

УЛЬТРАСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СПИННОГО МОЗГА И ДЕЛЬТОВИДНОЙ МЫШЦЫ КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ СИНДРОМА ВЕРДНИГА-ГОФМАНА

Малкова Е.М.¹, Терещенко И.П.², Помогаева А.П.³

¹Новосибирский институт повышения квалификации работников здравоохранения, ²ООО «Базис Генотех», Новосибирск, Россия;

³Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия, e-mail: malkova_em@mail.ru

THE ULTRASTRUCTURAL STUDY OF THE SPINAL CORD AND THE DELTOID MUSCLE OF THE CLINICAL CASE OF THE VERDNIG-HOFFMANN SYNDROME

Malkova EM¹, Tereshchenko IP², Pomogaeva AP³

¹Novosibirsk Institute for the Advanced Training of Health Workers, ²«Bazis Genotekh» Ltd, Novosibirsk, Russia; ³Siberian State Medical

University, Tomsk, Russia; e-mail: malkova_em@mail.ru

Для цитирования:

Малкова Е.М., Терещенко И.П., Помогаева А.П. Ультроструктурное исследование спинного мозга и дельтовидной мышцы клинического случая синдрома Верднига-Гофмана // Морфологические ведомости. – 2018. – Том 26. – № 4. – С. 15-19. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.18\(26\).04.15-19](https://doi.org/10.20340/mv-mn.18(26).04.15-19)

For the citation:

Malkova EM, Tereshchenko IP, Pomogaeva AP. The ultrastructure analysis of the spinal cord and the deltoid muscle of the clinical case of the Werdnig-Hoffmann syndrome. *Morfologicheskie Vedomosti – Morphological Newsletter*. 2018 Dec 30;26(4):15-19. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.18\(26\).04.15-19](https://doi.org/10.20340/mv-mn.18(26).04.15-19)

Резюме: Синдром Верднига-Гофмана - инфантильная форма наследственной спинальной прогрессирующей мышечной атрофии с аутосомно-рецессивным типом наследования с частотой 1 на 10000 населения. Приводятся данные о комплексном ультрамикроскопическом изучении спинного мозга и дельтовидной мышцы клинического случая синдрома Верднига-Гофмана у новорожденного ребенка мужского пола, умершего в возрасте 1 месяц. В образцах сыворотки крови и ткани спинного мозга выделена РНК вируса краснухи. Описаны изменения структуры спинного мозга и дельтовидной мышцы. При ультроструктурном исследовании показано наличие вируса в ткани спинного мозга и эндотелиоцитах сосудов мышцы. В ткани спинного мозга на фоне деструкции нейронов был обнаружен вирус краснухи. Вирусные частицы локализовались как в цитоплазме сохранившихся олигодендроцитов, так и диффузно в деструктивно измененной ткани спинного мозга. Количество клеток в ткани спинного мозга было уменьшено, нарушена структура их митохондрий и обнаружена вакуолизация цитоплазмы. Для миелиновых волокон присуща гетерогенность толщины оболочек, неравномерное распределение, деформация контуров, вариабельность диаметров. Миелиновые волокна расслоенные, фрагментированные, осмиофильность утрачена. При исследовании образцов мышечной ткани преобладали деструктивно измененные мышечные волокна. При этом на фоне неравномерно выраженной атрофии мышечных волокон выявлена репродукция вируса краснухи в цитоплазме эндотелиоцитов капилляров и перicytes сосудов мышцы. Предположена этиологическая роль вируса краснухи в возникновении клинических симптомов, составляющих синдром спинальной мышечной атрофии, как варианта врожденной краснухи.

Ключевые слова: синдром Верднига-Гофмана, краснуха, электронная микроскопия, спинной мозг, дельтовидная мышца

Summary: The Werdnig-Hoffmann syndrome is an infantile form of hereditary spinal progressive muscle atrophy with an autosomal recessive mode of inheritance with a frequency of 1 per 10,000 population. The data on the complex ultramicroscopic study of the spinal cord and deltoid muscle of a clinical case of Werdnig-Hoffmann syndrome in a newborn male child who died at the age of 1 month are given. Rubella virus patterns of the RNA were isolated in serum and spinal cord tissue samples. Changes in the structure of the spinal cord and deltoid muscle are described. An ultrastructural study showed the presence of a virus in the tissue of the spinal cord and vascular endothelial cells of the muscle. In the tissue of the spinal cord against the destruction of neurons was detected rubella virus. Viral particles were localized both in the cytoplasm of preserved oligodendrocytes and diffusely in destructively altered tissue of the spinal cord. The number of cells in the spinal cord tissue was reduced, the structure of their mitochondria was disturbed, and vacuolization of the cytoplasm was detected. For myelin fibers there is inherent heterogeneity of the thickness of the membranes, uneven distribution, deformation of the contours, and variability of diameters. Myelin fibers stratified, fragmented, osmiophilia lost. In the study of muscle samples prevailed destructively modified muscle fibers. At the same time, against the background of an unevenly pronounced atrophy of muscle fibers, the reproduction of the rubella virus in the cytoplasm of capillary endotheliocytes and pericytes of muscle vessels was detected. The etiological role of the rubella virus in the onset of the clinical symptoms constituting spinal muscular atrophy syndrome as a variant of congenital rubella has been suggested.

Key words: Werdnig-Hoffmann syndrome, rubella, electron microscopy, spinal cord, deltoid muscle

Введение. Синдром Верднига-Гофмана (Werdnig-Hoffmann) (далее – СВГ) принято определять как инфантильную форму наследственной спинальной прогрессирующей мышечной атрофии с аутосомно-рецессивным типом наследования [1-2]. Заболевание было описано в 1891 году G. Werdnig, и в 1893 году J. Hoffmann. Частота данного синдрома составляет 1 на 10000 населения [3]. Клинические признаки проявления болезни появляются с первых часов и дней жизни, требуют проведения интенсивной терапии, в течение первых трех лет жизни ребенка болезнь часто заканчивается летальным исходом. Среди концепций возникновения СВГ существует предположение о первичном поражении передних рогов спинного мозга с последующей денервационной нейропатией или с первичной патологией мышц [2, 4]. Этиология спинальной мышечной атрофии не выяснена, однако установлена делеция гена 5q12-13, вовлеченного в реализацию спинальных мышечных атрофий, названного «survival motor neuron gene» (SMN) [5-6]. У детей с СВГ описывали преобладание периферических немиелинизированных нервных волокон или волокон с утраченной миелиновой оболочкой [2]. Среди причин возникновения различных демиелинизирующих заболеваний широко обсуждается воздействие вирусных инфекций [7-8]. Предположение о том, что СВГ, особенно его врожденная форма, может быть связан с течением внутриутробной вирусной инфекции, послужило основанием для проведения углубленного комплексного исследования

клинического и секционного материала. С момента описания синдрома в литературе приводятся лишь единичные данные о патоморфологических изменениях в тканях головного и спинного мозга, а также в пораженных мышцах [2, 7, 9]. Чаще всего авторы для установления клинического диагноза исследовали спинномозговую жидкость и определяли в сыворотке крови уровень креатинфосфокиназы, а для патоморфологического анализа использовали биоптаты атрофированных мышц [10].

Цель исследования – описание ультраструктурной характеристики тканей спинного мозга и дельтовидной мышцы клинического случая наблюдения синдрома Верднига-Гоффмана, а также поиск вероятной связи заболевания с конкретным инфекционным процессом.

Материалы и методы исследования. Проведено клинко-морфологическое исследование архивного материала тканей спинного мозга и дельтовидной мышцы новорожденного ребенка мужского пола, умершего в 1 месяц. В анамнезе отмечено, что он родился от второй беременности, первая беременность закончилась медицинским абортom. Гестационный период протекал с угрозой прерывания беременности. Женщина перенесла острое респираторное заболевание при сроке беременности 16 недель, этиология заболевания не уточнялась. Роды первые, в 40 недель, срочные, самопроизвольные, протекали с лихорадкой. При жизни ребенка проводили полимеразно-цепную реакцию с использованием наборов «Вектохлами-ДНК-ампли-100», «Векто-ЦМВ-ДНК-ампли-100», «Векто-ВПГ-ДНК-ампли-100», «Векто-Рубелла-РНК-ампли-100», «ВектоТоксо-ДНК-ампли-100», «ВектоУро-ДНК-ампли-100», «ВектоМико-ДНК-ампли-100» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск). ДНК *Ch. trachomatis*, *M. hominis*, *U. urealyticum*, *T. gondii*, вируса простого герпеса 1 типа, цитомегаловируса не были выявлены. Методом ОТ-ПЦР в крови была обнаружена РНК вируса краснухи. При прижизненной электромиографии обнаружено поражение мотонейронов спинного мозга на уровне C₂-S₈ и C₂-L₄ и их аксонов. В клиническом диагнозе пациента спинальная амиотрофия Верднига-Гоффмана, врожденная форма, тяжелое течение. Патологоанатомический диагноз пациента: спинальная амиотрофия Верднига-Гоффмана, врожденная форма, дистрофия и некроз двигательных нейронов спинного мозга и поперечнополосатых мышечных волокон; ателектазы в легких, серозно-десквамативная пневмония; жировая дистрофия гепатоцитов, дистрофические изменения паренхиматозных органов. Для молекулярно-биологического, микроскопического и ультраструктурного исследований были предоставлены образцы спинного мозга (передний участок, медиальная и задняя части шейного утолщения, передняя и задняя части поясничного утолщения) и фрагменты дельтовидной мышцы. Методом ОТ-ПЦР из образцов ткани передней части шейного утолщения выделена РНК вируса краснухи. Образцы ткани спинного мозга и дельтовидной мышцы фиксировали в 4% растворе параформальдегида при 4°C в течение 48 ч. Препараты для световой микроскопии заливали в парафиновые блоки и окрашивали гематоксилином и эозином. Просмотр препаратов и микрофотосъемка проводились на световом микроскопе Imager Z1 (Zeiss, Германия). Для электронной микроскопии образцы промывали в трех порциях раствора Хенкса, дофиксировали в 1% растворе четырехоксида осмия, заливали в смесь эпон и аралдита. Полутонкие срезы окрашивали азуром II. Ультратонкие срезы последовательно контрастировали спиртовым раствором уранилацетата и цитратом свинца, исследовали в электронном микроскопе JEM 1400 (Jeol, Япония), фотосъемку проводили с помощью встроенной цифровой камеры Jeol и цифровой камеры бокового ввода Veleta (SIS, Германия).

Результаты исследования и обсуждение. При микроскопическом исследовании ткани спинного мозга было показано, что границы серого и белого вещества практически не различались. Количество нейронов в передних рогах спинного мозга было уменьшено, они отличались гетерогенностью. В белом веществе спинного мозга отмечалось неравномерное распределение профилей миелиновых нервных волокон. Просветы волокон имели неправильную форму, их контуры деформировались. На парафиновых и полутонких срезах выявлялось множество оптически прозрачных участков за счет формирования множественных очагов некроза. Дистрофические изменения астроцитов проявлялись в виде эксцентрического расположения ядер и появления крупных вакуолей в цитоплазме или же в виде изменения оптической плотности цитоплазмы и пикноза ядер. В олигодендроцитах форма ядер варьировала от круглых и овальных до вытянутых с неровными контурами. В ядрах хроматин распределялся в виде множественных круглых образований. Часто ядра олигодендроцитов выглядели оптически прозрачными, ядрышки не визуализировались. В цитоплазме находили множественные вакуоли. Количество клеток микроглии незначительно увеличивалось на отдельных участках, они диффузно распределялись в ткани белого и серого вещества спинного мозга. При электронно-микроскопическом исследовании в ткани спинного мозга на фоне деструкции нейронов был обнаружен вирус краснухи. Вирусные частицы локализовались как в цитоплазме сохранившихся олигодендроцитов, так и диффузно в деструктивно измененной ткани спинного мозга. Множественные электронно-прозрачные участки неравномерно распределялись как в сером, так и в белом веществе спинного мозга. Количество клеток в ткани спинного мозга было уменьшено. Единичные астроциты, обнаруженные в изученных образцах ткани спинного мозга, имели крупное ядро с маргинальной локализацией хроматина. Часть хроматина располагалась в виде скоплений на фоне электронно-прозрачной нуклеоплазмы. В цитоплазме выявлены очаги парциального некроза, митохондрии с деструкцией наружной мембраны и крист (их фрагментацией и разрушением). Сохранились единичные профили гранулярной эндоплазматической сети, наблюдалось скопление рибосом.

В нейронах отмечен выраженный отек цитоплазмы и деструкция клеточных органелл и цитоплазматической мембраны. Хроматин распределялся в ядрах сохранившихся олигодендроцитов в виде множественных круглых скоплений. В очагах тканевого распада прослеживались неоднородные изменения митохондрий, в которых на фоне набухания отмечалась деструкция и фрагментация крист. Фрагменты гранулярного цитоплазматического ретикула и комплекса Гольджи характеризовались скоплениями зернистого осмиофильного вещества (вирусные фабрики). Общая картина патологических изменений нейрона характеризовалась тем, что на фоне деструктивно измененной ткани визуализировались круглые ядра олигодендроцитов, при этом контуры цитоплазматической мембраны клетки не просматривались. Хроматин в ядрах олигодендроцитов конденсировался преимущественно маргинально, а также располагался в виде небольших круглых конгломератов на фоне электронно-прозрачной нуклеоплазмы (рис. 1). Встречались и фрагменты ядер олигодендроцитов.

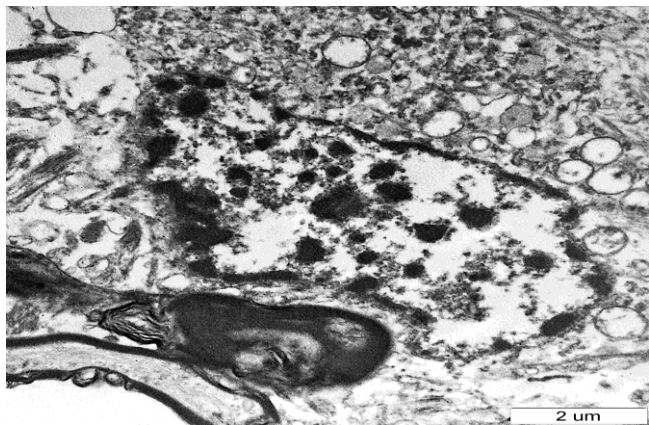


Рис. 1. Передний участок шейного утолщения спинного мозга. Ядро олигодендроцита с характерным расположением хроматина. Цитоплазма заполнена вирусными частицами. Деформация профилей миелиновых волокон, расслоение миелиновых оболочек, изменение структуры осевых цилиндров. Электронограмма.

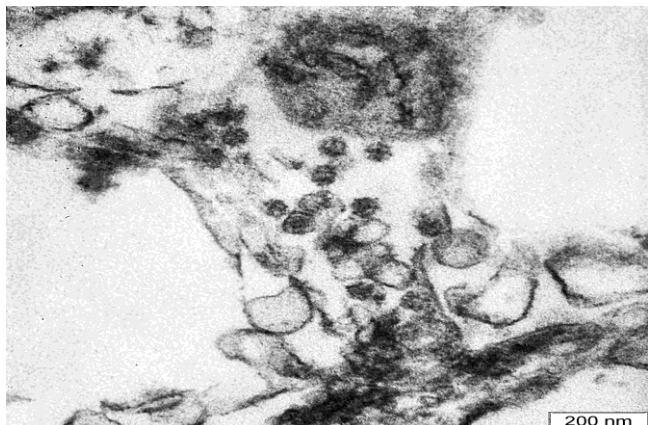


Рис. 2. Передний участок шейного утолщения спинного мозга. Множественные вирусные частицы в очаге деструкции. Электронограмма.



Рис. 3. Передний участок шейного утолщения спинного мозга. Деформация профилей миелиновых волокон, расслоение миелиновых оболочек, изменение структуры осевых цилиндров. Электронограмма.

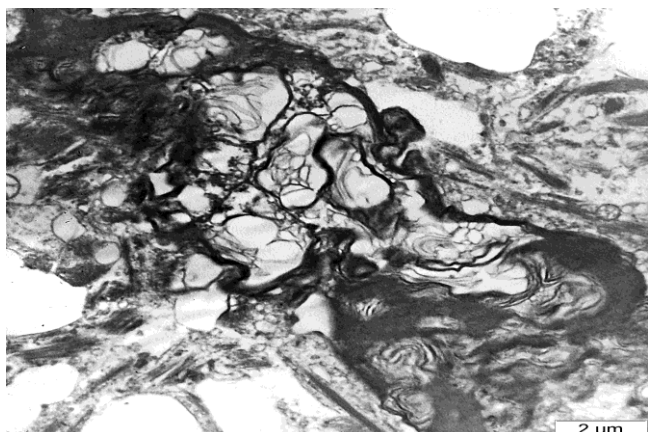


Рис. 4. Передний участок шейного утолщения спинного мозга. Деформация профилей миелиновых волокон, расслоение миелиновых оболочек («вспененные» миелиновые оболочки), изменение структуры осевых цилиндров. Электронограмма.

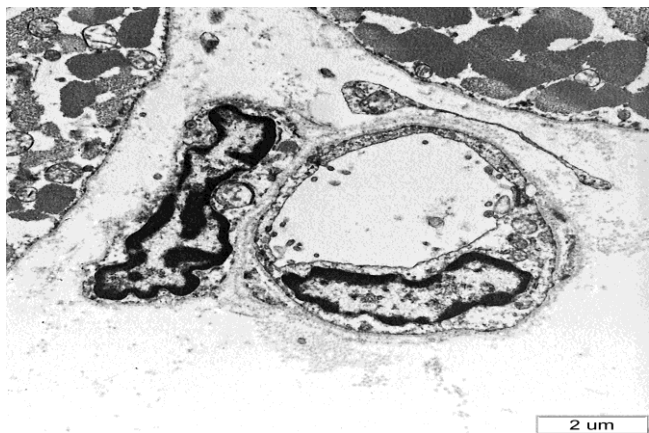


Рис. 5. Дельтовидная мышца. Вирус краснухи находится в цитоплазме эндотелиальной клетки и перицита. Прослеживается репликация вируса на люминарной поверхности цитоплазматической мембраны эндотелиоцита. Электронограмма.

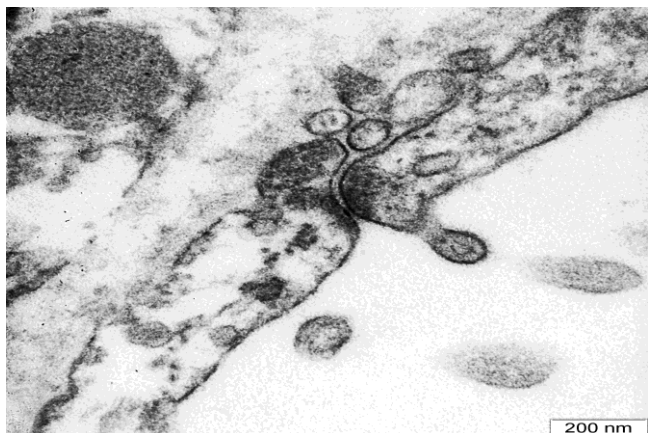


Рис. 6. Дельтовидная мышца. Репликация вируса краснухи на люминарной поверхности цитоплазматической мембраны эндотелиоцита. Электронограмма.

Деструктивно измененные участки ткани спинного мозга содержали очаговые скопления митохондрий, часть из них сохраняла регулярное расположение крист, тогда как в других – кристы разрушались, а сам матрикс был просветлен. Отдельные митохондрии имели неправильную, деформированную форму и увеличенные размеры. Очаговые скопления крупных митохондрий содержали органеллы овальной, округлой, вытянутой или причудливой формы. Нарушалась целостность наружной мембраны и упорядоченное расположение крист. В матриксе локализовались крупные частицы с электронно-плотной оболочкой. Обращало на себя внимание большое количество вакуолей, содержащих круглые частицы размером 60-80 нм, в некоторых из них просматривались центральные электронно-плотные структуры овальной или округлой формы (реже – треугольной или электронно-плотное хлопьевидное вещество). На фоне разрушенной ткани вирусные частицы различной степени зрелости локализовались не только в вакуолях, но и располагались диффузно, формируя крупные скопления (рис. 2). Расположение вирусных частиц в цитоплазматических вакуолях является специфическим морфологическим признаком краснухи [11].

Для миелиновых волокон была свойственна гетерогенность толщины оболочек, неравномерное распределение, изменение контуров образований (рис. 3, 4), варибельность диаметров. Миелиновые волокна расслаивались и фрагментировались, утрачивалась их осмиофильность. Их профили принимали причудливую форму, спиралевидно закручивались, внутренняя структура нарушалась. При расслоении миелиновых мембран появлялись мелкие и крупные вакуоли. Количество слоев в миелиновых волокнах варьировало. Создавалось впечатление о «вспененном» состоянии миелинового слоя. В просветах отдельных волокон находились дополнительные миелиновые образования, имеющие неправильную форму, или тонкие миелиновые структуры и их фрагменты. В просветах деформированных миелиновых волокон осевые цилиндры содержали крупные вакуоли. Их матрикс выглядел неравномерным. Нередко в одном волокне присутствовало и мелко- и крупнозернистое вещество. Входящие в состав осевого цилиндра нейротрубочки и нейрофиламенты, а также кристы митохондрий подвергались деструкции. Часть митохондрий сохраняла четкие упорядоченные кристы на фоне уплотненного матрикса. Аксоплазматические пузырьки, являющиеся участками гладкого эндоплазматического ретикулума, увеличивались. В целом, структура осевых цилиндров миелиновых волокон нарушалась за счет появления неравномерно распределенных оптически прозрачных вакуолей и изменения электронной плотности аксона. В осевых цилиндрах появлялись и гигантские митохондрии, сохраняющие двуслойную наружную мембрану. Расположение крист выглядело неупорядоченным, образовывались электронно-прозрачные полости с неровными контурами и электронно-плотные структуры неправильной формы. В целом, можно говорить о гетерогенности митохондрий. Часть осевых цилиндров утрачивали миелиновую оболочку. В просветах миелиновых волокон крупные оптически прозрачные вакуоли занимали до 2/3 площади просвета волокна, они отграничивались тонкими миелиновыми волокнами. Вирусные частицы локализовались вдоль фрагментированных миелиновых структур. В части миелиновых волокон прослеживалось формирование выростов неправильной формы, направленных в толщу осевого цилиндра. Следует отметить, что в ткани спинного мозга не выявлено выраженной воспалительно-клеточной инфильтрации. Отсутствие интенсивной лимфоцитарной инфильтрации спинного мозга исключало аутоиммунный характер поражения.

При исследовании образцов мышечной ткани в описываемом клинико-морфологическом наблюдении преобладали деструктивно измененные мышечные волокна. При этом на фоне неравномерно выраженной атрофии мышечных волокон выявлена репродукция вируса краснухи в цитоплазме эндотелиоцитов капилляров и перичитах (рис. 5, 6). Просветы капилляров не были изменены, также не выявлены деструктивные изменения в структуре эндотелиальных клеток. По данным Y. Kobayashi с соавт. [7], при СВГ не характерны патологические изменения капилляров мышечной ткани в виде набухания эндотелиоцитов и уменьшения просветов капилляров.

Заключение. Проведенное молекулярно-биологическое и электронно-микроскопическое исследование позволило выявить наличие РНК вируса краснухи у пациента с синдромом Верднига-Гофмана в образцах крови и ткани спинного мозга, а также вирусных частиц в деструктивно измененных олигодендроцитах спинного мозга и эндотелиальных клетках атрофированных мышц. Полученные данные соответствовали течению генерализованной вирусной инфекции у новорожденного ребенка с синдромом Верднига-Гофмана. Следует отметить эпидемиологические признаки, подтверждающие инфекционный генез патологического процесса: выявление заболевания во время эпидемической вспышки краснухи в Новосибирске, перенесенная в 16 недель гестации вирусная инфекция у матери, а также признаки инфекции у матери в родах (повышение температуры) и у ребенка сразу после рождения (пневмония). Это позволяет предположить течение внутриутробной инфекции у ребенка и расценить выявленный синдром Верднига-Гофмана как вариант клинических проявлений врожденной краснухи.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Hausmanowa-Petrusewicz I, Fidzianska A. Spinal muscular atrophy: foetal-like histopathological pattern in Werdnig-Hoffmann disease. *Bull NY Acad Med.* 1974;50(11):1157-1172.
2. Palmer-Morales Y, Pacheco-Flores G, Ames-Guevara Y, Gaxiola-Apodaca M, Gaspar-Franco D, Landavazo-Acuña G, Hernández-Rocha F. Two cases of Werdnig-Hoffmann disease. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2010;48(3):317-319.
3. Swinyard CA. Concepts of multiple congenital contractures (arthrogryposis) in man and animals. *Teratology.* 1982;25:247-248.
4. Iannaccone ST. Neuromuscular disease and neurorehabilitation. *Semin Neurol.* 1998;18:19-26.
5. Migita M, Uchikoba Y, Orimo H, Shimada T, Shimada T, Matsumoto T, Hayakawa J, Fujino O, Saitoh M, Fukunaga Y. Genetic diagnosis of Werdnig-Hoffmann disease: a problem for application to prenatal diagnosis. *J Nippon Med Sch.* 2003; 70(1):45-48.
6. Goutieres F, Aicardi J, Farkas E. Anterior horn cell disease associated with pontocerebellar hypoplasia in infants. *J Neurology, Neurosurgery, Psychiatry.* 1977;40:370-378.

7. Kobayashi Y, Suzuki H, Iinuma K, Tada K, Yamamoto TY. Endothelial alterations of skeletal muscle capillaries in childhood myopathies. *Tohoku J Exp Med.* 1983;140(4):381-389.
8. Bosma TJ, Etherington J, O'Shea S, Corbett K, Cottam F, Holt L, Banatvala JE, Best JM. Rubella virus and chronic joint disease: is there an association? *J Clin Microbiol.* 1998;36(12):3524-3526.
9. Pearn JH, Wilson J. Acute Werdnig-Hoffmann disease. *Arch Dis Child.* 1973;48:425-430.
10. Bendon RW, Sebastian MM. Stillborn infant with calcified chorionic epithelium, corneal scarring, and pericarditis. *Fetal Pediatr Pathol.* 2009;28:274-278.
11. Risco C, Carrascosa JL, Frey TK. Structural maturation of rubella virus in the Golgi complex. *Virology.* 2003;312:261-269.

Авторская справка

Малкова Елена Михайловна, доктор медицинских наук, преподаватель, Новосибирский институт повышения квалификации работников здравоохранения, Новосибирск, Россия; e-mail: malkova_em@mail.ru

Терещенко Ирина Петровна, кандидат медицинских наук, ведущий специалист по научно-методологической работе, ООО «Базис Генотех», Новосибирск, Россия; e-mail: irinat1980@gmail.com

Помогаева Альбина Петровна, доктор медицинских наук, профессор, Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия; e-mail: pomogaevaap@mail.ru