

КОМПЛЕКСНАЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПОЛИСИСТЕМНОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

А.В. МЕРКУРЬЕВА

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии РУДН,
Москва, 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.8, Медицинский факультет

В.С. СУХОРУКОВ, А.В. СМИРНОВ

Московский НИИ педиатрии и детской хирургии Минздрава РФ,
Москва, 125412, Талдомская ул., д.2

Д.И. МЕДВЕДЕВ

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии РУДН,
Москва, 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.8, Медицинский факультет

Изучены морфофункциональные признаки изменения митохондрий в клетках различных тканей (эпидермис, скелетные мышцы, соединительная ткань) у 17 детей с различными формами наследственных нарушений клеточного энергообмена (митохондриальными болезнями). Подтверждены данные о полисистемном распределении дефектных митохондрий при этих заболеваниях. Митохондриальные изменения отмечены в лимфоцитах всех больных, в скелетных мышечных волокнах на световом уровне - у 15; в клетках эпидермиса и дермы - у 11. При этом у двух больных, у которых на световом уровне в мышцах были не выявлены митохондриальные изменения, последние отмечены в коже. Таким образом, для выявления предполагаемого митохондриального заболевания необходимо морфологически исследовать как можно большее количество тканевых элементов.

Нарушения клеточного энергообмена, в основе которых, в первую очередь, лежит митохондриальная недостаточность, ведут к широкому спектру клинических проявлений [1-8]. Эти проявления зависят от степени вовлеченности в патологический процесс различных тканей и органов - от умеренного повышения утомляемости до тяжелых энцефалопатий и полиневропатий, от умеренных нарушений ритма сердца до дилатационных кардиомиопатий, от слабовыраженной мышечной слабости до грубых миопатических изменений. Митохондриальные нарушения могут проявляться и в других системах организма и, соответственно, представлять интерес для медицинских специалистов самых различных областей - неонатологов, нефрологов, урологов, отоларингологов, пульмонологов и др. Распространенность патологических состояний, связанных с митохондриальной недостаточностью, не ограничивается наследственными синдромами, вызываемыми мутациями генов, непосредственно ответственных за синтез митохондриальных белков. Широчайший круг других заболеваний включает в себя те или иные нарушения клеточной энергетики, как вторичные звенья патогенеза. При этом различия в индивидуальном уровне энергообмена диктуют свои требования и к проводимому лечению. Введение в применяемые лечебные комплексы энерготропных препаратов лицам со сниженным индивидуальным «энергетическим фоном» оказывается весьма эффективно.

В настоящее время для определения характеристик митохондриальных функций используются клинические, биохимические (оценка уровней пирувата и лактата, антиоксидантной активности, продуктов перекисного окисления липидов крови) и молекулярно-генетические методы (выявление мутаций митохондриальной ДНК и ядерных мутаций, приводящих к нарушению синтеза митохондриальных белков). Однако одно из ведущих мест в современной диагностике митохондриальных нарушений занимают морфологические методы (гистохимическое изучение активности митохондриальных ферментов и распределения таких субстратов как липиды, гликоген, соли кальция в биоптатах скелетных мышц, в гладкомышечных элементах различных органов, полученных при операционном вмешательстве, цитохимическое морфометрическое изучение активности ферментов митохондрий в различных форменных элементах крови).

Достаточно однородная скелетная мышечная ткань является идеальной моделью для морфологической диагностики митохондриальных болезней. Она способна подавать

сигналы "митохондриального дистресса" посредством выраженной пролиферации митохондрий и образования «рваных красных волокон» («ragged-red fibres» - RRF). Последние представляют собой мышечные волокна, имеющие аномальные скопления митохондрий, и за счет этого специфически выглядящие при некоторых гистологических окрашиваниях. Несмотря на появление все новых, иногда очень изощренных методов оценки митохондриальных функций, выявление RRF в скелетных мышцах остаются одним из наиболее распространенных дифференциально-диагностических тестов на наличие митохондриальной дисфункции.

По некоторым данным, в том числе полученным в Московском НИИ педиатрии и детской хирургии [2,3], RRF представляют собой морфологическое проявление недостаточности митохондриальных функций, своеобразный компенсаторный эффект. Последний свидетельствует о выраженных нарушениях функций митохондрий, однако значительное увеличение количества органелл может практически полностью компенсировать недостаточность клеточного энергообмена.

Необходимо учитывать, что, несмотря на большую диагностическую ценность выявления этого морфологического маркера, наличие RRF не является абсолютным показателем митохондриальной недостаточности. Количество и выраженность этих изменений митохондрий может варьировать даже при одной и той же нозологической форме заболевания, а при некоторых митохондриальных болезнях RRF могут вообще отсутствовать.

При морфологическом анализе биоптата скелетной мышцы у больного с подозрением на митохондриальное заболевание желательно, помимо выявления RRF, сразу использовать и другие методы анализа, которые могут значительно повысить точность исследования (гистохимическая оценка активности митохондриальных ферментов и выявление таких субстратов как липиды, гликоген, соли кальция, электронная микроскопия с анализом ультраструктуры митохондрий). Однако в научной литературе отсутствуют общепотребимые критерии оценки митохондриальной недостаточности с помощью этих методов.

Одной из проблем патогенеза нарушений клеточного энергообмена, а следственно и проблем диагностики этих состояний, является случайное («мозаичное») распределение патологически измененных митохондрий по тканям и органам. Именно это, в частности, может быть одной из причин отрицательных результатов диагностики по биопсиям скелетной мышцы. Отдельные данные литературы свидетельствуют о возможности диагностического использования методов выявления дефектных митохондрий в других тканевых элементах, в частности в эпителиях различной локализации или клетках рыхлой волокнистой соединительной ткани.

Сравнительная простота и малая травматичность взятия и обработки крови объясняет интерес к цитохимическому анализу активности митохондрий в клетках периферической крови для диагностики полисистемных митохондриальных нарушений. Выявлена достоверная корреляция таких параметров и показателей энергетической дисфункции в скелетной мышце [9]. Таким образом, у многих больных с полисистемной митохондриальной недостаточностью диагностическая биопсия мышц в последнее время часто заменяется цитохимическим анализом форменных элементов крови (в первую очередь, лимфоцитов). При этом диагностическое значение имеют различные модификации такого анализа: от быстрых и дешевых (скрининговых) до углубленных, с исследованием целого спектра митохондриальных ферментов и компьютерной морфометрической оценкой результатов микроскопии. В последнем случае, точность диагностики, естественно, значительно повышается.

В то же время, к сожалению, в научной литературе отсутствуют данные, позволяющие произвести полноценное сопоставление диагностических характеристик цитохимического и других морфологических методов.

Вышеприведенные данные свидетельствуют о теоретической и прикладной необходимости и актуальности проведения комплексного сравнительного гистологического

анализа проявлений митохондриальной недостаточности в различных тканевых элементах у больных с клинико-биохимическими и цитохимическими признаками полисистемной митохондриальной недостаточности.

Целью настоящего исследования явилось одновременное изучение морфофункциональных характеристик митохондрий клеточных элементов скелетных мышц, кожи и периферической крови.

Пациенты и методы.

Обследовано 17 детей с клиническими и биохимическими признаками митохондриальных болезней: синдромы MERRF (миоклонус-эпилепсия, RRF) - 1, MELAS (митохондриальная энцефаломиопатия, лактат-ацидоз, инсультоподобные эпизоды) - 2, Кернса-Сейра (пигментный ретинит, наружная офтальмоплегия, полная блокада сердца) - 2, недифференцированные митохондриальные энцефаломиопатии - 7, идиопатические митохондриальные кардиомиопатии - 5.

При проведении диагностической биопсии для гистологического анализа были взяты образцы скелетной мышцы и кожи. Материал исследовался с помощью обзорных светомикроскопических методов (окраска гематоксилином и эозином, по Гомори-Энгелу) традиционной электронно-микроскопической методики. Для выявления RRF в скелетной мышце проведено светогистохимическое выявление активности митохондриальных ферментов – сукцинатдегидрогеназы (по Нахласу) и цитохромоксидазы (по Берстону). Кроме того, проведено цитохимическое исследование активности ряда ферментов (сукцинатдегидрогеназы, альфа-глицерофосфатдегидрогеназы, глутаматдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы) по методу Пирса в модификации Нарциссова в лимфоцитах периферической крови. При компьютерной морфометрии использовалась программа «Видеотест» (методика Сухорукова, Тозлиян).

Результаты и обсуждение.

В лимфоцитах всех обследованных детей обнаружены выраженные нарушения цитохимической активности ферментов клеточного энергообмена. При этом характер и степень нарушений индивидуально варьировали. Достоверно ($p < 0,05$) были представлены следующие изменения: значительное снижение количества гранул; увеличение площади мелких гранул (соответствующих отдельным мелким митохондриям) и кластеров (скопления митохондрий); округление гранул; снижение оптической плотности гранул. Все это свидетельствовало о глубоком нарушении функций митохондрий. Полученные результаты подтверждают ранее полученные данные о высокой чувствительности цитохимической диагностики при митохондриальной недостаточности [10].

При светогистохимическом анализе скелетной мышцы RRF различной степени выраженности были выявлены у 15 из 17 детей. При электронно-микроскопическом анализе скелетных мышц детей, имеющих RRF, обнаружены типичные ультраструктурные изменения, сопровождающие этот светооптический феномен: аномально увеличенные субсарколеммальные и интермиофибриллярные скопления митохондрий, деструкция большинства из них (чаще по дезэнергизованному типу, с истончением крист и вакуолизацией матрикса) при наличии отдельных сохранных митохондрий. Важно отметить, что ультраструктурные изменения митохондрий, иногда очень значительные, определялись не только в мышечных волокнах, но и в соединительно-тканых элементах, в частности, в эндотелиоцитах и адвентициальных клетках капилляров. У одного из детей без RRF качественные митохондриальные изменения были значительно менее выражены, а аномальных скоплений этих органелл не наблюдалось; у другого – при малом количестве митохондрий отмечались их грубые ультраструктурные изменения.

Ультраструктурные признаки изменений митохондрий, в виде умеренного увеличения их количества и деструкции по дезэнергизованному типу, наблюдались в тканевых элементах кожи одиннадцати детей, в том числе у двоих детей, в скелетной мышце которых не было обнаружено RRF. Наиболее выражены эти изменения были в эпителио-

цитах базального и шиповатого слоев эпидермиса. Кроме того, их можно было отметить в фибробластах и клетках капилляров сосочкового слоя дермы.

Полученные данные подтверждают теоретические представления о тканевой полисистемности поражения при митохондриальных заболеваниях [3-6, 8]. Можно предположить, что равномерное распределение пораженных органелл в тканях должно быть более характерно для заболеваний, связанных с ядерными мутациями [4]. В то же время полисистемность в сочетании с мозаичной выраженностью митохондриальных нарушений может быть объяснена случайным распространением пула митохондрий с мутантной ДНК в онтогенезе [1, 6, 7]. Результаты работы позволяют рекомендовать исследовать у больных с подозрением на митохондриальную природу заболевания максимально возможное число тканевых элементов при диагностической биопсии.

Литература

1. Scheffler I. A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. // Mitochondrion. - 2001. - V.1. №1. - P.3-32.
2. Сухоруков В.С. Нарушения клеточного энергообмена у детей. // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2002. - т.47, №5. - С.44-50.
3. Сухоруков В.С. Гетерогенность и клиничко-морфологическая неоднородность митохондриальной патологии у детей. Автореф. дисс. д.м.н., Москва, 1998.
4. Chinnery P.F. Searching for nuclear-mitochondrial genes. Trends in Genetics Vol.19 No.2 February 2003 60
5. Chitkara D. K., Nurko S., Shoffner J. M., et al. Abnormalities in gastrointestinal motility are associated with diseases of oxidative phosphorylation in children. The American journal of gastroenterology Vol. 98, No. 4, 2003
6. De Vivo D. - The expanding spectrum of mitochondrial diseases. Brain & Development 1993; 15: 1-22.
7. Di Mauro S., Schon E. A. Mitochondrial Respiratory-Chain Diseases. N Engl J Med 2003;348:2656-68.
8. Materials of the 5 European Meeting on Mitochondrial Pathology (Italy 2001). Mitochondrion 2001; 1: Suppl.1.
9. Сухоруков В.С., Нарциссов Р.П., Петричук С.В. Сравнительная диагностическая ценность анализа скелетной мышцы и лимфоцитов при митохондриальных болезнях. Архив патологии 2000; 62: 2: 19-21.
10. Тозлиян Е.В. Раннее выявление митохондриальных нарушений у детей с недифференцированными формами задержки нервно-психического развития. Автореф. дисс. к.м.н., Москва, 2003.

COMPLEX HISTOLOGICAL DIAGNOSTICS OF POLYSYSTEMIC MITOCHONDRIAL INSUFFICIENCY

A.V. MERKURIEVA

Department of Histology, Cytology and Embryology RPFU, Moscow, 117198, M-Maklaya
st 8, Medical faculty

V.S.SUKHORUKOV, A.V. SMIRNOV,

Moscow Research Institute of Pediatrics and Child Surgery, Moscow, 125412,
Taldomskaya str.2

D.I.MEDVEDEV

Department of Histology, Cytology and Embryology RPFU, Moscow, 117198, M-Maklaya
st 8, Medical faculty

In different tissues (epidermis, skeletal muscles, connective tissue) morphological and histochemical signs of mitochondrial damage were analyzed in 17 children with various mitochondrial diseases. We confirmed data about polysystemic distribution of defect mitochondria in such patients. The mitochondrial changes revealed in lymphocytes in all patients; in skeletal muscles (by light microscopy) - in 15 patients; in cells of epidermis and derma - in 11 patients (including two patients without RRF in skeletal muscles). So for mitochondrial diseases morphological diagnostics we recommend to analyze cells from the different tissues as much as possible.