

Грамада Н.Е.<sup>1</sup>, Холмогорова Н.А.<sup>2</sup>, Пичугова С.В.<sup>3,4</sup>, Тулакина Л.Г.<sup>4</sup>, Бейкин Я.Б.<sup>3,4</sup>

## Ультраструктурные морфологические изменения митохондрий в плаценте матери и пуповине недоношенных новорожденных с очень низкой массой тела

1 - ГБОУ ВПО УГМУ Минздрава России, г. Екатеринбург, кафедра поликлинической педиатрии и педиатрии ФПК и ИП; 2 - Областная детская клиническая больница №1, г. Екатеринбург, отделение патологии новорожденных №2; 3 - Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург; 4 - МАУ «Клинико-диагностический центр», г. Екатеринбург

*Gromada N.E., Kholmogorova N.A., Pichugova S.V., Tulakina L.G., Bey-kin J.B.*

### The ultrastructural morphological changes of mitochondria in the placenta and umbilical cord in preterm infants with very low birth weight

#### Резюме

Проведено морфологическое ультраструктурное исследование патологических изменений в плаценте матери и пуповине недоношенных новорожденных с очень низкой массой тела с использованием электронного микроскопа. При сравнении результатов исследования со здоровыми доношенными детьми обнаружены патологические изменения органелл в цитоплазме синцитиотрофобласта плаценты: набухшие митохондрии с деструкцией крист и опустошением митохондриального матрикса, гигантские вакуоли. Указанные изменения митохондрий выявлены во всех случаях наблюдения, но с разной частотой и степенью выраженности. Аналогичные патологические морфологические ультраструктурные нарушения определяются в цитоплазме гладкомышечной клетки пуповины. Возможно, это результат влияния оксидантного стресса, обусловленного действием различных этиологических факторов при преждевременных родах.

**Ключевые слова:** Недоношенность, очень низкая масса тела, плацента, пуповина, митохондрии, ультраструктурная патология

#### Summary

Morphological study of ultrastructural abnormalities in the placenta and umbilical cord was conducted in preterm infants with very low birth weight using an electron microscope. Comparison of results of studies showed pathological changes in organelle in the cytoplasm of the syncytiotrophoblast of the placenta: swollen mitochondria with cristae destruction and devastation of the mitochondrial matrix, the giant vacuoles. These changes in mitochondria found in all cases of observation but with varying frequency and severity. Similar ultrastructural morphological disorders are defined in the cytoplasm of smooth muscle cells of the umbilical cord. Perhaps this is the result of oxidative stress due to the action of various etiologic factors for preterm birth.

**Key words:** Prematurity, very low birth weight, placenta, umbilical cord, mitochondria, ultrastructural pathology

#### Введение

Проблема выхаживания недоношенных детей с очень низкой и экстремально низкой массой тела остается одной из наиболее актуальных в современной медицине. За последние годы число преждевременных родов выросло также, как и число выживших младенцев с крайне малым весом. Дети, родившиеся преждевременно, занимают особое место среди новорожденных. У этих младенцев отмечаются высокие показатели смертности, заболеваемости, связанные с незрелостью органов и систем. По данным отечественных и зарубежных авторов, выживают около 99% детей, рожденных между 33 и 37 неделями беременности, тогда как выживаемость детей, рожденных

до 29 недель, составляет от 70-80 до 90-95%. Внедрение новых технологий в перинатальной медицине повышает процент выживших детей, рожденных с низкой (ОНМТ) и экстремально низкой массой тела (ЭНМТ) [1,2,3].

Анализ литературных источников показывает, что проблема рождения недоношенных детей достаточно хорошо освещена, преимущественно, с точки зрения клинико-anamnestических характеристик женщин, родивших этих детей, этиологических механизмов, предшествующих их рождению, особенностей клинических проявлений и методов их коррекции, отдаленных последствий у новорожденных данной категории. Исследованы и изучаются особенности функционирования кардио-

респираторной системы, патофизиологические процессы формирования гипоксического поражения ЦНС и иммунного ответа [4,5,6]. Однако остаются недостаточно изученными особенности морфологических характеристик оксидантного стресса и особенностей энергообмена клетки у матери и ребенка при преждевременных родах. Детальное изучение морфологии плаценты и тканей пуповины может показать важные, часто непредполагаемые ультраструктурные изменения, что позволит расширить возможности диагностики и определить прогнозы энергодефицитных состояний у недоношенных детей. Существует большой временной разрыв в исследованиях подобного плана, которые ранее были посвящены перинатальной инфекции.

**Цель исследования:** определение роли морфологических ультраструктурных патологических изменений тканей плаценты и пуповины для диагностики дефектов клеточного энергообмена у недоношенных новорожденных с очень низкой массой тела.

## Материалы и методы

Исследование проводили на базе отделений реанимации и интенсивной терапии новорожденных (ОРИТН) родильного дома МАУ ГКБ № 14 и областного перинатального центра, ОДКБ № 1, специальные исследования – институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, МАУ «Клинико-диагностический центр», г. Екатеринбург.

Были обследованы 18 недоношенных новорожденных с ОНМТ (10 мальчиков и 8 девочек), гестационный возраст 29-31 недели, масса тела 1500-1001г. Контрольную группу составили 20 здоровых доношенных новорожденных.

Исследование проводили по единой схеме, предполагавшей изучение соматического, акушерско-гинекологического анамнеза матерей в группе недоношенных и здоровых новорожденных соответственно, с учетом особенностей течения настоящей беременности, результатов клинического, инструментального и лабораторного обследования новорожденных.

Рождению детей с ОНМТ предшествовало осложненное течение настоящей беременности и родов, отягощенное акушерско-гинекологической патологией, возраст женщин старше 30 лет. При анализе акушерского анамнеза было выявлено, что бесплодие (первичное, вторичное) у женщин основной группы отмечалось в 10,1% случаев. В группе контроля данная патология не зарегистрирована. В обеих группах преобладали повторнородимые: в основной группе их было 60%, в группе контроля – 70,3%. Более чем у трети матерей (35%) в группе недоношенных детей регистрировались медицинские аборт.

Течение настоящей беременности у женщин основной группы достоверно чаще, чем в группе контроля сопровождалось угрозой прерывания. При анализе анамнестических данных матерей исследуемой группы установлены неудовлетворительные показатели состояния здоровья, проявившиеся различной экстрагенитальной

патологией в виде болезней системы кровообращения (12,4%), патологии эндокринной системы (11,7%), анемии (65%), очагов хронической инфекции мочеполовой системы (25,4%). У этих матерей наблюдалась преэклампсия тяжелой степени, тогда как в контрольной группе тяжелая степень преэклампсии не зафиксирована. Достоверно чаще относительно женщин контрольной группы регистрировались тяжелые формы хронической фетоплацентарной недостаточности (ХФПН) – в 72,2% случаев. У женщин группы контроля ХФПН была представлена, в основном, компенсированной формой.

Досрочное родоразрешение женщин в интересах матери и плода способом операции кесарева сечения было основной группой, а в контрольной группе проводилось только в плановом порядке. Преждевременная отслойка плаценты наблюдалась в группе матерей, родивших недоношенных детей (14,1%).

Тяжесть состояния новорожденных была обусловлена острой дыхательной недостаточностью за счет синдрома дыхательных расстройств, неврологической симптоматикой, угрозой реализации внутриутробной инфекции, недоношенностью (ОНМТ). Все дети находились на специальном охранительном режиме выхаживания с использованием кувезов, оксигенотерапии, парентерального питания, расчета вводимой жидкости, зондового вскармливания, ограничением манипуляций.

В структуре заболеваемости новорожденных преобладала сочетанная патология. У каждого ребенка (100%) имел место респираторный дистресс-синдром различной степени тяжести, потребовавший проведения искусственной вентиляции легких (ИВЛ) у 87% детей в течение длительного времени (от 1 до 12 суток).

По данным нейросонографии, 80% недоношенных в первые сутки жизни имели признаки церебральной ишемии III степени на фоне морфологической незрелости, у 20% детей диагностирована церебральная ишемия II степени. ВЖК III степени наблюдались у 5 детей и ВЖК II степени – у 10 новорожденных. Сочетанное ишемическое геморрагическое поражение ЦНС диагностировалось у 62% детей.

В клинической картине в раннем неонатальном периоде доминировал синдром прогрессирующей потери церебральной активности (70,2%) вплоть до комы – у 23,8%, повторные судороги – у 12,5%, наличие стволочной симптоматики – у 8,5% новорожденных.

С помощью метода электронной микроскопии проведено исследование морфологических ультраструктурных изменений в тканях плаценты матери и пуповины недоношенных детей. Фрагменты ткани пуповины и плаценты фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида с последующей дополнительной фиксацией в 1% растворе четырехоксида осмия ( $OsO_4$ ) в течение 2 часов, промывали в 0,2 М фосфатном буфере и проводили через спирты возрастающей концентрации и ацетон с целью обезвоживания. Затем образцы помещали на 24 часа в смесь аралдита и ацетона в соотношении 1:1, после чего заключали в аралдит с полимеризацией при температуре 37°C в течение 1 суток, далее – при температуре 60°C в

течение суток. Ультратонкие срезы получали на ультратоме «LeicaEMUC6» (Германия), контрастировали их цитратом свинца и исследовали в электронном микроскопе «Morgagni 268-D» (Чехия, Голландия) при увеличении от 2200 до 22000.

Статистическая обработка материала проводилась методом вариационной статистики с использованием программ MicrosoftExcel. Достоверность полученных результатов оценивалась парным методом по t-критерию Стьюдента, также использовался непараметрический критерий Манна-Уитни и метод Фишера (различия считались достоверными при  $p < 0,05$ ).

## Результаты и обсуждение

Электронно-микроскопические методы исследования тканей плаценты и пуповины позволили обнаружить дефекты на ультраструктурном уровне. В группе контроля (здоровые новорожденные) при исследовании фрагмента цитоплазмы синцитиотрофобласта плаценты митохондрии, в основной массе, имеют типичную форму, просматриваются кристы, двухконтурность митохондриальной мембраны сохранена (митохондрии показаны стрелками). x 22000.

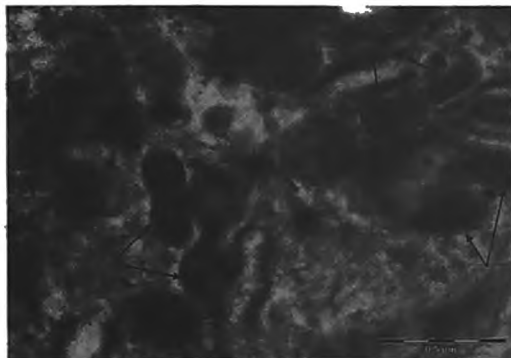


Рис.1. Фрагмент цитоплазмы синцитиотрофобласта. Митохондрии, в основной массе, имеют типичную форму, просматриваются кристы, двухконтурность митохондриальной мембраны сохранена (митохондрии показаны стрелками). x 22000.

митохондриальной мембраны, но в ряде случаев выявлено их уплотнение и уменьшение в размерах (рис.1). Во фрагментах цитоплазмы гладкомышечной клетки пуповины митохондрии набухшие, но в них еще просматриваются отдельные кристы, митохондриальный матрикс гомогенного вида (рис.2). Выше описанные изменения, по-видимому, являются отражением морфологических изменений в тканях плаценты и пуповины в интранатальном периоде (физиологический апоптоз?).

У матерей недоношенных детей, рожденных в сроке 29-31 неделя, обнаружены патологические изменения органелл цитоплазмы синцитиотрофобласта плаценты: набухшие митохондрии с деструкцией крист и опустошением митохондриального матрикса, гигантские вакуоли (рис.3). Указанные изменения митохондрий выявлены во всех случаях наблюдения, но с разной частотой и степенью выраженности. Аналогичные патологические морфологические ультраструктурные нарушения определяются в цитоплазме гладкомышечной клетки пуповины (рис.4). По литературным данным подобные исследования не проводились и практически не имеют об-



Рис.2. Фрагмент цитоплазмы гладкомышечной клетки пуповины. Митохондрии набухшие, но в них еще просматриваются отдельные кристы, митохондриальный матрикс гомогенного вида (показано стрелками). x 22000

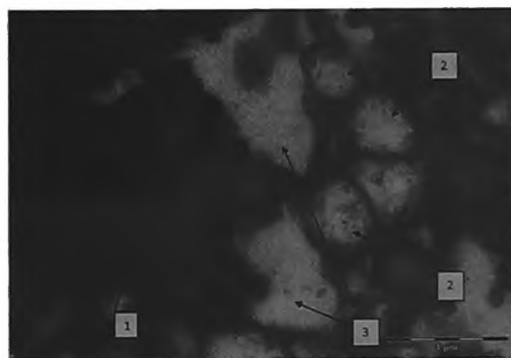


Рис.3. Фрагмент цитоплазмы синцитиотрофобласта. Ядро (1), набухшие митохондрии с деструкцией крист и опустошением митохондриального матрикса (2), гигантские вакуоли в цитоплазме (3). x 22000

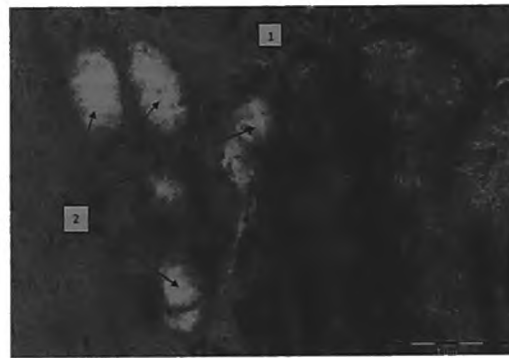


Рис.4. Фрагмент цитоплазмы гладкомышечной клетки пуповины. Ядро (1), набухшие митохондрии с деструкцией крист и опустошением митохондриального матрикса (2). x 22000

яснений. Возможно это результат влияния оксидантного стресса, обусловленного действием различных этиологических факторов при преждевременных родах [7,8].

Оксидантный стресс рассматривается как основной механизм повреждения ультраструктур тканей различных органов и систем в том числе, плаценты, нейронов, сердечной мышцы [4,6,8]. Возможно, набухание митохондрий, их недостаточное количество, опустошение митохондриального комплекса нарушает механизм передачи энергии в клетке у недоношенных с ОНМТ.

Исследования, проводимые ранее по определению цитохимической активности митохондрий (дегидрогеназ лимфоцитов), указывают на сопряженность процессов клеточного энергообмена и ультраструктурных морфологических изменений митохондрий в тканях [7,8]. Качественные изменения митохондрий – набухание крист, просветление митохондриального матрикса могут иметь генетическую природу и связаны с нарушением синтеза АТФ, но наиболее часто они связаны с инфекционным процессом, воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды и приемом лекарственных препаратов [8].

## Заключение

У матерей недоношенных детей, рожденных в сроке 29-31 неделя, обнаружены деструктивные изменения митохондрий сопоставлением митохондриального матрикса в цитоплазме синцитиотрофобласта плаценты и в цитоплазме гладкомышечной клетки пуповины. Не исключе-

но, что патологические ультраструктурные изменения в митохондриях указывают на нарушение механизмов передачи энергии в клетке на фоне оксидантного стресса при преждевременных родах. Используя метод электронной микроскопии можно определить характер ультраструктурной аномалии митохондрий в плаценте и пуповине, что позволяет расширить возможности в диагностике энергодифицитных состояний у недоношенных детей с ОНМТ. ■

*Грамада Наталья Евгеньевна, д.м.н., доцент кафедры поликлинической педиатрии и педиатрии ФПК и ПП ГБОУ ВПО УГМУ, Холмогорова Наталья Александровна, неонатолог, отделения патологии новорожденных №2, областная детская клиническая больница №1, г. Екатеринбург, Пичугова Светлана Владимировна, к.м.н., врач лаборатории электронной микроскопии МАУ «Клинико-диагностический центр», институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Тулакина Людмила Геннадьевна, к.м.н., заведующая лабораторией электронной микроскопии МАУ «Клинико-диагностический центр», Бейкин Яков Борисович, д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ, главный врач МАУ «Клинико-диагностический центр», институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Автор, ответственный за переписку: Грамада Наталья Евгеньевна - 620042, г. Екатеринбург, переулок Суворовский, дом №4, моб. +79028745932, e-mail: negromada@mail.ru*

## Литература:

1. Сигова Ю.А., Рогаткин С.О., Володин Н.Н. и др. Влияние перенесенной гипоксии-ишемии на частоту развития ВЖК у детей различного гестационного возраста. Мат. V Ежегодного Конгресса специалистов перинатальной медицины «Современная перинатология: организация, технологии и качество» (Москва, 27-29 сентября 2010 года). *Вопр. практич. Педиатрии* 2010; 1: 75-76.
2. Байбарина Е.Н., Сорока З.Х. Исходы беременности в сроки 22-27 недель в медицинских учреждениях Российской Федерации. *Вопросы современной педиатрии* 2011; 1: 17-20.
3. Руденко Н.В., Вениова С.Н. Состояние здоровья недоношенных детей с очень низкой и экстремально низкой массой тела при рождении. *Тихоокеанский медицинский журнал* 2012; 3: 34-36.
4. Медведев М.И., Дегтярева М.Г., Горбунова А.В., Гребенникова О.В. и др. Последствия перинатальных гипоксически-ишемических поражений головного мозга у доношенных новорожденных: диагностика и принципы восстановительного лечения *Педиатрия* 2011; Т.90, 1: 66-70.
5. Володин Н.Н., Горельшев С.К., Попов В.Е. ВЖК, постгеморрагическая гидроцефалия у новорожденных детей. Принципы оказания медицинской помощи: Методические рекомендации. М: Материалы IX Ежегодного Конгресса специалистов перинатальной медицины 2014: 78-87.
6. Ремнева О.В., Фадеева Н.И., Кореновский Ю.В. и др. Прогнозирование и ранняя диагностика тяжелых церебральных расстройств у недоношенных. *Педиатрия* 2014; Т.94, 1: 13-19.
7. Николаева Е.А., Сухоруков В.С. Современная диагностика митохондриальных болезней у детей. *Российский вестник перинатологии и педиатрии* 2007; 4: 11-21.
8. Сухоруков В.С. Индивидуальные особенности тканевого энергообмена, их роль в развитии детских болезней. *Российский вестник перинатологии и педиатрии* 2011; Т.56, 2: 4-11.