

Ультраструктурные изменения в скелетных мышцах и нервно-мышечных синапсах при полимиозите

Л.Л. Бабакова, О.М. Поздняков

ФГБУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва

Контакты: Олег Михайлович Поздняков orozdnyakov@rambler.ru

Ультраструктурное исследование биоптатов длинной ладонной и дельтовидной мышц 7 больных с клиническим диагнозом полимиозита выявило деструктивно-дегенеративные изменения в мышечных волокнах и их синаптическом аппарате. Показано, что нарушение нервно-мышечных контактов и последующая денервация мышечных волокон начинаются с повреждения субсинаптических структур. Наряду с деструктивными выявляются и регенеративные признаки.

Ключевые слова: полимиозит, ультраструктура, скелетная мышца, нервно-мышечный синапс

Ultrastructural muscle and neuro-muscular junction alterations in polymyositis

L.L. Babakova, O.M. Pozdnyakov

The Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Ultrastructural analysis of 7 biopsies from *m.palmaris longus* and *m.deltoideus* in patients with confirmed polymyositis revealed alteration and degeneration of muscle fibers and anomalies of neuro-muscular junction (NMJ). The NMJ abnormalities and following denervation of muscle fibers in polymyositis start with subsynaptic damages. The occurrence of regeneration features in muscle fibers at any stage is characteristic for PM.

Key words: polymyositis, skeletal muscle ultrastructure, neuro-muscular junction

Воспалительные миопатии составляют гетерогенную группу подострых, хронических, а в ряде случаев острых приобретенных мышечных заболеваний, которые клинически характеризуются мышечной слабостью разной степени выраженности и обнаруживаются в мышечном биоптате воспалительными изменениями. Поскольку эти заболевания представляют самую большую группу приобретенных и потенциально излечимых или по крайней мере контролируемых заболеваний мышц среди лиц любого возраста, их раннее распознавание важно для клиники.

На основе клинических, иммунопатологических, гистологических и прогностических критериев, а также в зависимости от реакции на патогенетическую терапию встречающиеся в клинической практике воспалительные миопатии могут быть подразделены на 4 основные подгруппы: полимиозит (ПМ), дерматомиозит (ДМ), некротизирующая аутоиммунная миопатия (НАМ) и спорадический миозит с включениями (inclusion body myositis — IBM). Все обсуждаемые формы патологии имеют первично аутоиммунную природу и опосредуются или цитотоксическими Т-клетками, например как при ПМ и IBM, или комплементсвязанной микроангиопатией, как при ДМ, или же макрофагами и, возможно, аутоантителами, как при НАМ [1].

Наиболее часто встречаемая форма воспалительной миопатии — ПМ, который характеризуется диф-

фузным воспалением мышц, проявляется нарастающей слабостью и болезненностью мускулатуры плечевого и тазового поясов, проксимальных отделов конечностей и шеи. Он может сочетаться с другими аутоиммунными заболеваниями или развиваться на фоне злокачественного новообразования. В тяжелых случаях возможен летальный исход. Заболевание может начаться в любом возрасте, но чаще всего в 50–70 лет. Около 70 % больных — женщины. В патогенезе заболевания участвуют цитотоксические CD8 Т-лимфоциты, которые повреждают мышечные волокна [2]. Диагноз ПМ ставится на основании характерной клинической картины, повышения активности креатинфосфокиназы и альдолазы в сыворотке крови, результатов игольчатой электромиографии (ЭМГ) и биопсии мышц. В рутинной практике в диагностике ПМ используется световая микроскопия с определением иммуногистохимических маркеров.

Основные и немногочисленные ультраструктурные исследования воспалительных миопатий были сделаны во 2-й половине XX в., часть из них не потеряла актуальность и сегодня [3–7]. Параллельно проводился детальный нейрофизиологический ЭМГ-анализ состояния мышечных волокон и перестройки двигательных единиц в острой фазе заболевания и на фоне проводимой терапии, а также обсуждался вопрос о характере возможного вовлечения структур нервно-мышечной передачи при разных формах ПМ [8–13],

однако изучение ультраструктуры нервно-мышечных синапсов не проводилось.

Цель исследования — изучение комплекса ультраструктурных изменений в скелетных мышцах и нервно-мышечных синапсах при полимиозите.

Материалы и методы

Исследован биопсийный материал 7 больных с подтвержденным клиническим диагнозом ПМ. Тяжесть заболевания в каждом случае была разной. Фрагменты мышц, полученные во время диагностической биопсии из длинной ладонной или дельтовидной мышц, последовательно фиксировали в формол-сахарозе и четырехокси осмия (1 % раствор), заливали в аралдит. Срезы контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца, просматривали в электронном микроскопе JEM-100S (JEOL, Япония).

Результаты и обсуждение

При электронно-микроскопическом исследовании в мышечных волокнах были обнаружены мозаично расположенные значительные деструктивно-регенеративные изменения, касающиеся всех структурных элементов: миофибрилл, саркоплазматического ретикулула, митохондрий, ядер, саркоплазмы, сарколеммы. Наиболее распространенными являлись истончение диаметра миофибрилл без нарушения организации саркомеров и расширение промежутков между ними (рис. 1).

Вместе с тем во многих мышечных волокнах наблюдали атрофию миофибрилл с появлением так называемых расчесанных волокон, локальный распад миофибрилл с образованием зернистой массы. Иногда деструкции подвергались участки саркомеров, вследствие чего появлялись большие пространства саркоплазмы с включением фрагментов мембран, вакуолей, миелоноподобных структур, а также войлокоподобных образований. В участках некроза мышечного волокна выявляли липидные капли, гликоген и так называемые аутофагические вакуоли (аутолизосомы).

Часто в препаратах встречались мышечные волокна, в которых нарушение структурной организации саркомеров связано с дезагрегацией миофибрилл и аномалией Z-линии. Наблюдалось изменение центральной части мышечного волокна по типу «центрального стержня» (волокна-мишени). При этом структура саркомеров в центре мышечного волокна была нарушена, Z-линия имела неправильную, зигзагообразную форму, митохондрии отсутствовали. В то же время периферическая зона мышечных волокон сохраняла нормальную структуру. Наряду с небольшими очажками «размытых» Z-линий в отдельных волокнах выявлялись аномальные полосы, напоминающие картину, наблюдаемую при немалиновой миопатии: в дегенерирующих мышцах обнаруживались нитевидные и палочковидные включения, представляющие собой плотные агрегаты фибрилл, лежащие

внутри мышечного волокна параллельно его длинной оси с густой поперечной исчерченностью. Считают, что эти агрегаты состоят из материала Z-полосок. В литературе типичные немалиновые тельца при ультраструктурном исследовании были описаны у 1 больной 66 лет с подтвержденным ПМ, отвечающим на терапию кортикостероидами, и были расценены как эпифеномен [14].

Изменения саркоплазматического ретикулула (Т-системы, концевых цистерн продольной системы) проявлялись в расширении его элементов и образовании вакуолей, а иногда структур, напоминающих соты, а также своеобразного вида трубчатых включений, которые на поперечном сечении имели правильную гексагональную упаковку.

Разрушение миофибрилл приводило к относительному увеличению саркоплазмы с образованием субсарколеммальных натеков, нарушению ее гомогенности, увеличению числа обычных или появлению необычных включений. Значительным изменениям подвергался и митохондриальный аппарат мышечных волокон.

Особого внимания заслуживают многочисленные лимфоциты, которые выявлялись между мышечными волокнами, а также в тесной связи с ними и даже внутри мышечных волокон. Как уже указывалось, это CD8 Т-лимфоциты, обуславливающие повреждение мышечных волокон (рис. 2).

Изменения сарколеммы распространялись на базальный слой, прилежащий снаружи к плазматической мембране мышечного волокна, который расширялся, местами наблюдалось нарушение его гомогенности. Рядом выявлялось большое количество коллагеновых фибрилл.

Во многих мышечных волокнах была обнаружена миграция ядер с периферии в центр, что характерно для денервированных волокон. В остальном изменения касались величины, формы, распределения хроматина, величины и количества ядрышек. В некоторых случаях наблюдались секвестрация ядер и образование клеточесателлитов. Часто встречались клетки-сателлиты, в том числе и отщепленные. В норме клетки-сателлиты случайны, их увеличение свидетельствует о том, что наряду с деструктивными процессами идут и регенеративные.

В синаптическом аппарате при ПМ также выявлены значительные изменения (рис. 3). Наряду с относительно мало измененными двигательными концевыми пластинками имелись и денервированные. Их можно было идентифицировать по наличию структурных изменений как в пресинаптической, так и постсинаптической областях. Пресинаптические области отдельных синапсов практически полностью отсутствовали. На месте существовавших терминалей аксонов обнаруживались многочисленные тяжи, состоящие из основного вещества щели и складок. В терминалях аксонов некоторых синапсов выявлены структурные изменения их органелл,

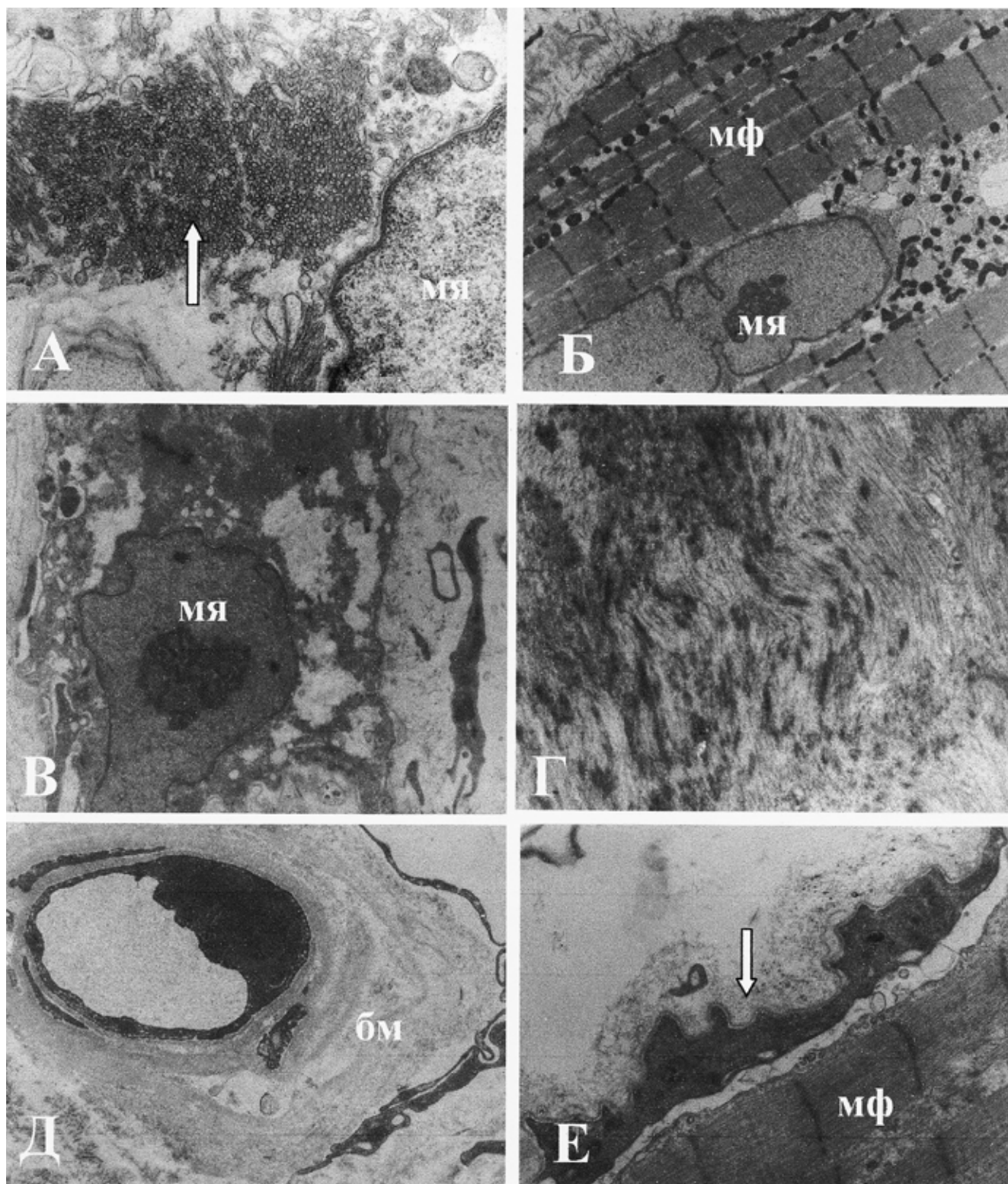


Рис. 1. Изменение ультраструктуры мышечных волокон у больных полимиозитом: а — пролиферация элементов саркотубулярного ретикулума с образованием трубчатых агрегатов (стрелка), $\times 19\,300$; б — истончение миофибрилл, миграция ядер с периферии в центр, $\times 3\,000$; в — распад мышечного волокна с явлениями некроза, $\times 3\,200$; г — локальный участок нарушения структурной организации саркомеров, стриминг Z-линий, $\times 13\,000$; д — кровеносный капилляр с расширенной и многослойной базальной мембраной, $\times 800$; е — клетка-сателлит (стрелка), отщепляющаяся от мышечного волокна, $\times 10\,000$. Условные обозначения: мя — мышечное ядро, мф — миофибриллы, бм — базальная мембрана

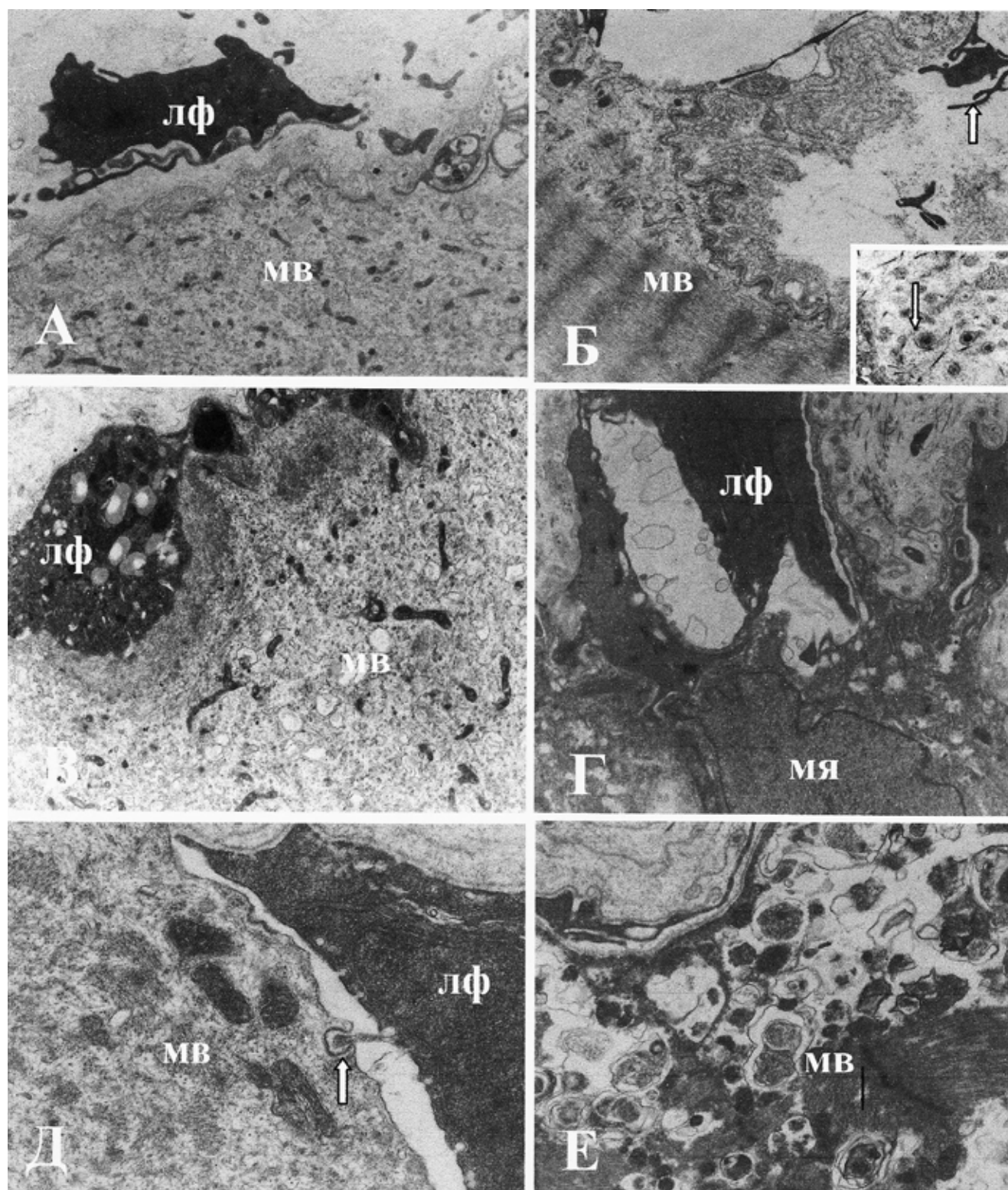


Рис. 2. Различные стадии инфильтрации мышечных волокон лимфоцитами у больных полимиозитом: а — свободный лимфоцит в межклеточном пространстве, $\times 3\,500$; б — разрушение периферической части мышечного волокна лимфоцитами (стрелка), $\times 9\,800$; вставка: вирусоподобные частицы (стрелка) на поверхности мышечной клетки, $\times 20\,000$; в — внедрение лимфоцита в мышечное волокно, $\times 3\,500$; г — инфильтрация лимфоцитами в некротизированную зону мышечного волокна, $\times 3\,200$; д — начальные признаки (стрелка) проникновения лимфоцита в мышечное волокно, $\times 20\,000$; е — локальный участок необратимого разрушения мышечного волокна, $\times 11\,500$.

Условные обозначения: лф — лимфоцит, мв — мышечное волокно, мя — мышечное ядро

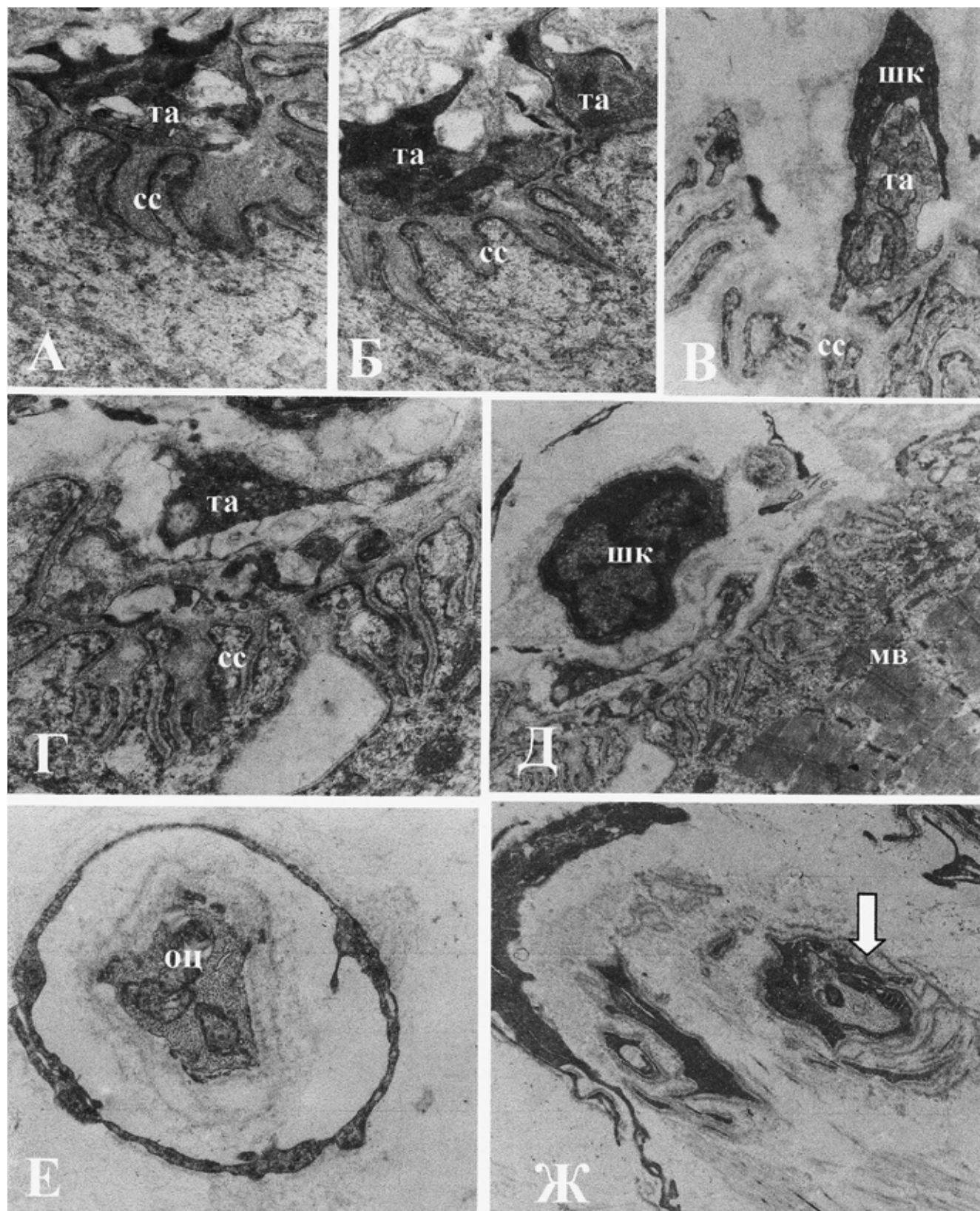


Рис. 3. Ультраструктура нервно-мышечных синапсов у больных полимиозитом: а, б — нервно-мышечные синапсы с нарушениями структурной организации в пре- и постсинаптических областях, $\times 16\,700$; в — дегенерирующая терминаль аксона, распад постсинаптической зоны, $\times 20\,000$; г, д — необратимое разрушение нервно-мышечного контакта, денервация мышечного волокна, $\times 7\,000$ (г), $\times 10\,600$ (д); е, ж — внутримышечные нервные волокна с признаками нарушения структурной организации (стрелка), $\times 18\,000$ (е), $\times 7\,600$ (ж). Условные обозначения: та — терминаль аксона, сс — синаптические складки, шк — Шванновская клетка, мв — мышечное волокно, оц — осевой цилиндр

в частности митохондрий. Фагоцитоза поврежденных терминалей отростками Шванновских клеток не наблюдалось.

Параллельно с изменениями в пресинаптической области наблюдались изменения в «подошве» нервно-мышечных соединений. Прежде всего это касалось синаптических складок, которые расширялись, иногда сливались друг с другом, что приводило к расширению синаптической щели и в результате к нарушению синаптической передачи. Создается впечатление, что повреждение постсинаптических структур предшествует пресинаптическим.

Наряду с деструкцией терминалей аксонов имело место и их новообразование, т. е. регенерация. Помимо растущих точек аксонов, были обнаружены и вновь образованные функционирующие терминали, в которых определялись синаптические везикулы, митохондрии, нейрофиламенты и даже Х-структуры. Они имели узкую, равномерную синаптическую щель и многочисленные зачаточные складки. Как правило, регенерация происходила в зоне старой концевой пластинки, не распространяясь за ее пределы, как это имеет место, например, при миастении. Концевые веточки аксонов прорастали на месте разрушенных, о чем можно судить по сохранившимся многослойным остаткам базального слоя.

В кровеносных микрососудах отмечалось нарушение структуры эндотелиоцитов и расширение и многослойность их базальной мембраны.

Обсуждение

Большинство публикаций посвящено изучению ультраструктурных особенностей воспалительных и наследственных миопатий. Сравнительная количественная и качественная оценка ультраструктурных изменений при прогрессирующей мышечной дистрофии Дюшена (ПМДД) и ПМ показала, что регенеративные проявления на всех стадиях течения заболеваний достоверно более выражены при воспалительном поражении мышцы, чем при генетически обусловленном заболевании [15]. В отличие от ПМ при ПМДД чаще отмечались дегенеративные изменения основной мембраны и инвазия волокон коллагена в саркоплазматический ретикулум в отдельных гиперконтрактных волокнах, атипичные регенераторные признаки в виде миоцитов на стадии мононуклеарных миобластов или примитивных мышечных трубочек с дегенерацией миофибрилл и цитоплазматических органелл. На далеко зашедших стадиях ПМДД в отличие от ПМ регенераторные проявления были едва различимы. Попытки обнаружения ультраструктурных различий ПМДД и ПМ предпринимались и с помощью определения различий в размере ядер мышечных волокон и ядер клеток-сателлитов [16]. Значительные различия касались только уменьшения размеров ядер клеток-сателлитов при ПМДД, наряду с увеличением их числа. При обсуждении регенераторного компонента при

ПМДД и ПМ по данным ультраструктурного анализа было показано, что количественное содержание миофибрилл в обоих случаях может оставаться одинаковым, но при этом степень и выраженность изменений более характерна для ПМДД [17]. При ПМДД также отмечено увеличение содержания гликогена и расширение саркоплазматического ретикула. Расширение саркоплазматического ретикула значительно чаще встречается в пренекротической фазе дегенерации мышечных волокон при ПМДД и рассматривается как начальное проявление ультраструктурных признаков патологического процесса.

Обсуждая диагностику воспалительных миопатий нельзя не упомянуть и такое заболевание, как фибромиалгия, достаточно часто требующее дифференциального диагноза с ПМ. Несмотря на отсутствие достоверных изменений при световой микроскопии, ультраструктурное исследование обнаружило лизис миофибрилл, участки скопления гликогена и митохондриальные конгломераты во всех случаях. Изменения митохондрий также касались нарушения их расположения, формы и размера, а в ряде случаев имелись кристаллические включения. В отличие от ПМ при фибромиалгии имелось расширение саркоплазматического ретикула (в 83 % случаев) и наличие миеленовых телец (в 75 % случаев). Выявленные при фибромиалгии изменения служат доказательством наличия структурных изменений, обнаружить которые невозможно иным способом, и которые отводят данному заболеванию особое место, отличая его от воспалительной или наследственной патологии мышц. При фибромиалгии также отмечается выраженная фрагментация ДНК, причем эти изменения не являются признаками апоптоза [17].

Таким образом, как показало наше исследование, при ПМ обнаруживается большая вариабельность изменений, как в мышечных волокнах, так и в синаптическом аппарате. Выявление в мышечных волокнах клеток-сателлитов, а в нервно-мышечных синапсах вновь образующихся терминалей аксонов свидетельствует о том, что в мышцах наряду с процессами деструкции идут и регенераторные процессы. Этот факт является важным для объяснения ремиттирующего течения заболевания. При ПМ первично повреждаются мышечные волокна. Вместе с тем, как уже отмечалось ранее, двигательная единица является единым образованием, и ее повреждение на любом уровне влечет за собой изменения во всех остальных звеньях. Поэтому неизбежны изменения и в синаптическом аппарате мышц и, вероятно, в мотонейронах. Необходимо также подчеркнуть, что структурные сдвиги в нервно-мышечных синапсах при ПМ отличаются от таковых при миастении и других нервно-мышечных заболеваниях.

Несомненный интерес представляет обнаружение вирусоподобных структур в мышцах больных ПМ. Хотя

диагностика методом полимеразной цепной реакции повторно не обнаруживала присутствие вирусов в мышцах больных воспалительными миопатиями, этот вопрос остается открытым [18, 19]. Так, ПМ был обнаружен, например, у ВИЧ-инфицированных больных. Причем симптомы ПМ предшествовали развитию картины иммунодефицита [20].

Представленные ультраструктурные изменения в разных элементах мышц в анализируемых в данном исследовании случаях ПМ встречаются и при других нервно-мышечных и мышечных заболеваниях, однако имеются определенные различия, особенно если принять во внимание частоту, разнообразие и степень распространения этих изменений.

Заключение

Электронно-микроскопическое исследование скелетных мышц в настоящее время проводится не так часто, как всего еще 2 десятилетия назад, что в первую очередь связано со стремительным развитием молекулярной генетики и иммуногистохимии, занявших передовые позиции в диагностике наследственных и приобретенных мышечных заболеваний. Однако сыгравший свою неоценимую роль в определении многих патологических ультраструктурных изменений двигательной единицы, данный метод сегодня по-прежнему остается одним из немногочисленных способов, раскрывающих детали патогенеза самых разных нервно-мышечных болезней человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dalakas M.C. Pathophysiology of inflammatory and autoimmune myopathies. *Presse Med* 2011;40:237–47.
2. Behan W.M., Behan P.O., Durward W.F., McQueen A. The inflammatory process in polymyositis: monoclonal antibody analysis of muscle and peripheral blood immunoregulatory lymphocytes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1987;50(11):1468–74.
3. Rose A.L., Walton J.N., Pearce G.W. Polymyositis: an ultramicroscopic study of muscle biopsy material. *J Neurol Sci* 1967; 5(3):457–72.
4. Mintz G., González-Angulo A., Fraga A. Tubuloreticular structures in different types of myositis: implications for pathogenesis. *Ultrastructure of muscle in polymyositis. Am J Med* 1968;44(2):216–24.
5. Mastaglia F.L., Walton J.N. An ultrastructural study of skeletal muscle in polymyositis. *J Neurol Sci* 1971;12(4):473–504.
6. Matsubara S., Mair W.G. Ultrastructural changes in polymyositis. *Brain* 1979; 102(4):701–25.
7. De Visser M., Emslie-Smith A.M., Engel A.G. Early ultrastructural alterations in adult dermatomyositis. Capillary abnormalities precede other structural changes in muscle. *J Neurol Sci* 1989;94(1–3):181–92.
8. Никитин С.С. Воспалительные заболевания мышц (полимиозиты). В кн.: Б.М. Гехт и др. Электрмиография в диагностике нервно-мышечных заболеваний. Тарангор: ТРТУ, 1997; с.111–20.
9. Henriksson K.G., Stålberg E. The terminal innervation pattern in polymyositis: a histochemical and SFEMG study. *Muscle Nerve* 1978;1(1):3–13.
10. Partanen J., Lang H. EMG dynamics in polymyositis. A quantitative single motor unit potential study. *J Neurol Sci* 1982;57(2–3):221–34.
10. Pestronk A., Drachman D. Polymyositis: reduction of acetylcholine receptors in skeletal muscle. *Muscle Nerve* 1985;8:233–9.
11. Barkhaus P.E., Nandedkar S.D. Electromyogr Clin Neurophysiol. Serial quantitative electrophysiologic studies in sporadic inclusion body myositis. 2007; 47(2):97–104.
12. Sun A.P., Ohtsuki Y., Yano T. et al. Typical nemaline bodies presenting in a patient with polymyositis. *Med Electron Microsc* 2002;35(3):167–72.
13. Morizumi H., Hizawa K., Nunomura S., Ii K. Comparative study of alterations of skeletal muscle in Duchenne muscular dystrophy and polymyositis. *Acta Pathol Jpn* 1984;34(6):1221–42.
14. Watkins S.C., Cullen M.J. A quantitative study of myonuclear and satellite cell nuclear size in Duchenne's muscular dystrophy, polymyositis and normal human skeletal muscle. *Anat Rec* 1988;222(1):6–11.
15. Watkins S.C., Cullen M.J. A qualitative and quantitative study of the ultrastructure of regenerating muscle fibres in Duchenne muscular dystrophy and polymyositis. *J Neurol Sci* 1987;82(1–3):181–92.
16. Sprott H., Salemi S., Gay R. et al. Increased DNA fragmentation and ultrastructural changes in fibromyalgic muscle fibres. *Ann Rheum Dis* 2004;63(3):245–51.
17. Leff R.L., Love L.A., Miller F.W. et al. Viruses in the idiopathic inflammatory myopathies: absence of candidate viral genomes in muscle. *Lancet* 1992; (339):1192–5.
18. Kanetaka Y., Kano Y., Hirahara K. et al. Relationship between cytomegalovirus reactivation and dermatomyositis. *Eur J Dermatol* 2011;21(2):248–53.
19. Dalakas M.C., Pezeshkpour G.H., Gravel M., Sever J.L. Polymyositis associated with AIDS retrovirus. *JAMA* 1986;256(17):2381–3.