диагностике грибовидного микоза. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2010;6:16-22. [Brattseva EV, Rotanov SV. Modern approaches to the diagnosis of mycosis fungoides. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2010;(6):16-22. (In Russ.)].
7. Zackheim HS, McCalmont TH. Mycosis fungoides: the great imitator. *J Am Acad Dermatol*. 2002;47(6):914-918. https://doi.org/10.1067/mjd.2002.124696
8. Wu J, Nihal M, Siddiqui J, Vonderheid EC, Wood GS. Low FAS/CD95 expression by CTCL correlates with reduced sensitivity to apoptosis that can be restored by FAS upregulation. *J Invest Dermatol*. 2009;129(5):1165-1173. https://doi.org/ 10.1038/jid.2008.309
9. Разнатовский И.М. Парапсориазы Брока и их отношение к пойкилодермии, грибовидному микозу и ретикулезу кожи. *Вестник дерматологии и венерологии*. 1976;6:42-46. [Raznatovskii IM. Parapsoriasies of Brocq and their relation to poikiloderma, mycosis fungoides and skin reticulosis. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 1976;(6):42-46. (In Russ.)].
10. Сыдиков А.А., Заславский Д.В., Зайцев В.С., Насыров Р.А. Иммуногистохимические критерии диагностики мелкобляшечного парапсориаза, крупнобляшечного парапсориза и грибовидного микоза. *Современные проблемы науки и образования*. 2013;6:568. [Sydikov AA, Zaslavskii DV, Zaitsev VS, Nasyrov RA. Immunohistochemical criteria for diagnosis of small-plaque, large-plaque parapsoriasis and mycosis fungoides. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2013;(6):568. (In Russ.)].
11. King-Ismael D, Ackerman AB. Guttate parapsoriasis/digitate dermatosis (small plaque parapsoriasis) is mycosis fungoides. *Am J Dermatopathol*. 1992;14(6):518-530; discussion 531-535.
12. Поддубная И.В., Савченко В.Г. (ред.). *Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний*. М.: Буки Веди; 2016;85-91. [Poddubnaya IV, Savchenko VG, eds. *Russian clinical guidelines in diagnosis and treatment of lymphoproliferative disorders*. Moscow: Buki Vedi; 2016:85-91. (In Russ.)].
13. Willerslev-Olsen A, Litvinov IV, Fredholm SM, Petersen DL. IL-15 and IL-17F are differentially regulated and expressed in mycosis fungoides. *Cell Cycle*. 2014;13(8):1306-1312. https://doi.org/ 10.4161/cc.28256
14. Burg G, Kempf W, eds. *Cutaneous lymphomas (Basic and clinical dermatology)*. Informa Health-Care; 2005.
15. Сидорова Ю.В., Никитин Е.А., Пекло М., Власик Т.Н., Самойлова Р.С., Кравченко С.К., Меликян А.Л., Виноградова Ю.Е., Пивник А.В., Сударикова А.Б. Опыт использования ПЦР для определения Т-клеточной клональности. *Терапевтический архив*. 2003;75(7):48-52. [Sidorova YuV, Nikitin EA, Peklo M, Vlasik TN, Samoilova RS, Kravchenko SK, Melikyan AL, Vinogradova YuE, Pivnik AV, Sudarikov AB. Experience of using PCR for determining T-cell clonality. *Terapevticheskii arkhiv*. 2003;75(7): 48-52. (In Russ.)].
16. Olsen EA, Whittaker S, Kim YH, Duvic M, Prince HM, Lessin SR, Bernengo MG. Clinical end points and response criteria in mycosis fungoides and Sezary syndrome: a consensus statement of the International Society for Cutaneous Lymphomas, the United States Cutaneous Lymphoma Consortium, and the Cutaneous Lymphoma Task Force of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(18):2598-2607. https://doi.org/ 10.1200/JCO.2010.32.0630
17. Keehn CA, Belongie IP, Shistik G, Fenske NA, Glass LF. The diagnosis, staging, and treatment options for mycosis fungoides. *Cancer Control*. 2007;14(2):102-111. https://doi.org/ 10.1177/107327480701400203
18. Жуков А.С., Белоусова И.Э., Хайрутдинов В.Р., Теличко И.Н., Самцов А.В. Уровень пролиферативной активности лимфоцитов при грибовидном микозе и бляшечном парапсориазе. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2014;1:30-36. [Zukov AS, Belousova IE, Hairutdinov VR, Telichko IN, Samtsov AV. The level of proliferative activity of lymphocytes in mycosis fungoides and plaque parapsoriasis. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2014;(1): 30-36. (In Russ.)].
19. Bernier C, Nguyen JM, Quereux G, Renault JJ, Bureau B. CD13 and TCR clone: markers of early mycosis fungoides. *Acta Derm Venereol*. 2007;87(2):155-159. https://doi.org/ 10.2340/00015555-0197

20. Бабаян А.Ю., Залетаев Д.В., Немцова М.В. Подтверждение значения теории полей канцеризации в генезе поверхностного рака мочевого пузыря. *Молекулярная медицина*. 2013;1:24-28. [Babayan AYu, Zaletaev DV, Nemtsova MV. Confirmation of the value of the theory of the fields of carcinization in the genesis of superficial bladder cancer. *Molekulyarnaya meditsina*. 2013;(1): 24-28. (In Russ.)].

21. Жуков А.С., Белоусова И.Э., Самцов А.В. Foxp3+ Т-лимфоциты в патогенезе грибовидного микоза. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2014;5:68-72. [Zhukov AS, Belousova IE, Samtsov AV. Foxp3+ T-lymphocytes in the pathogenesis of mycosis fungoides. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2014;(5):68-72. (In Russ.)].

22. Krejsgaard T, Odum N, Geisler C, Wasik MA, Woetmann A. Regulatory T cells and immunodeficiency in mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Leukemia*. 2012;26(3):32-42. https://doi.org/10.1038/leu.2011.237

23. Litvinov I, Cordeiro B, Fredholm S, Ødum N, Zargham H. Analysis of STAT4 expression in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) patients and patient-derived cell lines. *Cell Cycle*. 2014;13(18):2975-2982. https://doi.org/10.4161/15384101.2014.947759

24. Жуков А.С., Белоусова И.Э., Самцов А.В. Иммунологические и молекулярно-генетические механизмы развития грибовидного микоза. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2015;4:42-50. [Zhukov AS, Belousova IE, Samtsov AV. Immunological and molecular-genetic mechanisms of development of mycosis fungoides. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2015;(4):42-50. (In Russ.)].

25. Пальцев М.А., Залетаев Д.В., ред. Введение в молекулярную диагностику. М.: Медицина; 2011;2. [Pal'tsev MA, Zaletaev DV, eds. Introduction to molecular diagnostics. Moscow: Meditsina; 2011;2. (In Russ.)].

26. Santucci M, Biggeri A, Feller AC, Massi D, Burg G. Efficacy of histologic criteria for diagnosing early mycosis fungoides: an EORTC cutaneous lymphoma study group investigation. European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(1):40-50.

27. Smoller BR, Bishop K, Glusac E, Kim YH, Hendrickson M. Reassessment of histologic parameters in the diagnosis of mycosis fungoides. *Am J Surg Pathol*. 1995;19(12):1423-1430.

28. Johnson VE, Vonderheid EC, Hess AD, Eischen CM, McGirt LY. Genetic markers associated with progression in early mycosis fungoides. *J Eur Acad Dermatol Venerol*. 2014;28(11):1431-1435. https://doi.org/10.1111/jdv.12299

29. Keehn CA, Belongie IP, Shistik G, Fenske NA, Glass LF. The diagnosis, staging, and treatment options for mycosis fungoides. *Cancer Control*. 2007;14(2):102-111. https://doi.org/ 10.1177/107327480701400203

Поступила 08.06.18