

Оптимизация преаналитического этапа обработки материала для проведения гистохимического исследования биоптатов скелетной мышцы в диагностике нервно-мышечных заболеваний

А. М. Сычева¹, В. Д. Назаров², С. В. Лапин², М. Г. Рыбакова¹, Д. И. Руденко³

¹Кафедра патологической анатомии с патологоанатомическим отделением Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова Минздрава России; Россия, 197022 Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6–8, корп. 30;

²Лаборатория диагностики аутоиммунных заболеваний Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова Минздрава России; Россия, 197022 Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6–8, корп. 28;

³СПб ГБУЗ «Городская многопрофильная больница №2»; Россия, 194354 Санкт-Петербург, пер. Учебный, 5

Контакты: Сычева Анастасия Михайловна ussanas@mail.ru

Диагностика нервно-мышечных заболеваний затруднена многообразием клинических проявлений и требует использования дополнительных методов, важное место среди которых занимает патоморфологическое исследование биопсии скелетной мышцы. Несмотря на то что процедура взятия мышечной биопсии технически не сложна, для получения информативного материала требуется соблюдение множества условий на этапах преаналитической обработки полученных образцов ткани. Нарушение технологии взятия, хранения и фиксации материала способствует образованию артефактов, которые ограничивают возможности дальнейшего анализа морфологических изменений ткани биоптата. Проведено сравнение эффективности различных методов криообработки образцов мышечной ткани и изготовления гистологических препаратов с последующей оценкой морфологических изменений. В результате были выявлены основные причины возникновения артефактов. Обозначен оптимальный метод обработки мышечных биоптатов, позволяющий максимально предотвратить появление артефактов и обеспечить сохранность ткани для исследования.

Ключевые слова: биопсия мышцы, гистохимическое исследование, артефакты, нервно-мышечные заболевания

Для цитирования: Сычева А. М., Назаров В. Д., Лапин С. В. и др. Оптимизация преаналитического этапа обработки материала для проведения гистохимического исследования биоптатов скелетной мышцы в диагностике нервно-мышечных заболеваний. *Нервно-мышечные болезни* 2019;9(2):21–9.

DOI: 10.17650/2222-8721-2019-9-2-21-29

Optimization of the pre-analytical stage of material processing for histochemical examination of skeletal muscle biopsies in the diagnosis of neuromuscular diseases

A.M. Sycheva¹, V.D. Nazarov², S.V. Lapin², M.G. Rybakova¹, D.I. Rudenko³

¹Department of Pathological Anatomy with Pathoanatomical Unit of Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Ministry of Health of Russia; Build. 30, 6–8 L'va Tolstogo Str., Saint Petersburg 197022, Russia;

²Laboratory of Autoimmune Diseases Diagnostic of Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Ministry of Health of Russia; Build. 28, 6–8 L'va Tolstogo Str., Saint Petersburg 197022, Russia;

³The Saint Petersburg Department of Health "City Multi-Field Hospital №2" of Emergency Medicine, Ministry of Health of Russia; 5 Uchebny Lane, Saint Petersburg 194354, Russia

Diagnosis of neuromuscular diseases is complicated by the variety of clinical manifestations and requires the use of additional methods, an important place among which is the pathomorphological study of skeletal muscle biopsy. Despite the fact that the procedure for taking a muscle biopsy is not technically difficult, to obtain informative material a multitude of conditions must be observed at the stages of pre-analytical processing of the obtained tissue samples. Violation of the technology of taking, storing and fixing the material contributes to the formation of artifacts that limit the possibilities for further analysis of the morphological changes in tissue biopsy. A comparison was made of the effectiveness of various methods for cryoprocessing of muscle tissue samples and the manufacture of histological specimens with a subsequent assessment of morphological changes. As a result, the main causes of artifacts were identified. The optimal method for processing muscle biopsy specimens is indicated, which makes it possible to prevent the appearance of artifacts as much as possible and to ensure the preservation of tissue for research.

Key words: muscle biopsy, histochemical study, artifacts, neuromuscular diseases

For citation: Sycheva A. M., Nazarov V. D., Lapin S. V. et al. Optimization of the pre-analytical stage of material processing for histochemical examination of skeletal muscle biopsies in the diagnosis of neuromuscular diseases. *Nervno-myshechnye bolezni = Neuromuscular Diseases* 2019;9(2):21–9.

Введение

Проведение дифференциального диагноза нервно-мышечной патологии часто осложняется многообразием клинических проявлений и требует использования дополнительных методов диагностики. Наряду с инструментальными, лабораторными и генетическими исследованиями гистологический и гистохимический анализ биопсии мышцы является наиболее специфичным и информативным методом, позволяющим распознать характер повреждения скелетных мышц и определить нозологическую форму заболевания.

Выбор локализации мышцы для биопсии определяется по совокупности данных неврологического осмотра и результатов инструментальных исследований (ультразвуковое исследование, магнитно-резонансная томография, электронейромиография). Взятие материала может быть осуществлено путем открытой или игольной биопсии, при этом основными критериями являются достаточный объем мышечной ткани и ее минимальная травматизация [1–3]. Для гистохимического анализа ткани предпочтительнее исследование криотомных срезов нативного материала скелетной мышцы без применения фиксирующих растворов, с учетом того, что фиксация приводит к снижению активности ферментов в тканях.

В основе гистологического окрашивания клеток и тканей лежат физико-химические свойства их структур и реактивов (кислотность, диффузия, адсорбция, абсорбция, растворимость и др.). Гистологические методы окраски, такие как окрашивание гематоксилином и эозином, пикрофуксином по ван Гизону, трихромом по Гомори, позволяют оценить общую гистоархитектонику биоптата (размер и форму мышечных волокон, распределение волокон разного размера в образце, число и расположение ядер, наличие гиперсокращенных, базофильных, некротизированных мышечных волокон, распространенность изменений (отдельные волокна или группы), характер и выраженность клеточной инфильтрации, наличие фагоцитоза, пери- и эндомизиальный фиброз, косвенные признаки митохондриальных нарушений, некоторые ультраструктурные изменения (немалиновые стержни, цитоплазматические и редуцированные тельца, тубулярные скопления, вакуоли «с ободком»), состояние миелиновой оболочки нервов). В свою очередь, метаболические характеристики биоптата скелетной мышцы доступны для оценки при использовании гистохимических методик окрашивания, так как они основаны на специфической реакции определенных химических веществ и их продуктов в ткани. К обязательным методам исследования мышечного биоптата относятся реакции, позволяющие оценить активность окислительных (цитохром оксидаза, сукцинат дегидрогеназа, никотинамидадениндинуклеотидтетразолин редуктаза), гидролитических (кислая и щелочная фосфатаза, неспецифическая эстераза) ферментов

и аденозинтрифосфатазы. Также используются методы, выявляющие метаболические нарушения – ШИК-реакция (periodic acid Schiff (PAS) reactio), окрашивание масляным красным O и конго красным [1, 4, 5].

Информативность морфологического исследования зависит от соблюдения правил проведения преаналитического этапа обработки биопсийного материала. Их нарушение может привести к возникновению артефактов, которые деформируют гистоархитектонику и изменяют гистохимические свойства образца, что в итоге затрудняет или делает невозможной трактовку морфологической картины скелетной мышцы [1]. Примеры возможных искусственных изменений представлены в табл. 1. В данной работе проводится анализ основных ошибок обработки биоптатов скелетной мышцы и рассматриваются способы, позволяющие избежать или минимизировать появление артефактов.

Несмотря на актуальность проведения комплексного морфологического анализа биоптатов скелетных мышц у неврологических пациентов и наличие стандартных протоколов гистологических и гистохимических методов окрашивания, это исследование проводится ограниченно лишь в отдельных специализированных центрах. В некоторой степени эта проблема обусловлена недостаточной технической оснащенностью лабораторий (криотом, редкие, дорогостоящие, не используемые в рутинной практике реактивы) и сложностью проведения всех ступеней преаналитического этапа обработки материала.

Цель данного исследования – разбор основных практических ошибок и оптимизация проведения преаналитического этапа обработки биоптатов скелетной мышцы у пациентов с нервно-мышечной патологией.

Материалы и методы

Проведено морфологическое исследование 5 фрагментов аутопсийного материала скелетных мышц от пациентов без установленной нервно-мышечной патологии и биоптатов скелетных мышц 12 пациентов, которым после неврологического осмотра, выполнения электронейромиографии и магнитно-резонансной томографии, рекомендовалось взятие мышечной биопсии [1, 2, 6]. Для анализа использовали фрагменты скелетной мышцы 5 пациентов с первичными миопатиями (воспалительные, прогрессирующие мышечные дистрофии) и 7 – с нейрогенным повреждением мышц (центрального и периферического генеза).

Взятие биоптата мышцы у всех пациентов проводили открытым способом. При выполнении хирургической манипуляции использовали атравматические инструменты (анатомический пинцет, атравматический шовный материал), механическое воздействие на биоптат было минимизировано с целью уменьшения «биопсийной травмы» исследуемого материала. Оптимальные размеры мышечного биоптата для исследования: длина 0,8–1,0 см, диаметр 0,4–0,5 см. Образцы

Таблица 1. Возможные артефакты изменения на этапах обработки биоптата скелетной мышцы

Table 1. Possible artifactual changes at the stages of skeletal muscle biopsy processing

Этап Stage	Причина Cause	Возможные артефакты Possible artifacts
Взятие биоптата скелетной мышцы Skeletal muscle biopsy	Инфильтрация мышечной ткани раствором анестетика, форсированное механическое воздействие на мышечную ткань хирургическими инструментами Infiltration of muscle tissue with an anesthetic solution, forced mechanical action on muscle tissue with surgical instruments	Деформация, сдавление, нарушение ориентации и разволокнение миоцитов в пучке, появление гиперсокращенных волокон Deformation, compression, disturbance of orientation and separation of fibers of myocytes in the beam, the appearance of hyper-reduced fibers
Транспортировка образца в лабораторию Transportation of the sample to the laboratory	Длительное время транспортировки Long transport time	Ослабление или отсутствие реакции некоторых ферментов при гистохимических методах окраски The weakening or absence of the reaction of certain enzymes during histochemical staining methods
	Транспортировка образца в большом количестве изотонического солевого раствора Transporting the sample in a large amount of isotonic saline	Образование оптических пустот (ледяных кристаллов), нарушающих архитектуру волокна The formation of optical voids (ice crystals) that violate the architecture of the fiber
Замораживание Freezing	Недостаточно быстрое замораживание биоптата Not fast freezing biopsy	Образование оптических пустот (ледяных кристаллов), нарушающих архитектуру волокна The formation of optical voids (ice crystals) that violate the architecture of the fiber
	Слишком быстрое замораживание Freeze too fast	Образование трещин в биоптате Cracking biopsy specimens
Изготовление криотомных срезов Production of cryotomic cuts	«Толстые» срезы (более 10 мкм) «Thick» sections (more than 10 μM)	Формирование складок, неравномерное распределение и окрашивание реактивами The formation of folds, uneven distribution and staining reagents
	Хранение при комнатной температуре снятых на стекло криотомных срезов Storage at room temperature shot on the glass of cryotomic slices	Множественные трещины саркоплазмы при окраске Multiple sarcoplasmic cracks during staining

мышц доставляли в лабораторию в течение 1 ч после процедуры забора материала, обернутыми в марлевую или нейлоновую салфетку, слегка смоченную физиологическим раствором (для предотвращения высыхания образца) в контейнере без фиксирующих растворов.

Для получения наиболее полного представления о патологическом процессе каждый биоптат разделялся на 2 части, одна из которых была заморожена, а другая зафиксирована в 10 % растворе формалина и залита в парафин. Для анализа гистохимических свойств информативнее исследование замороженного образца, так как при этом способе обработки материала не изменяются структурные элементы клетки, в частности, не происходит денатурация белков.

На этапе подготовки исследования на аутопсийном материале было выполнено сравнение состояния препаратов при различных методиках заморозки образца: в условиях камеры криотома с температурным режимом $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$ при использовании геля *O.C.T. Tissue Tek* для изготовления криоблоков; при температуре жидкого азота с гелем *O.C.T. Tissue Tek* для изготовления криоблоков; в жидком азоте без промежуточной

среды и при температуре жидкого азота с использованием промежуточной среды (изопентан). Методом выбора в дальнейшей работе с биопсийным материалом оказался последний способ, при котором отмечались минимальные артефакты изменения.

Изопентан в емкости небольшого объема погружали в жидкий азот до перехода его в твердое агрегатное состояние. Затем изопентан нагревали при комнатной температуре до момента, когда 2/3 объема вещества перейдут в жидкую фазу. В раствор для замораживания погружали образцы мышц на 15–20 с. Так как патологические изменения определяются по всей длине мышечного волокна, для увеличения количества представленных в срезе и доступных для исследования миоцитов биоптаты должны быть ориентированы так, чтоб в срез попадали поперечные сечения мышечных волокон.

Формирование криотомных срезов проводили при температурном режиме камеры криотома $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$. Толщина криотомных срезов мышцы варьировала в пределах 6–14 мкм.

После криообработки из биоптатов изготавливали препараты, окрашенные с применением реакций,

Таблица 2. Стандартные виды окрашивания для исследования мышечного биоптата
Table 2. Standard types of staining for the study of muscle biopsy

Окраска Staining	Значение Value
Гематоксилин и эозин Haematoxylin and eosin (H&E)	Оценка общей гистоархитектоники образца: формы и размера мышечных волокон, распространенности изменений, локализации ядер и их распределения в мышечном волокне, наличия очаговых изменений (некротизированные, регенерирующие, гиперсжатые, базофильные волокна) и их выраженности (отдельные волокна или группы), определение наличия клеточной инфильтрации и изменений со стороны сосудов Assessment of the total histoarchitectonics of the sample: the shape and size of muscle fibers, the prevalence of changes, the localization of nuclei and their distribution in the muscle fiber, the presence of focal changes (necrotic, regenerating, hypercontracted, basophilic fibers) and their severity (individual fibers or groups), detection of cell infiltration and changes in the vessels
Пикрофуксин по ван Гизону van Gieson's picro-fuchsin stain (VG)	Оценка объема соединительной ткани в эндомизии, перимизии Estimation of connective tissue volume in endomysium, perimysium
Трихром по Гомори Gomori trichrome (TG)	Выявление митохондриальной патологии и некоторых ультраструктурных нарушений (вакуоли «с ободком», цитоплазматические тельца, немалиновые стержни, тубулярные скопления); определение миелина в периферических нервах Detection of mitochondrial pathology and some ultrastructural abnormalities (vacuoles with "a rim", cytoplasmic bodies, non-crimson rods, tubular accumulations); definition of myelin in peripheral nerves
Аденозинтрифосфатаза Adenosine triphosphatase (ATPase)	При разных значениях pH среды (pH 10,4; 4,7; 4,3) демонстрирует распределение мышечных волокон по типам, сгруппированность и наличие преобладания миоцитов какого-либо типа At different pH values of the medium (pH 10.4; 4.7; 4.3) to demonstrate the distribution of muscle fibers by type, grouping and the presence of a predominance of myocytes of any type
Никотинамидадениндинуклеотид тетразолия восстановленный Reduced nicotinamide adenine dinucleotidetetrazolium reductase (NADH-TR)	Выявление миофибриллярных нарушений, распределение мышечных волокон по типам Detection of myofibrillary disorders; distribution of muscle fibers by type
Сукцинатдегидрогеназа Succinate dehydrogenase (SDH)	Выявление митохондриальных нарушений, распределение мышечных волокон по типам Detection of mitochondrial disorders, distribution of muscle fibers by type
Цитохромоксидаза Cytochrome oxidase (COX)	
Неспецифическая эстераза Nonspecific esterase	Выявление активности литических ферментов, реактивных изменений эндотелия, нервно-мышечных и мышечно-сухожильных переходов Detection of lytic enzyme activity, reactive changes of the endothelium, neuromuscular and muscle-tendon transitions
Кислая фосфатаза Acid phosphatase (ACP)	Положительное окрашивание при воспалительных миопатиях демонстрирует активность лизосомальных ферментов Positive staining in inflammatory myopathies demonstrates the activity of lysosomal enzymes
Щелочная фосфатаза Alkaline phosphatase (ALP)	Положительное окрашивание при воспалительных миопатиях демонстрирует активность литических ферментов, реактивные изменения со стороны эндотелия Positive staining in inflammatory myopathies demonstrates the activity of lytic enzymes, reactive changes in the endothelium
ШИК-реакция Periodic Acid Schiff (PAS)	Распределение гликогена в мышечном волокне (наличие вакуолей, содержащих гликоген), выявление гликогенозов, наличия «белых» волокон The distribution of glycogen in the muscle fiber (the presence of vacuoles containing glycogen), the detection of glycogenosis, presence of "white" fibers
Масляный красный O Oil Red O	Определение размера и распределения липидных капель в цитоплазме волокон, выявление нарушений липидов Determination of the size and distribution of lipid droplets in the cytoplasm of fibers, detection of lipid abnormalities
Конго красный Congo red staining	Выявление отложений амилоида Detection of amyloid deposits

указанных в табл. 2. Первоначально при помощи обзорных окрасок (гематоксилин и эозин, пикрофуксин по ван Гизону, трихром по Гомори) проводили оценку

общей гистоархитектоники мышечного образца: изменения формы и размеров миоцитов, расположение ядер, объем соединительной ткани в пери- и эндомизии,

наличие в саркоплазме включений со специфическим окрашиванием. Затем оценивали распределение мышечных волокон по типам. Выявить различия между волокнами I и II типа можно при реакциях с окислительными ферментами (цитохромоксидаза, сукцинатдегидрогеназа, никотинамидадениндинуклеотидтетразолинредуктаза), ШИК-реакцией и с помощью окраски масляным красным O, но при многих патологических процессах результат этих окрасок может меняться. К примеру, при хронических воспалительных миопатиях возникают вторичные митохондриальные нарушения, перекрестная реакция с цитохромоксидазой и сукцинатдегидрогеназой демонстрирует «цитохромоксидаза-негативные» волокна. Исходя из этого, методом выбора гистохимического окрашивания для типирования мышечных волокон была выбрана реакция с аденозинтрифосфатазой в щелочной (pH = 10,4), кислой (pH = 4,3) и промежуточной (pH = 4,7) среде

буфера. Гистологические и гистохимические реакции проводились по стандартным протоколам окрашивания компании-производителя реактивов (Bio Optica, Италия).

Результаты

Преимуществом использованного нами метода явилось полное сохранение гистоархитектоники ткани, которое оценивали по следующим критериям: сохранность гистоархитектоники мышечных волокон (до 85 % миоцитов в срезе сохранены), отсутствие артефактов, соответствие окрашивания образца контролю.

При хранении и транспортировке образца мышцы в избыточном количестве изотонического раствора NaCl (0,9 %) происходит перераспределение жидкости и образование на этапе заморозки крупных оптических пустот, представленных кристаллами льда (рис. 1а). При криообработке биоптата скелетной мышцы в условиях камеры криотома с температурным режимом -26°C

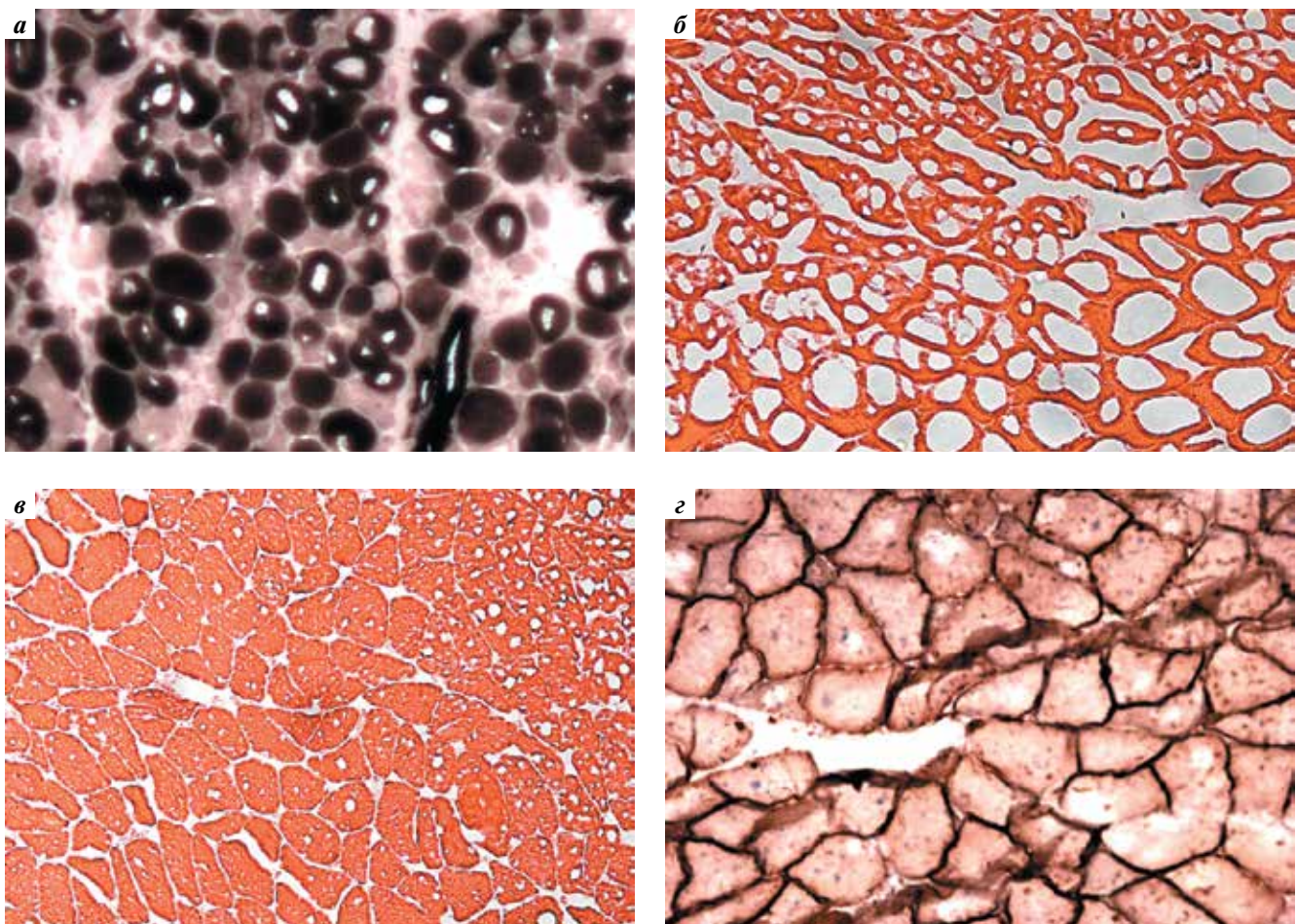


Рис. 1. Артефакты, возникающие при изготовлении гистологических препаратов: а – ледяные кристаллы при транспортировке биоптата в большом количестве изотонического солевого раствора NaCl 0,9 % и последующей заморозке; б – «ледяные вакуоли» в результате замораживания с использованием геля O.C.T. Tissue Tek для изготовления криоблоков при температуре -26°C ; в – то же, что и (б) при температуре жидкого азота; г – «толстый» срез (16 мкм) с формированием складок, неравномерное распределение реактива на этапе окрашивания

Fig. 1. Artifacts arising in the manufacture of histological preparations: а – ice crystals during transportation of biopsy in a large amount of 0.9 % isotonic saline NaCl solution and subsequent freezing; б – “ice vacuoles” as a result of freezing with the gel O.C.T. Tissue Tek for the manufacture of cryoblock at -26°C ; в – the same as (б) at the temperature of liquid nitrogen; г – “thick” cut (16 μm) with the formation of folds, uneven distribution of the reagent at the stage of dyeing

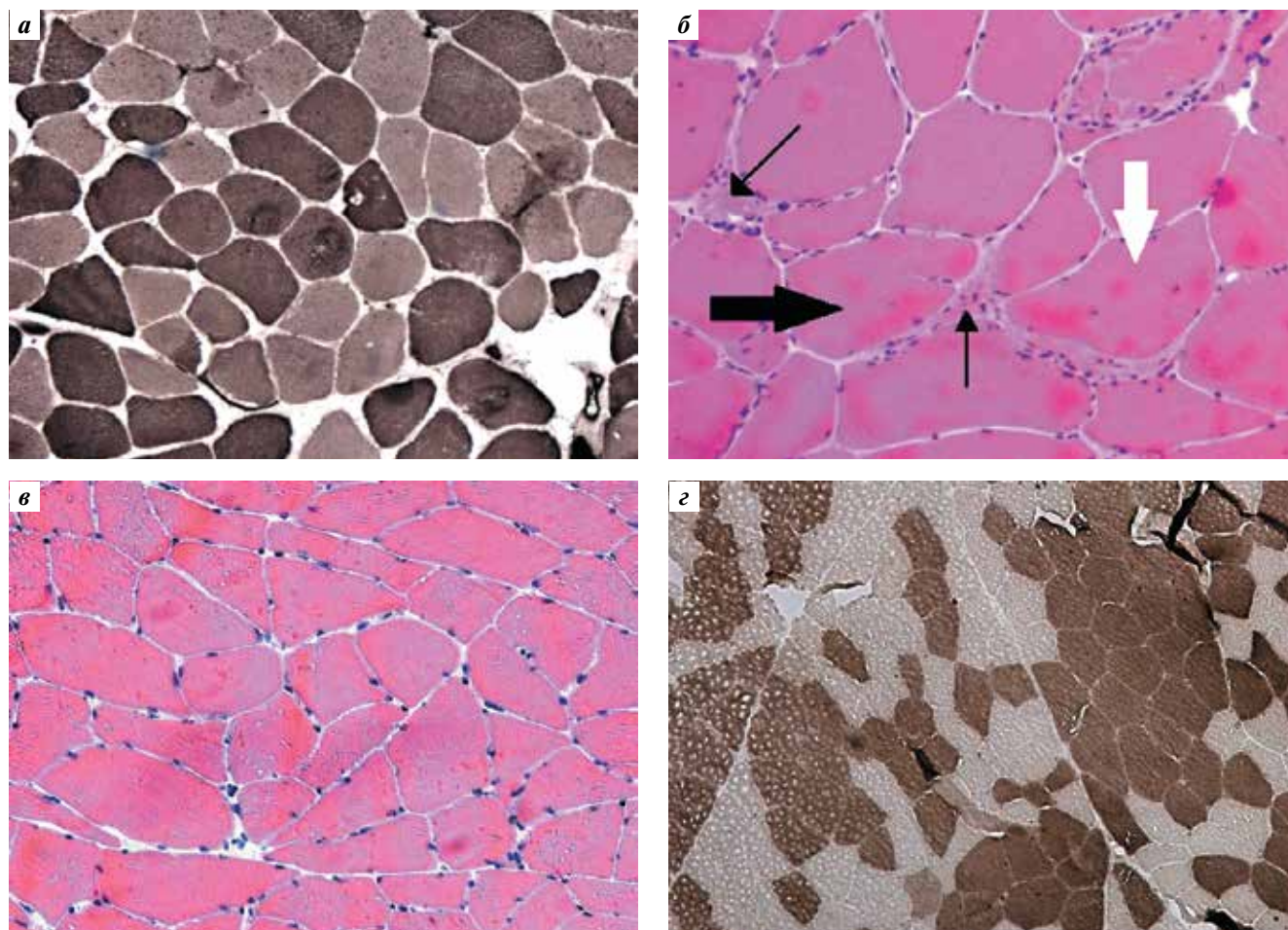


Рис. 2. Морфологические изменения миоцитов при нервно-мышечных заболеваниях. Первичное поражение мышц: а – миоциты округлой формы, распределение волокон по типу «шахматной доски» при типировании, реакция с АТФазой, рН 4,3; б – структурные изменения миоцитов: расщепленное волокно (толстая черная стрелка), миоцит с внутренними ядрами (белая стрелка), некротизированные мышечные волокна (тонкие черные стрелки), окраска гематоксилин-эозин. Вторичное (нейрогенное) поражение мышц: в – миоциты аугулярной формы, окраска гематоксилин-эозин; г – группировка мышечных волокон в соответствии с их типами, реакция с АТФазой, рН 10,4

Fig. 2. Morphological changes in myocytes with neuromuscular diseases. Primary lesion of the muscles: а – myocytes of a rounded shape, the distribution of fibers according to the type of «chessboard» during typing, reaction with ATPase, pH 4.3; б – structural changes in myocytes: split fiber (thick black arrow), myocyte with internal nuclei (white arrow), necrotic muscle fibers (thin black arrows), hematoxylin-eosin stain. Secondary (neurogenic) lesion of muscles: в – angular cells, hematoxylin-eosin staining; г – grouping of muscle fibers in accordance with their types, reaction with ATPase, pH 10.4

с использованием геля *O.C.T. Tissue Tek* для изготовления криоблоков и при температуре жидкого азота с гелем *O.C.T. Tissue Tek* для изготовления криоблоков по всей площади гистологических препаратов из-за недостаточно высокой скорости заморозки определялись выраженные искусственные изменения – «ледяные вакуоли» (рис. 1б, в). Замораживание образца непосредственно в жидком азоте без промежуточной среды часто приводило к образованию в ткани трещин. Методом выбора в дальнейшей работе с биопсийным материалом явился способ с использованием жидкого азота и изопентана как промежуточной среды, так как при этом обеспечивалось достаточно быстрое замораживание образца без его криповреждения.

Наиболее хорошие результаты были получены при использовании 4-го способа замораживания мышечного биоптата (с использованием промежу-

точной среды (изопентан) при температуре жидкого азота) – артефакты отсутствовали в 80 % случаев, в остальных 20 % они определялись по периферии среза и не препятствовали оценке гистоархитектоники образца.

Оптимальная визуализация изменений в образце достигалась при толщине гистологических срезов 6–10 мкм. Срезы, толщина которых превышала 10 мкм, на этапе окрашивания часто отставали от стекла, что приводило к формированию складок, перераспределению реагента по площади препарата и неравномерному окрашиванию структур (рис. 1г).

Использованный нами метод позволил провести дифференциальный диагноз между первичным (рис. 2а, б) и вторичным, т. е. нейрогенным (рис. 2в, г) поражением мышц. Основные критерии, которые учитывались при оценке биоптатов, приведены в табл. 3.

Таблица 3. Основные отличия между первичными и вторичными миопатиями

Table 3. The main differences between primary and secondary myopathies

Критерий Measure	Первичные миопатии Primary myopathies	Вторичные (нейрогенные) миопатии Secondary (neurogenic) myopathies
Форма мышечных волокон Muscle fiber shape	Форма большинства мышечных волокон ближе к округлой The shape of most muscle fibers is closer to round	Форма миоцитов ангулярная. Исключение: спинальная мышечная атрофия, при которой мышечные волокна становятся округлыми The form of myocytes is angular. Exception: spinal muscular atrophy, in which the muscle fibers become rounded
Разделение волокон на типы Separation of fibers into types	Волокна разных типов распределены в образце диффузно. Для большинства миопатий характерно преобладание мышечных волокон I типа Different types of fibers are diffusely distributed in the sample. Most myopathies are characterized by the predominance of type I muscle fibers	Сгруппированность мышечных волокон по типам (более 6 миоцитов одного типа рядом) Grouping of muscle fibers by type (more than 6 myocytes of the same type are nearby)
Изменения размера волокон Fiber size changes	Диффузный характер изменения размера мышечных волокон; при врожденных миопатиях может быть очаговый характер изменения размера Diffuse nature of the change in the size of muscle fibers; with congenital myopathies, there may be a focal nature of size change	Очаговый характер изменения размера волокон свидетельствует о вторичном повреждении мышцы Focal nature of the change in fiber size indicates secondary muscle damage
Изменения расположения и вида ядер Changes in the location and type of nuclei	Наличие внутренних ядер в 30 % мышечных волокон образца (60 % и более – характерно для миотонической дистрофии, врожденной миопатии) The presence of internal nuclei in 30 % of the muscle fibers of the sample (60 % or more is characteristic of myotonic dystrophy, congenital myopathy)	Около 10 % мышечных волокон в образце содержат внутренние ядра. В атрофированных миоцитах глыбчатые ядра (крупные, гиперхромные) About 10 % of the muscle fibers in the sample contain internal nuclei. In atrophied myocytes, cobble nuclei (large, hyperchromic)

Обсуждение

Большое значение для информативности морфологического исследования играет правильный выбор мышцы для биопсии. При длительном течении патологического процесса, при взятии на анализ клинически максимально измененной мышцы обнаруживают, как правило, выраженные морфологические неспецифические изменения, остаточное присутствие мышечной ткани с выраженными дистрофическими изменениями, признаками атрофии и преимущественным замещением фиброзно-жировой тканью, что не позволило сделать заключение об этиологии процесса. С учетом этих сведений и данных литературы при подозрении на патологию мышц с хроническим течением взятие биоптата рекомендуется проводить из мышц с наименьшими клиническими симптомами, такими как мышечная слабость, онемение, боль, судороги. При остром и подостром течении миопатии ситуация обратная – для проведения биопсии используются мышцы с максимальными проявлениями заболевания. [1, 7].

Кроме правильно выбранной для исследования мышцы в конечном результате к образованию артефактов, которые существенно затрудняют проведение морфологического анализа биоптата, приводит нарушение технологии обработки материала скелетной мышцы.

Механическое воздействие на ткань биоптата при взятии биоматериала приводит к деформации мышечных волокон. С целью минимизации «биопсийной травмы» было решено использовать для хирургической процедуры атравматические инструменты (атравматический пинцет, иглы, шовный материал). При попытке увеличения длительности временного промежутка от момента взятия биоптата до его криообработки до 2 ч и более, анализируя гистологические препараты, мы отмечали снижение интенсивности окрашивания структур препарата при гистохимических реакциях и выявляли изменения, напоминающие проявления дистрофии. Это объясняется снижением активности ферментов и истощением запасов гликогена в мышечной ткани. Исходя из этого, был выбран оптимальный отрезок времени между получением биоптата и его замораживанием, не превышающий 1,5 ч, что соответствует рекомендациям зарубежных авторов [1, 8].

Морфологическая картина мышечного образца может нарушаться при изменении толщины криотомных срезов. При уменьшении этого параметра (<6 мкм) формировались «полутонкие» срезы, на которых в некоторых случаях отсутствовали признаки патологического процесса, так как толщина среза не соотносилась с размерами структур клеток. При увеличении

толщины срезов (>10 мкм) отмечалось увеличение случаев отставания криотомного среза от стекла и образования складок, что в дальнейшем приводило к неравномерному распределению красителя и преимущественно мембранному окрашиванию миоцитов. Для лучшей визуализации морфологической картины биоптатов была выбрана толщина криотомных срезов 6–10 мкм.

При замораживании биоптата с применением геля *O.C.T. Tissue Tek* для изготовления криоблоков формировались крупные оптические пустоты, представленные кристаллами льда. Это явление обусловлено перераспределением жидкости в ткани при низкой скорости заморозки. Подобные изменения мы отмечали при транспортировке и хранении биоптата скелетной мышцы в избыточном количестве изотонического раствора NaCl 0,9 %. Множественные «ледяные вакуоли» нарушают гистоархитектонику мышечных волокон и затрудняют оценку их структуры. Аналогичные искусственные изменения в мышечном биоптате ранее описали V. Dubowitz и соавт. в руководстве *Muscle biopsy: a practical approach*. (2013). Также в этом источнике рекомендуется при наличии единичных вакуолеподобных структур по типу оптических пустот в миоцитах при обзорных гистологических окрасках сопоставление с морфологическими изменениями при окрашивании ШИК-реакцией, масляным красным О и конго красным для исключения миопатий с образованием вакуолей.

Для получения препаратов, доступных адекватной морфологической оценке, мы применяли метод замораживания мышечного биоптата с использованием промежуточной среды (изопентан) при температуре жидкого азота. Как описано в литературе, изопентан предотвращает образование вокруг замораживаемой ткани газового слоя, способствуя увеличению скорости замораживания биоптатов [1, 8].

После фиксации в ткани лучше сохраняется структура ядер и контуры клеток определяются четче. Поэтому для оценки состояния эндотелия капилляров и определения состава клеточного инфильтрата (при миопатиях с воспалительным компонентом) при рутинных гистологических методах окрашивания мы отдавали предпочтение оценке срезов фиксированного 10 % раствором формалина, залитого в парафин материала, а не криотомных срезов. Для этого мы проводили разделение образцов мышечной ткани на 2 фрагмента, один из которых фиксировался

в 10 % растворе формалина, а 2-й подвергался криообработке. Схожие рекомендации приведены в статье N.C. Joyce и соавт. *Muscle biopsy evaluation in neuromuscular disorders* (2012) [8].

Таким образом, для проведения качественного морфологического исследования рекомендуется соблюдать определенные условия на преаналитическом этапе обработки материала. При выборе мышцы для биопсии следует ориентироваться на особенности клинического течения патологического процесса, результаты осмотра и инструментальных исследований. Применение атравматических хирургических инструментов и соблюдение стандартов взятия материала при выполнении открытой биопсии позволяет получить достаточный для анализа объем материала и уменьшить механическое повреждение мышечной ткани. Для комплексной оценки морфологических изменений мышечный биоптат разделяется на 2 фрагмента: один из них фиксируется в растворе 10 % формалина, а 2-й подвергается заморозке. Информативность гистохимического исследования зависит от скорости и метода криообработки материала — оптимальный временной промежуток между взятием биоптата и его замораживанием не должен превышать 1,5 ч, лучшие результаты достигаются при термической обработке образца с помощью жидкого азота и промежуточной среды (изопентана). Для визуализации структур ткани изготавливаются криотомные срезы толщиной 6–10 мкм. Данные рекомендации позволяют избежать появления артефактов при изготовлении гистологических препаратов и дают возможность оценить морфологические изменения биоптата скелетной мышцы.

Заключение

Морфологическое исследование биоптата скелетной мышцы является одним из важных диагностических методов при нервно-мышечной патологии. Нарушение технологии преаналитической обработки материала приводит к образованию искусственных изменений, что в дальнейшем осложняет или делает невозможным проведение аналитического этапа. В части случаев в образце мышечной ткани обнаруживаются лишь неспецифические изменения, которые могут соответствовать различным нозологиям внутри паттерна, и установление диагноза возможно лишь при сопоставлении данных клинико-лабораторных методов исследования.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Dubowitz V., Sewry C., Oldfors A. Muscle Biopsy: A Practical Approach. 4th Edition. USA: Saunders Elsevier, 2013. 572 p.
- Challa S. Muscle Biopsy. 1st Edition. Croatia: InTech, 2011. 154 p.
- Mills S.E. Histology for Pathologists. 3rd Edition. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. 1280 p.
- Киссели Д. Практическая микротехника и гистохимия. Будапешт: Издательство академии наук Венгрии, 1962. 382 с. [Kisseli D. Practical microtechnology and histochemistry. Budapest: Hungarian Academy of Sciences Publishing, 1962. 382 p. (In Russ.)].
- Тимофеев А.В., Агапов М.М., Ваганова А.Н., Симонов В.С. Конспект лаборанта-гистолога. Основы гистологического процесса. СПб: ЭЛБИ-СПб, 2015. 369 с. [Timofeev A.V., Agapov M.M., Vaganova A.N., Simonov V.C. Summary of laboratory histologist. Fundamentals of the histological process. Saint Petersburg: ELBI-SPb, 2015. 369 p. (In Russ.)].
- Шатилло А.В. Гистохимическая диагностика в клинике редких нервно-мышечных заболеваний: краткая информация и клинические примеры. Международный неврологический журнал 2013;1(55):21–4. [Shatillo A.V. Histochemical diagnostics in the clinic of rare neuromuscular diseases: brief information and clinical examples. Mezhdunarodny Nevrologichesky Zhurnal = International Neurological Journal 2013;1(55):21–4. (In Russ.)].
- Rabi N.T., Shannon V. Neuromuscular Disorders. USA: Wiley-Blackwell, 2011. 267 p.
- Joyce N.C., Oskarsson B., Jin L.W. Muscle biopsy evaluation in neuromuscular disorders. Phys Med Rehabil Clin N Am 2012;23(3):609–31. DOI: 10.1016/j.pmr.2012.06.006. PMID: 22938878.

Вклад авторов

А.М. Сычева: изготовление материалов и получение данных для анализа, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;

В.Д. Назаров: анализ полученных данных, редактирование текста рукописи;

С.В. Лапин: организация работы, редактирование текста рукописи;

М.Г. Рыбакова: научное руководство и разработка дизайна статьи, руководство анализом полученных данных, редактирование текста рукописи;

Д.И. Руденко: анализ полученных данных, участие в сопоставлении клинических данных и результатов морфологического исследования.

Authors' contributions

A.M. Sycheva: making materials and obtaining data for analysis, analyzing the data obtained, reviewing publications on the topic of the article, writing the text of the article;

V.D. Nazarov: analyzing the data obtained, editing the text of the manuscript;

S.V. Lapin: work organization, editing the text of the manuscript;

M.G. Rybakova: scientific management and design development of the article, management of the analysis of the data, editing the text of the manuscript;

D.I. Rudenko: analyzing the data obtained, participation in the comparison of clinical data and the results of morphological research.

ORCID авторов/ORCID authors

А.М. Сычева/A.M. Sycheva: <https://orcid.org/0000-0003-3207-5253>

В.Д. Назаров/V.D. Nazarov: <https://orcid.org/0000-0002-9354-8790>

С.В. Лапин/S.V. Lapin: <https://orcid.org/0000-0002-4998-3699>

Д.И. Руденко/D.I. Rudenko: <https://orcid.org/0000-0001-5101-1007>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.