

УДК: 616-053.2-036.8

Д.А. Шкурупій,

Вищий державний навчальний заклад України «Українська медична
стоматологічна академія»

E-mail: Shkurupiy@list.ru

**Електронно-мікроскопічна характеристика скелетних м'язів
новонароджених із синдромом поліорганної недостатності, померлих на етапі
інтенсивної терапії**

Вступ. Синдром поліорганної недостатності (СПОН) є специфічним проявом критичних станів і, хоча і не є відокремленою нозологічною одиницею, розглядається як єдиний патологічний процес в основі якого лежать неконтрольовані каскадні цитокінові реакції, а прикінцевим етапом є формування мікроциркуляторно-мітохондріальної дисфункції з розвитком клітинного енергодефіциту в наслідок порушення функції мітохондрій через погіршення тканинної перфузії і, відповідно – транспорту і утилізації кисню [1].

Клінічні прояви мітохондріальної дисфункції представлені різноманітними клінічними проявами і включають в себе декілька десятків синдромів, що об'єднуються під назвою «мітохондріальні хвороби». Дані стани мають зв'язок із вродженим чи набутим дефектом генетичного апарату мітохондрій, який обумовлює поліморфність і поліорганність проявів мітохондріальних хвороб. Зважаючи на це не можна виключити асоціацію розвитку СПОН з дефектами роботи мітохондрій [2].

В зв'язку із адаптацією до позаутробних умов існування і необхідністю забезпечення росту і фізичного розвитку новонароджені мають високий рівень основного обміну, а відтак – і високу потребу в адекватному клітинному енергозабезпеченні [3]. Тому саме у новонароджених в критичних станах є актуальною проблема пошуку мітохондріальних порушень.

Одну з найбільших в організмі кількість мітохондрій мають скелетні м'язи, тому саме ця тканина обирається для визначення морфологічних ознак мітохондріальних ушкоджень [4].

Мета дослідження: визначення патогенетичних ланок формування СПОН у новонароджених шляхом посмертної діагностики змін скелетних м'язів методом електронної мікроскопії.

Матеріали та методи дослідження. Об'єктом дослідження був обраний секційний матеріал скелетних м'язів новонароджених, померлих на етапі інтенсивної терапії. Під час проведення аутопсій був проведений забір матеріалу у 20 новонароджених з ознаками СПОН, померлих на етапі інтенсивної терапії: з них у 9 дітей (45,0%) СПОН був наслідком перинатальної асфіксії, а 11 дітей (55,0%) – наслідком перинатального інфікування.

Секційний матеріал фіксували глютар-альдегідом на фосфатному буфері, ущільнювали в епоксидній смолі, напівтонкі зрізи і фарбували їх поліхромним барвником, виготовляли ультратонкі зрізи, контрастували їх уранілацетатом і проводили мікроскопічне дослідження за допомогою електронного мікроскопу МБР-100. Дослідження проводили на базі лабораторії електронної мікроскопії кафедри гістології, цитології та ембріології вищого державного навчального закладу

України «Українська медична стоматологічна академія». Перед початком дослідження був отриманий дозвіл комісії з етичних питань та біоетики даного закладу.

Оцінювали форму і структуру органел міосимпласту і міосателітоциту, констатували наявність мітохондріальних субсарколемальних скупчень в міосимпласті, вакуолізацію міжфібрилярних проміжків. Кількість змін підраховували серед 100 об'єктів в полі зору [5].

Статистична обробка даних проводилась за допомогою методів описової та непараметричної статистики. Враховували абсолютні значення показників, кількість досліджень (n), обчислювали середнє арифметичне (M), помилку репрезентативності (m), медіану (Me), кватильний розмах ($50L$, $50U$), суму рангів (Σr), критерій Вілкоксона-Манна-Уїтні (U), критичній рівень значимості імовірності помилки першого роду (p). Використовували програмне забезпечення STATISTICA 6.0. [6].

Результати дослідження та їх обговорення. Результати електронної мікроскопії констатували наявність змін ультраструктури скелетних м'язів у померлих новонароджених.

В нормі у новонародженого міосимпласт, який є структурною одиницею скелетного м'язу має бути представленим у вигляді клітинної структури діаметром близько 10 мкм, покритою двошаровою цитоплазматичною мембраною. Більшу частину саркоплазми міосимпласту займають міофібрили з чітко визначеною посмугованістю. Біля внутрішнього шару сарколеми розташовані ядра міосимпласту чіткої округлої форми з рівномірним хроматиновим забарвленням на периферії. Біля

полюсів ядер концентруються органели (апарат Гольджи, частини ендоплазматичного (саркоплазматичного) ретикулуму тощо). До міосимпласту прилягають камбіальні клітини – міосателітоцити, які мають із міосимпластом загальний поверхневий шар цитоплазматичної мембрани (базальну мембрану). Ядра міосателітоцитів мають чітку округлу форму, світле забарвлення, займають більшу площу клітини рівномірно відтісняючи цитоплазму з органелами на периферію клітини. Мітохондрії скелетних м'язів в нормі рівномірно розташовуються проміж міофібрил, біля сарколеми, в цитоплазмі міосателітоцитів і є електронно-щільними структурами з пластинчатими кристами шириною 0,5-1 мкм [7, 8].

У померлих новонароджених виявлялись зміни характеристик ядер як міосателітоцитів так і міосимпластів (рис.1).

Рис. 1

Рис. 1. Електронограма ядра міосимпласту у померлого новонародженого. Зб. x4000:

1 – міофібрили;

2 – ядро міосимпласту.

Ядра міосимпластів приймали неправильні форми з нерівномірною електронною щільністю за рахунок дифузного відкладення хроматину. В середньому кількість таких ядер на 100 ядер в полях зору складала $42,35 \pm 2,19$ ($M_e=40,0$; $50L=36,0$; $50U=46,5$; $n=20$) і достовірно не відрізнялась залежно від виду основного захворювання: у дітей, померлих від наслідків перинатальної асфіксії цей показник склав $42,0 \pm 2,74$ ($M_e=38,0$; $50L=37,0$; $50U=43,0$; $\Sigma r=95,0$; $n=9$), у дітей,

померлих від наслідків перинатального інфікування – $42,63 \pm 3,42$ ($Me=41,0$; $50L=35,0$; $50U=54,0$; $\Sigma r=115,0$; $n=11$), ($U=49,0$; $p=0,97$).

В міосателітоцитах спостерігались не лише зміни форми клітини і її ядра, а й нерівномірна електронна щільність цитоплазми. Такі зміни реєструвались у померлих новонароджених в середньому в $56,25 \pm 2,39$ клітинах на 100 міосателітоцитів в полях зору ($Me=55,0$; $50L=48,5$; $50U=65,0$; $n=20$). Достовірної різниці в кількості змінених міосателітоцитів виявлено не було: у дітей, померлих від наслідків перинатальної асфіксії вони склали $61,33 \pm 3,18$ ($Me=60,0$; $50L=54,0$; $50U=69,0$; $\Sigma r=120,0$; $n=9$), а у дітей, померлих від наслідків перинатального інфікування – $52,09 \pm 3,05$ ($Me=51,0$; $50L=43,0$; $50U=62,0$; $\Sigma r=90,0$; $n=11$), ($U=24,0$; $p=0,052$).

В ряді міосателітоцитів померлих новонароджених окрім описаних вище змін спостерігались порушення цілісності цитоплазматичної та ядерної мембрани, конденсація та вакуолізація цитоплазми, конденсація хроматину, фрагментація ядра. В середньому такі зміни були виявлені в $23,15 \pm 3,36$ клітинах на 100 міосателітоцитів в полі зору ($Me=19,5$; $50L=13,0$; $50U=26,0$; $n=20$) і частіше спостерігались у дітей, померлих від наслідків перинатального інфікування, де середнє значення таких клітин склало $31,18 \pm 4,75$ ($Me=25,0$; $50L=21,0$; $50U=36,0$; $\Sigma r=158,5$; $n=12$) проти $13,33 \pm 1,83$ клітини ($Me=12,0$; $50L=10,0$; $50U=15,0$; $\Sigma r=51,0$; $n=9$) у дітей, померлих від наслідків перинатальної асфіксії ($U=6,5$; $p=0,01$) (рис. 2).

Рис. 2

Рис. 2. Електронограма ядра міосателітоциту померлого новонародженого. Зб. х6000:

- 1 - порушення цілісності ядерної мембрани,
- 2 - конденсація хроматину;
- 3 – пальцеподібні випинання нуклеолеми.

У дітей, померлих від наслідків перинатальної асфіксії зміна форми, об'єму та електронно-мікроскопічного зображення спостерігались в $39,89 \pm 4,54$ органелах на 100 мітохондрій в полі зору ($Me=35,0$; $50L=29,0$; $50U=46,0$; $\Sigma r=84,0$; $n=9$) ($U=39,0$; $p=0,43$), а у дітей, померлих від наслідків перинатального інфікування – $42,55 \pm 3,17$ ($Me=44,0$; $50L=31,0$; $50U=51,0$; $\Sigma r=126,0$; $n=11$) ($U=39,0$; $p=0,43$).

В ряді випадків біля сарколеми спостерігались скупчення розширених і світлих мітохондрій. Подібні зміни можна розглядати як аналог патогномонічного для мітохондріальних цитопатій синдрому «рваних м'язових волокон». Останній синдром є виявленням таких скупчень при світловій мікроскопії шляхом забарвлення матеріалу барвником Гоморі [9]. Виявлення субсарколемальних скупчень змінених мітохондрій серед померлих новонароджених в середньому складало $3,15 \pm 0,48$ випадків ($Me=3,0$; $50L=1,0$; $50U=5,0$; $n=20$). У дітей, померлих від наслідків перинатальної асфіксії мітохондріальні скупчення були виявлені в $3,44 \pm 0,87$ випадках ($Me=4,0$; $50L=1,0$; $50U=5,0$; $\Sigma r=102,0$; $n=9$), а у дітей, померлих від наслідків перинатального інфікування – в $2,91 \pm 0,55$ випадках ($Me=3,0$; $50L=1,0$; $50U=4,0$; $\Sigma r=108,0$; $n=11$) ($U=42,0$; $p=0,57$).

Ультраструктурне зображення мітохондріальних порушень наведено на рис. 3.

Рис. 3

Рис. 3. Електронограма ділянки скелетного м'яза померлого новонародженого.

Зб. х3000:

- 1 - мітохондрія міосателітоцита звичайної форми і розміру,
- 2 – збільшені у розмірах мітохондрії, як утворюють субсарколемальні скупчення;
- 3 – міжміофібрилярні мітохондрії звичайної форми.

В середньому у $8,5 \pm 0,84$ випадків зі 100 полів зору зрізів кожного гістологічного блоку була виявлена наявність вакуолізації міжфібрилярних поміжків ($Me=7,0$; $50L=6,0$; $50U=11,0$; $n=20$). У дітей, померлих від наслідків перинатальної асфіксії такі зміни були виявлені в $7,56 \pm 1,23$ випадках ($Me=7,0$; $50L=6,0$; $50U=9,0$; $\Sigma r=79,0$; $n=9$), а у дітей, померлих від наслідків перинатального інфікування – в $9,27 \pm 1,15$ випадках ($Me=9,0$; $50L=7,0$; $50U=12,0$; $\Sigma r=131,0$; $n=11$) ($U=34,0$; $p=0,24$) (рис. 4).

Рис. 4

Рис. 4. Електронограма ділянки скелетного м'яза померлого новонародженого.

Зб. х4000:

- 1 – міофібрили;
- 2 – міжфібрилярні вакуолі.

Підсумки аналізу електронограм скелетних м'язів новонароджених померлих на етапі інтенсивної терапії свідчать про виражені морфологічні зміни в ультраструктурі скелетних м'язів, які носять переважно універсальний, неспецифічний характер. Наявні зміни форми ядра і конденсація хроматину, що може призвести до інактивації транскрипції [10]; зміна форми клітин, конденсація цитоплазми є ознакою порушення клітинного трансмембранного обміну; поява міжфібрилярної вакуолізації, зміна форми, розмірів і дезорганізація крист

мітохондрій є наслідком порушення мітохондріального транспорту, наслідком чого є клітинний гіпоергоз і зміни мітохондріального геному [9,11]. Ці зміни можуть розглядатись як передвісники загибелі клітини, оскільки ряд міосателітоцитів мають ознаки апоптозу, про що свідчать порушення цілісності клітинних мембрани, конденсація та вакуолізація цитоплазми, конденсація хроматину, фрагментація ядра [11]. Цей шлях клітинної загибелі активніше реалізується у дітей, померлих від наслідків перинатального інфікування на відміну дітей, померлих від наслідків перинатальної асфіксії. Таким чином, патогенетичні шляхи формування СПОН у новонароджених полягають не лише в мітохондріальному ураженні, а й в порушенні транскілярного обміну, змінах у клітинному ядрі і активації апоптичних процесів.

Висновки. Патогенетичними ланками формування СПОН у новонароджених є мітохондріальні ураження, зміни інтрануклеарних процесів, порушення трансмембранного обміну, активація апоптичних процесів. У новонароджених із СПОН в тканинах скелетних м'язів:

1. Мають місце зміна форми ядра і конденсація хроматину, що може призвести до інактивації транскрипції;
2. Наявні зміни форми клітин і конденсація цитоплазми, що є ознаками порушення клітинного трансмембранного обміну;
3. Порушується структурна організація мітохондрій підтвердженням чого є поява міжфібрилярної вакуолізації, зміна форми, розмірів і дезорганізація їх кріст;

4. Найвні ознаки апоптозу міосателітоцитів, про що свідчать порушення цілісності клітинних мембран, конденсація та вакуолізація цитоплазми, конденсація хроматину, фрагментація ядра.
5. Процес апоптозу достовірно більш виражений у дітей, померлих від наслідків перинатального інфікування.

Список літератури.

1. *Мосенцев Н.П., Усенко Л.В., Мальцева Л.А., Мосенцев Н.Н., Коломоец А.В.* Альтернативные компоненты коррекции микроциркуляторно-митохондриальной дисфункции у больных с тяжелым сепсисом и септическим шоком: Методические рекомендации /Днепропетровск, 2008.- 32 с.
2. *Поздняков О.М. Бабакова А.А., Гехт Б.М.* Митохондриальные цитопатии // Журнал неврологии и психиатрии.-2007.- №2 -С.64-69.
3. *Breuer E.D.* Pediatric experience with intradialytic parenteral nutrition and supplemental tube feeding // American Journal of Kidneys Disease. - 1999. - Vol. 50, №1. - P. 205-207.
4. *Клембовский А. И., Сухоруков В.С.* Клиническая морфология в педиатрии // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2001. – №6. – С. 6–11.
5. *Автандилов Г.Г.* Проблемы патогенеза и патологоанатомической диагностики болезней в аспекте морфометрии / М.: Медицина, 1984.-288 с.
6. *Реброва О.Ю.* Статистический анализ медицинских данных. Применение прикладных программ STATISTICA / М: МедиаСфера, 2002. – 312 с.
7. *Афанасьев Ю.И., Юрина Н.А., Котовский Е.Ф. и др.* Гистология [5-е изд.] / М.: Медицина, 2002.-744 с.
8. *Пальцева М.А., Паукова В.С., Улумбекова Э.Г. и др.* Патология: Руководство / М: ГЭОТАР-МЕД, 2002. — 960 с.

9. *Иллариошкин С.Н.* Алгоритм діагностики митохондриальних энцефалопатій // *Нервные болезни.*-2007.-№3.- С. 23-26.
10. *Egger G., Liang G, Aparicio A., Jones PA.* Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy // *Nature.*- 2004.-№429.- 457-463.
11. *Фільченко О.О., Стойка Р.С.* Апоптоз і рак: від теорії до практики / Тернопіль: ТДМУ, 2006.- 524 с.

Анотація

Д.А. Шкурупій. Електронно-мікроскопічна характеристика скелетних м'язів новонароджених із синдромом поліорганної недостатності, померлих на етапі інтенсивної терапії.

Синдром поліорганної недостатності (СПОН) є специфічним проявом критичних станів. Його прикінцевим етапом є формування мікроциркуляторно-мітохондріальної дисфункції з розвитком клітинного енергодефіциту. Новонароджені мають високу клітинну енергопотребу, тому саме у них в критичних станах є актуальною проблема пошуку мітохондріальних порушень.

Під час проведення аутопсій був проведений забір матеріалу у 20 новонароджених з ознаками СПОН, померлих на етапі інтенсивної терапії: з них у 9 дітей (45,0%) СПОН був наслідком перинатальної асфіксії, а 11 дітей (55,0%) – наслідком перинатального інфікування. Секційний матеріал після підготовки аналізували методом електронної мікроскопії.

Аналіз електронограм скелетних м'язів померлих новонароджених свідчив про виражені морфологічні зміни в ультраструктурі скелетних м'язів, які переважно носили неспецифічний характер: зміни форми ядра, конденсація хроматину, зміна форми клітин, конденсація цитоплазми, поява міжфібрилярної вакуолізації, зміна

форми, розмірів і дезорганізація крист мітохондрій. В 23,15% міосателітоцитів були наявні ознаки апоптозу у вигляді порушення цілісності клітинних мембран, конденсації та вакуолізації цитоплазми, конденсації хроматину, фрагментації ядра. Цей шлях клітинної загибелі активніше реалізувався у новонароджених, померлих від наслідків перинатального інфікування (в середньому – в 31,18% випадків) на відміну дітей, померлих від наслідків перинатальної асфіксії (в середньому – в 13,33% випадків).

Резюме

Д.А. Шкурупій. Електронно-мікроскопічна характеристика скелетних м'язів новонароджених із синдромом поліорганної недостатності, померлих на етапі інтенсивної терапії.

Методом електронної мікроскопії було проведено дослідження аутопсичного матеріалу скелетних м'язів 20 новонароджених, померлих з ознаками синдрому поліорганної недостатності. Встановлена наявність виражених морфологічних змін в скелетних м'язах померлих новонароджених, які переважно носили неспецифічний характер: зміни форми ядра, конденсація хроматину, зміна форми клітин, конденсація цитоплазми, поява міжфібрилярної вакуолізації, зміна форми, розмірів і дезорганізація крист мітохондрій. Були наявні ознаки апоптозу. Цей шлях клітинної загибелі активніше реалізувався у новонароджених, померлих від наслідків перинатального інфікування, ніж у померлих від наслідків перинатальної асфіксії.

Резюме

Д.А. Шкурупий. Электронно-микроскопическая характеристика скелетных мышц новорожденных с синдромом полиорганной недостаточности, умерших на этапе интенсивной терапии.

Методом электронной микроскопии было проведено исследование аутопсического материала скелетных мышц 20 новорожденных, умерших с признаками синдрома полиорганной недостаточности. Установлено наличие выраженных морфологических изменений в скелетных мышцах умерших новорожденных, которые преимущественно носили неспецифический характер: изменения формы ядра, конденсация хроматина, изменение формы клеток, конденсация цитоплазмы, появление межфибриллярной вакуолизации, изменение формы, размеров и дезорганизация крист митохондрий. Имелись признаки апоптоза. Этот путь клеточной гибели активнее реализовался у новорожденных, умерших от последствий перинатального инфицирования, нежели у умерших от последствий перинатальной асфиксии.

Resume

D.A. Shkurupiy. Electronic-microscopic characteristic of skeletal muscles of newborns with the multiorgan insufficiency syndrome, who died on the stage of intensive care.

By the method of electronic microscopy research of skeletal muscles autopsy material was conducted 20 newborns, who died with the signs of multiorgan insufficiency syndrome. Set presence of the expressed morphological changes in the skeletal muscles of these newborns, which mainly carried unspecific character: changes of kernel form, condensation of chromatin, change of cages form, condensation of cytoplasm, appearance

of intrafibrillary vacuolation, change of form, sizes and disorganization of mitochondrial cristae. It was present signs of apoptosis. This way of cellular death more active in newborns, who died from the consequences of perinatal infection, than at who died from the consequences of perinatal asphyxia.

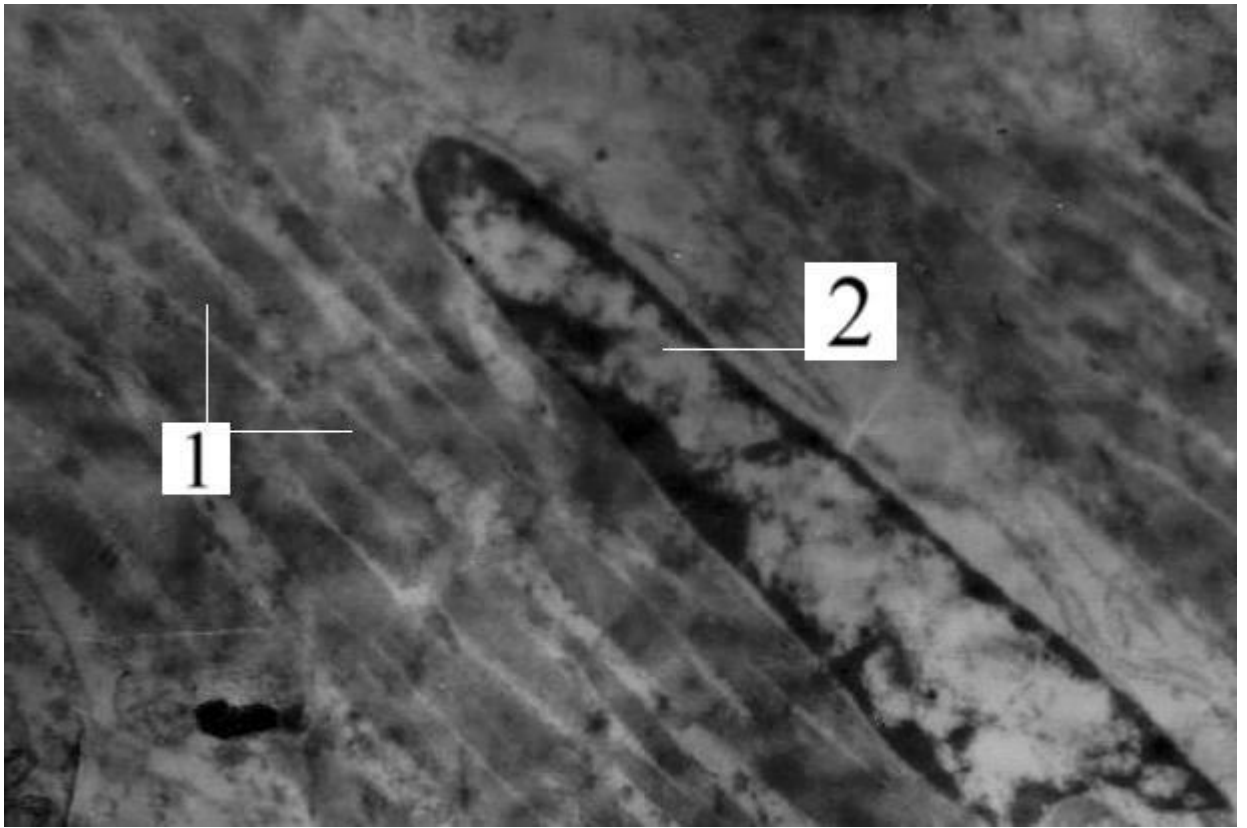


Рис. 1. Електронограма ядра міосимпласту у померлого новонародженого. Зб. x4000:

1 – міофібрили;

2 – ядро міосимпласту.

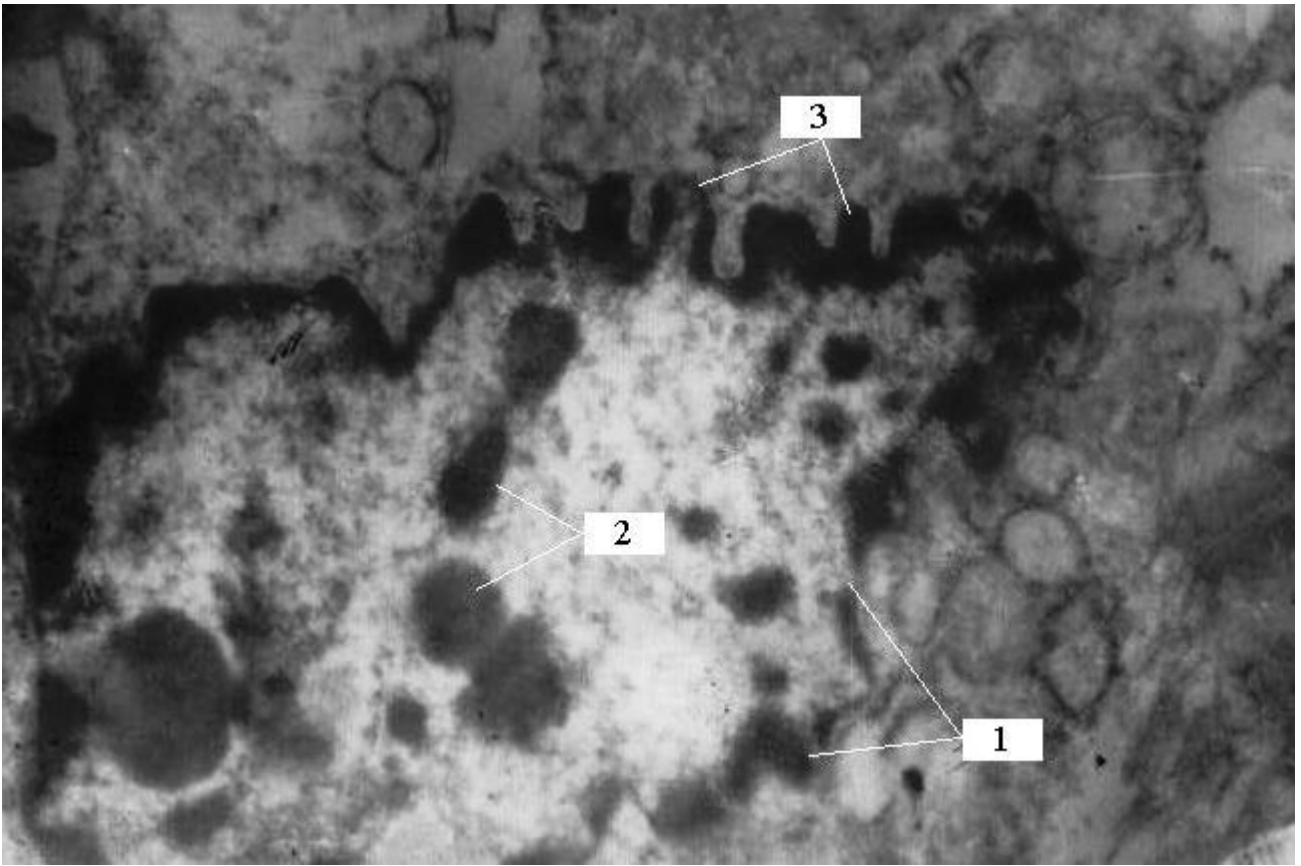


Рис. 2. Електронограма ядра міосателітоциту померлого новонародженого. Зб. x6000:

- 1 - порушення цілісності ядерної мембрани,
- 2 - конденсація хроматину;
- 3 – пальцеподібні випинання нуклеолеми.

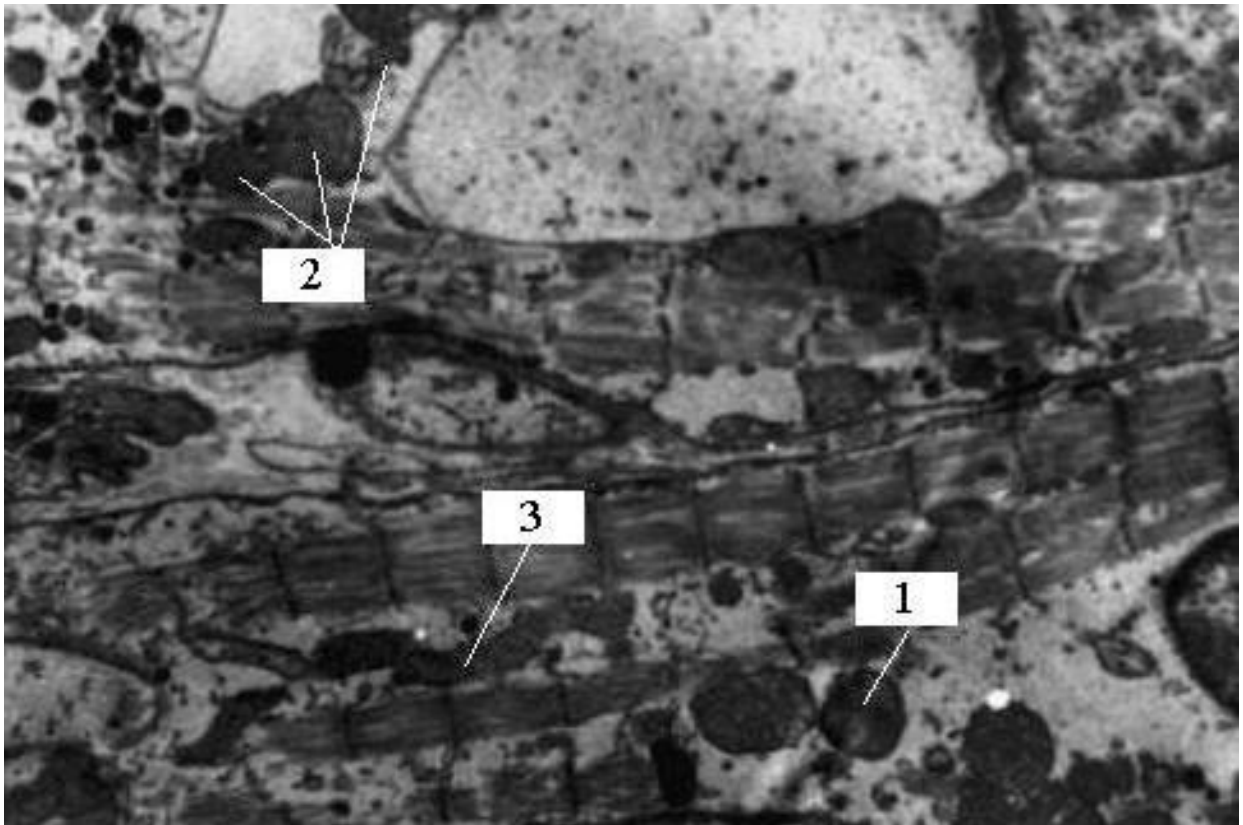


Рис. 3. Електронограма ділянки скелетного м'яза померлого новонародженого.

Зб. x3000:

- 1 - мітохондрія міосателітоцита звичайної форми і розміру,
- 2 – збільшені у розмірах мітохондрії, як утворюють субсарколемальні скупчення;
- 3 – міжміофібрилярні мітохондрії звичайної форми.

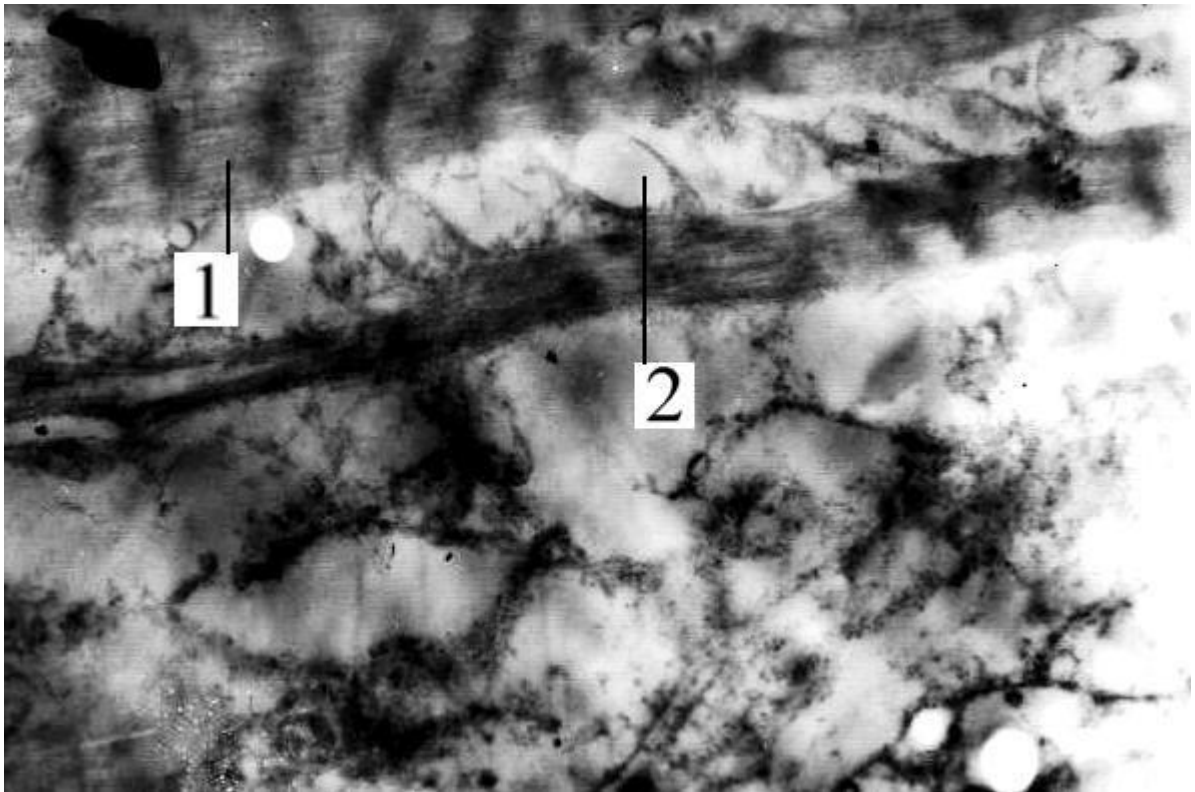


Рис. 4. Електронограма ділянки скелетного м'яза померлого новонародженого.

Зб. x4000:

1 – міофібрили;

2 – міжфібрилярні вакуолі.