

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИОКАРДА ГЛУБОКОНЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ, РАЗВИВАВШИХСЯ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ ВНУТРИУТРОБНОЙ ГИПОКСИИ

Кулида Л.В., Проценко Е.В., Сарыева О.П.

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н. Городкова» Минздрава России, Иваново, e-mail: kulida@mail.ru

Проведенное морфологическое исследование сердца глубоконедоношенных новорожденных – с экстремально низкой массой тела (1-я группа – 25) и очень низкой массой тела (2-я группа – 15) – включало обзорную гистологию, раздельное взвешивание, морфометрию, иммуногистохимию и трансмиссионную электронную микроскопию. Установлено, что увеличение массы сердца новорожденных 2-й группы до $9,05 \pm 1,38$ г по отношению к аналогичному параметру детей 1-й группы ($7,16 \pm 1,76$ г) обусловлено не только закономерным ростом плода по мере увеличения гестационного возраста, но и избирательной гипертрофией правого желудочка. Структурную основу последней составляют увеличение площади ядер кардиомиоцитов ($26,84 \pm 2,63$ мкм²) и удельной площади мышечного компонента миокарда ($85,24 \pm 2,95\%$; $p=0,004$) в сочетании со снижением удельной площади интерстициальной ткани ($14,76 \pm 1,98\%$; $p=0,001$). Доказано, что основными морфологическими особенностями миокарда новорожденных с ЭНМТ, перенесших хроническую внутриутробную гипоксию, являются распространенные нарушения микроциркуляции, хаотичное расположение мышечных волокон, слабая экспрессия тропонина Т, а также деструкция митохондриальных мембран с лизисом миофибрилл. Структурную основу гипоксических повреждений миокарда у новорожденных с ОНМТ составляют очаговые нарушения микроциркуляции, умеренная экспрессия тропонина Т в сочетании с очаговой деструкцией крист митохондрий.

Ключевые слова: глубоконедоношенные новорожденные, миокард, гипоксия, сердечный тропонин, миоглобин.

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE MYOCARDIUM IN DEEPLY PREMATURE INFANTS DEVELOPING UNDER CONDITIONS OF CHRONIC INTRAUTERINE HYPOXIA

Kulida L.V., Procenko E.V., Saryeva O.P.

Ivanovo Research Institute of Maternity and Childhood named V.N. Gorodkov, Ministry of Health of Russia, Ivanovo, e-mail: kulida@mail.ru

We conducted a comprehensive morphological study of heart samples of 25 newborns with extremely low body weight and 15 children with very low body weight. The study included an overview histology, separate weighing of the heart, morphometry, immunohistochemical examination and transmission electron microscopy. The analysis of organometric parameters in newborns with very low body weight revealed an increase in heart mass to $9,05 \pm 1,38$ g, ($p=0,01$) compared with newborns of extremely low body weight ($7,16 \pm 1,76$ g) due to hypertrophy of the right ventricle. The structural basis of hypertrophy was an increase in the area of cardiomyocyte nuclei ($26,84 \pm 2,63$ мкм² $p=0,001$) and the specific area of the muscle component of the myocardium ($85,24 \pm 2,95\%$; $p=0,004$), as well as a decrease in the specific area of interstitial tissue ($14,76 \pm 1,98\%$; $p=0,001$) compared with similar parameters of newborns with extremely low body weight. It is proved that the main morphological features of the myocardium of newborns with extremely low body weight who have undergone chronic intrauterine hypoxia are widespread microcirculation disorders, chaotic arrangement of muscle fibers, weak expression of troponin T, as well as destruction of mitochondrial membranes with lysis of myofibrils. The structural basis of hypoxic myocardial damage in newborns with very low body weight is focal microcirculation disorders, moderate expression of troponin T in combination with focal destruction of mitochondrial crystals.

Keywords: newborns 22-32 weeks of gestation, myocardium, hypoxia, cardiac troponin, myoglobin.

Гипоксически-ишемические повреждения миокарда занимают ведущее место в структуре перинатальных повреждений сердечно-сосудистой системы у глубоконедоношенных новорожденных [1]. Неблагоприятный медико-биологический и

социальный прогноз определяет значимость данной патологии [2]. По литературным данным [3], последствия гипоксической кардиопатии, характеризующиеся снижением сократительной функции миокарда, перегрузкой правых отделов сердца и нарушениями ритма, могут сохраняться в течение 3–6 месяцев после рождения детей. Связанные с кислородным голоданием и тканевой гипоксией структурные изменения в миокарде, как правило, характеризуются мелкоочаговыми повреждениями в виде субэндокардиального и папиллярного некроза, капилляростаза, микротромбоза, периваскулярных геморрагий, способствующих контрактурным повреждениям кардиомиоцитов [4, 5]. В современной литературе появились сведения о взаимосвязи между повреждением митохондрий и дисфункцией тканевых структур фетоплацентарного комплекса (ФПК) [6]. Очевидно, сердце, как и другие органы ФПК, подвергается окислительному стрессу [7], в связи с чем изменяются морфофункциональные характеристики кардиомиоцитов и сократительная способность миокарда [8, 9], детальное изучение морфогенеза нарушений которой у глубоконедоношенных новорожденных приобретает особую актуальность. Повреждающее воздействие гипоксии на миокард перинатального периода представляется мультифакториальным [10], а морфогенетические изменения кардиомиоцитов – до конца не изученными. В кардиологии среди клинико-лабораторных методов исследования особую актуальность приобретает количественное определение в крови пациентов биохимических маркеров гипоксически-ишемического повреждения миокарда. К таковым относятся тропонин и миоглобин. Субъединицы тропонинового комплекса (I, T, C) входят в состав сократительного аппарата мышечных клеток [11, 12]. Миоглобин – кислород-связывающий белок, обеспечивающий энергетический потенциал сократительной функции миокарда [13]. В неонатологии тропонины применяются в качестве биохимических маркеров некроза кардиомиоцитов. Отмечено повышение миоглобина и тропонинов в крови у детей с внутрижелудочковыми кровоизлияниями и врожденными пороками сердца (ВПС), в том числе и у глубоконедоношенных новорожденных [14]. Однако в литературе практически отсутствуют сведения об особенностях экспрессии указанных биомаркеров непосредственно в миокарде.

Цель исследования: изучить структурные особенности миокарда, определяющие его сократительную способность, у новорожденных с экстремально низкой (ЭНМТ) и очень низкой массой тела (ОНМТ), развивавшихся в условиях хронической внутриутробной гипоксии.

Материалы и методы исследования. Выполнено морфологическое исследование сердца 25 умерших новорожденных с экстремально низкой массой тела (ЭНМТ) – от 500 до 999 г (1-я группа) и 15 детей с очень низкой массой тела (ОНМТ) – от 1000 до 1499 г (2-я

группа). Комплексное исследование включало органометрию, обзорную гистологию, морфометрию, иммуногистохимическое исследование с антителами к сердечному тропонину Т (сТnТ) и миоглобину, а также трансмиссионную электронную микроскопию. Материалом для исследования являлись иссеченные из правого и левого желудочков сердца фрагменты.

Для гистологического исследования использовали стандартный метод парафиновой проводки материала с последующей окраской препаратов гематоксилином и эозином. Стандартное иммуногистохимическое исследование на парафиновых срезах включало этапы обработки тканей в условиях высокой температуры, демаскирования антигена, блокирования эндогенной пероксидазы. В работе применялись кроличьи антитела: моноклональные к тропонину Т (1:800) и поликлональные к миоглобину (1:800) (Biorbyt, Великобритания). Для концептуализации комплексов «антиген-антитело» на гистологических препаратах использовали систему детекции «UltraVision» (ThermoFisher Scientific, USA). Для оценки экспрессии сердечного тропонина Т применяли основанный на визуализации полуколичественный метод, в соответствии с которым отрицательную экспрессию биомаркера обозначали знаком «-», а положительную – знаком «+» с учетом того, что последняя может быть слабой (+), умеренной (++) и выраженной (+++). Интенсивность реакции «антиген-антитело» оценивали в 100 клетках 10 полей зрения при увеличении светового микроскопа в 400 раз ($\times 400$). При оценке экспрессии миоглобина количественным методом определяли индекс экспрессии (ИЭ) биомаркера по известной формуле [15]:

$$\text{ИЭ} = \sum P(i) / 100 \text{ у.е.},$$

где I – интенсивность окраски иммунных комплексов в баллах от 0 до 3;

P(i) – процент клеток, окрашенных по-разному.

Гистостереометрию интерстиция и мышечной части миокарда правого желудочка – вычисление средней площади ядра кардиомиоцита и определение удельной плотности ядер в единице площади ткани – проводили с использованием компьютерной программы «ВидеоТест-Морфология-4.0».

Для электронно-микроскопического исследования материал после фиксации и постфиксации обезвоживали и заключали в смолы. Подготовленные для дальнейшей обработки ультратонкие срезы с целью контрастирования последовательно обрабатывали 3%-ным уранилацетатом, 100%-ным метиловым спиртом и цитратом свинца. Изучение ультратонких срезов осуществляли при помощи электронного микроскопа ЭВМ-100АК. Цифровой материал обработан с помощью стандартного пакета программного обеспечения «Statistica». Достоверность различий между вариационными рядами с нормальным типом

распределения оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Для малых выборок использовали непараметрический критерий Манна–Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение. Внутриутробно новорожденные 1-й и 2-й групп развивались в условиях хронической субкомпенсированной фетоплацентарной недостаточности (ХСФПН), которая явилась одной из основных причин развития преждевременных родов. Структурную основу ХСФПН составили хронические нарушения материнского (32%) и фетального (28%) кровообращения в сочетании с воспалением (67,3%). В плацентах новорожденных 2-й группы чаще ($p=0,01$) определялись материнская (32%) и фетальная мальперфузия (44%), преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты (67%) и хронические инфаркты (33%). Базальный (68,8%) и париетальный (62,5%) децидуит и хронический виллузит промежуточных ворсин (56,3%) с поствоспалительной гиповаскуляризацией стромы ворсин (50%) чаще диагностировались в 1-й группе ($p=0,05$). Патологические изменения в исследуемых плацентах развивались на фоне несформированных компенсаторных процессов. В плацентах обеих групп были диагностированы лишь адаптационные перестройки в виде дилатации и полнокровия капилляров промежуточных ворсин.

Новорожденные исследуемых групп по соматическому статусу соответствовали сроку гестации (табл. 1).

Таблица 1

Антропометрические показатели новорожденных в зависимости от гестационного возраста, Ме [25;75]

Параметры	1-я группа 22–27 недель, n=25	2-я группа 28–32 недели, n=15	Достоверность различий, p
Масса, г	582,5 [465,0; 700,0]	1260,0 [960,0; 1400,0]	0,001
Длина, см	28,5 [24,0; 32,0]	38,0 [31,0; 39,0]	0,002
Окружность головы, см	23,0 [20,0; 24,5]	27,5 [26,0; 28,0]	0,002
Окружность груди, см	19,7 [18,0; 22,0]	24,0 [23,0; 25,0]	0,002

Продолжительность жизни новорожденных 1-й группы в среднем составила 3,5 суток, у детей 2-й группы – 3 суток. Органометрия и раздельное взвешивание сердца, выполненные

при патологоанатомическом исследовании умерших детей, позволили выявить у новорожденных 2-й группы значимое ($p=0,01$) увеличение показателя массы сердца ($9,05\pm 1,38$ г) по отношению к аналогичному параметру детей 1-й группы ($7,16\pm 1,76$ г), обусловленное не только закономерным ростом плода по мере увеличения гестационного возраста, но и избирательной гипертрофией правого желудочка. Структурной основой последней, по данным гистометрии, является увеличение показателей удельной площади его мышечной части и площади ядра гладкомышечной клетки. Кроме того, удельная площадь интерстиция миокарда у детей с ОНМТ значимо меньше аналога новорожденных с ЭНМТ (табл. 2).

Таблица 2

Морфометрические параметры правого желудочка сердца

Морфометрические параметры	1-я группа 22–27 недель, n=25	2-я группа 28–32 недели, n=15	Достоверность различий, p
Площадь ядер кардиомиоцитов, мкм ²	20,72 [19,4; 22,57]	26,84 [22,08; 24,51]	0,001
Плотность расположения ядер кардиомиоцитов	591 [552; 602]	510 [497; 521]	0,04
Удельная площадь мышечного компонента миокарда, %	78,83 [76,78; 79,24]	85,24 [83,42; 86,92]	0,004
Удельная площадь интерстициального компонента миокарда, %	21,17 [20,06; 22,23]	14,76 [13,08; 16,58]	0,001

При морфологическом исследовании миокарда у всех глубоко недоношенных новорожденных в правом желудочке сердца обнаруживались изменения в виде нарушений архитектоники и фрагментации кардиомиоцитов, участков венозного застоя и геморрагий диапедезного характера, обусловленных гипоксией. Патоморфологическими особенностями миокарда детей с ЭНМТ являются выраженные в значительной степени внутриклеточный цитолиз, распространенные микроциркуляторные нарушения, инфильтрация эозинофилами, беспорядочное расположение кардиомиоцитов относительно друг друга на фоне отека интерстиция. Гипоксические повреждения выявлены в сосудах разного калибра и топографии (субэндокардиальных, субэпикардиальных и интрамиокардиальных отделах миокарда). Сосуды микроциркуляторного русла в основном были дилатированы, что носило компенсаторный характер, поскольку увеличение площади соприкосновения сосудов с

окужающими тканями играет важную роль в осуществлении обменных процессов между кровью и тканями, а также является ключевым звеном регенерации.

Иммуногистохимическое исследование маркеров ранних гипоксических повреждений кардиомиоцитов и сократительной функции миокарда – тропонина Т и миоглобина – позволило выявить следующие особенности. Экспрессия тропонина Т у новорожденных 1-й группы была слабовыраженной (+), а в зонах гипоксически-обусловленного некроза миокарда – отрицательной (рис. 1).

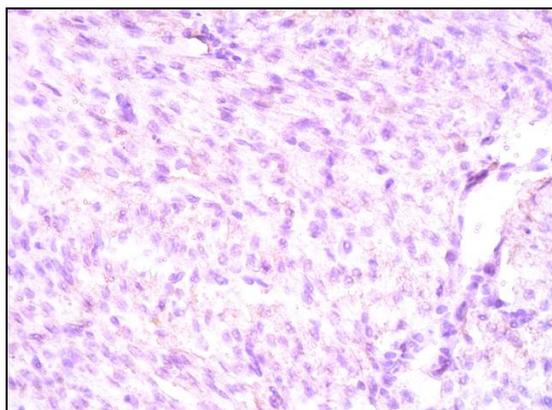


Рис. 1. Миокард новорожденного 25 недель гестации. Слабая (+) экспрессия сердечного тропонина Т, некроз кардиомиоцитов. ИГХ с антителами к сердечному тропонину Т, визуализация диаминобензидином. СМ ×400

Дети 2-й группы отличались умеренно выраженной (++) экспрессией биомаркера в структурированном миокарде правого желудочка сердца и выраженной (+++) – в субэпикардальных отделах (рис. 2).

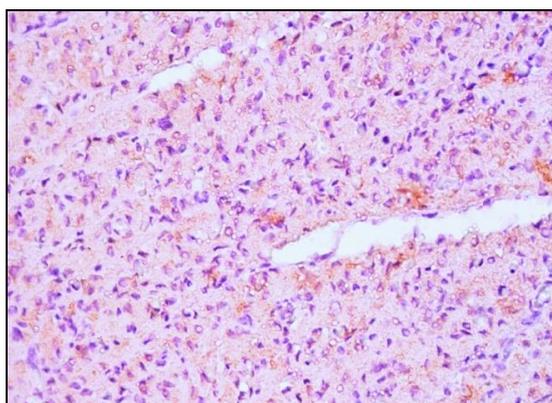


Рис. 2. Миокард новорожденного 30 недель гестации. Выраженная экспрессия сердечного тропонина Т. ИГХ с антителами к сердечному тропонину Т, визуализация диаминобензидином. СМ ×100

Положительная ИГХ-реакция с антителами к миоглобину визуализирована в виде мелкозернистых гранул темно-коричневого цвета в цитоплазме кардиомиоцитов. У детей 1-й группы экспрессия биомаркера определялась в 30% кардиомиоцитов правого желудочка и таком же проценте клеток межжелудочковой перегородки. При этом ИЭ миоглобина в миокарде топографически разных областей сердца составил 0,5 усл.ед. У новорожденных 2-й группы положительная иммуногистохимическая реакция выявлена в среднем в 50% кардиомиоцитов правого и 33,3% клеток левого желудочков, а также в 20% клеток межжелудочковой перегородки, а ИЭ миоглобина соответственно составил 0,4; 0,4 и 0,3 усл.ед. Подобная динамика иммуногистохимической экспрессии биомаркера свидетельствует о низкой сократительной способности миокарда глубоконедоношенных детей, перенесших внутриутробную гипоксию.

Исследование миокарда глубоконедоношенных детей на клеточном уровне позволило детализировать ультраструктуру миоцитов для объективизации дифференциальной диагностики незавершенной дифференцировки клеток и нарушений, обусловленных гипоксией. У новорожденных с ЭНМТ, внутриутробно развивавшихся в условиях гипоксии, саркоплазма миоцитов обеднена клеточными органеллами, включая перинуклеарную область. Миофибриллы, обеспечивающие сократительную функцию кардиомиоцитов, истончены, фрагментированы и отличаются беспорядочным расположением в пучках, сосредоточенных в основном под клеточной мембраной (рис. 3).

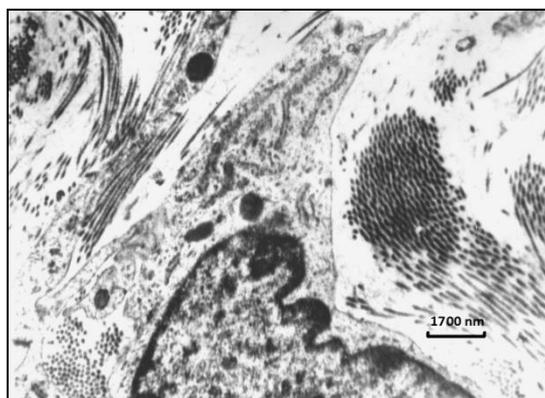


Рис. 3. Миокард новорожденного 27 недель гестации. Расположение тонких миофибриллярных структур под сарколеммой. Единичные фаго- и лизосомы. Инвагинаты нуклеолеммы. ТЭМ. Контрастирование уранилацетатом и цитратом свинца

В миокарде новорожденных с ОНМТ определяется упорядоченное расположение пучков миофибрилл с преимущественно перинуклеарной локализацией. В саркоплазме – малочисленные митохондрии с нарушенной архитектоникой крист и вакуолизацией матрикса. Ядерный гетерохроматин образует фрагментарные скопления в основном под

нуклеолеммой либо в центральной части нуклеоплазмы, что свидетельствует о слабой функциональной активности ядер кардиомиоцитов. Кроме того, в последних выявлены участки фокального плазмолизиса (рис. 4). Полученные данные согласуются с результатами опубликованных ранее научных исследований, в том числе экспериментальных [16].

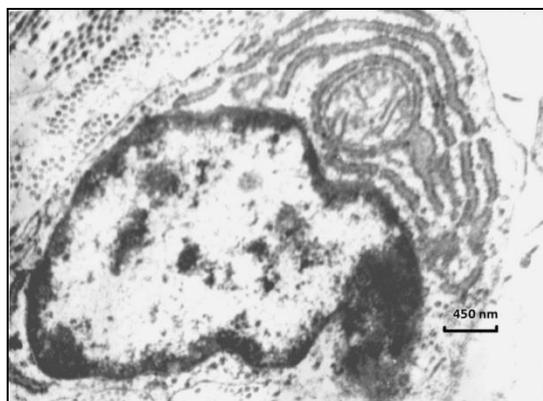


Рис. 4. Миокард новорожденных с ОНМТ. Гранулярный эндоплазматический ретикулум и мембранные рибосомы в перинуклеарной плазмолемме кардиомиоцита. ТЭМ. Контрастирование уранилацетатом и цитратом свинца

Заключение. Таким образом, при комплексном морфологическом исследовании образцов сердца глубоконедоношенных новорожденных, развивавшихся в условиях хронической гипоксии, было показано, что основные изменения на разных уровнях структурной организации преимущественно обнаруживаются в правом желудочке. К таковым относятся дисциркуляторные (спастически-паретические изменения сосудов микроциркуляторного русла, диапедезные паравазальные кровоизлияния, интерстициальный отек) и деструктивные (фрагментация и дезориентация кардиомиоцитов, деструкция митохондрий, внутриклеточный цитолиз) изменения, а также слабая экспрессия основных маркеров сократительной функции миокарда – сердечного тропонина Т и миоглобина – у глубоконедоношенных новорожденных, особенно родившихся в гестационные сроки 22–27 недель. Выявленные структурные особенности являются обоснованием нарушения сократительной способности миокарда у данной категории новорожденных.

Список литературы

1. Киреева О.В., Емельянчик Е.Ю., Салмина А.Б. Особенности адаптации новорожденных детей, родившихся от матерей с преэклампсией, в раннем неонатальном

периоде // Сибирское медицинское обозрение. 2019. № 6. С. 24-31. DOI: 10.20333/2500136-2019-6-24-31.

2. Дегтярева Е.А., Романцов М.Г., Жданова О.И., Михеева А.А., Авакян А.А. Цитофлавин как средство коррекции постгипоксических повреждений миокарда у новорожденных детей // Охрана материнства и детства. 2010. № 2. С. 37-41.

3. Крючко Д.С., Мурашко Е.В., Антонов А.Г., Байбарина Е.Н. Транзиторная ишемия миокарда у новорожденных с респираторной патологией // Вопросы практической педиатрии. 2008. № 5. С. 92-96.

4. Сатаева Т.П., Заднипряный И.В. Изменения структуры миокарда беременных и новорожденных крыс в условиях гипобарической гипоксии // Вестник новых медицинских технологий. 2018. № 4. С. 176-180. DOI: 10.24411/1609-2163-2018-16176.

5. Кулида Л.В., Малышева М.В., Перетятко Л.П., Сарыева О.П., Проценко Е.В. Патоморфология гипоксических повреждений миокарда у новорожденных 22-27 недель гестации // Архив патологии 2021. №4. С. 29-34. DOI: 10.17116/patol20218304129.

6. Вишнякова П.А., Кан Н.Е., Ходжаева З.С., Высоких М.Ю. Митохондрии плаценты в норме и при преэклампсии // Акушерство и гинекология. 2017. № 5. С. 5-8. DOI: 10.18565/aig.2017.5.5-8.

7. Красный А.М., Кан Н.Е., Тютюнник В.Л., Ховхаева П.А., Волгина Н.Е., Сергунина О.А., Тютюнник Н.В., Беднягин Л.А. Окислительный стресс при преэклампсии и при нормальной беременности // Акушерство и гинекология. 2016. № 5. С. 90-94. DOI: 10.18565/aig.2016.5.90-94.

8. Третьякова О.С., Заднипряный И.В. Биоэнергетика миокарда в условиях гипоксии: возрастные аспекты // Оперативная хирургия и клиническая анатомия. 2020. № 1. С. 52-62. DOI: 10.17116/operhirurg2020401152.

9. Муслов С.А., Сеницын А.А., Зайцева Н.В. Анализ параметров механических свойств тканей сердца // Кардиологический вестник. 2020. Т. 15. № 5. С.13-14.

10. Wang L., Zhou Y., Li M.X. Evaluation of left ventricular dysfunction by Tei index in neonates with hypoxemia. Chin. J. Contemp. Pediatr. 2011. Vol. 13. P. 111-114.

11. Катруха И.А. Тропонинный комплекс сердца человека. Структура и функции // Успехи биологической химии. 2013. № 53. С. 149-194. DOI: 10.1134/S0006297913130063.

12. Starnberg K., Jeppsson A., Lindahl B., Hammarsten O. Revision of the troponin T release mechanism from damaged human myocardium. Clin Chem. 2014. Vol. 60 (8). P. 1098-104. DOI: 10.1373/clinchem.2013.217943.

13. Hendgen-Cotta U.B., Kelm M., Rassaf T. Myoglobin functions in the heart. Free Radic Biol Med. 2014. Vol. 73. P. 252-9. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.05.005.

14. Шарыкин А.С., Сафановская А.А., Трунина И.И. Диагностические возможности исследования сердечных тропонинов в педиатрии // Доктор.Ру. 2014. № S3. С. 45-52.
15. Tavassoli F.A. Pathology of the Breast. 2nd Edition, Appleton & Lange, Stamford. 1999. 874 p.
16. Заднипряный И.В., Третьякова О.С., Сатаева Т.П. Ультраструктура миокарда новорожденных крысят в условиях хронической гемической гипоксии // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия Медицина. Фармация. 2015. № 4. С. 72-76.