

Диагностическая значимость метода конфокальной лазерной сканирующей *in vivo* микроскопии

А.А. Кубанова¹, А.А. Кубанов¹, В.А. Смольяникова², Н.В. Грибанов¹, Ю.Б. Махакова¹

¹ ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России
107076, Москва, ул. Короленко, д. 3, стр. 6

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

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия *in vivo* — перспективный метод исследования, позволяющий без нарушения целостности кожного покрова визуализировать клеточные структуры эпидермиса и сосочкового слоя дермы с разрешением и контрастностью, приближенными к таковым при классическом гистологическом исследовании.

Цель. Оценить значимость метода конфокальной лазерной сканирующей *in vivo* микроскопии в диагностике актинического кератоза, обыкновенного псориаза и розацеа по сравнению с классическим гистологическим исследованием.

Материал и методы. Приведены результаты исследования методом конфокальной лазерной сканирующей *in vivo* микроскопии в сопоставлении с гистологической картиной у 10 пациентов с диагнозом эритематозной формы актинического кератоза, 10 — с распространенным псориазом, 10 — с эритематозной и папулезной формами розацеа.

Результаты. Описаны диагностически значимые признаки заболеваний, выявляемые при конфокальной лазерной сканирующей *in vivo* микроскопии, и определены возможности метода в диагностике воспалительных заболеваний кожи.

Ключевые слова: конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ), неинвазивная диагностика, гистологическая картина.

Diagnostic value of the confocal laser scanning microscopy *in vivo*

A.A. Kubanova¹, A.A. Kubanov¹, V.A. Smolyannikova², N.V. Griбанov¹, Yu.B. Makhakova¹

¹ State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation Korolenko str., 3, bldg 6, Moscow, 107076, Russia

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

The confocal laser scanning microscopy *in vivo* is a promising study method to visualize cell structures of epidermis and papillary dermis without affecting the skin integrity, which provides for a resolution and contrast similar to those characteristic of the classical histology examination.

Goal. To assess the confocal laser scanning microscopy *in vivo* (CLSM) technique for diagnosing actinic keratosis, psoriasis vulgaris and rosacea vs. the classical histology examination.

Study materials. The article describes the results obtained by using the confocal laser scanning microscopy *in vivo* technique vs. the histology examination in 10 patients with erythematous actinic keratosis, 10 patients with extensive psoriasis and 10 patients with erythematous and papulous rosacea.

Results. The article describes diagnostically significant signs of the diseases detected by using the confocal laser scanning microscopy *in vivo* as well as the potential of this method in terms of diagnosing inflammatory skin diseases.

Key words: **confocal laser scanning microscopy (CLSM), non-invasive diagnostics, histological picture.**

Corresponding author: griбанov@cnikvi.ru. Vestnik Dermatologii i Venerologii 2015; 3: 67—74.

■ Одним из принципиально новых методов неинвазивной диагностики, позволяющих исследовать морфологические структуры кожи, является конфокальная лазерная сканирующая микроскопия *in vivo* (КЛСМ *in vivo*).

КЛСМ *in vivo* — метод визуализации эпидермиса и сосочкового слоя дермы, позволяющий получить изображения послойных оптических срезов, ориентированных в горизонтальной плоскости с разрешением, сопоставимым с обычной световой микроскопией [1]. С помощью конфокального микроскопа *in vivo* возможно в режиме реального времени анализировать клеточные структуры без нарушения целостности ткани [2, 3].

В зарубежной литературе имеется большое количество публикаций, посвященных эффективности применения КЛСМ *in vivo* для диагностики и оценки результатов лечения актинического кератоза, псориаза и розацеа [4—13].

Цель настоящего исследования — оценить значимость метода КЛСМ *in vivo* в диагностике актинического кератоза, обыкновенного псориаза и розацеа по сравнению с классическим гистологическим исследованием.

Материал и методы

На базе ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России было проведено клиническое обследование 10 пациентов (4 мужчин, 6 женщин в возрасте от 42 до 82 лет) с эритематозной формой актинического кератоза, 10 пациентов (7 мужчин, 3 женщины в возрасте от 18 до 56 лет) с обыкновенным распространенным псориазом, 10 пациентов (2 мужчин, 8 женщин в возрасте от 25 до 65 лет) с эритематозно-телеангиэктатической и папулезной формами розацеа. Во всех наблюдениях диагноз был установлен клинически и подтвержден гистологическим исследованием.

Пациенты с эритематозной формой актинического кератоза имели мелкоочаговые высыпания размером от 0,5 до 3 см, локализованные на лице, представленные эритематозными пятнами с шелушением на поверхности. Давность заболевания у пациентов с актиническим кератозом составляла от 4 мес. до 7 лет.

У пациентов с распространенным псориазом были исследованы очаги, локализованные на конечностях и туловище, представленные папулами и бляшками с мелкопластинчатым шелушением на поверхности. Длительность заболевания составляла от 3 до 15 лет.

Для пациентов с розацеа были характерны эритематозные высыпания, локализованные на лице, расширенные сосуды, у больных с папулезной формой отмечалось присоединение единичных папул. У 6 пациентов при микроскопическом исследовании соскоба кожи с очагов поражения было обнаружено наличие клеща *Demodex folliculorum*.

Исследования очагов поражения проводились на конфокальном лазерном сканирующем *in vivo* ми-

кроскопе VivaScope® 1500 (Lucid® Inc., Rochester, NY, США), использующем лазерное излучение с длиной волны 830 нм с максимальной выходной мощностью 22 мВт, путем получения дерматоскопического изображения VivaCam, послойных срезов VivaStack с шагом 3 мкм до максимально возможной глубины и квадратных горизонтальных срезов VivaBlock с полем зрения от 3 × 3 до 8 × 8 мм. В качестве иммерсионных сред использовались масло Crodamol STS® и гель для ультразвукового исследования.

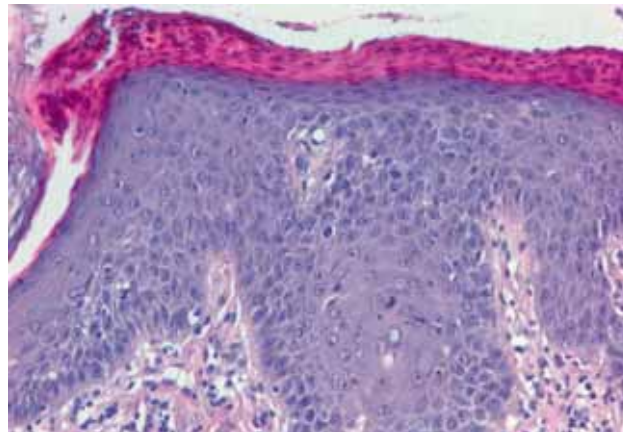
Анализ и обработка полученных изображений проводились на персональных компьютерах с использованием программ для обработки изображений Microsoft Office Picture Manager, Image J.

Результаты и их обсуждение

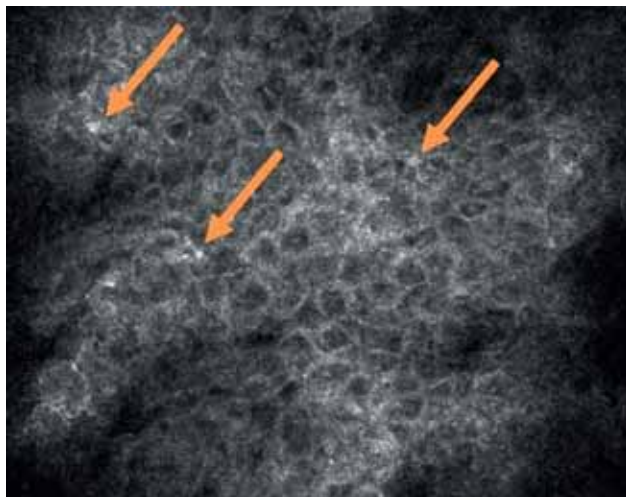
Гистологическая картина актинического кератоза во всех наблюдениях была однотипной, при исследовании биоптатов кожи выявлялись нарушения стратификации слоев эпидермиса и умеренно выраженный полиморфизм кератиноцитов, включающий в себя увеличение размеров и изменение формы клеток и их ядер. Со стороны дермы наиболее характерным признаком был солнечный эластоз, проявляющийся дезорганизацией коллагеновых волокон и их базофилией. Как правило, в верхних отделах дермы выявлялись воспалительные инфильтраты различной степени выраженности, преимущественно лимфоцитарного характера. Изменения толщины эпидермиса не имели диагностического значения, поскольку наблюдалось как его утолщение, так и атрофия (рис. 1а).

При исследовании методом КЛСМ *in vivo* определялось нарушение архитектоники эпидермиса в виде атипичного сотовидного паттерна, что соответствовало нарушению стратификации слоев, выявляемому при гистологическом исследовании. Плеоморфизм кератиноцитов проявлялся неравномерным увеличением размеров клеток и изменением их формы, часть ядер приобретала более яркое свечение, что, вероятно, было связано с большим содержанием в них и более плотным расположением хроматина. В шиповатом слое эпидермиса отмечалось неравномерное увеличение межклеточного пространства (рис. 1б). На уровне дермо-эпидермального соединения и сосочкового слоя дермы визуализировались расширенные и удлиненные капилляры. Коллагеновые волокна сосочкового слоя дермы имели более яркое контрастное свечение и хаотичное расположение, характерное для фотоповреждения и эластога (рис. 1в).

При гистологическом исследовании биоптатов кожи больных распространенным псориазом отмечались классические проявления этого заболевания: в эпидермисе акантоз, пара- и гиперкератоз, истончение, а на отдельных участках — исчезновение зернистого слоя, межклеточный отек, скопление нейтрофильных гранулоцитов и образование микроабсцессов Мунро.



а



б



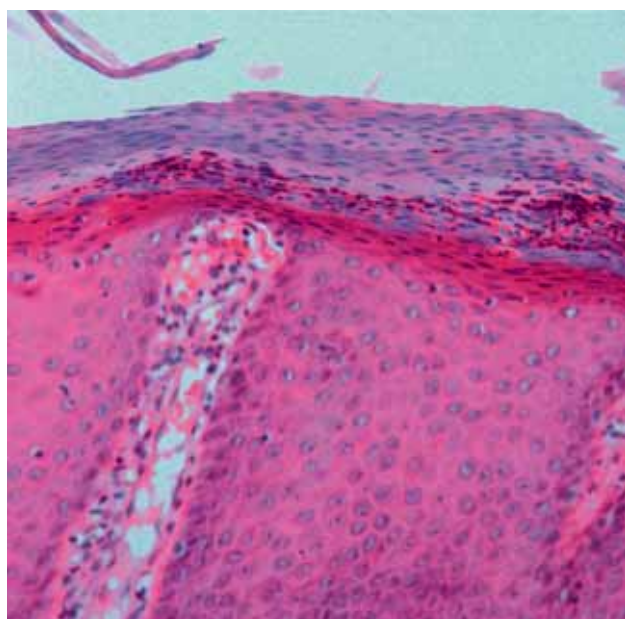
в

Рис. 1. Результаты гистологического исследования и метода КЛСМ *in vivo* у больного с эритематозной формой актинического кератоза: а — гистологическая картина (окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$); б — конфокально-микроскопическое изображение шиповатого слоя эпидермиса с атипичным сотовидным паттерном и ядерной атипией кератиноцитов (стрелки) (глубина 18 мкм); в — конфокально-микроскопическое изображение верхнего слоя дермы с хаотично располагающимися коллагеновыми волокнами (глубина 81 мкм)

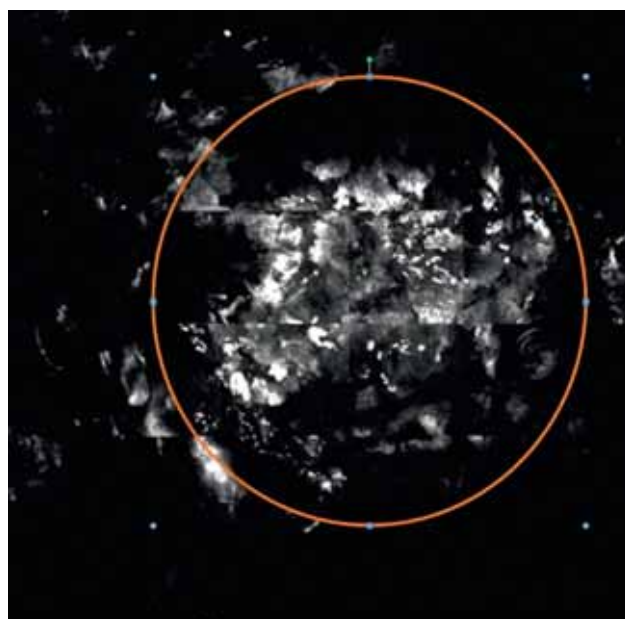
В межэпидермальных сосочках дермы располагались извитые капилляры, вплотную подходящие к нижней границе эпидермиса, часто окруженные различной степени выраженности лимфогистиоцитарными инфильтратами (рис. 2а).

При исследовании методом КЛСМ *in vivo* очаги псориаза характеризовались в первую очередь крупными яркими полигональными структурами в роговом слое, соответствующими гиперкератотическим наслоениям (рис. 2б). Паракератоз не выявлялся, вероятно, это

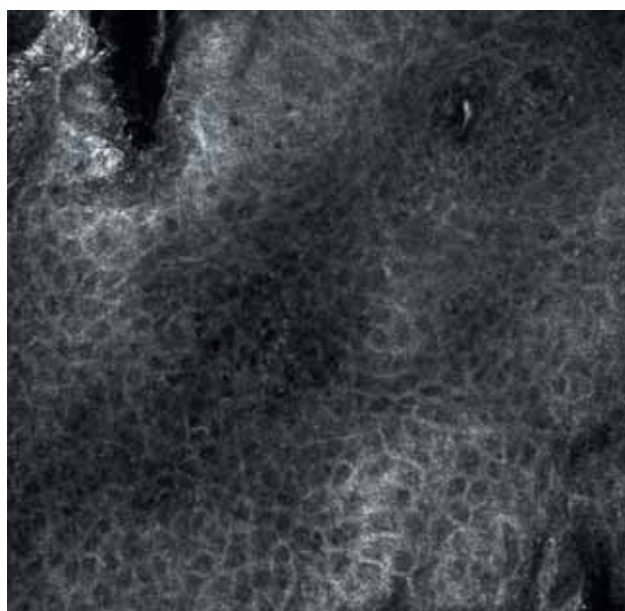
связано с тем, что парагиперкератотические чешуйки имеют очень плотную структуру, и это не позволяет визуализировать остатки ядер. При послойном сканировании отмечалось неравномерное утолщение эпидермиса, что соответствовало акантозу, характерному для заболевания. В верхних отделах шиповатого слоя определялись скопления светлых округлых или овальных структур на фоне областей пониженной яркости, соответствующих скоплениям нейтрофилов (рис. 2в). Отсутствие четкого сотовидного паттерна в этой зоне



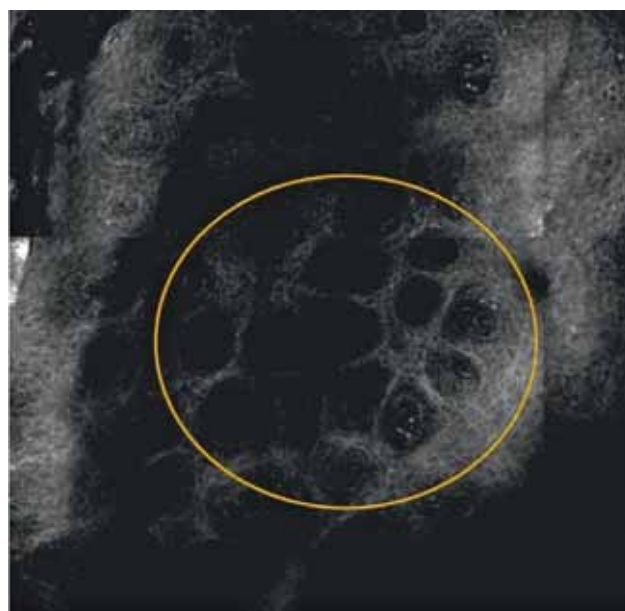
а



б



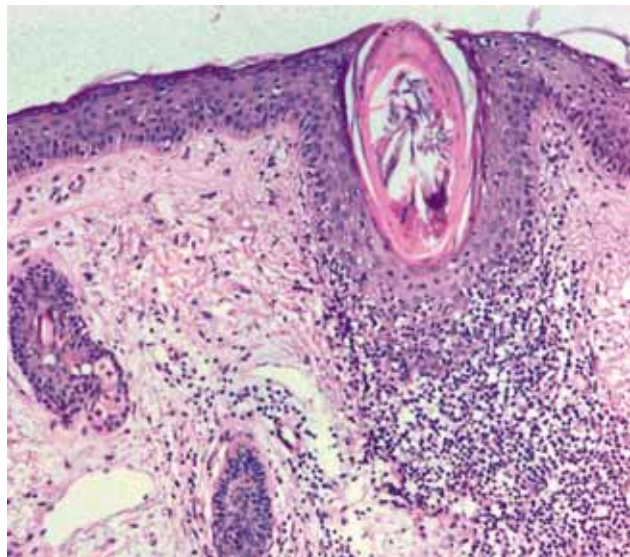
в



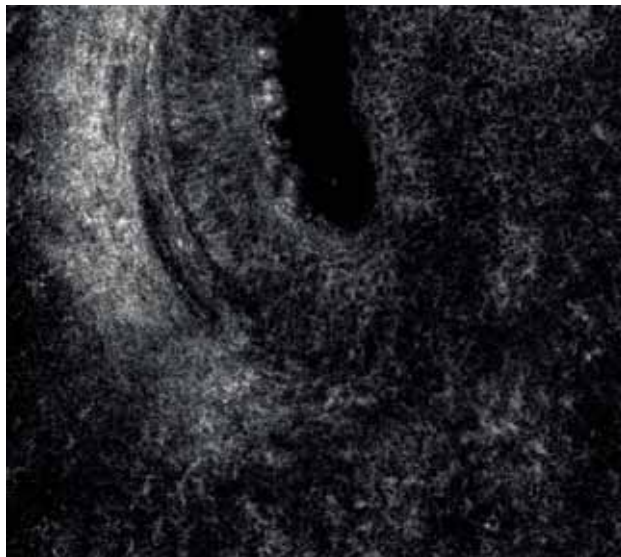
г

Рис. 2.

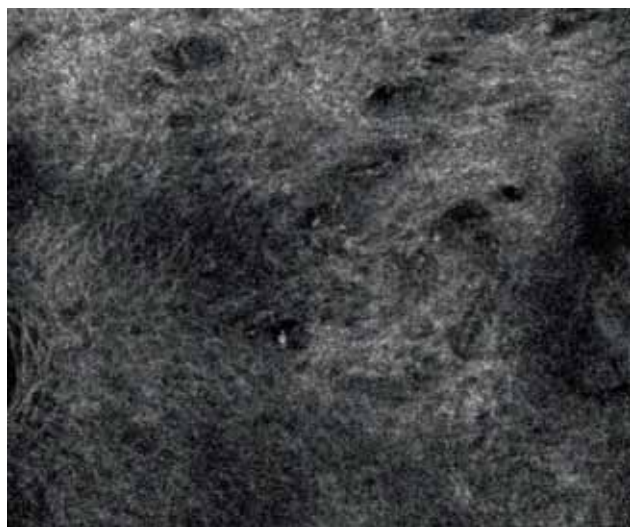
Результаты гистологического исследования и метода КЛСМ *in vivo* у больного с псориазом распространенным: а — гистологическая картина (окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$); б — конфокально-микроскопическое изображение поверхности патологического очага. Выделены гиперкератотические наслоения (глубина визуализации 3 мкм); в — конфокально-микроскопическое изображение эпидермиса. Выделены скопления нейтрофилов, соответствующие микроабсцессам Мунро (глубина визуализации 24 мкм); г — конфокально-микроскопическое изображение дермо-эпидермального соединения. Выделены дермальные выросты, содержащие петлевидно извитые кровеносные сосуды, окруженные воспалительными клетками (глубина визуализации 72 мкм)



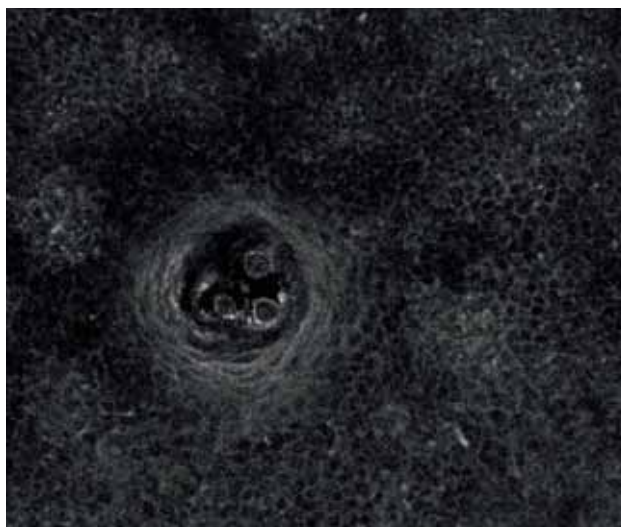
а



б



в



г

Рис. 3. Результаты гистологического исследования и метода КЛСМ *in vivo* у больной с эритематозно-телеангиэктатической формой розацеа: а — гистологическая картина (окраска гематоксилином и эозином, $\times 50$); б — конфокально-микроскопический снимок расширенного фолликула с прилегающим расширенным кровеносным сосудом (глубина визуализации 69 мкм); в — воспалительная инфильтрация в области волосяного фолликула (глубина визуализации 72 мкм); г — волосяной фолликул с телами *Demodex folliculorum* (глубина визуализации 18 мкм)

и снижение яркости вызвано деструктивным изменением отдельных клеток эпидермиса при формировании микроабсцессов Мунро. В увеличенных и деформированных сосочках дермы определялись мелкие петлевидные кровеносные сосуды, вплотную подходящие к нижней границе эпидермиса (рис. 2г).

Необходимо подчеркнуть, что поскольку при КЛСМ *in vivo* можно наблюдать реальный кровоток, то подобные изменения сосудов хорошо визуализировались и отмечались во всех наблюдениях. При классическом гистологическом исследовании выявить извитой ход сосудов и их контакт с базальной мембраной значи-

тельно сложнее, так как в процессе взятия и обработки биоптатов они часто спадаются. Вокруг сосудов визуализировались мелкие яркие округлые клетки, соответствующие воспалительному инфильтрату.

При гистологическом исследовании биоптатов кожи больных телеангиэктатической формой розацеа отмечались расширение сосудов поверхностного сосудистого сплетения, отек дермы и скудные, преимущественно лимфоцитарные инфильтраты вокруг сосудов и волосяных фолликулов. Изменения эпидермиса носили вторичный характер и проявлялись умеренным гиперкератозом и в некоторых наблюдениях незначительным акантозом. Для папулезной формы характерны большая выраженность воспалительной реакции, расширение устьев волосяных фолликулов и заполнение их роговыми массами (рис. 3а).

При исследовании методом КЛСМ *in vivo* у пациентов с розацеа на глубине от 65 до 80 мкм на всем поле зрения видны резко расширенные устья волосяных фолликулов. Причем в наибольшей степени этот признак выражен у пациентов с папулезной формой. При наличии демодекозного поражения в устьях некоторых волосяных фолликулов определялись тела клещей, визуализируемые в виде нескольких округлых структур, заполняющих отверстие фолликула (рис. 3в, г) Зернистый, шиповатый и базальный слои эпидермиса не имели значительных отличий от таковых в коже вне очагов поражения, что в дальнейшем подтвердило гистологическое исследование. Основные изменения локализовались в дерме и были представлены уменьшением глубины залегания сосудов поверхностного сосудистого сплетения, увеличением их диаметра, удлинением видимой части. Во всех 10 наблюдениях вне зависимости от формы розацеа выявлялось характерное расположение сосудов вдоль эпителия волосяных фолликулов (рис. 3б).

Следует отметить, что этот признак можно рассматривать как диагностический для КЛСМ *in vivo*, в то же время он практически не выявляется при классическом гистологическом исследовании. Изменения коллагеновых волокон и воспалительный инфильтрат, на-

против, лучше визуализировались в биопсийном материале. Так как проникающая способность лазерного луча ограничена, полученные изображения глубоких отделов дермы были недостаточно четкими и не давали возможности детализировать клеточный состав инфильтратов, позволяя только оценить их тропность к определенным структурам дермы.

Заключение

Таким образом, проведенное исследование показало, что КЛСМ *in vivo* является ценным диагностическим методом, наиболее близким к традиционному гистологическому исследованию, использующим в качестве критериев постановки диагноза те же параметры.

КЛСМ *in vivo* может использоваться в качестве самостоятельного метода для диагностики заболеваний, характеризующихся нарушениями структуры эпидермиса, например, таких как актинический кератоз.

В то же время методом КЛСМ *in vivo* невозможно детализировать изменения, возникающие в глубоких отделах дермы, и клеточный состав воспалительных инфильтратов, поэтому его нельзя рассматривать в качестве полной альтернативы гистологическому исследованию.

При диагностике заболеваний, характеризующихся изменениями в эпидермисе и дерме, КЛСМ *in vivo* может использоваться в совокупности с классическим гистологическим исследованием для визуализации отдельных структур, например изменений сосудов поверхностного сосудистого сплетения при розацеа, которые за счет сохраненного в них кровотока при КЛСМ *in vivo* визуализируются лучше, чем при исследовании биопсийного материала. Также изменения, выявляемые при КЛСМ *in vivo*, могут учитываться при проведении дифференциальной диагностики воспалительных заболеваний кожи и при уточнении их клинической формы, например при розацеа и псориазе.

КЛСМ *in vivo* является неocenимым методом для наблюдения динамики патологического процесса и контроля эффективности проводимого лечения заболевания. ■

Литература

- Ferrari B., Pupelli G., De Carvalho N.T. et al. Dermoscopic difficult lesions: an objective of reflectance confocal microscopy impact for accurate diagnosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015; 29: 1135—1140.
- Longo C., Zalaudek I., Argenziano G. et al. New Directions in dermatopathology: in vivo confocal microscopy in clinical practice. *Dermatol Clin* 2012; 30: 799—814.
- Moscarella E., Argenziano G., Lallas A. et al. Confocal Microscopy: a new era in understanding the pathophysiologic background on inflammatory skin diseases. *Exp Dermatol* 2014; 23: 320—321.
- Soyer H.P., Prow T.W. Reflectance confocal microscopy in the diagnosis of nodular skin lesions. *Br J Dermatol* 2013; 169: 4.
- Moscarella E., Rabinovitz H., Zalaudek I. et al. Dermoscopy and reflectance confocal microscopy of pigmented actinic keratosis: a morphological study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015; 29: 307—314.
- Malveyh J., Roldan-Marin R., Iglesias-Garcia P. et al. Monitoring treatment of field cancerisation with 3% diclofenac sodium, 2,5% hyaluronic acid by reflectance confocal microscopy: a histologic correlation; *Acta Derm Venereol* 2015; 95: 45—50.

7. Malvey J. A new vision of actinic keratosis beyond visible clinical lesions; *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015; 29: 3—8.
8. Meinke M. C., Richter H., Kleemann A. et al. Characterization of atopic skin and the effect of a hyperforin-rich cream by laser scanning microscopy. *J Biomed Opt* 2015; 20: 5.
9. Hofmann-Vellenhof R., Pellacani G., Malvey J. *Reflectance Confocal Microscopy For Skin Diseases*. 2012 Springer Verlag Berlin Heidelberg.
10. Lacarrubba F., Pellacani G., Gurgone S. et al. Advances in non-invasive techniques as aids to the diagnosis and monitoring of therapeutic response in plaque psoriasis. *Int J Dermatol* 2015; 54: 626—634.
11. Caruntu C., Boda D., Caruntu A. et al. In vivo imaging techniques for psoriatic lesions. *Rom J Morphol Embryol* 2014; 55: 1191—1196.
12. Turgut Erdemir A., Gurel M. S., Koku Aksu A. E. et al. Reflectance confocal microscopy vs. standardized skin surface biopsy for measuring the density of Demodex mites. *Skin Res Technol* 2014; 20: 435—439
13. Sattler E. C., Hoffmann V. S., Ruzicka T. et al. Reflectance confocal microscopy for monitoring the density of Demodex mites in patients with rosacea before and after treatment. *Br J Dermatol* 2015; 20

об авторах: ▶

А.А. Кубанова — д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

А.А. Кубанов — д.м.н., профессор, зам. директора по научной работе ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

В.А. Смольяникова — д.м.н., профессор кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России, Москва

Н.В. Грибанов — аспирант ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

Ю.Б. Махакова — аспирант ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

Конфликт интересов

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