

Возможности конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в неинвазивной диагностике развития злокачественных эпителиальных опухолей кожи в процессе прогрессирования дерматогелиоза

Е.С. Снарская, С.Б. Ткаченко, Е.В. Кузнецова, А.С. Алленова

ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России
119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Развитие злокачественных эпителиальных новообразований кожи, из которых наиболее сложным характером течения и многообразием клинико-морфологических вариантов отличаются актинический кератоз и базально-клеточная карцинома кожи, сопряжено в большинстве случаев с прогрессированием дерматогелиоза. Риск трансформации актинического кератоза в плоскоклеточный рак кожи варьируется от 0,1 до 20%, а в случаях множественных очагов поражения АК увеличивается до 80%. Неинвазивный метод отражательной конфокальной лазерной сканирующей микроскопии является наиболее перспективным в целях раннего выявления признаков развития эпителиальных новообразований кожи и позволяет проводить динамический мониторинг состояния опухолевого поля, позволяя *in vivo* своевременно диагностировать появление плоскоклеточного пула клеток. Метод конфокальной лазерной сканирующей микроскопии позволяет получить контрастные изображения всех морфологических структур эпидермиса и верхней части дермы, которые ориентированы в горизонтальной плоскости и имеют разрешение, сопоставимое с традиционной световой микроскопией биоптата кожи. По нашим данным, полученным на основании изучения динамики развития и морфологических структур очагов актинического кератоза (50 случаев) методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, выявлен целый ряд морфологических особенностей, дальнейший анализ которых позволит выделить признаки прогрессирования канцерогенеза при дерматогелиозе.

Ключевые слова: **конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, дерматогелиоз, актинический кератоз, базальноклеточная карцинома.**

Potential of confocal laser scanning microscopy for non-invasive diagnostics of malignant epithelial skin tumors in the course of dermatoheliosis progression

E.S. Snarskaya, S.B. Tkachenko, E.V. Kuznetsova, A.S. Allenova

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University
Trubetskaya str., 8, bldg 2, Moscow, 119991, Russia

Most cases of malignant epithelial skin neoplasms including actinic keratosis and basal cell carcinoma, which are characterized by the most complicated course and numerous clinical and morphological options, involve dermatoheliosis progression. The risk of actinic keratosis transformation into basal cell carcinoma varies from 0.1% to 20% and up to 80% in cases of multiple AK lesion foci. A non-invasive method known as reflectance confocal laser scanning microscopy is the most promising one for the purposes of early diagnostics of signs pointing at epithelial skin neoplasm development and makes it possible to monitor the tumor in progress *in vivo* to diagnose the presence of a pool of squamous cells on a timely basis. The confocal laser scanning microscopy method provides high-contrast images of for any horizontal-oriented morphologic structures in the epidermis and upper dermis with a resolution comparable to those characteristic of traditional optical microscopy of skin tissue samples. According to our data obtained as a result of studying dynamic changes and morphologic structures in actinic keratosis foci (50 cases) using the confocal laser scanning microscopy method, we discovered a number of morphologic features, and their further analysis will distinguish the signs of progressing carcinogenesis in case of dermatoheliosis.

Key words: confocal laser scanning microscopy, dermatoheliosis, actinic keratosis, basal cell carcinoma.

Corresponding author: snarskaya-dok@mail.ru. Vestnik Dermatologii i Venerologii 2016; 3: 75—82.

■ Понятие «дерматогелиоз» (син. фотостарение) включает широкий спектр клинических изменений, манифестирующих преимущественно на открытых участках кожного покрова (лицо, шея, зона декольте, предплечья и тыльная поверхность кистей рук) в результате кумулятивного эффекта воздействия УФ-излучения [1, 2]. Из всего спектра клинических изменений наиболее важным в прогностическом отношении является развитие множественных предраковых (актинический кератоз) и злокачественных эпителиальных опухолей кожи (базально-клеточный, метатипический, плоскоклеточный рак кожи) [3, 4].

Актинический кератоз (АК) является предраковым заболеванием кожи, входящим в симптомокомплекс дерматогелиоза, манифестирует очень рано у светлокожих людей (I—II фототип), при этом риски развития и распространения процесса возрастают на 40% при наличии солнечных ожогов в анамнезе [5—7]. Среди европейцев старше 40 лет распространенность АК достигает 15%, а у 70-летних жителей Европы и США его частота близка к 100% [5, 8]. При прогрессировании дерматогелиоза отмечается быстрое увеличение количества очагов АК. Так, у пациентов может наблюдаться в среднем от 7 до 10 элементов АК с преимущественной локализацией на коже головы и шеи [9]. Клинические проявления АК довольно типичны и характеризуются наличием эритематозных пятен розовато-красноватого оттенка округлых очертаний с нечеткими границами или бляшек с умеренно выраженным шелушением и корочками сероватого цвета на поверхности [10]. В 2007 г. была разработана градация по степени клинической выраженности АК, в соответствии с которой выделяют три уровня: I — элементы визуально могут не определяться, слегка определяются при пальпации; II — хорошо различимы и визуально, и пальпаторно; III — плотные, гиперкератотические очаги, без труда определяемые при осмотре и пальпации [11]. Однако АК имеет большое разнообразие клинических форм, в связи с чем выделяют 4 типа АК: эритематозный, ороговевающий, пигментированный и тип красного плоского лишая, что зачастую затрудняет дифференциальную диагностику с прочими новообразованиями кожи, как злокачественными, так и доброкачественными [12]. Кроме того, риск трансформации АК в плоскоклеточный рак кожи варьирует от 0,1 до 20%, а для пациентов, имеющих множественные очаги АК, риск развития инвазивной плоскоклеточной карциномы оценивается до 80% [13]. У более чем 30% пациентов, страдающих АК, одновременно диагностируется базально-клеточный рак кожи, причем ассоциация этих заболеваний особенно часта у пациентов с множественными очагами поражения АК [14]. Эпидемиологические исследования подтверждают, что большие, страдающие АК, имеют наиболее высокий риск развития базально-клеточного рака кожи, а экспериментальные данные подчеркива-

ют возможность развития метатипического рака кожи на основе базалоидного опухолевого комплекса, отличающегося большим инвазивным потенциалом и способностью к метастазированию [15, 16].

В настоящее время золотым стандартом диагностики эпителиальных новообразований кожи и оценки степени их инвазивного потенциала является гистологическое исследование, однако локализация в косметически значимых зонах и множественность поражения часто делают процесс взятия биоптата невозможным или высокорискованным. В амбулаторной практике для подтверждения диагноза широко используется цитологическое исследование, но эта методика является инвазивной, ее данные менее информативны, чем данные гистологического исследования, и достоверность результата составляет лишь 86% [17, 18]. Метод дерматоскопического исследования, положительные характеристики которого заключаются в неинвазивности и скорости проведения квалифицированным специалистом, бывает недостаточно информативен для проведения убедительной дифференциальной диагностики. Кроме того, визуализация дерматоскопических признаков может быть затруднена из-за наличия шелушения или корочек на поверхности элементов.

Метод отражательной конфокальной лазерной сканирующей микроскопии является перспективным в отношении диагностики предраковых, злокачественных и доброкачественных эпителиальных опухолей кожи и позволяет *in vivo* получить контрастные изображения эпидермиса и верхней части дермы, ориентированные в горизонтальной плоскости, с разрешением, сопоставимым с традиционной световой микроскопией, и оценить патоморфологические изменения в коже. Данная неинвазивная методика обеспечивает возможность установления диагноза в кратчайшие сроки, оценки динамических изменений, происходящих в ходе эволюции новообразований кожи, а также результатов различных методов лечения [19].

По нашим данным, основанным на изучении особенностей динамики очагов АК методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, получен широкий спектр характерных морфологических изменений. Так, для элементов АК характерны наличие очагов гиперкератоза, клеток полигональной формы, содержащих ядра (паракератоз), широких и расплывчатых межклеточных соединений на уровне рогового слоя эпидермиса, атипичная структура «медовых сот», неправильная форма и размер кератиноцитов, участки дезорганизации и утраты структуры «медовых сот» на уровнях шиповатого и зернистого слоев, расширенные кровеносные сосуды на уровне сосочков дермы, солнечный эластоз. Полученные нами результаты в целом сопоставимы с данными некоторых зарубежных исследований, посвященных вопросам

изучения АК методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии [20—22].

Цели настоящего исследования — выявление предикторов развития эпителиальных новообразований кожи и изучение особенностей морфогенеза опухолевой прогрессии в случаях АК и признаков развития и прогрессирования базально-клеточной карциномы. В ходе дальнейших исследований и мониторинга полученных морфологических изменений очагов АК нами будут предложены алгоритм диагностики и признаки прогрессирования канцерогенеза при дерматогелиозе.

В таблице представлено соответствие гистологических признаков данным, полученным с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии [23].

Приводим клиническое наблюдение.

Пациентка М., 57 лет, обратилась с жалобами на наличие множественных высыпаний на коже лица. Считает себя больной в течение 7—8 лет, наблюдалась у дерматолога с диагнозом «актинический кератоз», лечение не получала. Общее состояние удовлетворительное. Сопутствующие заболевания: хронический холецистит, хронический гастрит.

St. Localis: на коже лба, носа, щек визуализируются множественные пятна, бляшки розового цвета с шероховатой поверхностью, на части элементов отмечается наличие плотных корочек серовато-коричневого цвета. Кроме того, на коже левой скуловой области визуализируется пятно розового цвета размером 0,8 × 1,0 см с неровными границами и чешуйкой желтоватого цвета в центре. Свободная от высыпаний

кожа лица, шеи имеет серо-желтый оттенок, отмечается множество глубоких статических и мимических морщин. Волосы, ногтевые пластины, слизистые оболочки не поражены. II фототип кожи по Фитцпатрику. IV стадия фотостарения по Глоау.

Диагноз: актинический кератоз (гиперкератотическая форма). Базально-клеточный рак (поверхностная форма) левой скуловой области и правой щеки.

Для проведения дифференциальной диагностики мы использовали метод прижизненной лазерной сканирующей микроскопии на аппарате Vivascope 1500, Lucid Inc. Исследованию подлежали:

- элемент на коже лба № 1 (рис. 1);
- элемент на коже лба № 2 (см. рис. 1);
- элемент на коже левой скуловой области № 3 (рис. 2);
- элемент на коже правой щеки № 4 (рис. 3).

При исследовании очагов № 1, 2, 4 выявлены следующие признаки: гиперкератоз, наличие отдельных чешуек, атипичная структура «медовых сот», участки дезорганизации и утраты структуры «медовых сот», расширенные, разветвленные кровеносные сосуды на уровне сосочковой дермы, солнечный эластоз (рис. 4—9).

При изучении данных конфокальной микроскопии очага № 3 выявлены следующие признаки: замещение нормальной архитектоники ткани опухолевыми гнездами неправильной формы (светлые островки опухоли из базалоидных клеток, содержащих меланин, окруженные темными участками, и «темные силуэты», представленные гнездами базалоидных клеток без пигмента и окруженные

Таблица

Соответствие признаков, выявляемых при конфокальной лазерной сканирующей микроскопии АК, данным традиционного гистологического исследования

Признак, выявляемый при конфокальной микроскопии	Определение	Сопоставление с классическим гистологическим исследованием
Чешуйки (роговой слой)	Аморфный материал различной отражательной способности	Гиперкератоз
Полигональные клетки, содержащие ядра (роговой слой)	Резко очерченные клетки с тонким отражающим свет контуром, окружающим темное ядро	Паракератоз
Атипичная структура «медовых сот» (шиповатый/зернистый слой); полная дезорганизация с утратой указанного паттерна	Неодинаковая форма и размер клеток, формирующих паттерн «медовых сот»; полная утрата паттерна «медовых сот»	Атипия кератиноцитов
Округлые клетки, содержащие ядра (шиповатый/зернистый слой)	Резко очерченные светлые клетки небольшого размера, овальной или округлой формы	Экзоцитоз (воспалительный инфильтрат)
Увеличенный просвет кровеносных сосудов, проходящих в дермальных сосочках	Темные овальные, круглые пространства, соответствующие сосочкам дермы, внутри которых визуализируются клетки с различной отражательной способностью (клетки крови)	Расширение сосудистой сети
Солнечный эластоз	Бессистемно расположенные пучки светлого цвета, умеренно отражающие свет структуры, напоминающие шнуры	Скопление аморфного материала под эпидермально-дермальным сочленением



Рис. 1. Объекты исследования на коже лба



Рис. 2. Объект исследования на коже левой скуловой области (№ 3)



Рис. 3. Объект исследования на коже правой щеки (№ 4)

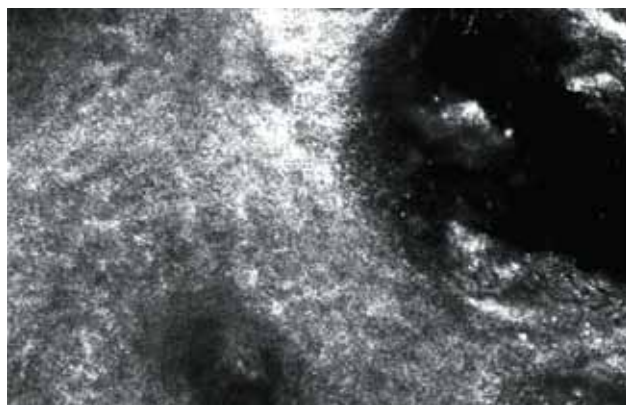


Рис. 4. Чешуйки, характеризующие наличие гиперкератоза, шелушения в исследуемой области. Глубина сканирования 14,89 мкм

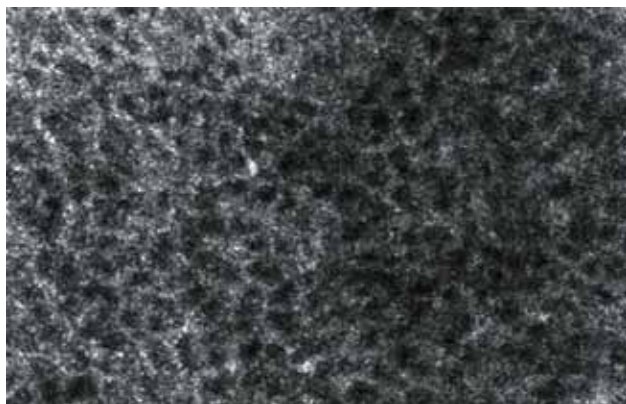


Рис. 5. Типичная структура «медовых сот» (снимок сделан на участке кожи, визуально неизменном). Глубина сканирования 39,71 мкм

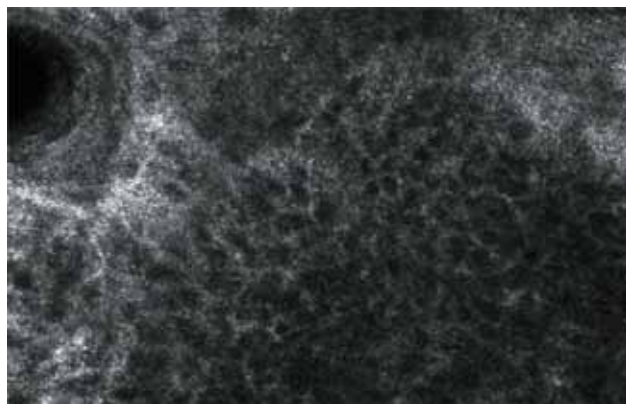


Рис. 6. Атипичная структура «медовых сот», размытые, нечеткие межклеточные соединения. Глубина сканирования 39,71 мкм

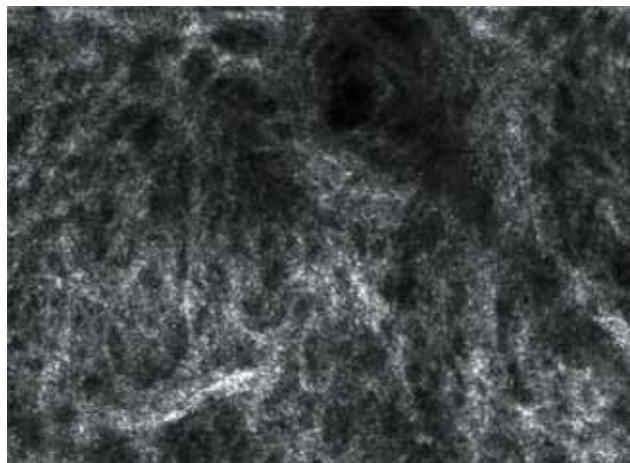


Рис. 7. Полная утрата паттерна «медовых сот», дезорганизация кератиноцитов. Глубина сканирования 39,71 мкм

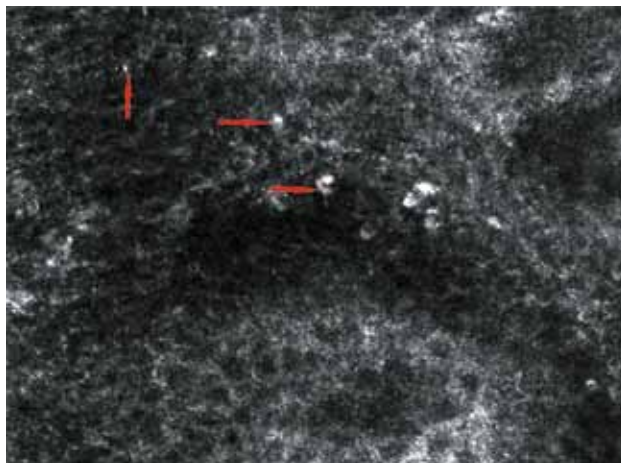


Рис. 8. Небольшие округлые светлые клетки, различные среди элементов атипичной структуры «медовых сот», представляют собой клетки воспалительного инфильтрата. Глубина сканирования 39,71 мкм

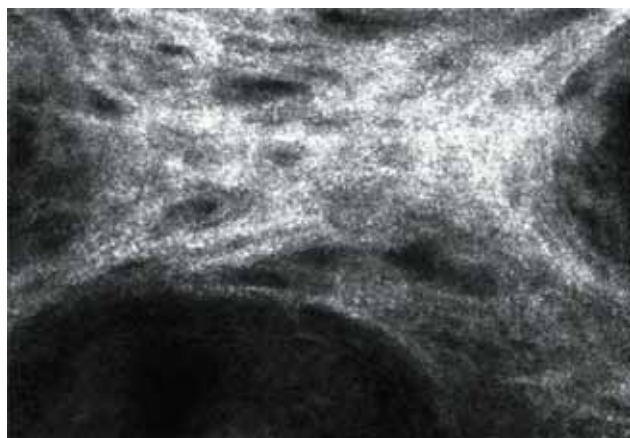


Рис. 9. Солнечный эластоз. Глубина сканирования 59,57 мкм

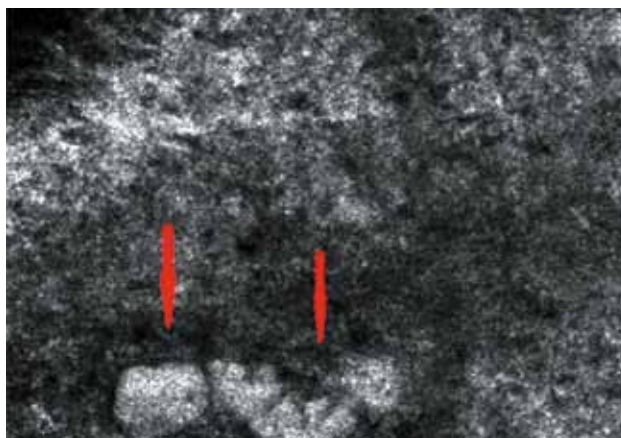


Рис. 10. Светлые островки опухоли. Глубина сканирования 29,79 мкм

пучками коллагеновых волокон), явление расположения клеток параллельно одной оси, дендритные клетки в окружающем эпидермисе (клетки Лангерганса), наличие округлых светлых клеток, увеличенный диаметр просвета сосудов, наличие ветвящихся сосудов (рис. 10—13).

По данным конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, очаг № 3 соответствует базально-клеточному раку кожи, а очаги № 1, 2, 4 являются элементами актинического кератоза.

Для подтверждения диагноза пациентке было проведено цитологическое исследование с исследуемых очагов, через 2 нед. получено заключение: соскоб № 3 (кожа левой скуловой области): «Цитограмма базально-клеточного рака», в образцах № 1, 2, 4 данных о наличии базалиомы не выявлено. Проведенное далее гистологическое исследование с очагов № 3 на коже левой скуловой области и № 4 на коже правой щеки подтвердило наличие базально-клеточного рака кожи и АК соответственно (рис. 14, 15).

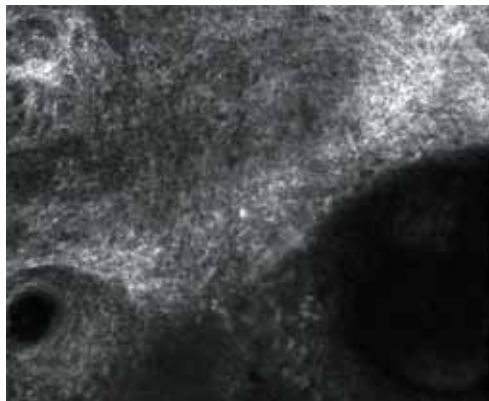


Рис. 11. «Темный силуэт». Глубина сканирования 74,46 мкм

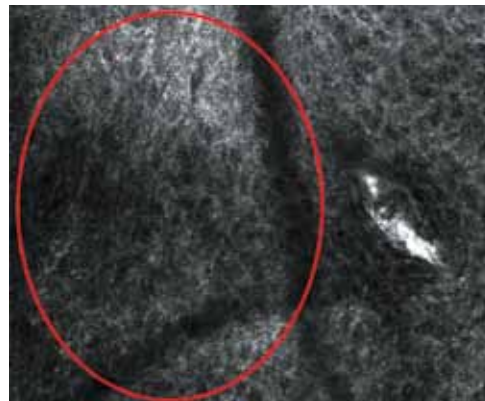


Рис. 12. Феномен расположения клеток параллельно одной оси. Глубина сканирования 29,79 мкм

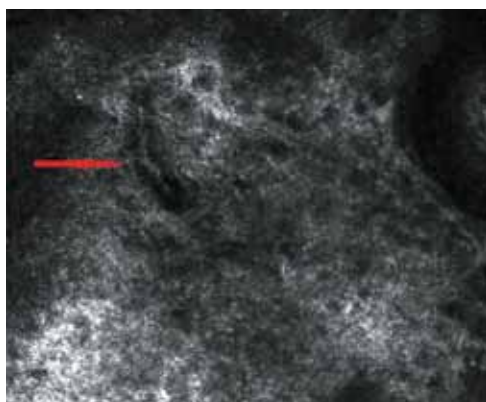


Рис. 13. Горизонтально расположенный расширенный сосуд. Глубина сканирования 74,46 мкм

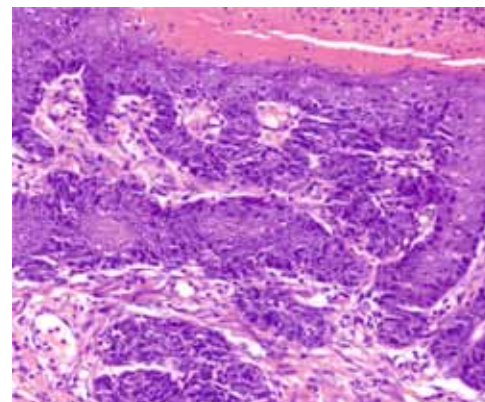


Рис. 14. Гистологический препарат очага № 3. Морфологическая картина представлена фокусами скопления эпителиальных тяжей, что соответствует базально-клеточному раку кожи. Здесь и на рис. 15: окраска гематоксилином и эозином. ×200

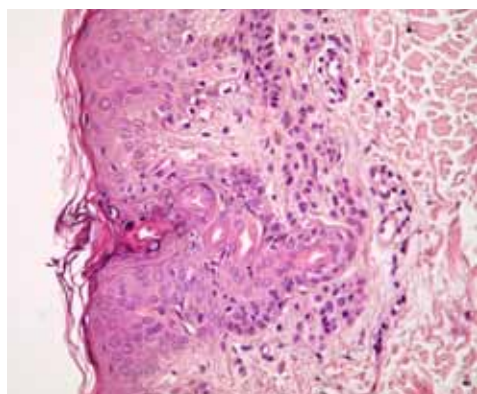


Рис. 15. Гистологический препарат очага № 4. Картина АК с умеренно выраженной дисплазией на фоне выраженного эластоза в дерме

Таким образом, данные конфокальной лазерной сканирующей микроскопии могут быть использованы для неинвазивной *in vivo* дифференциальной диагностики элементов АК и поверхностной базалиомы, а также других эпителиальных новообразований, развивающихся на фоне прогрессирующего дерматогелиоза кожи. Преимуществами данного метода исследования являются прежде всего неинвазивность исследования, сроки проведения и точность данных, сравнимая с традиционной световой микроскопией, а также уникальная возможность мониторинга состояний морфологических структур кожи, позволяющая прогнозировать развитие плоскоклеточного пула клеток, а также оценивать эффективность проведенной терапии. ■

Литература

1. Snarskaja E.S. Photoaging of the skin: modern aspects. *Vestn dermatol venerol* 2011; (2): 98—103. [Снарская Е.С. Фотостарение кожи: современные аспекты. *Вестн дерматол венерол* 2011; (2): 98—103.]
2. Fisher G.J., Kang S., Varani J. et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol* 2002 Nov; 138 (11): 1462—70.
3. Wu S., Han J., Vlegel R.A. et al. Cumulative ultraviolet radiation flux in adulthood and risk of incident skin cancers in women. *Br J Cancer*. 2014 Apr 2; 110 (7): 1855—61.
4. Lesiak A., Slowik-Rylska M., Rogowski-Tylman M. et al. Risk factors in Central Poland for the development of superficial and nodular basal cell carcinomas. *Arch Med Sci* 2010 Apr 30; 6 (2): 270—5.
5. Memon A.A., Tomenson J.A., Bothwell J. et al. Prevalence of solar damage and actinic keratosis in a Merseyside population. *Br J Dermatol* 2000; 142: 1154—9.
6. Schaefer I., Augustin M., Spehr C. et al. Prevalence and risk factors of actinic keratoses in Germany — analysis of multisource data. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013; 28: 309—13.
7. Traianou A., Ulrich M., Apalla Z. et al. Risk factors for actinic keratosis in eight European centers: a case-control study. *Br J Dermatol* 2012; 167 (Suppl 2): 36—42.
8. Callen J.P., Bickers D.R., Moy R.L. Actinic keratoses. *J Am Acad Dermatol* 1997 Apr; 36 (4): 650—653.
9. Drake L.A., Ceilley R.I., Cornelison R.L., Dobes W.L., Dorner W., Goltz R.W., et al. Guidelines for care of actinic keratoses. *J Am Acad Dermatol* 1995; 32: 95—8.
10. Babilas P., Landthaler M., Szeimies R.M. Actinic keratoses. *Hautarzt* 2003; 54: 551—62.
11. Röwert-Huber J1, Patel MJ, Forschner T, Ulrich C, Eberle J, Kerl H, Sterry W, Stockfleth E. Actinic keratosis is an early in situ squamous cell carcinoma: a proposal for reclassification. *Br J Dermatol*. 2007 May; 156 Suppl 3: 8—12
12. Strunk T., Braathen L.R., Szeimies R.-M. Actinicheskiy keratoz — obzor literatury. *Vestnik dermatologii i venerologii* 2014; (5): 42—52. [Strunk T., Braathen L.R., Szeimies R.-M. Актинический кератоз — обзор литературы. *Вестн дерматол венерол* 2014; (5): 42—52.]
13. Zalaudek I, Giacomel J, Schmid K, et al. Dermatoscopy of facial actinic keratosis, intraepidermal carcinoma, and invasive squamous cell carcinoma: a progression model. *J Am Acad Dermatol* 2012 Apr; 66 (4): 589—97.
14. Traianou A, Ulrich M, Apalla Z, et al. Risk factors for actinic keratosis in eight European centres: a case-control study. *Br J Dermatol* 2012 Aug; 167 Suppl 2: 36—42.
15. Khalesi M, Whiteman DC, Doi SA, et al. Cutaneous markers of photo-damage and risk of Basal cell carcinoma of the skin: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013 Sep; 22 (9): 1483—9.
16. Snarskaya E.S., Molochkov V.A., Pilev L.N. et al. Experimental methatypic carcinoma (first Russian experimental model). *Ros zhurn kozhn venerich boleznej* 2004; (6): 66—70. [Снарская Е.С., Молочков В.А., Пылев Л.Н. и др. Экспериментальный метатипический рак кожи (первая отечественная модель). *Рос журн кожн венерич болезней* 2004; (6): 66—70.]
17. Snarskaya E.S., Molochkov V.A. Basal cell carcinoma. *M*; 2003: 136. [Снарская Е.С., Молочков В.А. Базалиома. *M* 2003: 136.]
18. Kondrat'eva E.G., Lamotkin I.A. Mistakes in the diagnostics of basal cell carcinoma. 2009; (3): 71. [Кондратьева Е.Г., Ламоткин И.А. Ошибки в диагностике базально-клеточного рака кожи. 2009; (3): 71.]
19. Lukasheva N.N., Tkachenko S.B., Potekaev N.N. In vivo confocal laser scanning microscopy: a history of creation, principle of operation, potentiality in dermatology. *Klini dermatol venerol* 2008; (5):10—15. [Лукашева Н.Н., Ткаченко С.Б., Потеекаев Н.Н. и др. Прижизненная отражательная конфокальная лазерная сканирующая микроскопия: история создания, принцип работы, возможности применения в дерматологии. *Клин дерматол венерол* 2008; (5):10—15.]
20. Peppelman M., Nguyen K.P., Hoogendoorn L. et al. Reflectance confocal microscopy: non-invasive distinction between actinic keratosis and squamous cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015 Jul; 29 (7): 1302—9.
21. Ulrich M., Maltusch A., Rius-Diaz F. et al. Clinical applicability of in vivo reflectance confocal microscopy for the diagnosis of actinic keratoses. *Dermatol Surg* 2008 May; 34 (5): 610—9.
22. Horn M., Gerger A., Ahlgrim-Siess V. et al. Discrimination of actinic keratoses from normal skin with reflectance mode confocal microscopy. *Dermatol Surg* 2008 May; 34 (5): 620—5.
23. Rishpon A., Kim N., Scope A. et al. Reflectance confocal microscopy criteria for squamous cell carcinomas and actinic keratoses. *Arch Dermatol* 2009 Jul; 145 (7): 766—72.

об авторах:

Е.С. Снарская — д.м.н., профессор кафедры кожных и венерических болезней им. В.А. Рахманова факультета послевузовского профессионального образования врачей ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва

С.Б. Ткаченко — д.м.н., профессор, зав. НИО иммунозависимых дерматозов ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России

Е.В. Кузнецова — аспирант кафедры кожных и венерических болезней им. В.А. Рахманова факультета послевузовского профессионального образования врачей ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва

А.С. Алленова — аспирант кафедры кожных и венерических болезней им. В.А. Рахманова НИО иммунозависимых дерматозов НИЦ ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье