



ВОЗМОЖНОСТИ ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ НЕРВНО-МЫШЕЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Т. В. Жукова¹, А. В. Белецкий², Ю. Н. Рушкевич³, С. А. Лихачев³

¹МИТСО, г. Минск, Республика Беларусь

²Минская центральная районная клиническая больница
г. Минск, Республика Беларусь

³Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии
г. Минск, Республика Беларусь

РЕЗЮМЕ. Нервно-мышечные заболевания включают широкий спектр, который характеризуется нарушением функции и/или повреждением периферических нервов. В то время как нейропатологические процессы отражаются электрофизиологическими параметрами, состояние нервной и мышечной ткани (воспаление, дистрофические изменения, нарушения кровообращения, нарушения компенсаторно-приспособительных механизмов), зачастую являющееся ключом к разгадке причины заболевания, оценивается только морфологически.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ: использование возможностей патоморфологических методов для дифференциальной диагностики различного вида нервно-мышечных заболеваний.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: исследование выполнено на текущем материале, полученном от 18 пациентов при операциях по поводу взятия нерва и кожно-мышечного лоскута для морфологической установки диагноза у пациентов с нервно-мышечными заболеваниями. Изучено 8 препаратов у больных с миодистрофией и 2 препарата со спинальной амиотрофией, 2 препарата с генерализованной формой миастении, болезнью моторного нейрона 2, с миозитами 4. Материал подвергался специальным методам обработки для проведения рутинных методов окраски гематоксилином-эозином, специальных окрасок для выявления нервного волокна, жировой ткани и иммуногистохимического исследования (ИГХ) для определения воспалительной инфильтрации (CD45), а также — сосудов (CD34).

РЕЗУЛЬТАТЫ: при помощи морфологического исследования у пациентов с нервно-мышечными заболеваниями были выявлены следующие изменения: при миодистрофиях выявлена различная степень повреждения мышечного волокна от 20 до 80 %, продуктивное воспаление с наличием в инфильтрате плазматических и гигантских клеток, что характерно для случаев с наличием генетических повреждений. Выраженность продуктивного воспаления была сопоставима с объемом повреждения мышечного волокна. В этих же случаях отмечалась разная степень жировой дистрофии. Изменения в нервной ткани при миодистрофиях отсутствовали. Отмечалось нарушение структуры моторных бляшек. Мышечные волокна были истончены, замещались жировой и соединительной тканью.

В группе пациентов со спинальной амиотрофией сочетались морфологические признаки, характерные для нейрогенных амиотрофий и миодистрофий. Изменения мышечного волокна были связаны в основном с нарушением иннервации и проявлялись в умеренно выраженных дистрофических изменениях (белковая дистрофия, жировая дистрофия). Продуктивная воспалительная инфильтрация отсутствовала.

У пациентов с болезнью моторного нейрона отмечались тяжелые изменения в мышечном волокне дистрофического характера. Жировая дистрофия занимала от 50 до 90 % мышечных волокон, нервные волокна отсутствовали.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Таким образом, современные подходы к диагностике нервно-мышечных заболеваний базируются не только на классических клинических и лабораторных методах исследований, но и в значительной мере могут опираться на морфологическую диагностику. Являясь высокоинформативным методом исследования, гистологическое изучение биопсийного материала требует проведения технически сложной процедуры, однако при ее квалифицированном проведении дает хороший результат.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нервно-мышечные заболевания, морфологический метод, диагностика.

Для цитирования: Жукова Т. В., Белецкий А. В., Рушкевич Ю. Н., Лихачев С. А. Возможности патоморфологической диагностики нервно-мышечных заболеваний Российский нейрохирургический журнал им. проф. А. Л. Поленова. 2023;15(2):41–46. DOI 10.56618/2071-2693_2023_15_2_41.

POSSIBILITIES OF PATHOMORPHOLOGICAL DIAGNOSTICS
OF NEUROMUSCULAR DISEASEST. V. Zhukova¹, A. V. Belecky², Y. N. Ruchkevich³, S. A. Lixachov³¹ MITSO, Minsk, Republic of Belarus² Central District Clinical Hospital, Minsk, Republic of Belarus³ Republican Scientific and Practical Centre for neurology and neurosurgery, Minsk, Republic of Belarus

SUMMARY. Polyneuropathies include a wide range of diseases that are characterized by impaired function and/or damage to the peripheral nerves. While neuropathological processes are reflected by electrophysiological parameters, the state of the nervous and muscular tissue (inflammation, dystrophic changes, circulatory disorders, compensatory-adaptive mechanisms disorders), which is often the key to unraveling the cause of the disease, is assessed only morphologically.

AIM OF THE STADY: using the possibilities of pathomorphological methods for the differential diagnosis of various types of neuromuscular diseases.

MATERIALS AND METHODS: the study was performed on the current material obtained from 18 patients during operations for the removal of a nerve and a musculocutaneous flap for morphological diagnosis in patients with neuromuscular diseases. 8 drugs were studied in patients with myodystrophy and 2 drugs with spinal amyotrophy, 2 drugs with a generalized form of myasthenia gravis, motor neuron disease 2, with myositis 4.

The material was subjected to special processing methods for routine hematoxylin-eosin staining, special stains to identify nerve fiber, adipose tissue and immunohistochemistry (IHC) to determine inflammatory infiltration (CD45), as well as vessels (CD34).

RESULTS. With the help of a morphological study in patients with neuromuscular diseases, the following changes were revealed: with myodystrophy, a different degree of damage to the muscle fiber from 20 to 80 % was revealed, productive inflammation with the presence of plasma and giant cells in the infiltrate, which is typical for cases with the presence of genetic damage. The severity of productive inflammation is comparable to the amount of damage to the muscle fiber.

In the same preparations, different degrees of fatty degeneration are noted. There are no changes in the nervous system in muscular dystrophies. A violation of the structure of motor plaques with the disappearance of fibrillar plaques was noted. Muscle fibers become thinner, replaced by adipose and connective tissue.

In the group with spinal amyotrophy, morphological features characteristic of neurogenic amyotrophy and myodystrophy are combined, however, changes in the muscle fiber are mainly associated with impaired innervation and manifest themselves in moderately pronounced dystrophic changes (protein degeneration, fatty degeneration). There was no productive inflammatory infiltration.

In patients with motor neuron disease, severe changes in the muscle fiber of a dystrophic nature were noted. Fatty degeneration occupied from 50 to 90 % of muscle fibers, nerve fibers were absent.

CONCLUSION. Thus, modern approaches to the diagnosis of neuromuscular diseases are based not only on classical clinical and laboratory research methods, but can also be largely based on morphological diagnostics. Being a highly informative research method, the histological study of biopsy material requires a technically complex procedure, but when it is carried out qualified, it gives a good result.

KEY WORDS: neuromuscular diseases, morphological method, diagnostics.

For citation: Zhukova T. V., Belecky A. V., Ruchkevich Y. N., Lixachov S. A. Possibilities of pathomorphological diagnostics of neuromuscular diseases. Rossiiskii neirokhirurgicheskii zhurnal imeni professora A. L. Polenova. 2023;15(2):41–46. DOI 10.56618/2071–2693_2023_15_2_41.

Введение. Нервно-мышечные заболевания характеризуются нарушением функции произвольной мускулатуры, утраты или снижения двигательного контроля, что может наступать в результате поражения как собственно мышц, так и иметь вторичный характер — вследствие дисфункции нервно-мышечного соединения, поражения периферических нервов или мотонейронов спинного мозга. В клинической картине некоторых нервно-мышечных заболеваний могут присутствовать признаки поражения двигательных ядер ствола головного мозга. Поражения других участков нервной системы, приводящих к нарушению двигательного контроля, в частности пирамидного тракта, согласно общепринятому определению, не относятся к нервно-мышечным заболеваниям [6].

Проблема диагностики нервно-мышечных заболеваний представляет собой одну из самых серьезных проблем клинической неврологии. В практической деятельности достаточно часто употребляется собирательное понятие миопатия, однако особенности конкретного случая, в том числе и морфологические имеют серьезное дифференциальное значение. Однако, если диагностика нервно-мышечных заболеваний как синдрома зачастую не вызывает значительной клинической сложности, то выявление этиологического фактора, послужившего причиной болезни, напротив, является относительно трудной и важной задачей для выработки правильной терапевтической тактики [1]. В то время как нейропатологические процессы отражаются электрофизиологическими параметрами, состояние нервной и мышечной ткани

(воспаление, дистрофические изменения, нарушения кровообращения, нарушения компенсаторно-приспособительных механизмов), зачастую являющееся ключом к разгадке причины заболевания, оценивается только морфологически [2, 3]. Предпочтительное исследование икроножного нерва объясняется тем, что это поверхностный и легко анатомически определяемый нерв, а также тем фактом, что он часто вовлекается в патологический процесс при изучаемой патологии. Важно, что биопсии подвергается не весь нерв, а небольшой участок (фасцикулярная биопсия), что позволяет уменьшить риски чувствительных нарушений в результате процедуры [4, 5].

Возможность провести дифференциальную диагностику между различными этиологическими формами нервно-мышечных заболеваний является, прежде всего, возможностью адекватного лечения.

Цель исследования: использование возможностей патоморфологических методов для дифференциальной диагностики различного вида нервно-мышечных заболеваний.

Материалы и методы: исследование выполнено на текущем материале, полученном от 18 пациентов при операциях по поводу взятия нерва и кожно-мышечного лоскута для морфологической установки диагноза у пациентов с нервно-мышечными заболеваниями (миодистрофиями, миозитами, спинальной амиотрофией, генерализованной формой миастении, болезнью моторного нейрона). Изучено 8 препаратов у больных с миодистрофией и 2 препарата со спинальной амиотрофией, 2 препарата с генерализованной формой миастении, болезнью моторного нейрона 2, с миозитами 4.

После регистрации из присланного на исследование объекта (икроножный нерв, кожно-мышечный лоскут) вырезали 5 кусочков. Объект разрезали на пластины толщиной до 5 мм и изучали с помощью бинокулярной лупы для ориентировочной дифференциации диспластических процессов (сохранение дольчатости, наличие узлов, однородности, мелкозернистой структуры) и опухолей (фокусы уплотнения, «стекловидные» поля, сосочковые структуры, очаги некроза, обызвествления). Вырезанные кусочки ткани имели размер 1х1х0,5 см, оптимальный для быстрой фиксации и проводки материала.

Проводка проводилась в автоматическом режиме полуоткрытого контура в спиртах восходящей концентрации. После проведения проводки материал заливался в парафиновые блоки. Нарезка проводилась разовыми лезвиями (толщина препарата 3 микрона).

Для гистологического исследования применялась стандартная методика окрашивания гематоксилином и эозином.

Проведение иммуногистохимического исследования включало депарафинизацию, дегидратацию, промывку, демаскировку в буфере выявляемых антител, охлаждение, промывку в буфере, в 3 % перекиси, когда происходит блокировка эндогенных пероксидаз. Производилось также ограничение областей иссле-

дования при помощи гидрофобного карандаша, затем проводилась инкубация с первичными антителами, промывка антител, нанесение визуализирующей системы, инкубация, промывка с нанесением хромагена для выявления комплексов, промывка не связавшихся комплексов, подкрашивание ядер.

Перед инкубацией с первичными антителами срезы обрабатывали в микроволновом режиме при мощности 750 Вт в цитратном буфере (pH 6,0) — 2 раза по 5 минут, затем охлаждали при комнатной температуре не менее 15–20 минут и наносили соответствующие первичные антитела. Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали 10 минут в темноте с 3 % перекисью водорода, приготовленной на дистиллированной воде, а затем промывали 5 минут в фосфатном буфере. Инкубация с первичными антителами проводилась в течении 30 минут при комнатной температуре. Инкубированные срезы тщательно промывали в фосфатном буфере при pH 7,4–7,6, затем наносили комплекс EnVision (anti-mouse и anti-rabbit, фирмы DAKO) и инкубировали 30–40 минут при комнатной температуре, тщательно промывали в фосфатном буфере при pH 7,4–7,6, и наносили красящий раствор диаминобензидина (ДАВ) — DAB+ фирмы DAKO, визуализирующий реакцию. Затем срезы отмывали в дистиллированной воде и докрашивали гематоксилином Майера и заключали в канадский бальзам.

Оценку результатов окрашивания проводили с применением светового микроскопа «Leica» (Германия) под увеличением x10, x20, x40. Для всех маркеров оценивали локализацию окрашивания в клетке (ядро, цитоплазма, мембрана).

В качестве красителя жиров использовали судан 3. Липиды исследовали на замороженных срезах, фиксированных в формалине. Для получения лучшего результата использовали свежefиксированный материал. Длительное хранение объектов в формалине ведет к неудовлетворительной окраске судановыми красителями и делает совершенно невозможным дифференцированное окрашивание сульфатом нильским голубым.

Механизм окрашивания включает извлечение судана из спиртовых растворов жиром, который является лучшим растворителем.

Для ИГХ исследования использовались следующие антитела:

CD 34 — моноклональные, мышинные, клон QBEND, разведение 1:100, фирма-производитель: BioGenex;

CD 45 — моноклональные, мышинные, клон LJ27.9, разведение 1:200, фирма-производитель: BioGenex.

Desmin — моноклональные, мышинные, клон GM007, разведение 1:200, фирма-производитель: BioGenex.

Synaptophysin — моноклональные, мышинные, клон PBM-2B10, разведение 1:200, фирма-производитель: BioGenex.

Результаты.

При помощи иммуногистохимического исследования с моноклональными антителами к десмину у пациентов с нервно-мышечными заболеваниями была выявлена разная степень повреждения мышечного волокна. У части из них в мышечной ткани при помощи моноклональных антител к общему лейкоцитарному фактору наблюдалось продуктивное воспаление, сопровождающее изменения, происходящие при генетических повреждениях. Выраженность продуктивного воспаления была сопоставима с объемом повреждения мышечного волокна. В препаратах также отмечалась разная степень жировой дистрофии.

У пациентки с миодистрофией, характеризующейся жировым перерождением мышечных волокон не более 50 %, также имелась воспалительная инфильтрация. На срезах, окрашенных гематоксилином — эозином удалось дифференцировать наличие в инфильтрации лейкоцитов и плазматических клеток, характерных для продуктивного воспаления. Ни в одном из случаев в инфильтрате не были обнаружены нейтрофильные лейкоциты, являющиеся маркером обострения процесса.

Самые тяжелые разрушения мышечного волокна 90 % отмечались у пациентов с миастенией. В этих случаях отсутствовал воспалительный инфильтрат. Иммуногистохимическое исследование с антителами к общему лейкоцитарному фактору было серонегативным. Ткань не экспрессировала синаптофизин, как и ткань пациентов с миодистрофиями.

В случаях биопсий пациентов со спинальной амиотрофией экспрессировались антитела к синаптофизину и общему лейкоцитарному фактору. Мышечное волокно сохраняло структуру и форму.

При помощи иммуногистохимического исследования с моноклональными антителами к CD 34 выявлены изменения в стенке сосудов у пациентов с миозитами, которые заключались в наличии склероза, пролиферации эндотелия в стенке сосудов, а также наличие воспалительного инфильтрата не только периваскулярного, но и расположенного непосредственно в стенке сосудов.

Таким образом, проведенное морфологическое, иммуногистохимическое и морфометрическое исследование позволило выявить следующие изменения у пациентов в вышеперечисленных исследуемых группах:

Пациенты в группе с миодистрофиями имели разрушение мышечного волокна от 20 до 80 % имеющее в основе своей аутоиммунное воспаление, характеризующееся наличием продуктивного воспаления с наличием в инфильтрате плазматических и гигантских клеток. Мышечная ткань, таким образом замещалась фиброзно-грануляционной тканью, с преобладанием фиброза (рис. 1а). Нервное волокно сохранено (рис. 1б).

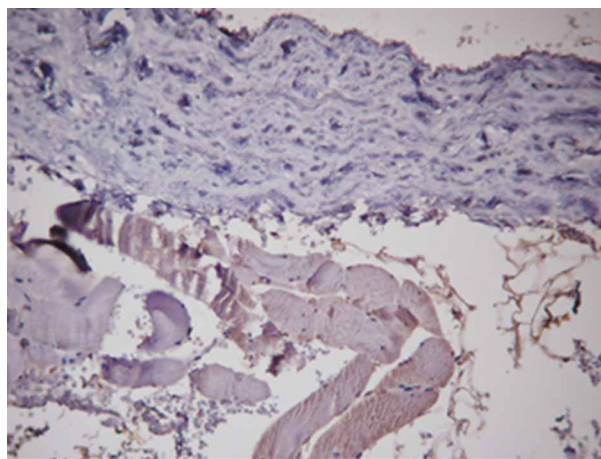


Рисунок 1а. Пациентка 47 лет с миодистрофией. Разрушение мышечного волокна 65 %, характеризующееся наличием продуктивного воспаления с наличием в инфильтрате плазматических и гигантских клеток. Мышечная ткань замещена фиброзно-грануляционной тканью, с преобладанием фиброза. Гематоксилин-эозин x400.
Figure 1a. Patient is 47. Myodystrophy. Destruction of muscle fiber 65 %, characterized by the presence of productive inflammation with the presence of plasma and giant cells in the infiltrate. Muscle tissue is replaced by fibrous-granulation tissue, with a predominance of fibrosis. Hematoxylin-eosin x400.

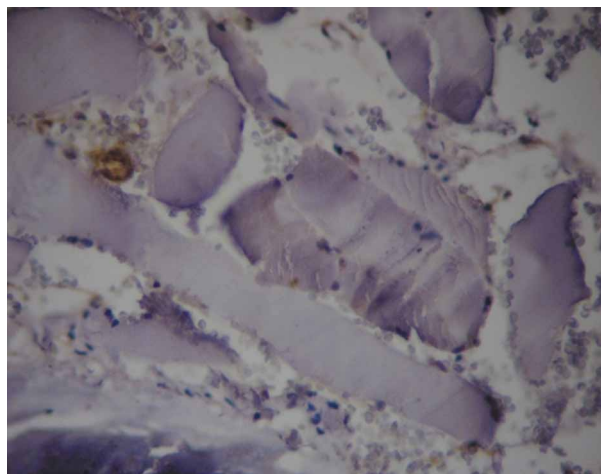


Рисунок 1б. Пациентка 47 лет с миодистрофией. Нервное волокно сохранено. ИГХ. Экспрессия антигена Synaptophysin x400.
Figure 1b. Patient is 47. Myodystrophy. The nerve fiber is preserved. IGH. Expression of the antigen Synaptophysin x400.

Выявлено, что изменения со стороны нервов при мышечных дистрофиях отсутствуют либо они минимальны. Отмечено нарушение структуры моторных бляшек с исчезновением фибриллярной структуры. Основные изменения определялись в самой мышечной ткани, что выражалось в истончении волокон, замещении больших их участков их жировой и соединительной тканью, наличием отдельных гипертрофированных участков с увеличением количества мышечных ядер. Последние могут располагаться цепочками. Изменения в сосудах представлены утолще-

нием стенок, стенозированием с образованием микротромбозов. Гистохимическое исследование мышечного биоптата позволяет выявить накопление кислых мукополисахаридов, уменьшение ряда ферментов. Выявленное в препаратах продуктивное воспаление может стать критерием активности процесса.

Пациенты в группе со спинальной амиотрофией сочетали морфологические признаки, характерные для нейрогенных амиотрофий и миодистрофий, однако изменения мышечного волокна были связаны в основном с нарушением иннервации и проявлялись в умеренно выраженными дистрофическими изменениями (белковая дистрофия, жировая дистрофия), продуктивная воспалительная инфильтрация не встречалась.

Пациенты в группе с миастенией не имели значительных изменений мышечного волокна (до 20 % волокон с наличием белковой-гиалиновокапельной дистрофии), что отображено на рисунке 2.

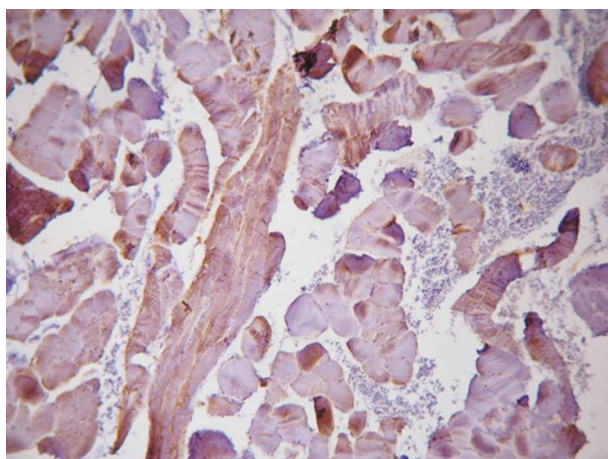


Рисунок 2. Пациентка 53 лет с миастенией. Значительных изменений мышечного волокна нет. (до 20 % волокон с наличием белковой-гиалиновокапельной дистрофии). ИГХ. Экспрессия антигена Desmin x400.

Figure 2. Patient is 53. Myasthenia gravis. There are no significant changes in the muscle fiber. (up to 20 % of fibers with the presence of protein-hyalin droplet dystrophy). IGH. Expression of the Desmin x400 antigen.

Пациенты с болезнью моторного нейрона имели тяжелые изменения в мышечном волокне дистрофического характера. В препаратах не выявлялось нервное волокно ни в одном случае. Жировая дистрофия занимала от 50 до 90 % мышечных волокон в 1 поле зрения. Воспалительная инфильтрация не обнаруживалась, что отображено на рисунке 3.

Больные с миозитами не имели значимых изменений в мышечном волокне. Морфологическими проявлениями были воспалительный инфильтрат, состоящий из лимфоцитов. У половины пациентов в инфильтрате обнаруживались нейтрофильные лейкоциты, а также некрозы и кровоизлияния, что отображено на рисунке 4.

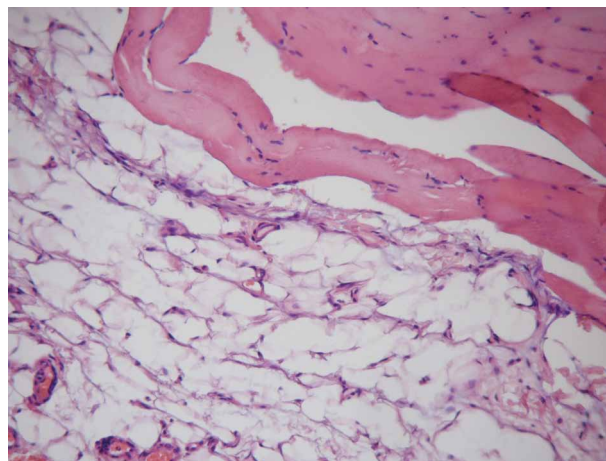


Рисунок 3. Пациент 47 лет с болезнью моторного нейрона. Тяжелые изменения в мышечном волокне дистрофического характера. Нервное волокно не выявляется. Жировая дистрофия занимает 80 % мышечных волокон в 1 поле зрения. Воспалительная инфильтрация не обнаруживается. Гематоксилин-эозин x400.

Figure 3. Patient is 47. Motor neuron disease. Severe changes in the muscle fiber of a dystrophic nature. Nerve fiber is not detected. Fatty degeneration occupies 80 % of muscle fibers in 1 field of view. Inflammatory infiltration is not detected. Hematoxylin-eosin x400.

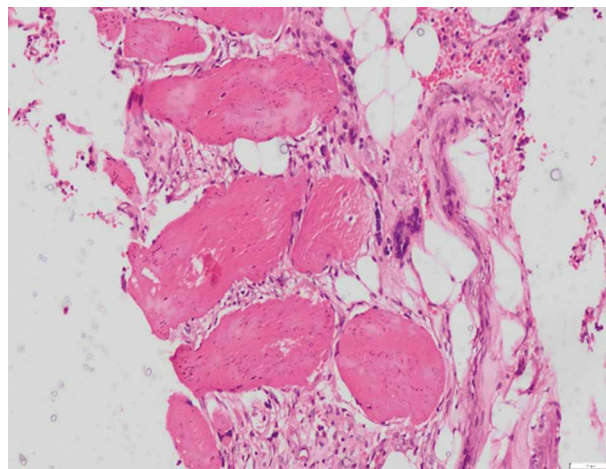


Рисунок 4. Больная 35 лет. Миозит. Значимых изменений в мышечном волокне нет, определяется воспалительный инфильтрат, а также некрозы и кровоизлияния. Гематоксилин-эозин x400.

Figure 4. Patient is 35. Myositis. There are no significant changes in the muscle fiber, an inflammatory infiltrate is determined, as well as necrosis and hemorrhage. Hematoxylin-eosin x400.

Заключение. Таким образом, современные подходы к диагностике заболеваний периферических нервов базируются не только на классических клинических и лабораторных методах исследований, но и в значительной мере могут опираться на морфологическую диагностику. Являясь высокоинформативным методом исследования, гистологическое изучение биопсийного материала требует проведе-

ния технически сложной процедуры, однако при ее квалифицированном проведении дает хороший результат. Полинейропатия неясного генеза — наиболее частый диагноз, который указан в направлении на биопсию. Изложенные морфологические методы исследования биоптатов нерва и получаемые при их использовании результаты позволяют неврологу оценить необходимость проведения такого рода диагностических процедур. Описанное морфологическое исследование в ряде сложных случаев может дать значительную информацию об этиологии и морфогенезе заболевания.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. **Conflict of interest.** The author declares no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки. **Financing.** The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. All patients gave written informed consent to participate in the study

ORCID авторов / ORCID of authors

Жукова Татьяна Владимировна/
Zhukova Tatsiana Vladimirovna
0000-0003-0263-3453

Белецкий Александр Валентинович/
Belecky Aleksandr Valentinovich
0000-0001-9604-2675

Рушкевич Юлия Николаевна/
Ruchkevich Yuliya Nikolaevna
0000-0002-6019-042X

Лухачев Сергей Алексеевич/
Lihachov Sergey Alekseevich
0000-0002-6019-042X

Литература /References

1. Mathis S., Magy L., Le Masson G. Value of nerve biopsy in the management of peripheral neuropathies. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2018; 18 (7): 589–602.
2. Dyck P.J., Dyck P.J.B., Englestad J. Pathologic alterations of nerves. In: Dyck P.J., Thomas P.K., eds. *Peripheral Neuropathy*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005: 733–741.
3. Weis J., Brandner S., Lammens M. Processing of nerve biopsies: A practical guide for neuropathologists. *Clinical Neuropathology*. 2012; 31 (1): 7–23.
4. Mellgren S.I., Lindal S. Nerve biopsy — some comments on procedures and indications. *Acta Neurol Scand*. 2011; 124 (Suppl. 191): 64–70.
5. King R., Ginsberg L. The nerve biopsy: indications, technical aspects, and contribution. In: Said G., Krarup C., eds. *Handbook of Clinical Neurology*. (3rd series): *Peripheral Nerve Disorders*. The Netherlands: Elsevier BV; 2013: 115 (1): 155–170.
6. Кондратьев С. А., Кондратьева Е. А., Кондратьев А. Н., Лестева Н. А., Куканов К. К., Иванова Н. Е. Мышечная слабость в раннем послеоперационном периоде после удаления опухоли головного мозга. *Российский нейрохирургический журнал им. профессора А. Л. Поленова*. 2021; 13(4):51–58. EDN: *ERBXEE* [Kondratiev S.A., Kondratieva E.A., Kondratiev A.N., Lesteva N.A., Kukanov K.K., Ivanova N.E. Muscle weakness in the early postoperative period after removal of a brain tumor. *Rossiiskii neirokhirurgicheskii zhurnal im. professora A.L. Polenova*. 2021; 13(4):51–58. EDN: *ERBXEE* (In Russ.).]