

## Прямая морфологическая детекция *Borrelia burgdorferi* в мышечных биоптатах: возможность связи нервно-мышечной патологии с боррелиозом

А.В. Сахарова<sup>1</sup>, Л.В. Диденко<sup>2</sup>, Т.И. Муравина<sup>1</sup>, Р.П. Чайковская<sup>1</sup>, Е.А. Кост<sup>2</sup>, М.Ф. Мир-Касимов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Научный центр неврологии» РАМН;

<sup>2</sup> ФГБУ «Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва

**Контакты:** Алла Викторовна Сахарова [alla.sakharova@gmail.com](mailto:alla.sakharova@gmail.com)

Исследовано 40 биоптатов мышц, взятых у больных с нервно-мышечной симптоматикой при неустановленном или предположительном диагнозе. В 18 из них в полутонких срезах ткани обнаружены очаги повреждения мышечных волокон с наличием спирохетоподобных структур. При электронной микроскопии этих участков были выявлены боррелии в виде вегетативных и разнообразных L-форм. Применение методов иммуноцитохимии с антителами к антигенам *Borrelia burgdorferi* подтвердило принадлежность спирохет к данному виду. Это позволило считать этиологическим или осложняющим фактором нервно-мышечной патологии боррелиоз, а также рекомендовать применять указанные морфологические методы как диагностические в случаях нервно-мышечных заболеваний неясного происхождения.

**Ключевые слова:** нейроборрелиоз, *Borrelia burgdorferi*, мышечные биопсии, микроскопия полутонких срезов, электронная микроскопия, электронная иммуноцитохимия

### Direct morphological identification of *Borrelia burgdorferi* in the muscle biopsies: the possibility of association of the neuromuscular abnormalities with Borreliosis

A.V. Sakharova<sup>1</sup>, L.V. Didenko<sup>2</sup>, T.I. Muravina<sup>1</sup>, R.P. Chaikovskaya<sup>1</sup>, E.A. Kost<sup>2</sup>, M.F. Mir-Kasimov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences; <sup>2</sup>N.F. Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

The authors examined 40 muscle biopsy specimens taken from patients with neuromuscular symptoms when the diagnosis was unestablished or presumptive. Eighteen of them exhibited foci of muscle fiber damage with the presence of spirochete-like structures in the semithin tissue sections. Electron microscopy of these areas detected *Borrelia* as vegetative and diverse L-forms. Immunocytochemical techniques using antibodies to *Borrelia burgdorferi* antigens confirmed that the spirochetes belonged to this species. This allows one to consider borreliosis as an etiological or complicating factor of neuromuscular pathology and to recommend the above morphological methods for the diagnosis of neuromuscular diseases of unknown origin.

**Key words:** neuroborreliosis, *Borrelia burgdorferi*, muscle biopsy specimens, microscopy of semithin sections, electron microscopy, electron immunocytochemistry

#### Введение

Симптомы поражения центральной и периферической нервной системы выявляются как в острой, так и в хронической стадии боррелиоза. По данным отечественных авторов, на территории России 1-е место среди поражений органов при этом заболевании занимает именно нервная система [1–3]. При хроническом нейроборрелиозе возможны развитие неврита краниальных нервов, радикулоневрита, мононеврита периферических нервов, а также прогрессирующее многоочаговое поражение головного и спинного мозга. В связи с этим симптоматика нейроборрелиоза крайне полиморфна и может имитировать различные нервно-мышечные и психоневрологические заболевания (рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз,

болезни Паркинсона и Альцгеймера, рассеянный энцефаломиелит, митохондриальные энцефаломиопатии и др.) [4, 5]. Не случайно нейроборрелиоз называют «вторым великим имитатором» (после сифилиса) [6, 7]. Если у пациента ранний период заболевания протекал субклинически или имел нехарактерную симптоматику, связь с боррелиозом обнаруживается лишь при лабораторном анализе. Однако боррелии трудно выделить и культивировать, а серологические методы из-за сложного иммунопатогенеза боррелиоза часто дают ложноотрицательные результаты.

В НЦН РАМН в диагностически трудных случаях нервно-мышечных заболеваний применяется метод проведения мышечных биопсий. В период с 2004 по 2010 г. в лабораторию патологической анатомии пос-

тупило 40 биоптатов мышц (четырёхглавой мышцы бедра, реже дельтовидной мышцы). Они были изучены согласно правилам, принятым для изучения мышечных биопсий, с набором методик, обеспечивающих верификацию или уточнение клинического диагноза. В качестве диагностических методов использована электронная микроскопия ткани, фиксированной глутаровым альдегидом и четырёхокисью осмия, с предварительным просмотром полутонких срезов.

В 18 биоптатах при изучении полутонких срезов были выявлены участки разрушения мышечной ткани, содержавшие структуры, по морфологическим признакам сходные со спирохетами. Эти биоптаты были подвергнуты углубленному исследованию с применением иммуноцитохимических методик на уровне световой и электронной микроскопии. Срезы парафиновых блоков биоптатов изучались в реакции световой иммуногистохимии, а для электронной иммуноцитохимии использовались срезы тех же биоптатов с блоков, залитых в эпон. Результаты этих исследований

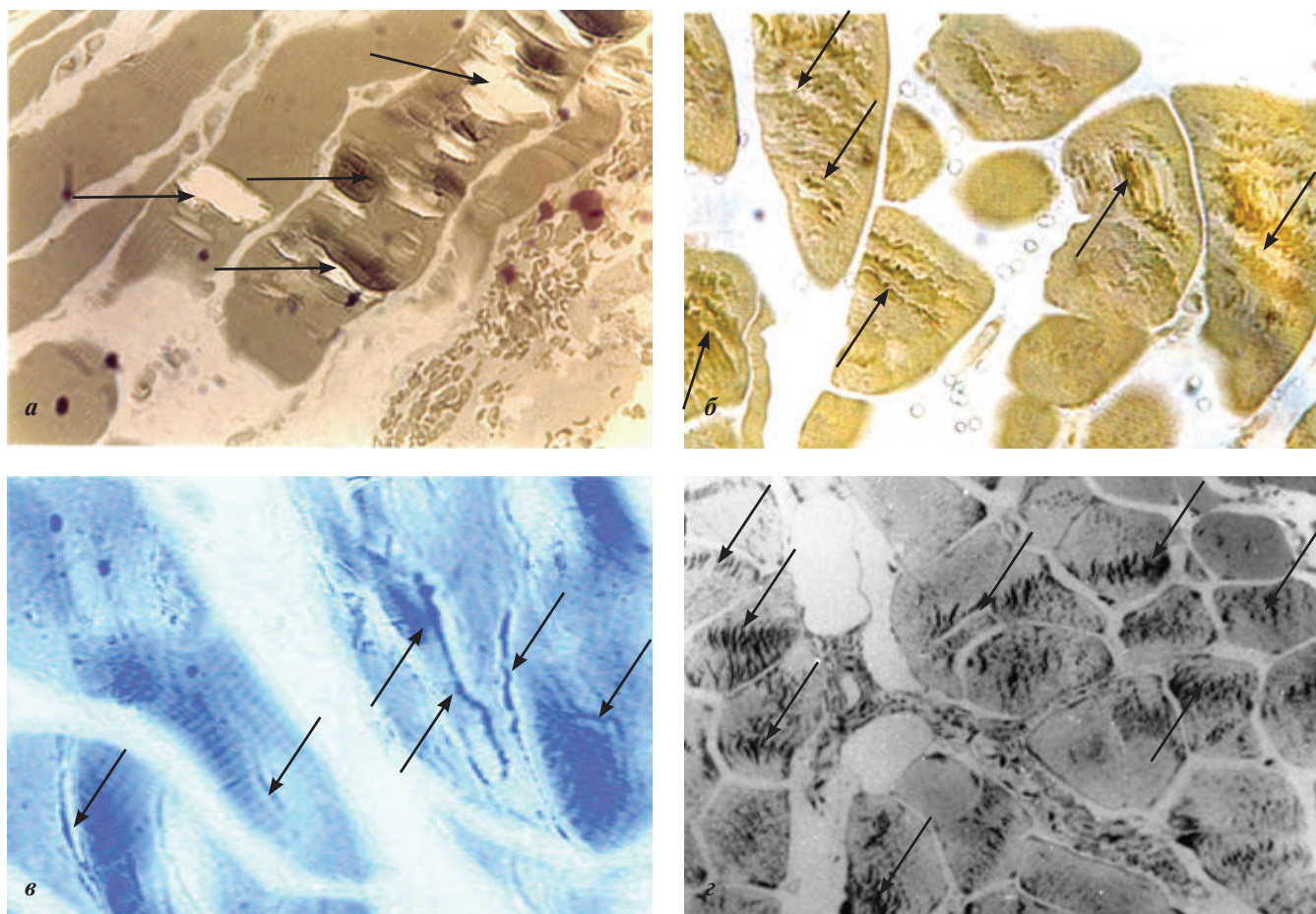
являются основным предметом обсуждения в данной публикации.

### Материалы и методы

Материалом исследования служили мышечные биоптаты, направляемые в лабораторию патологической анатомии НЦН РАМН в случаях, когда у больных с неврологической симптоматикой клинический диагноз был неясен или неокончателен ( $n = 40$ ). Клинические диагнозы больных, у которых в биоптатах были обнаружены спирохетоподобные структуры ( $n = 18$ ), представлены в таблице. Все биоптаты были исследованы с применением стандартного набора морфологических окрасок и гистохимических реакций [8, 9], при необходимости прибегали к импрегнации азотно-кислым серебром [10, 11]. Биоптаты также исследовали на полутонких срезах в световом микроскопе с последующей электронной микроскопией на микроскопах JEM-100B и JEM-1011. Те биоптаты, в которых на полутонких срезах были обнаружены структуры, сходные

*Характеристика пациентов по полу, возрасту, клиническому диагнозу*

№ п/п	Код пациента	Пол	Возраст, лет	Клинический диагноз
1	836/04-05	Ж	33	Дифференциальный диагноз: невральная амиотрофия, миопатия неясной этиологии
2	127/05	М	15	Дифференциальный диагноз: миопатия, нейрогенная амиотрофия
3	638/05	Ж	34	Первичный антифосфолипидный синдром, энцефалопатия
4	431/06	Ж	36	Дифференциальный диагноз: боковой амиотрофический склероз, боррелиоз
5	150/07	М	23	Дифференциальный диагноз: спинальная амиотрофия, митохондриальная энцефаломиопатия
6	638/07	Ж	28	Нейроборрелиоз. Энцефалопатия, полинейропатия, пирамидный синдром
7	981/07	Ж	49	Митохондриальная энцефаломиопатия
8	1021/07	Ж	14	Дифференциальный диагноз: митохондриальная энцефаломиопатия, миотоническая дистрофия
9	1041/07	Ж	31	Рассеянный энцефаломиелит, боррелиоз
10	1165/07	Ж	58	Боковой амиотрофический склероз, боррелиоз в анамнезе
11	1262/07	М	28	Митохондриальная энцефаломиопатия
12	1306/07	Ж	32	Миоклонус-эпилепсия
13	1544/07	М	60	Боррелиоз
14	290/08	Ж	34	Дифференциальный диагноз: митохондриальная энцефаломиопатия, мигрень с аурой
15	674/08	М	74	Боррелиоз
16	721/08	М	33	Дифференциальный диагноз: рассеянный энцефаломиелит – митохондриальная энцефаломиопатия
17	856/08	Ж	48	Митохондриальная энцефаломиопатия
18	1404/08	Ж	57	Дифференциальный диагноз: митохондриальная энцефаломиопатия, гликогеноз 5-го типа, первичный дефицит карнитина



**Рис. 1.** Морфологические изменения мышечных волокон в местах локализации боррелий: а – участки очагового распада мышечных волокон (стрелки), соседствующие с участками сохраненной ткани,  $\times 40$ ; б, з – скопления спирохетоподобных структур (стрелки) в мышечных волокнах,  $\times 20$ ; в – отдельные спирохеты внутри мышечных волокон (стрелки),  $\times 100$ . Световая микроскопия, глутар-осмиевая фиксация, полутонкие срезы (а, б – неокрашенные препараты, в – окраска метиленовым синим, з – импрегнация азотнокислым серебром)

по виду со спирохетами, затем исследовали методом непрямой реакции иммунофлюоресценции в соответствии со стандартным протоколом [8], и они же (та часть материала, которая предназначалась и обрабатывалась для электронно-микроскопического исследования) изучались с помощью электронной иммуноцитохимии с использованием моноклональных антител к антигенам *Borrelia burgdorferi*. Первичными антителами служили мышинные моноклональные антитела к 10 поверхностным антигенам *Borrelia burgdorferi* в 3 сочетаниях смесей антител: 1) к антигенам везикулярных липопротеинов поверхности наружной мембраны Osp A, Osp B, Osp C; 2) к поверхностным белкам: р31, р66, р93; и 3) к флагеллярным белкам: FlaB41, DbpA, VISe и Fla37 (Barbara Johnson, Molecular Biology Section Centers for Disease Control and Prevention of Vector-Borne Infectious Diseases) в концентрации 1 мг/мл. Антитела разводили в пропорции 1:30 в 0,05 М солевом фосфатном буфере (рН 7,4) с добавлением 0,5 % BSA (PBS/BSA).

В качестве вторичных антител для иммунофлюоресцентного исследования использовали иммуноглобулины (Ig), конъюгированные с FITC и техасским красным (TEXAS), а для электронной иммуноцитохимии – козы антимышинные IgG, конъюгированные с коллоидным золотом, с частицами размером 10 нм (Alexa Fluor 488/Invitrogen) в разведении 1/100 в 0,05 М Трис-буфере при рН 8,2.

Для электронной иммуноцитохимической реакции мы использовали один из вариантов процедур, отработанных для проведения реакции иммуномеченения в режиме post-embedding-метода [12]. Контролем иммуноцитохимических реакций служили препараты, в которых инкубация с первичными антителами была пропущена, а как отрицательный контроль в отношении инфекции считали биоптаты от пациентов, у которых отсутствие клинических и лабораторных признаков боррелиоза совпадало с отсутствием спирохетоподобных структур в морфологических препаратах.



### Результаты

В полутонких срезах в 18 случаях из 40 были обнаружены спирохетоподобные структуры. Дальнейшее описание результатов основано на изучении этих 18 биопсий с использованием всех методов, указанных в предыдущем разделе.

Среди всех изученных биопсий были биопсии от пациентов с боррелиозом (см. таблицу), подтвержденным иммунными серологическими методами или методом полимеразной цепной реакции (наблюдения 6, 10, 13, 15), а также с другими диагнозами: митохондриальная энцефаломиопатия (наблюдения 7, 11, 17), первичный антифосфолипидный синдром (наблюдение 3), миоклонус-эпилепсия (наблюдение 12). В ряде случаев биопсия выполнялась для дифференциации: нейрогенной амиотрофии и миопатии неясной этиологии (наблюдения 1, 2, 5), боррелиоза и бокового амиотрофического склероза (наблюдение 4), митохондриальной энцефаломиопатии и мигрени с аурой (наблюдение 14), митохондриальной энцефаломиопатии и миотонической дистрофии (наблюдение 8), митохондриальной энцефаломиопатии и рассеянного энцефаломиелита (наблюдение 16), митохондриальной энцефаломиопатии,

гликогеноза 5-го типа и первичного дефицита карнитина (наблюдение 18), боррелиоза и рассеянного энцефаломиелита (наблюдение 9).

Гистологическое и гистохимическое изучение биоптатов при световой микроскопии во всех случаях выявило дистрофические изменения мышечных волокон, выраженные в разной степени, которые сочетались с диссеминированной, реже мелкопучковой атрофией. Небольшие лимфоцитарные инфильтраты были выявлены в единичных биоптатах.

При световой микроскопии в полутонких срезах в 18 случаях были обнаружены фокальные повреждения мышечной ткани. В срезах наряду с относительно сохранной тканью имелись участки с очаговым распадом мышечных волокон (рис. 1а). В очагах разрушения были выявлены извитые спирохетоподобные структуры, образующие скопления и лежащие по отдельности (рис. 1б, в). При импрегнации азотнокислым серебром, проведенной различными методами, извитые нитевидные структуры окрашивались в черный цвет (рис. 1г).

При применении методов световой иммуногистохимии с антителами к антигенам *Borrelia burgdorferi* была получена положительная реакция с неравномер-

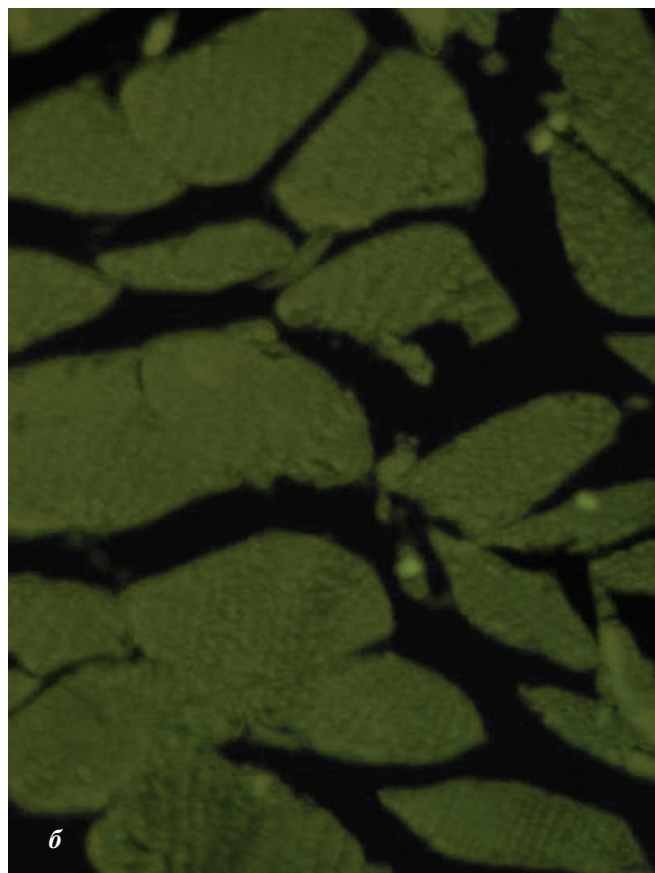
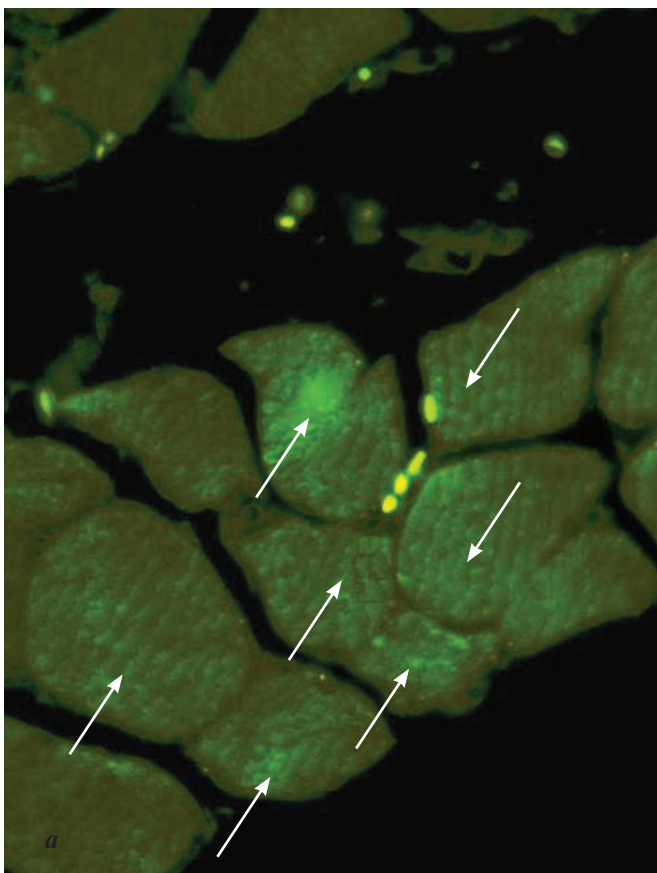
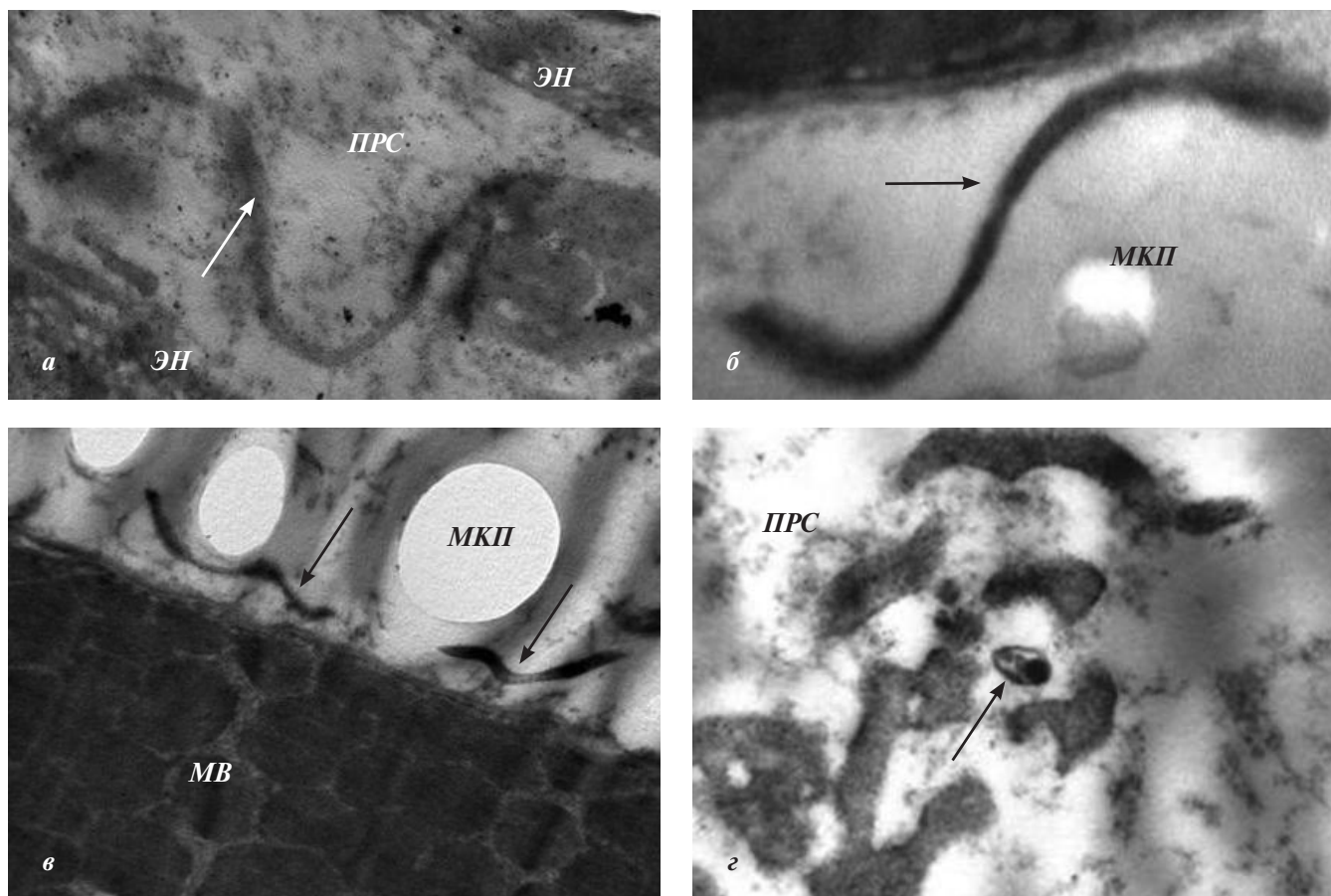


Рис. 2. Иммунофлуоресцентная реакция с моноклональными антителами к антигенам *Borrelia burgdorferi*: а — интенсивная флуоресценция в местах локализации антигенов (стрелки), б — (контроль) отсутствие специфического свечения при инкубации без антител к *Borrelia burgdorferi*. Флуоресцентная микроскопия, формалиновая фиксация, парафиновые срезы. Флуоресцентная метка,  $\times 40$



**Рис. 3.** Боррелии, располагающиеся внеклеточно и сохраняющие признаки вегетативных форм: а – участок косо-продольного среза капилляра с боррелией в его просвете,  $\times 50\,000$ ; б, в – боррелии типичной, плоско-извитой формы без четкой клеточной стенки в межклеточном пространстве эндомизия вблизи мышечной клетки, б  $\times 40\,000$ , в  $\times 20\,000$ ; г – поперечный профиль боррелии, сохранившей клеточную стенку в просвете сосуда,  $\times 40\,000$ . Трансмиссионная электронная микроскопия. Условные сокращения здесь и на рис. 4–8: МВ – мышечное волокно, МКП – межклеточное пространство, ПРС – просвет сосуда, ЭН – эндотелиальная клетка

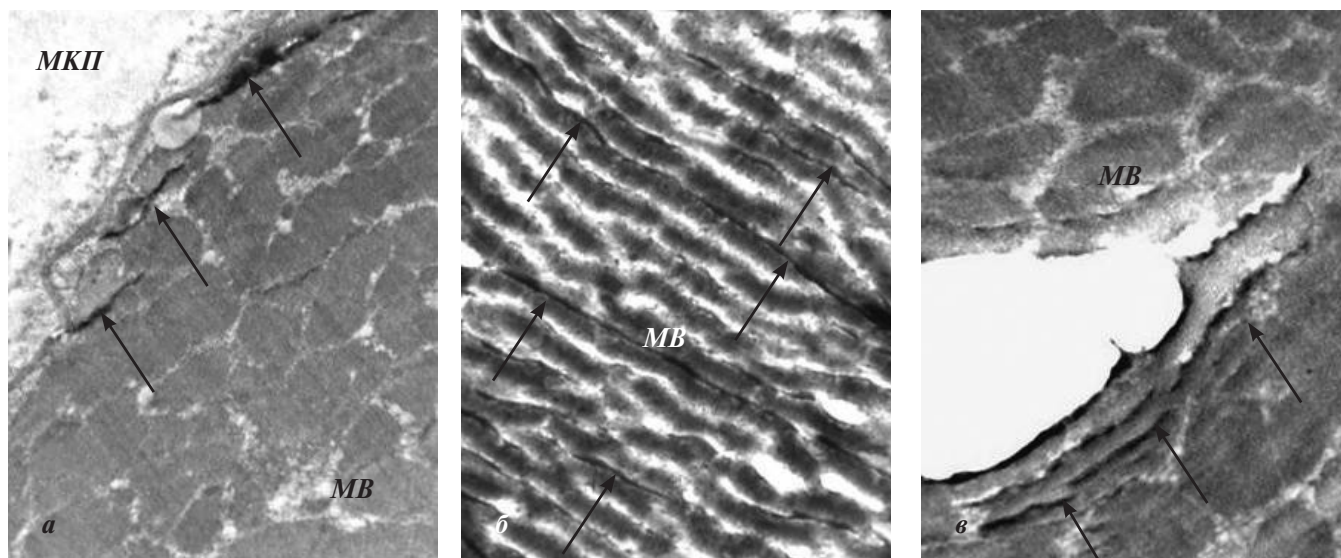
ной картиной в срезах ткани. В одних участках срезов специфическая люминесценция была диффузной, в других – выявляла структуры, по форме сходные со спирохетами. Люминесценция повторяла картину, наблюдаемую в полутонких срезах при осмиевой и серебряной импрегнациях (рис. 2а). В контрольных препаратах реакция отсутствовала (рис. 2б).

Последующее электронно-микроскопическое изучение поврежденных участков срезов обнаружило в них микроорганизмы с ультраструктурными признаками боррелий, которые в зависимости от своего местоположения различались по электронной плотности и виду. Расположенные внеклеточно структуры (в просвете сосуда или в межклеточном пространстве) были в виде удлинённых извитых форм. Их электронная плотность мало отличалась от таковой клеток хозяина. Контуры плазматической мембраны клеточной стенки и флагелл на продольных срезах не выявлялись или были нечеткими (рис. 3а–в). Однако изредка на поперечных срезах микроба можно было увидеть клеточную стенку и ассиметричное периплазматическое

пространство с протоплазматическим цилиндром (рис. 3г).

Те мышечные волокна, в которых встречались единичные боррелии, сохраняли свою структуру, и микроорганизмы были как бы встроены в клетку (рис. 4а). Структура миоцитов, содержащих скопления спирохет, была нарушена, мышечные волокна находились в состоянии некроза (рис. 4б) и вокруг спирохет наблюдалось окаймляющее их электронно-прозрачное пространство, переходящее в трещины или полости (рис. 4в).

Находящиеся внутри клеток или соприкасающиеся с клетками хозяина боррелии отличались высокой электронной плотностью и большим разнообразием строения. Атипичные формы спирохет, сходные с описанными в литературе L-формами, были представлены структурами высокой электронной плотности, с причудливыми очертаниями, вздутиями и утолщениями (рис. 5а, б), а также веревчатыми структурами, свернутыми в тугую спираль или завиток (рис. 5в). Кроме того, в клетках и межклеточном пространстве встреча-



**Рис. 4.** Состояние мышечной ткани, содержащей L-формы боррелий: а – немногочисленные боррелии с высокой электронной плотностью в мышечном волокне с сохраненной структурой,  $\times 15\ 000$ ; б – мышечное волокно с признаками полного распада, заполненное многочисленными боррелиями,  $\times 15\ 000$ ; в – разрывы ткани, трещины и полости в мышечном волокне в местах скопления спирохет,  $\times 30\ 000$ . Трансмиссионная электронная микроскопия

лись скопления мелких везикулярных структур, лежащих свободно или внутри мембраны (рис. 5г).

Характерную картину взаимодействия микроба с клеткой демонстрирует боррелия, мигрирующая сквозь эндотелиальную клетку из сосуда (рис. 6а), или внедряющаяся под базальную мембрану мышечного волокна (рис. 6б), а также в отросток фибробласта (рис. 6в). Немногочисленные лимфоциты, встречавшиеся в эндомизии, всегда были в окружении боррелий (рис. 6г).

Методом электронной иммунной цитохимической реакции были получены убедительные доказательства того, что все формы обнаруженных микроорганизмов действительно являются боррелиями, так как специфическая метка на *Borrelia burgdorferi* локализовалась на поверхности микроорганизмов или вблизи них (рис. 7а, б). В контрольных препаратах метка отсутствовала (рис. 7в).

В мышечных волокнах золотая метка выявлялась в области разрушенных миофибрилл (рис. 8а). С большим постоянством она обнаруживалась вблизи мелких сферических структур (рис. 8б, в), которые было трудно распознать в не обработанных мечеными антителами срезах в связи с малыми размерами и невысокой электронной плотностью этих образований. Реакция антител с антигенами *Borrelia burgdorferi* имела различную интенсивность в разных участках препаратов.

Описанные изменения были в равной степени представлены в случаях с диагнозом боррелиоза, подтвержденного серологическими методами, и в случаях с другими предположительными или дифференциальными диагнозами, где такого подтверждения не было.

### Обсуждение

Диагностика нейроборрелиоза трудна особенно в тех случаях, когда в анамнезе нет сведений об инфицировании. В нашем материале в большинстве случаев были исследованы биоптаты пациентов, у которых связь клинических неврологических проявлений с боррелиозной инфекцией не предполагалась. Поэтому мы исследовали материал согласно принятым для мышечных биопсий правилам, используя методы световой микроскопии и гистохимии, но не выявили с их помощью специфических изменений, которые могли служить основанием для диагноза боррелиоза.

При электронной микроскопии в 18 из 40 биоптатов были обнаружены микроорганизмы, идентифицированные как боррелии на том основании, что они были идентичны микробам, выявленным в биоптатах с клиническим диагнозом боррелиоза, и сходны с боррелиями, описанными в литературе [13–17]. Безусловным подтверждением присутствия в ткани именно боррелий явились положительные результаты иммунофлуоресцентного и электроно-иммуноцитохимического анализа с использованием моноклональных антител к антигенам *Borrelia burgdorferi*.

Наличие большого числа боррелий в мышечной ткани позволяет предположить, что и другие органы и ткани, в том числе различные отделы нервной системы, могут быть инвазированы этими микробами, т. е. имеющаяся у больного клиническая симптоматика связана не только с мышечным поражением.

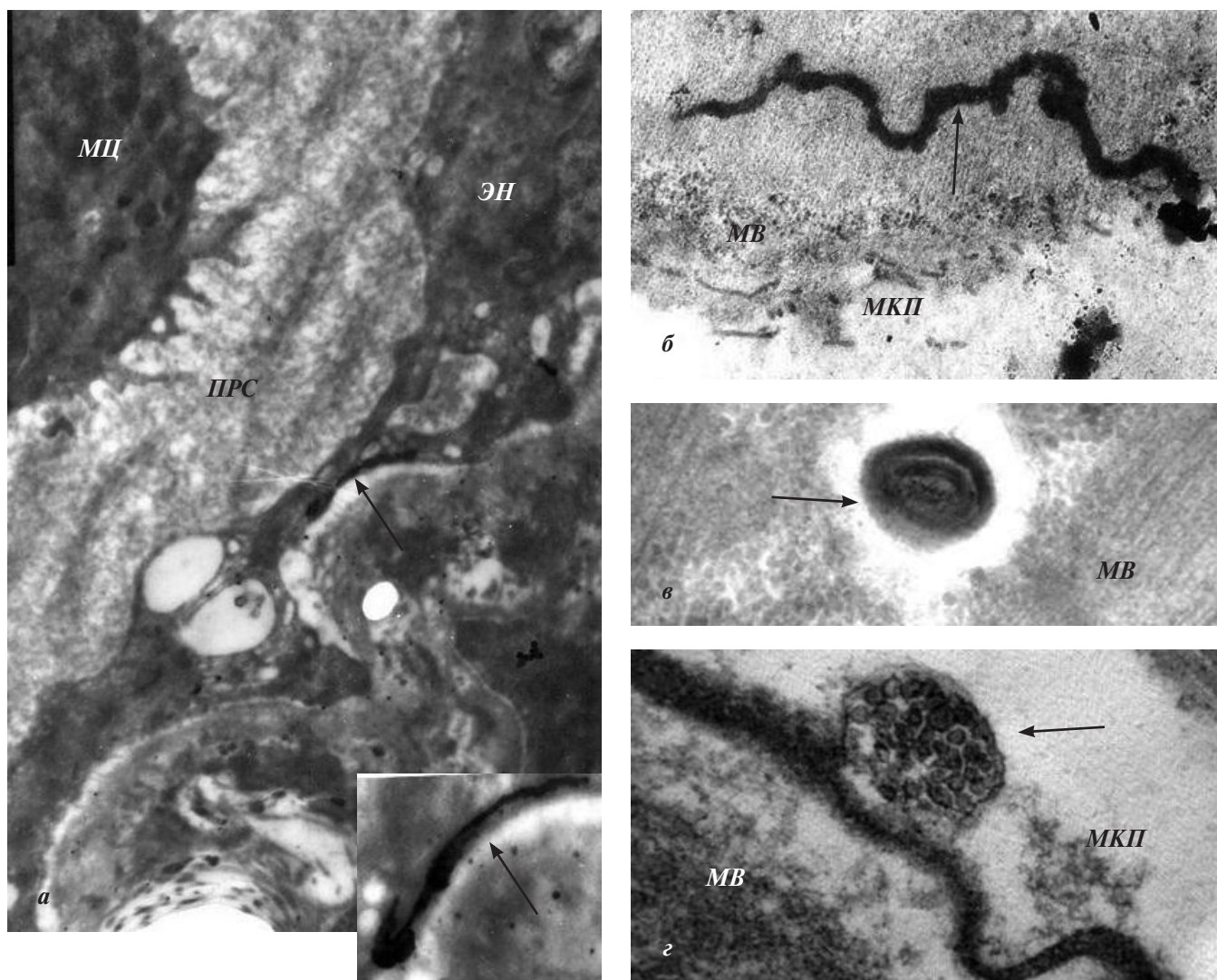
Среди методов морфологического выявления спирохет электронная микроскопия выделяется высокой



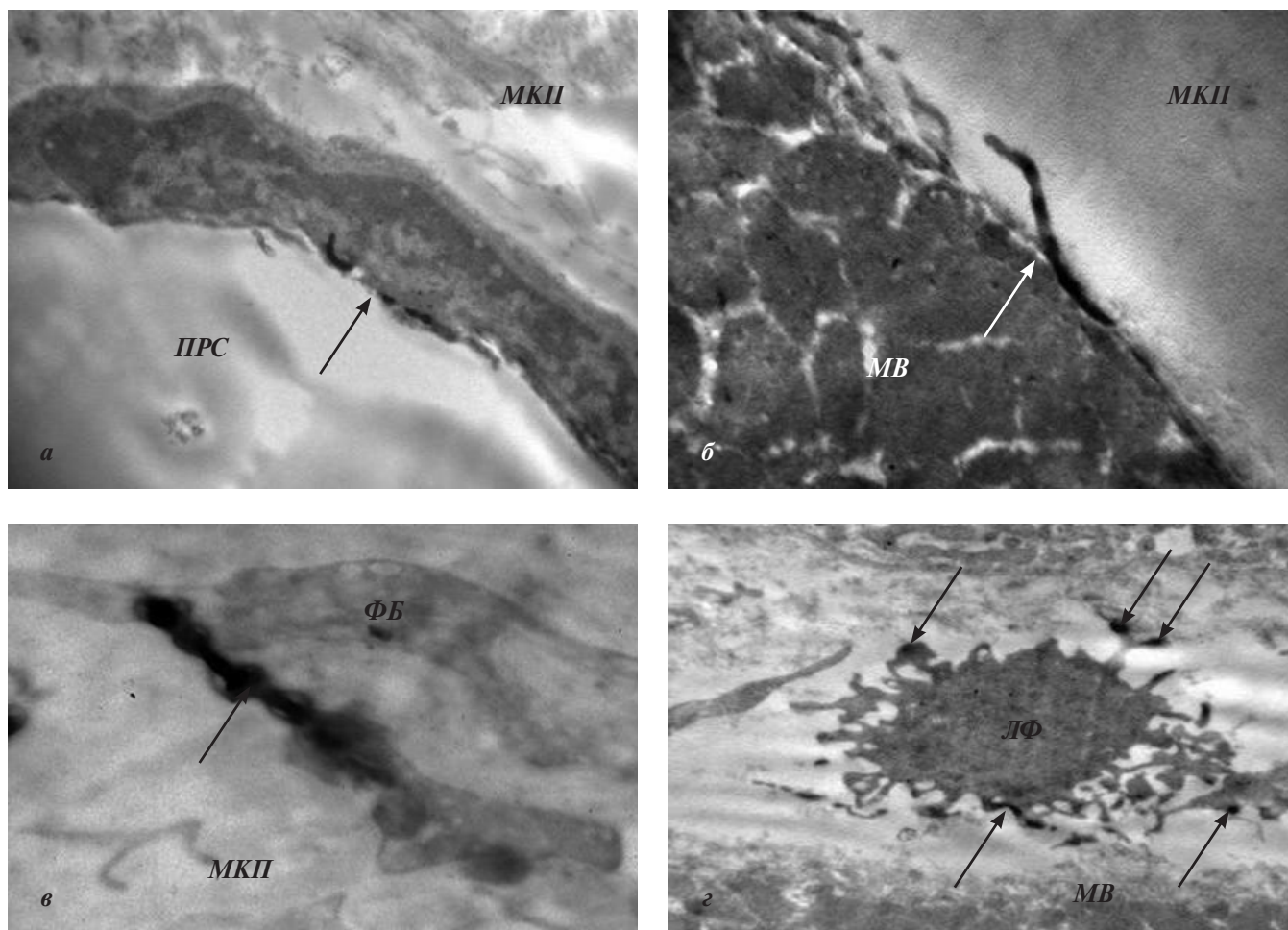
чувствительностью. При стандартной глутар-осмиевой фиксации ткани спирохеты импрегнируются осмием, при этом их электронная плотность оказывается настолько высокой, что они без труда обнаруживаются даже в неокрашенных уранилацетатом и цитратом свинца срезах. Однако, как подчеркивается в литературе, спирохеты можно не распознать при отсутствии опыта, особенно если не учитывать их способности трансформироваться и образовывать разнообразные L-формы [18–21]. Для исследователя, имеющего достаточный опыт и знания о метаморфозах спирохет, электронно-микроскопический метод является высокодостоверным. К сожалению, трудоемкость этого метода ограничивает его применение в повседневной практике. Это еще в большей степени относится к методу электронной иммуноцитохимии, который выполняется в очень немногих лабораториях.

Нами найден достаточно надежный способ выявления спирохет в полутонких срезах мышечной ткани. В ходе исследования мы заметили, что в полутонких срезах тех биоптатов, в которых при электронной микроскопии были найдены боррелии, обнаруживались фокальные участки разрушенных мышечных волокон; в местах разрушения и по соседству с ними четко визуализировались боррелии, импрегнированные осмием. В биоптатах, где боррелии не были обнаружены, феномена фокальных разрушений мышечной ткани и спирохет не наблюдалось.

Поскольку до сих пор нет общепринятых специфических морфологических критериев боррелиоза, обнаруженная нами возможность выявления в полутонких осмированных срезах спирохет является новой в визуализации и при наличии сопутствующих тканевых повреждений может рассматриваться как значимый фактор в комплексной диагностике боррелиоза.



**Рис. 5.** L-формы боррелий в различных местах мышечной ткани: а – фрагмент стенки и просвета сосуда с L-формой боррелии в эндотелиальной клетке,  $\times 20\,000$ , на врезке,  $\times 100\,000$ ; б – в мышечном волокне,  $\times 30\,000$ ; в – типичная цистная форма в мышечном волокне,  $\times 40\,000$ ; г – везикулярная форма в межклеточном пространстве эндомизия,  $\times 50\,000$ . Трансмиссионная электронная микроскопия. Условное сокращение: МЦ – моноцит



**Рис. 6.** Трансформированные боррелии, находящиеся в контакте с клетками эндомизия: а – боррелия, пересекающая стенку капилляра,  $\times 15\ 000$ ; б – боррелия, проникающая под базальную мембрану мышечной клетки,  $\times 30\ 000$ ; в – боррелия, фагоцитируемая отростком фибробласта,  $\times 50\ 000$ ; г – боррелии, контактирующие с лимфоцитом (стрелки),  $\times 15\ 000$ . Трансмиссионная электронная микроскопия. Условные сокращения: ЛФ – лимфоцит, ФБ – фибробласт

В настоящем исследовании было показано, что при боррелиозе наиболее характерно повреждение мышечных волокон. Интенсивность разрушения мышечных волокон находится в прямой зависимости от количества обнаруживаемых в образцах спирохет, которое, как известно, может увеличиваться со временем в результате их размножения в ткани [14]. В тех участках препаратов, где выявлялись единичные спирохеты, ультраструктурные изменения были незначительными, а в местах скопления боррелий наблюдался полный распад мышечных волокон. Размножение боррелий в клетках приводит к разрушению последних и высвобождению возбудителя во внеклеточное пространство.

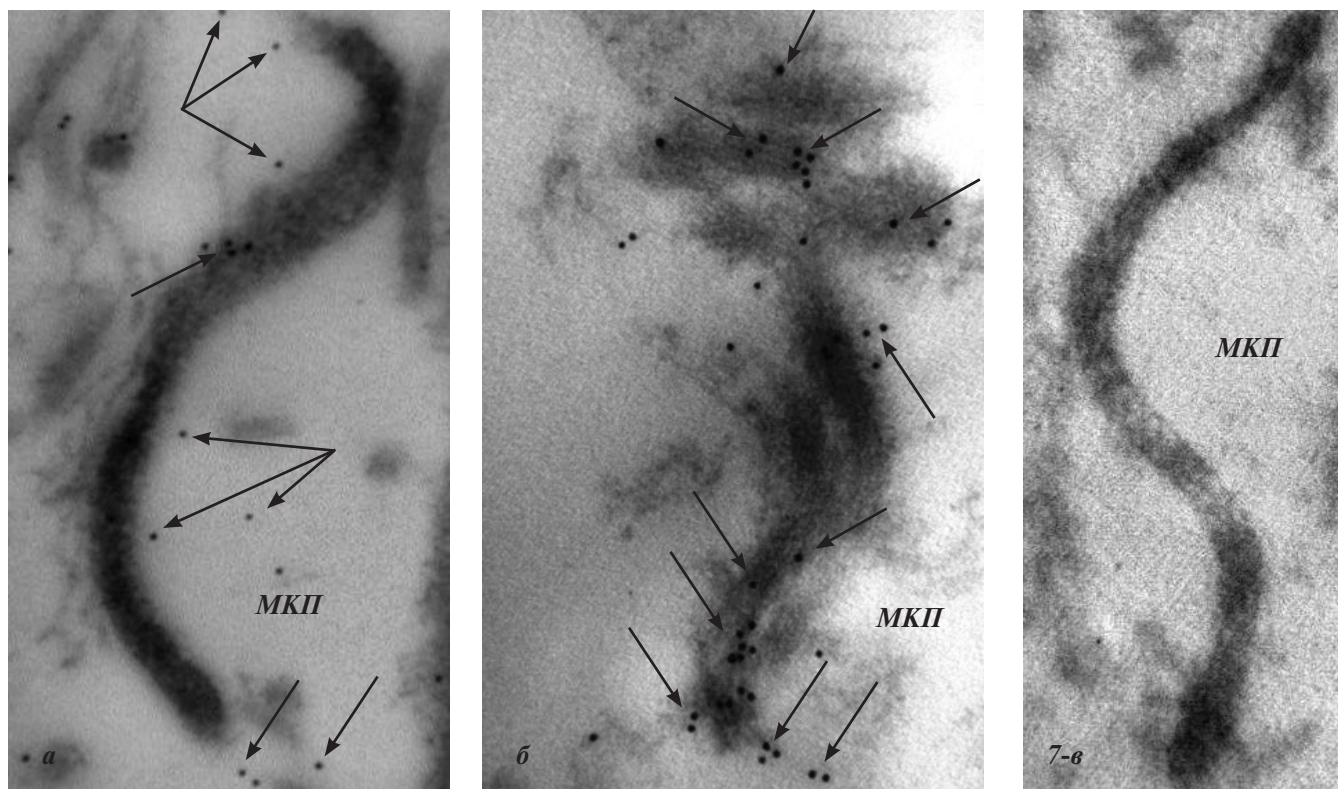
Следует отметить, что в очагах разрушения мышечных волокон не отмечалась лейкоцитарная или макрофагальная инфильтрация, что может указывать на несостоятельность клеточного звена иммунитета при боррелиозной инфекции. Причинами этого явления согласно данным литературы могут быть:

- повреждение боррелиями иммунных клеток. В опытах *in vitro* показано, что боррелии способны инвазировать и уничтожать Т- и В-лимфоциты и таким способом ликвидировать одну из линий иммунной защиты [22];
- утрата при трансформации боррелий в L-формы их клеточной стенки – основного иммуногенного компонента микроорганизмов, что приводит к неэффективности клеточного и гуморального звена иммунитета [23–25];
- обеспечение боррелий защитой от иммунных факторов организма-хозяина благодаря внутриклеточному паразитированию [16, 24].

Следует учесть, что исследованные нами биоптаты получены от пациентов со значительной давностью заболевания, т. е. с хронической формой болезни.

Пустые пространства и разрывы ткани вокруг спирохет (см. рис. 4б, в) служат иллюстрацией описанной в литературе способности боррелий активировать протеолитические ферменты клеток хозяина [26, 27], разрушать их и продвигаться в них.



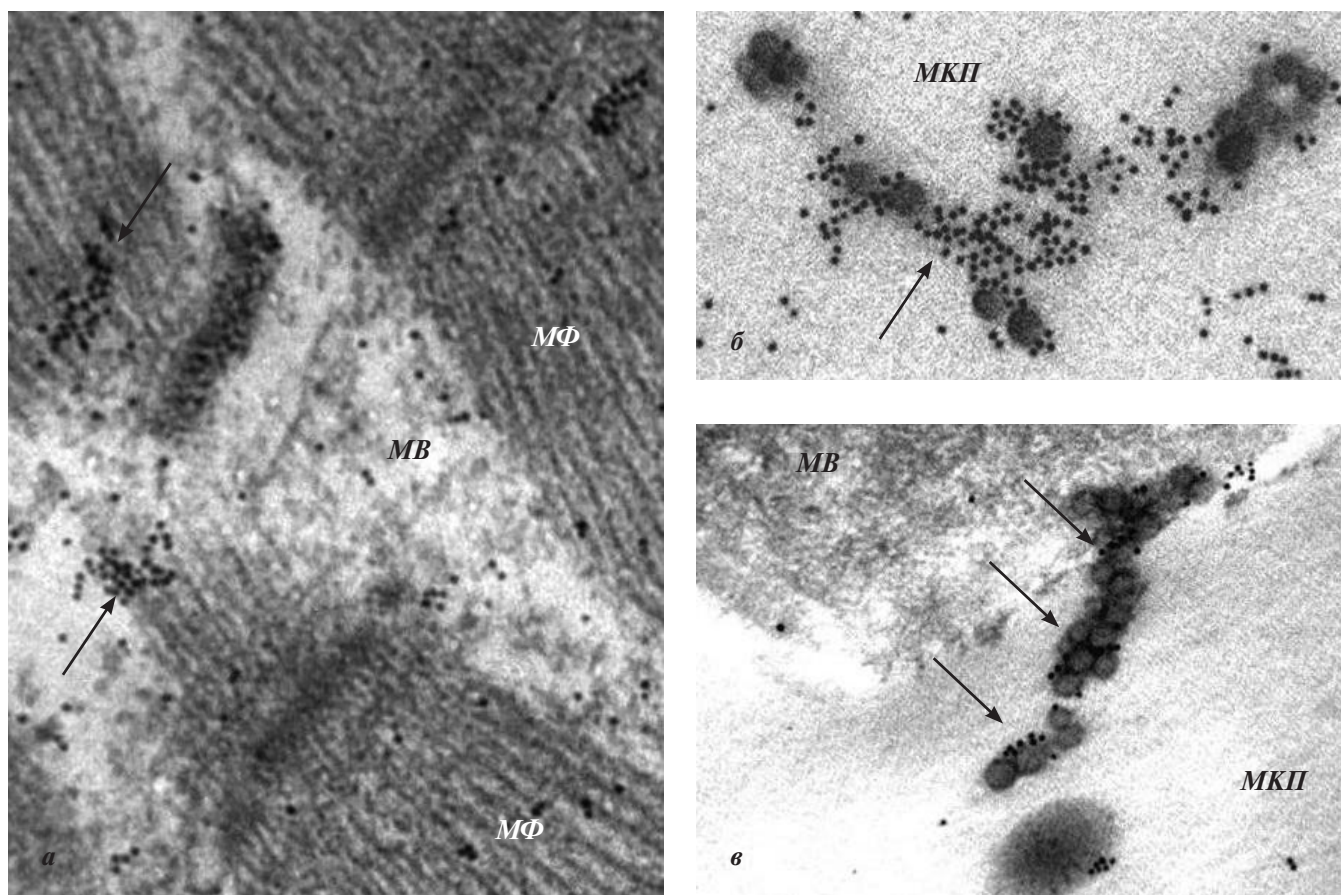


**Рис. 7.** Субклеточное распределение антигенов *Borrelia burgdorferi* в ткани биоптата: а, б – межклеточное пространство, метка локализуется на микробах и вблизи них (стрелки),  $\times 60\ 000$ ; в – контроль (инкубация без первичных антител), метка отсутствует,  $\times 50\ 000$ . Электронная иммуноцитохимия с использованием меченых коллоидным золотом антител к антигенам *Borrelia burgdorferi*. Размер частиц коллоидного золота 10 нм.

Представленные в литературе данные о морфологии спирохет и об их взаимодействии с организмом хозяина получены на основании изучения их в культуре ткани и в опытах *in vitro* и *ex vivo* [13, 14, 17, 28]. Работы, в которых боррелии изучались электронно-микроскопически в тканях человека, малочисленны и в основном демонстрируют их вегетативные формы [15, 16, 29].

В нашем исследовании с большой выборкой биопсий мышечной ткани, в которой методом электронной микроскопии были обнаружены и изучены боррелии, демонстрируется огромное разнообразие размеров и форм микроба. Мы показали, что форма и электронная плотность боррелий зависят от их локализации. Боррелии, располагающиеся внеклеточно, как правило, представлены хотя и измененными, но вегетативными формами, похожими на боррелий при их культивировании в клеточных линиях (см. рис. 3). Внутриклеточные особи (см. рис. 4, 5а, б, 6а–г) в большинстве случаев приобретают признаки L-форм, образуют электронно-плотные структуры с вздутиями и выростами, а также микроцисты, способные, как известно, вновь трансформироваться в подвижные организмы [30].

Особый интерес представляют впервые выявленные нами мелкие шаровидные (сферические) объекты, в которых наличие антигенов *Borrelia burgdorferi* было убедительно доказано методом электронной иммуноцитохимии. Анализируя результаты данного исследования в целом, мы не можем не отметить факт высокой частоты выявления боррелиозной инфекции в нашем материале. Ретроспективный анализ результатов электронно-микроскопического исследования 22 мышечных биопсий, проведенных нами в 1990–1997 гг. показал, что только в 1 случае были обнаружены боррелии. В 2004–2010 гг. мы их выявили у 18 пациентов. Возможно, такое увеличение частоты обнаружения инфекционного объекта в мышечных биопсиях является следствием изменения экологической и связанной с ней эндемической ситуации в мире [31, 32], а также с увеличением доли населения со сниженным иммунитетом [23, 33], из которого, по-видимому, и составила группа инфицированных больных, направляемых с неясным диагнозом в НЦН РАМН. Нельзя исключить здесь и роли накопленного опыта, постоянного применения электронного микроскопа и использования впервые обнаруженной нами новой возможности визуализации спирохет в полутонких срезах мышечной ткани, фиксированной осмием.



**Рис. 8.** Локализация антигенов *Borrelia burgdorferi* в мышечной ткани: а – фрагмент продольного среза мышечного волокна, метка концентрируется на месте разрушенных миофибрилл (стрелки),  $\times 80\,000$ ; б – густая концентрация золотой метки вблизи сферических структур в межклеточном пространстве эндомизия,  $\times 80\,000$ ; в – выстроенные в продольный тяж сферические структуры, отороченными золотой меткой у края мышечного волокна (стрелки),  $\times 80\,000$ . Электронная иммуноцитохимия. Условное сокращение: МФ – мышечные фибриллы

Мы не можем полностью отрицать тот факт, что инфицирование боррелиями у некоторых больных произошло на фоне уже имеющегося неврологического заболевания, что, конечно, не исключает необходимости диагностики и лечения боррелиоза в этих случаях.

### Выводы

Обнаружение спирохет *Borrelia burgdorferi* в мышечных биоптатах больных с нервно-мышечной патологией неясного происхождения позволяет считать боррелии этиологическим фактором заболевания.

Оптимальными морфологическими методами диагностики боррелиоза являются иммуноцитохимические методы (световые и электронно-микро-

скопические) с использованием специфических антител к антигенам *Borrelia burgdorferi*.

Электронно-микроскопическое выявление боррелий, в том числе их L-форм, в мышечных биоптатах является высокоинформативным тестом в диагностике хронического боррелиоза, в том числе и нейроборрелиоза.

Наличие очагов повреждения мышечных волокон в биоптате с присутствием спирохетоподобных структур при световой микроскопии полутонких срезов служит поводом для применения более специфических методов, указанных выше, или повторных попыток выявления боррелиоза другими методами, доступными для данного лечебного учреждения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Лобзин Ю.В., Усков А.Н. Нейроборрелиоз: эпидемиология, клиника, диагностика и лечение. В кн.: Нейроинфекции (Аннотированные доклады I национальной конференции с международным участием 28–29 мая 2007 г.). С. 80–83.
2. Хронические нейроинфекции. Под ред. И.А. Завалишина, Н.Н. Спирина, А.Н. Бойко, С.С. Никитина. М.: ГЭОТАР–Медиа, 2011. С. 224–260.
3. Баранова Н.С., Спиринов Н.Н., Шипова Е.Г., Степанов И.О. Поражение нервной системы на отдельных стадиях Лайм-боррелиоза. Ж неврол и психиатр 2010;110;2;90–6.
4. Вельгин С.О., Протас И.И., Пономарев В.В. и др. Клинический полиморфизм нейроборрелиоза в поздней стадии заболевания. Ж неврол и психиатр 2006;106:8–51.
5. MacDonald A.B. Concurrent neocortical borreliosis and Alzheimer's disease: Demonstration of a spirochete L-cyst form. Annals NY Academy of Sciences 1988; 539:468–70.
6. Margulis L., Maniotis A., MacAllister J. et al. Spirochet round bodies. Syphilis, Lyme disease, & AIDS: Resurgence of "the great imitator". Symbiosis 2009;47:51–8.
7. Pachner A.R. Borrelia burgdorferi in nervous system: the new "great imitator". Annals of NY Academy of Sciences 1988; 539:56–64.
8. Dubowitz V., Sewry C. A. (ed. by). Muscle Biopsy. A practice approach. 2007. Saunders, Elsevier London. Third edition.
9. Engel W.K. The essentiality of histo- and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease. Neurology 1962;12:778–94.
10. de Koning P., Hoogkamp-Korstanje J.A. Diagnosis of Lyme disease by demonstration of spirochetes in tissue biopsies. Zentralbl Bakteriologie Mikrobiol Hyg 1986;263:179–88.
11. de Koning J., Bosma R.B., Hoogkamp-Korstanje J.A. Demonstration of spirochetes in patients with Lyme disease with a modified silver stain. J Med Microbiol 1987;23:261–7.
12. Bettica A., Johnson A.B. Ultrastructural immunogold labeling of glial filaments in osmicated and Epoxy-embedded tissue. J Histochem Cytochem 1990;38:103–9.
13. Comstock L.E., Thomas D.D. Penetration of endothelial cell monolayers by *Borrelia burgdorferi*. Infect Immun 1989;57:1626–8.
14. Duray P., Yin Sh.-R., Ito Y. et al. Invasion of human tissue *ex vivo* by *Borrelia burgdorferi*. J Infect Dis 2005;191:1747–54.
15. Hulinska D., Jirous J., Valesova M., Hercogova J. Ultrastructure of *Borrelia burgdorferi* in tissue of patients with Lyme disease. J Basic Microbiol 1989;29:73–83.
16. Hulinska D., Basta J., Murgia R., Cinco M. Intracellular morphological events observed by electron microscopy on neutrophil phagocytosis of *Borrelia garinii*. J Spirochetal Tick-Borne Dis 1995;2(4):82–6.
17. Hayes S.F., Burgdorfer W. Ultrastructure of *Borrelia burgdorferi*. In: K. Weber, W. Burgdorfer, eds. Aspects of Lyme borreliosis. Heidelberg: Springer-Verlag, 1993.
18. Aberer E., Kersten A., Klade H. et al. Heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* in the skin. Am J Dermatopathol 1996; 18(6):571–9.
19. Brorson Ø., Brorson S.H. Transformation of cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to normal, mobile spirochetes. Infection 1997;25:240–6.
20. Brorson Ø., Brorson S.H., Scethes J. et al. Destruction of spirochete *Borrelia burgdorferi* round-body propagules (RBs) by the antibiotic Tigecycline. Proc Natl Acad Sci USA 2009;106:18656–61.
21. Morphological Transformation in *Borrelia burgdorferi* and Other Spirochetes: Observations of Round Forms & Blebs, 1905–2010. 262 Studies (63 on Lyme disease; 199 on other spirochetes) Lust Updated: 26 November 2010.
22. Dorward D.W., Fischer E.R., Brooks D.M. Invasion and cytopathic killing of human lymphocytes by spirochetes causing Lyme disease. Clin Infect Dis 1997;25:52–8.
23. Елисеева И.В., Бабиц Е.М., Волянский Ю.Л. и др. О роли латентных, трудно культивируемых и некультивируемых персистентных бактерий в патологии человека. Анали Мечниковского Института 2006;(1):12–45.
24. Miklosy J., Kasas S., Zurn A.D. et al. Persisting atypical and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* and local inflammation in Lyme neuroborreliosis. J Neuroinflammation 2008;5:40.
25. Mac Donald A.B. A life cycle for *Borrelia burgdorferi*? Medical Hypotheses 2006;67:810–8.
26. Grab D.J., Perides G., Dumler J.S. et al. *Borrelia burgdorferi*, host-derived proteases, and the blood brain barrier. Infect Immun 2005;73(2):1014–22.
27. Grubhoffer L., Golovchenko M., Vancová M. et al. Lyme borreliosis: insights into tick-host-borrelia relations. Folia parasitologica 2005;52:279–94.
28. Barbour A.G., Hayes S. Biology of *Borrelia* Species. Microbiol Rev 1986: 381–400.
29. Chary-Valckenaere I., Jaulhac B., Champigneulle J. et al. Ultrastructural demonstration of intracellular localization of *Borrelia burgdorferi* in Lyme arthritis. Brit J Rheumatol 1998;37:468–9.
30. Al-Robaiy S., Dihazi H., Kacza J. et al. Metamorphosis of *Borrelia burgdorferi* organisms – RNA, lipid and protein composition in context with the spirochetes' shape. J Basic Microbiology, Suppl: Med Microbiol 2010;50, Issue Suppl 1:5–17.
31. Hofhuis A., van der Giessen J.W.B., Borgsteede F. et al. Lyme borreliosis in the Netherlands: strong increase in GP consultations and hospital admissions in last past 10 years. Euro Surveill 2006;11:22/06/2006.
32. Lindgren E., Jeanson T.G.T. Lyme borreliosis in Europe: Influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures. In: Climate Change and Adaptation Strategies for Human Health [B. Menne and K. Ebi (eds.)]. Darmstadt: Steinkopff, 2006; s.157–188.
33. Руководство по инфекционным болезням. Под ред. Ю.В. Лобзина. СПб.: Фолиант, 2000. 932 с.