

# Электронно-микроскопические критерии дифференциальной диагностики врожденной миопатии центрального стержня у человека

П.А.Шаталов<sup>1</sup>, В.С.Сухоруков<sup>1,2</sup>, Д.А.Харламов<sup>1</sup>, А.В.Брыдун<sup>1</sup>, В.В.Глинкина<sup>2</sup>, Д.В.Влодавец<sup>1</sup>, И.С.Виноградская<sup>2</sup>, В.Б.Суслов<sup>2</sup>, Л.М.Лихачева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Московский НИИ педиатрии и детской хирургии  
(директор — проф. А.Д.Царегородцев);

<sup>2</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, Москва  
(и.о. ректора — проф. А.Г.Камкин)

В дифференциальной диагностике врожденных миопатий большое значение имеет морфологический анализ мышц. Однако не для всех нервно-мышечных заболеваний определены четкие диагностические критерии морфологических изменений. Целью исследования стал поиск электронно-микроскопических маркеров, эффективных для диагностики миопатии центрального стержня. Были исследованы мышечные биоптаты 56 пациентов в возрасте от 1 до 21 года с диагнозами: миопатия центрального стержня (24 больных), многостержневая миопатия (6 больных), саркотубулярная миопатия (10 больных), митохондриальная миопатия (16 больных). Использованы методы световой (в частности, гистохимические) и электронной микроскопии. Выявлены основные электронно-микроскопические характеристики, которые могут быть использованы для дифференциальной диагностики врожденных миопатий (центральностержневой, многостержневой, саркотубулярной), а также морфологические отличия этих заболеваний от митохондриальных миопатий.

*Ключевые слова:* врожденные миопатии, митохондриальные миопатии, мышечная биопсия, световая микроскопия, электронная микроскопия

## Electron microscopic criteria for the congenital central core myopathy differential diagnostics in human

P.A.Shatalov<sup>1</sup>, V.S.Sukhorukov<sup>1,2</sup>, D.A.Kharlamov<sup>1</sup>, A.V.Brydun<sup>1</sup>, V.V.Glinkina<sup>2</sup>, D.V.Vlodavets<sup>1</sup>, I.S.Vinogradskaya<sup>2</sup>, V.B.Suslov<sup>2</sup>, L.M.Likhacheva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Moscow Research Institute of Pediatrics and Pediatric Surgery  
(Director — Prof. A.D.Tsaregorodtsev);

<sup>2</sup>The Russian National Research Medical University named after N.I.Pirogov, Moscow  
(Acting Rector — Prof. A.G.Kamkin)

Various methods of muscle biopsy morphological analysis are very important in the differential diagnostics of congenital myopathies. Not all neuromuscular diseases are identified by clear diagnostic criteria of morphological changes. The aim of this study was to search for electron microscopic markers, effective for the differential diagnosis of central core myopathy. Muscle biopsies were investigated in 56 patients aged from 1 to 21 years with diagnosis of central core myopathy (24 patients), multicore disease (6 patients), sarcotubular myopathy (10 patients), mitochondrial myopathy (16 patients). There were used methods of light (including histochemical) and electron microscopy. There were revealed basic electron-microscopic characteristics that could be used for differential diagnosis of congenital myopathies: central core, multicore and sarcotubular myopathies, as well as their morphological differences from mitochondrial myopathies.

*Key words:* congenital myopathy, mitochondrial myopathy, muscle biopsy, light microscopy, electron microscopy

Одной из наиболее распространенных групп наследственных болезней человека являются нервно-мышечные заболевания, среди которых особое место занимают врожденные «структурные» миопатии. Среди них первое место по частоте занимает врожден-

### Для корреспонденции:

Сухоруков Владимир Сергеевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий НИЛ общей патологии Московского НИИ педиатрии и детской хирургии, профессор кафедры гистологии и эмбриологии лечебного факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова

Адрес: 125412, Москва, ул. Талдомская, 2

Телефон: (495) 483-4001

E-mail: vsukhorukov@inbox.ru

Статья поступила 15.06.2012, принята к печати 19.09.2012

ная миопатия центрального стержня, вызванная мутацией гена рианодинового рецептора [1]. Рианодиновый рецептор представляет собой кальциевый канал, расположенный в мембране эндоплазматического ретикулума и регулирующий выход из него кальция [2].

В скелетной мышечной ткани рианодиновый рецептор расположен в мембране поперечных цистерн саркоплазматического ретикулума и связан с дигидропиридиновым рецептором на инвагинациях плазмалеммы в Т-трубочках. Сигнал, приходящий по сарколемме за счет этой связи, воздействует на саркоплазматический ретикулум, вызывая выброс кальция, необходимый для мышечного сокращения [2].

В основе патогенеза болезни центрального стержня, таким образом, лежат нарушения перераспределения ионов кальция в субмикроскопических зонах скелетно-мышечного волокна. Функционально эти нарушения выражаются в неспецифической картине миопатического симптомокомплекса (в случае раннего дебюта — симптомокомплекса «вялый ребенок»). Эта неспецифичность уже с первых работ, в которых было описано заболевание, потребовала активного поиска дифференциально-диагностических методов его четкого выявления. Одним из ключевых подходов к дифференциальной диагностике врожденной миопатии центрального стержня стал морфологический анализ биоптатов скелетной мышечной ткани. Важной особенностью мышечных волокон при этом является деление на центральную и периферическую зоны, которые различаются по своим гистохимическим характеристикам. При этом если периферические зоны по этим характеристикам принципиально не изменены, то в центральных областях мышечного волокна (миона) практически отсутствует активность большинства ферментов, что и приводит к появлению на светогистохимических препаратах феномена центрального стержня. Несмотря на успехи молекулярно-генетического объяснения этиологии этого заболевания, соответствующие методы диагностики до сих пор трудоемки, дороги и обладают низкой чувствительностью. Поэтому актуальность морфологической диагностики остается очень высокой.

Таким образом, основным дифференциально-диагностическим маркером заболевания является его светогистохимическая диагностика с выявлением активности различных, в первую очередь митохондриальных, ферментов. В то же время среди врожденных заболеваний, проявляющихся симптомокомплексом «вялый ребенок», встречаются такие, при которых светогистохимическая характеристика мышц может быть очень сходна с картиной центрального стержня. В первую очередь речь идет о заболеваниях, сопровождающихся количественными изменениями пула митохондрий. К ним относятся как собственно митохондриальные миопатии, так и другие нервно-мышечные заболевания с компенсаторным увеличением количества этих органелл [1, 3]. При этом часто наблюдается увеличение количества митохондрий в периферических (субсарколеммальных) зонах, в результате чего эти участки обладают значительно большей энзиматической активностью по сравнению с центральными. Кроме того, существуют заболевания, патогенетически сходные с болезнью центрального стержня, но отличающиеся размерами и распределением зон со сниженной активностью ферментов — так называемые многостержневые миопатии, часто тоже дебютирующие с рождения. Во всех этих случаях светогистохимическая дифференциальная диагностика затруднена и требует расширения методических подходов, что наиболее эффективно при использовании электронной микроскопии. В то же время электронно-микроскопические (ультраструк-

турные) критерии дифференциальной диагностики изучены крайне недостаточно [4], что актуализирует научный поиск этих критериев при перечисленных заболеваниях. Необходимо также найти электронно-микроскопические маркеры саркотубулярной врожденной миопатии, патогенез которой тоже связан с повреждением саркотубулярного ретикулула.

Цель настоящего исследования — поиск электронно-микроскопических маркеров, эффективных при дифференциальной диагностике врожденной миопатии центрального стержня, в частности, при отличии ее от многостержневой, саркотубулярной и митохондриальной миопатий.

## Материалы и методы

Исследованы биоптаты скелетных (передних бедренных) мышц у 56 пациентов в возрасте от 1 до 21 года, с диагнозами «врожденная миопатия центрального стержня» (24 больных), «многостержневая миопатия» (6 больных), «саркотубулярная миопатия» (10 больных), «митохондриальная миопатия» (16 больных).

Морфологический анализ проведен с помощью следующих методов: световая микроскопия (окраска гематоксилином и эозином; гистохимическое выявление активности сукцинатдегидрогеназы по Нахласу с соавт. (1957) [5]) и электронная микроскопия. Для электронно-микроскопического исследования использовали материал, зафиксированный в глutarовом альдегиде и четырехокиси осмия и залитый в эпон-аралдитовую смесь смол. Исследование ультратонких срезов проводили на трансмиссионных электронных микроскопах JEOL JEM-100B и LEO 912 AB.

## Результаты исследования и их обсуждение

При световой микроскопии на препаратах больных врожденной миопатией центрального стержня, окрашенных гематоксилином и эозином, никаких изменений, кроме умеренно выраженной миогенной атрофии, не выявлено, а при гистоферментативной оценке активности сукцинатдегидрогеназы были обнаружены типичные центральные зоны с отсутствием или значительным снижением активности фермента (рис. 1).

При электронно-микроскопическом анализе скелетно-мышечной ткани больных врожденной структурной миопатией центрального стержня были выявлены следующие основные варианты изменений ультраструктур: атрофические изменения пучков миофиламентов, очаги дезориентации миофиламентов, расщепление пучков миофиламентов, субсарколеммальная пролиферация митохондрий, признаки деструкции комплексов Т-трубочек и саркотубулярных цистерн (триад), гипертрофия митохондрий, вакуолизация и деструкция митохондрий и саркоплазматического ретикулула, повышение количества липидных и других включений. Изменения ультраструктур при этом заболевании очень полиморфны и затрагивают фактически все компоненты мышечного волокна (рис. 2).

Все эти изменения в разных сочетаниях могут быть представлены у одних и тех же больных. Нами были выделены 4 наиболее типичных таких сочетания (комплекса): комплекс изменений I характеризуется отсутствием грубых изменений. Комплекс изменений II — наличием очагов дезориентации, атрофии и расщепления миофиламентов, гипертрофии, вакуолизации и деструкции митохондрий, дезориентации и уплотнения триад, увеличения количества гликогена и липидов. Комплекс изменений III — атрофией пучков миофибрилл, их грубой дезориентацией с расширением цитозольных пространств между ними, заполненных мелкогранулярным материалом на фоне относительного уменьшения размеров и количества митохондрий. Комплекс изменений IV — регистрацией центрально расположенных очагов атрофии миофиламентов, иногда сопровождающихся их расщеплением и дезориентацией при отсутствии изменений митохондрий и других органелл.

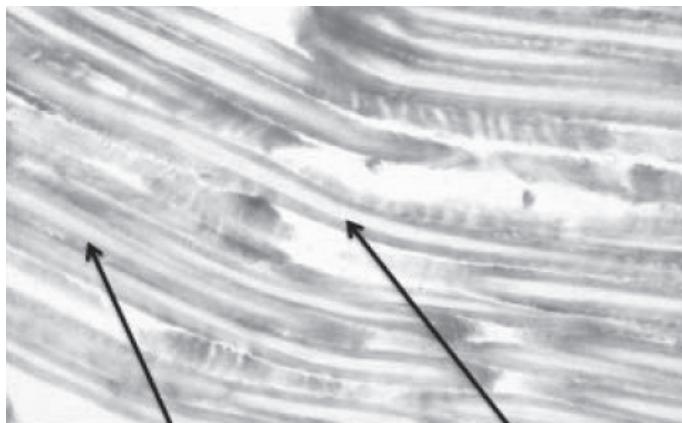


Рис. 1. Скелетная мышечная ткань пациента с врожденной миопатией центрального стержня (ув. 100). Возраст пациента — 21 год. Гистохимическое выявление активности сукцинатдегидрогеназы (по Нахласу с соавт., 1957) на криостатных срезах. Почти во всех продольно срезанных мышечных волокнах определяется полное отсутствие активности фермента в центральных зонах (стрелки)

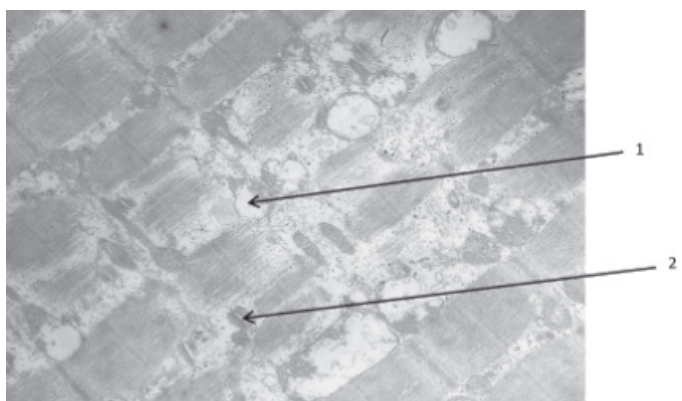


Рис. 2. Электронограмма скелетной мышечной ткани пациента с врожденной миопатией центрального стержня (ув. 10000). Возраст пациента — 10 лет. Стрелками обозначены: 1 — вакуолизирующая митохондрия; 2 — уплотненная триада

При проведении световой микроскопии на препаратах больных врожденной многостержневой миопатией, окрашенных гематоксилином и эозином, никаких изменений, кроме умеренно выраженной миогенной атрофии, не выявлялось. При гистохимическом определении активности сукцинатдегидрогеназы обнаруживались участки снижения энзиматической активности, но, в отличие от болезни центрального стержня, они не распространялись по всей длине мышечного волокна и характеризовались разным размером и расположением относительно сарколеммы.

При электронно-микроскопическом анализе мышц больных многостержневой миопатией были найдены относительно небольшие зоны, характеризующиеся расщеплением и атрофией пучков миофиламентов (вплоть до полного исчезновения их саркомерной организации) с частым умеренным увеличением количества липидных и гликогеновых включений (рис. 3). Кроме того, у этих больных отмечались участки субсарколеммальной пролиферации митохондрий. Комплексных ультраструктурных изменений, подобных таковым при миопатии центрального стержня, не было.

С помощью светового микроскопа на всех препаратах больных врожденной саркотубулярной миопатией не выявлялось никаких изменений, кроме умеренно выраженной миогенной атрофии.

При ультраструктурном анализе скелетно-мышечной ткани больных врожденной саркотубулярной миопатией было установлено, что основным изменением при этом заболевании является вакуолизация саркоплазматических цистерн разной степени выраженности; как правило, вакуолизованные структуры были упорядочены относительно Z-полосок (рис. 4). Кроме того, в некоторых субсарколеммальных участках наблюдались скопления относительно неизменных митохондрий.

При проведении световой микроскопии у больных митохондриальными миопатиями на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, как прави-

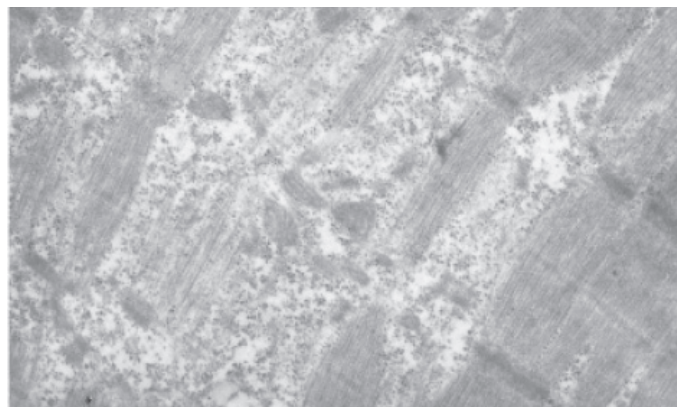


Рис. 3. Электронограмма скелетной мышечной ткани пациента с врожденной многостержневой миопатией (ув. 20000). Возраст пациента — 3,5 года. Центральный участок электронограммы занимает зона «стержня», характеризующаяся атрофией и дезорганизацией миофиламентов и другими ультраструктурными изменениями

ло, была обнаружена миогенная атрофия различной степени выраженности, у части больных наблюдалось небольшое количество коагуляционных некрозов отдельных мышечных волокон без признаков фагоцитоза и лимфоцитарной инфильтрации. При гистохимическом выявлении активности сукцинатдегидрогеназы у 14 из 16 больных отмечались участки мышечных волокон с гетерогенным повышением активности фермента (феномен RRF — «рваные» красные волокна). Главным образом эти участки располагались субсарколеммально, а у некоторых больных — и в центральных зонах мышечного волокна.

При электронно-микроскопическом анализе у этих больных во всех участках мышечных волокон были выявлены следующие основные варианты изменений ультраструктур: увеличение количества митохондрий (особенно в субсарколеммальных зонах), появление необычно крупных, удлинённых или гантелеобразных форм митохондрий, наличие признаков деструкции митохондриальных крист или изменение плотности матрикса, присутствие липидных включений среди скоплений митохондрий, регистрация необычных включений в митохондриях (например, кристаллообразных), выраженная гибель митохондрий, наличие среди скоплений митохондрий вторичных лизосом, снижение количества митохондрий (рис. 5).

Усовершенствование гистохимических методик и технических деталей электронного микроскопа существенно улучшило понимание природы многих нервно-мышечных заболеваний. При врожденных структурных миопатиях встречаются четкие, легко отличимые морфологические особенности в скелетных мышцах. Каждое заболевание этой группы характеризуется рядом специфических морфологических признаков.

В основе патогенеза болезни центрального стержня лежат ультраструктурные изменения в центральных зонах скелетно-мышечных волокон, а также отсутствие в них функциональной активности, в первую очередь митохондриальных ферментов. Гистологические характеристики этих зон (стержней), не схожие с таковыми в периферических участках волокна, являются основным диагностическим критерием заболевания.

Анализ светомикроскопических препаратов с использованием техники гистозензимохимического выявления активности сукцинатдегидрогеназы подтверждает данные научной литературы [1–4] о том, что подобные исследования являются необходимыми при дифференциальной диагностике врожденных миопатий. При этом многие признаки, выявленные с помощью световой микроскопии при рассмотренных видах врожденных миопатий, являются очень сходными. Световая микроскопия при анализе мышечных биоптатов наших больных позволила исключить значительное число состояний, характеризующихся сходной клинической картиной: врожденные и прогрессирующие мышечные дистрофии, центральная ядерная миопатия, немалиновую миопатию, миопатию с диспропорциями типов волокон и др.

В то же время светомикроскопический анализ не всегда позволяет различить между собой централь-

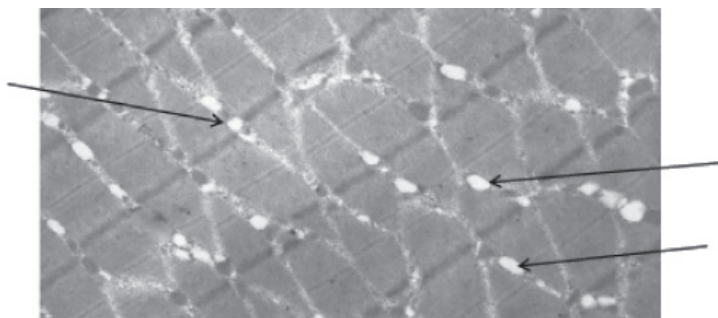


Рис. 4. Электронограмма скелетной мышечной ткани пациента с врожденной саркотубулярной миопатией (ув. 15000). Возраст пациента — 6 лет. Стрелками обозначена множественная вакуолизация элементов саркоплазматического ретикулама

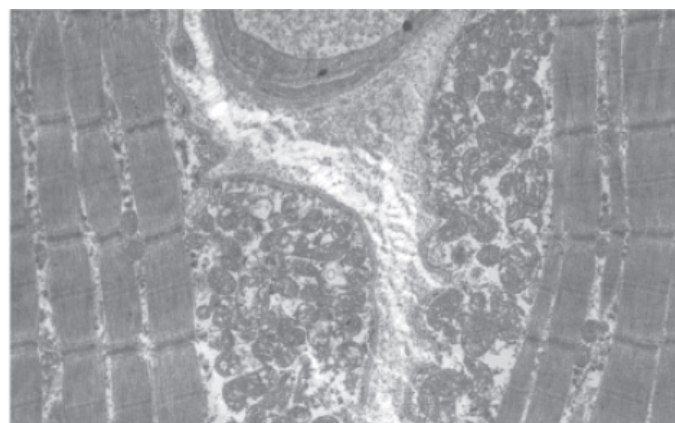


Рис. 5. Электронограмма скелетной мышечной ткани пациента с митохондриальной миопатией (ув. 15000). Возраст пациента — 11 лет. В центре электронограммы находятся два субсарколеммальных участка соседних мышечных волокон с аномальными скоплениями деструктивных митохондрий

ностержневую, многостержневую, саркотубулярную и митохондриальную миопатии. Так, имеющиеся при болезни центрального стержня участки со сниженной энзиматической активностью не всегда можно отличить от таковых при многостержневой миопатии. При митохондриальной миопатии периферические аномальные скопления митохондрий могут напоминать также стержневые изменения, что требует более тонкой дифференциальной диагностики. С этой целью нами была использована электронная микроскопия, позволившая детально оценить ультраструктурные особенности мышц при указанных заболеваниях и выявить специфические маркеры, значимые для дифференциальной диагностики. Кроме того, учитывая патогенез болезни центрального стержня, связанный с патологическими изменениями молекулярных каналов саркотубулярной системы, было проведено сравнение ультраструктуры мышц при этом заболевании и при врожденной саркотубулярной миопатии. Актуальность электронно-микроскопического изучения мышц при последнем заболевании связана еще и с тем, что светомикроскопический анализ не выявляет диагностически значимые признаки.

В результате сравнения электронно-микроскопической картины при указанных врожденных миопатиях были определены соответствующие диагностически значимые ультраструктурные критерии.

Так, при болезни центрального стержня были найдены различные сочетания локальных деструктивных изменений содержимого мышечного волокна. При этом изменения были как в фибриллярном аппарате, так и в мембранных структурах, и характеризовались различной степенью выраженности: от нарушения ориентации миофибрилл до деструкции саркомеров; от увеличения количества митохондрий до деструкции их и других мембранных структур в очагах поражений.

При многостержневой миопатии были выявлены относительно небольшие зоны с расщеплением и атрофией пучков миофиламентов (вплоть до полного исчезновения их саркомерной организации) с частым присутствием умеренного количества липидных и гликогеновых включений.

При саркотубулярной миопатии было определено, что основным изменением при этом заболевании является вакуолизация саркоплазматических цистерн разной степени выраженности; как правило, вакуолизованные структуры были упорядочены относительно Z-полосок. Такая патоморфологическая картина не наблюдалась при других рассмотренных врожденных миопатиях.

При сравнении ультраструктурных изменений при болезни центрального стержня и саркотубулярной миопатии выяснилось, что при последней ультраструктурные изменения в основном не затрагивают целостности мышечного волокна, и поражение связано с элементами саркоплазматического ретикулума. Характерной особенностью саркотубулярной миопатии является множественная везикуляция цистерн саркоплазматического ретикулума (в основном в районе Z-полосок).

При сравнении ультраструктурных изменений при болезни центрального стержня и митохондриальной миопатии было выявлено, что при последней ультраструктурные изменения затрагивают главным образом митохондрии. Наблюдаются множественные нарушения митохондрий, такие как гипертрофия, нарушение структуры крист и плотности матрикса. Вокруг патологически измененных митохондрий нередко определяется большое количество липидных включений, вторичных лизосом и скоплений гликогена. Принципиально важным признаком митохондриальных миопатий является распространенность этих изменений по всей мышечной ткани без образования гетерогенных в этом отношении локусов. Увеличение количества митохондрий имеет место у большинства больных как субсарколеммально, так и интермиофибрилярно.

### Заключение

Результаты нашего исследования подтверждают информативность электронной микроскопии при морфологической диагностике нервно-мышечных заболеваний. Несмотря на успехи в изучении многих из них с помощью световой микроскопии, некото-

рые нозологические формы, особенно относящиеся к врожденным и метаболическим миопатиям, требуют анализа мышечной ткани на уровне ультраструктур. Выявление с помощью электронного микроскопа определенных нами признаков может иметь решающее значение при дифференциальной диагностике врожденных нервно-мышечных заболеваний.

*Работа проведена при поддержке Совета по грантам Президента РФ, грант № МК-4236.2011.7.*

### Литература

1. Сухоруков В.С., Харламов Д.А. Врожденные миопатии. М.: ООО Пресс-Арт, 2010. 155 с.
2. Мельников К.Н. Разнообразие и свойства кальциевых каналов возбудимых мембран // Психофармакол. и биол. наркол. 2006. Т.6. №1-2. С.1139-1151.
3. Sukhorukov V.S. Quantitative Alterations in Mitochondria: Adaptation Contra Violation // Adaptation Biology and Medicine / Ed. by P.Wang, C.-H.Kuo, N.Nakada, P.K.Singal. New Delhi, India: Narosa Publishing House Pvt. Ltd, 2011. V.6. P.77-89.
4. Jungbluth H., Sewry C.A., Muntoni F. Core myopathies // Semin Pediatr Neurol. 2011. V.18. P.239-249.
5. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная / Пер. с англ. Под ред. В.В.Португалова. М.: ИИЛ, 1962. 963 с.

### Информация об авторах:

Шаталов Петр Алексеевич, научный сотрудник НИЛ общей патологии Московского НИИ педиатрии и детской хирургии  
Адрес: 125412, Москва, ул. Талдомская, 2  
Телефон: (495) 483-4001

Харламов Дмитрий Алексеевич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отделения психоневрологии и эпилептологии, руководитель Детского научно-практического центра нервно-мышечной патологии Московского НИИ педиатрии и детской хирургии  
Адрес: 125412, Москва, ул. Талдомская, 2  
Телефон: (495) 487-5508

Брыдун Анатолий Васильевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник НИЛ общей патологии Московского НИИ педиатрии и детской хирургии  
Адрес: 125412, Москва, ул. Талдомская, 2  
Телефон: (495) 483-4001

Глинкина Валерия Владимировна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой гистологии и эмбриологии лечебного факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова  
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1  
Телефон: (495) 434-4083

Влодавец Дмитрий Владимирович, кандидат медицинских наук, научный сотрудник отделения психоневрологии и эпилептологии Московского НИИ педиатрии и детской хирургии  
Адрес: 125412, Москва, ул. Талдомская, 2  
Телефон: (495) 487-5508

Виноградская Ирина Сергеевна, заведующая учебной лабораторией кафедры гистологии и эмбриологии лечебного факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова  
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1  
Телефон: (495) 434-4083

Сулов Владимир Борисович, старший научный сотрудник отдела электронной микроскопии НИИ фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова  
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1  
Телефон: (495) 434-6429

Лихачева Лидия Михайловна, старший научный сотрудник отдела электронной микроскопии НИИ фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова  
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1  
Телефон: (495) 434-6429