



UNIVERSITATEA „OVIDIUS” DIN CONSTANȚA

ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ

DOMENIUL MEDICINĂ

ANUL UNIVERSITAR 2023-2024

TEZĂ DE DOCTORAT

**MORTALITATEA FETALĂ –
IMPLICAȚII MORFOLOGICE ÎN
TANATOGENEZA FEȚILOR UNICI
ȘI A GEMENILOR NĂSCUȚI
PREMATUR**

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător de Doctorat: **Prof. Univ. Dr. Mariana Așchie**

Doctorand: **Trofimov (Ghițoi) Sînziana-Andra**

CUPRINS

ABREVIERI	8
INTRODUCERE	12
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
1. Sarcina fiziologică.....	17
1.1 Dezvoltarea sarcinii fiziologice.....	17
1.2. Sarcina unică și sarcina multiplă	21
2. Aparatul pulmonar fetal	24
2.1 Dezvoltarea embriologică pulmonară.....	24
2.2. Noțiuni de anatomie pulmonară	27
2.3. Histologie pulmonară	35
2.4. Fiziologie pulmonară.....	39
2.5. Surfactantul pulmonar: structură și fiziologie.....	40
3. Sarcina patologică. Mortalitate și tanatogeneză fetală.....	46
3.1. Sarcina patologică	46
3.2. Mortalitate fetală. Mortalitate perinatală. Mecanisme tanatogenetice.....	51
3.3. Impactul tanatogenetic al prematurității. Implicațiile patologiei surfactantului în tanatogeneza fetală.....	54
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ.....	58
4. Motivația, scopul și obiectivele studiului	60
4.1. Motivația studiului	60
4.2. Scopul și obiectivele studiului	60
5. Material și metodă.....	63
5.1. Selecția cazurilor	63
5.2. Metode de lucru.....	64
5.2.1. Documentarea din foile de observație materne și ale feților născuți vii	64
5.2.2. Tehnici de autopsiere	65
5.2.3. Tehnici de lucru histopatologice.....	72
5.2.4. Tehnici de lucru imunohistochimice.....	73
5.2.5. Analiza statistica.....	75

6. Studiul 1 – Factorii de risc implicați în decesele prematurilor prin prisma proceselor tanatogene	77
6.1. Introducere	77
6.2. Obiective	79
6.3. Material și metodă.....	80
6.4. Rezultate	82
6.5. Discuții.....	140
6.6. Concluzii	150
7. Studiul 2 – Implicațiile proteinelor surfactantului în decesul gemenilor prematuri.....	154
7.1. Introducere	154
7.2. Obiective	156
7.3. Material și metodă.....	157
7.4. Rezultate	160
7.5. Discuții.....	172
8. Concluzii	184
9. Originalitatea și concluziile finale ale tezei	186
BIBLIOGRAFIE	187

Cuvinte cheie – malformații, prematuritate, supraviețuire, surfactant

Teza de doctorat cuprinde:

- 221 de pagini, dintre care 40 de pagini Partea Generală
- 106 de figuri
- 26 tabele
- 533 de referințe bibliografice

Notă: în prezentul rezumat cuprinsul a fost păstrat sub aceeași formă ca în teza de doctorat.

INTRODUCERE

Lucrarea de față își propune ca scop identificarea unor noi factori de risc, potențial modificabili prin mijloacele de prevenție disponibile actual și care sunt implicați în tanatogeneza fetoilor prematuri.

Cele mai recente cercetări în domeniu pun accentul pe impactul avut de surfactantul pulmonar în patologia prematurului, nu doar neonatală, ci și perinatală, cu rol esențial în apărarea imunologică fetală, inclusiv intrauterină. Totuși, studiul efectiv al fracțiunii proteinelor surfactant, precum și al corelațiilor dintre prezența/absența acestora și ceilalți parametri gestaționali și fetalii este, la ora actuală abia la început de drum. Ținând cont de aceste aspecte, se evidențiază necesitatea efectuării de cercetări suplimentare, cu scopul de a ordona informațiile deja existente și de a le extinde prin obținerea de noi rezultate care să indice viitoarele direcții de aprofundare ale subiectului, impactul surfactantului fiind major asupra unui segment cazuistic aflat în plină expansiune.

Ca urmare, am optat pentru aprofundarea acestei direcții de studiu și am caracterizat din punct de vedere imunohistochimic prezența a trei fracțiuni proteice ale surfactantului pulmonar pe eșantioane de țesut pulmonar, provenite de la un lot de prematuri gemelari, decedați perinatal.

1. Sarcina fiziologică

1.1 Dezvoltarea sarcinii fiziologice

Primele 8 săptămâni de evoluție, pe parcursul cărora zigotul se dezvoltă de la un organism unicelular la existența primordiilor de organ, se numește perioada de organogeneză sau de embriogeneză. Acesteia îi succede perioada fetală pe durata căreia procesele de diferențiere au loc în paralel cu creșterea în greutate a viitorului copil.

Cele trei foițe germinative - endoderm, mezoderm, ectoderm - reprezintă substratul tuturor țesuturilor viitorului organism, după cum urmează:

- Endodermul va da naștere epiteliilor tractului digestiv și respirator, ficatului și pancreasului, tiroidei;
- Mezodermul dă naștere unor domenii axiale, paraaxiale și laterale ce conțin celule precursorare pentru o multitudine de viitoare organe și sisteme: țesuturile muscular, cartilaginose și osoase, sistem cardio-circulator și urogenital, inclusiv gonade;
- Ectodermul se va diferenția în neuroectoderm - baza de dezvoltare, în urma fenomenului de neurulație, pentru tubul neural și creștele neurale - și ectoderm superficial din care vor

evolua epidermul, glandele subcutanate, părul și unghiile, hipofiza anterioară și, respectiv creasta ectodermică anterioară. De asemenea, ectodermul superficial are funcții de reglare hormonală (prin intermediul hipofizei), fiind implicată în procesele de homeostazie. Astfel, se poate susține ideea că structurile derivate din această foiță embrionară vor face legătura între organismul nou-format și mediul extern.

Perioada fetală se extinde de la începutul lunii a treia de gestație până la momentul parturii. Se caracterizează prin maturizarea organelor concomitent cu un ritm accelerat de creștere, inițial mai evident în lungime - aproximativ câte 5 cm în lunile a 3-a, a 4-a și a 5-a, apoi mai evident în greutate, cu un câștig de aproximativ 750 g pe lună, în lunile a 8-a și a 9-a.

1.2. Sarcina unică și sarcina multiplă

În timp ce sarcinile cu făt unic rămân dominante numeric pe plan mondial, ultimele decenii au adus o creștere semnificativă a sarcinilor multifetale, numai în Statele Unite ale Americii, incidența nașterilor gemelare crescând cu 76% între anii 1908 și 2009. Se remarcă totuși o oarecare scădere a incidenței - de 4% în perioada 2009-2018- pentru prima dată după treizeci de ani de trend ascendent. În aceeași perioadă, ratele gestațiilor triplete și, respectiv multifetale de ordin superior a crescut cu peste 400% în anii 1980 și 1990.

Pe termen lung, modificările în sens ascendent ale incidenței sarcinilor și, respectiv nașterilor cu număr multiplu de feți se corelează, mai ales, cu doi factori: vârsta progresiv crescută a mamelor - vârsta avansată a mamei la momentul concepției corelându-se cu o probabilitate mai mare de apariție naturală a unei sarcini multiple - și, respectiv utilizarea pe scară din ce în ce mai largă a tehnicilor de reproducere asistată (ART) consecutiv creșterii ratelor de infertilitate. Astfel, dacă în Europa rata de transfer a unui embrion unic în timpul procedurilor FIV era de aproximativ 10% în anii 1990, acest procent a ajuns să depășească valoarea de 40% în anul 2017, în timp ce numărul transferurilor cu doi embrioni a rămas constant în jurul cifrei de 55%.

De fapt, cercetările de până acum par a obiectiva prezența unor diferențe - nu doar incidentale - între prognosticul vital (neonatal, dar și tardiv), morbiditate și dezvoltare neuro-cognitivă pe termen lung între feții proveniți din sarcini unice și feții proveniți din sarcini multiple, la aceeași vârstă gestațională. Chiar dacă observațiile sunt limitate la prematuritatea medie, 32-36 de săptămâni de gestație - feții proveniți din sarcini multiple sunt mai expuși riscurilor de morbiditate și mortalitate. Cu toate acestea, concluziile de până acum iau în calcul mai frecvent sarcinile gemelare, iar studiul propriu-zis al cauzalității

acestor diferențe este deficitar.

Dintre toate sarcinile multiple, cele mai frecvente sunt, sarcinile gemelare, cu un total de 97-98% dintre acestea. O evaluare corectă a vârstei gestaționale și a corionicității în primul trimestru sunt esențiale pentru monitorizarea ulterioară, considerând existența unor particularități. Astfel, sarcinile gemelare monocorionice sunt mult mai rare, reprezentând 20% din totalul sarcinilor gemelare, dar se asociază cu o rată de deces fetal intrauterin înainte de 24 de săptămâni și cu o rată a mortalității perinatale de aproximativ 10 ori mai mari decât sarcinile dicorionice, datorită placentăției caracterizate de multiple anastomoze între cei doi fetoși. Astfel, în cazul sarcinilor gemelare monocorionice sunt mai frecvente patologii precum restricția intrauterină de creștere (RCIU) sau sindromul transfuzor-transfuzat, cu creșterea consecutivă a riscului de naștere prematură și cu afectarea negativă a prognosticului vital.

2. Aparatul pulmonar fetal

2.1 Dezvoltarea embriologică pulmonară

S-au descris trei perioade majore ale procesului de dezvoltare, care se suprapun parțial, două dintre ele având loc în decursul vieții intrauterine - perioada embrionară (începe în ziua 22 și se desfășoară între săptămânile 4-7, cu formarea căilor aeriene principale și a pleurei) și perioada fetală - iar cea de-a treia fiind perioada de dezvoltare postnatală. Perioada fetală este, la rândul său subdivizată în trei etape: pseudoglandulară (între săptămânile 5 și 17, cu dezvoltarea arborelui bronșic și a parenchimului pulmonar), canaliculară (între săptămânile 16-26, cuprinde dezvoltarea căilor aeriene distale, cu formarea acinilor, a membranei alveolo-capilare și a surfactantului) și saculară (continuarea procesului de expansiune acinară). De asemenea, perioada postpartum cuprinde două substadii: alveolarizație clasică și, respectiv continuă. Practic, perioada de alveolarizație debutează în jurul săptămânii 36, deci peripartum și continuă pe tot parcursul copilăriei.^[54,55,57-61] Stadiul Embrionar (săptămânile 4-7 in-utero).

Dacă inițial alveolele imature au aspect de tumefacții care invadează septurile primare, pe măsură ce sacii alveolari continuă să crească aceste protruții cresc și ele în dimensiuni. Septurile nou-formate, mai lungi și cu grosime redusă se numesc septuri secundare. Acestea sunt structurile responsabile pentru partea finală de diviziune a arborelui respirator de la sacii alveolari la alveole. Acest proces de septare se produce în zonele cu activitate fibroblastică și de secreție a colagenului și elastinei în interstițiu și are un ritm accelerat în primele aproximativ șase luni de viață extrauterină, apoi încetinește dar continuă până spre vârsta de trei ani, creșterea numerică alveolară având drept consecință

directă creșterea dimensiunilor pulmonare. Paralel cu procesul de creștere se desfășoară și maturizarea structurală cu subțierea barierei alveolo-capilare, pe seama fuzionării dublei rețele capilare într-una singură, fiecare dintre ele în relație funcțională intimă cu câte două alveole.

Definitivarea procesului de creștere și maturizare pulmonară are loc în jurul vârstei de 8 ani.

2.2. Noțiuni de anatomie pulmonară

Sistemul respirator este structura complexă care asigură mijloacele necesare pentru ca oxigenul atmosferic, indispensabil și necesar în flux continuu celulelor vii, să ajungă la acestea. Sistemul respirator este alcătuit din căi aeriene (zonă conducătoare, având rolul de a aduce aerul din exteriorul corpului în sistem) și parenchim pulmonar (a cărui porțiune numită „respiratorie” asigură schimbul de gaze dintre atmosferă și organism).

Porțiunea conducătoare sau căile aeriene pornesc de la fosele nazale și cuprinde, în continuare nazofaringe, laringe, trahee, care se divide în cele două bronhii principale, care se ramifică arborescent la nivelul fiecăruia dintre pulmoni, până la bronhiiolele terminale. De la acest nivel - al bronhiiolelor respiratorii - începe porțiunea respiratorie, cuprinzând ductele și sacii alveolari și terminându-se la nivelul alveolelor terminale unde are loc schimbul gazos propriu-zis (hematoza).

Pulmonul reprezintă o structură anatomică pereche - cu rol vital indispensabil și structură complexă - situat în cavitatea toracică, de o parte și de alta a mediastinului. Este organul esențial al procesului respirator, responsabil de aportul de oxigen la nivelul corpului prin schimbul gazos dintre aerul atmosferic și sânge, prin intermediul membranei alveolo-capilare.

Parenchimul pulmonar cuprinde bronhiiole, ductele alveolare și alveolele, are o structură buretoasă, și o consistență elastică, iar datorită conținutului aeric post-partum, fragmentele plutesc când sunt imersate, iar la palpare se constată crepitații.

Din punct de vedere anatomic, fiecare pulmon este tapetat de pleură - membrană seroasă dublu stratificată cu rol de protecție și în dinamica mișcărilor respiratorii - prezintă două suprafețe, trei margini, o bază (considerată de unii autori a treia suprafață) și un apex, se subîmparte în lobi și segmente, având, în ansamblu, forma unei jumătăți de con în secțiune oblică, de la vârf spre bază.

Din punct de vedere structural, pulmonii se constituie din multiple componente: arborele bronșic, componenta stromală, componenta parenchimotoasă, componenta vasculo

– nervoasă.

Pulmonul drept vine în raport - prin intermediul acestei fețe - cu esofagul, cu trunchiul arterial brahio-cefalic drept, cu vena cava superioară, cu vena azygos și cu arcul acesteia și cu pericardul, prin intermediul ramului drept al nervului frenic și al vaselor pericardico-frenice. În hilul pulmonar drept, topografia elementelor notează bronhia în poziție postero-superioară, având artera anterior și venele situate inferior față de arteră.

Pulmonul stâng vine în raport cu esofagul, cu porțiunea descendentă a arterei aorte și, respectiv cu arcul acesteia, cu artera subclaviculară stângă și cu pericardul, de care este separat prin ramul stâng al nervului frenic și prin vasele pericardico-frenice. Hilul pulmonar stâng are o topografie diferită față de cel drept, artera fiind în poziție superioară, cu bronhia dedesubt, iar venele fiind situate: una anterior, cealaltă inferior bronhiei.

Din punct de vedere anatomic, arborele bronșic ia naștere prin emergența bronhiilor principale (primare) - pulmonară dreaptă și, respectiv, stângă - din trahee la nivelul unghiului sternal, corespunzător planului care intersectează cea de-a patra vertebră toracică (planul toracic transvers).

Traheea este o structură de formă cilindrică al cărei schelet de susținere este format din inele cartilaginoase incomplete, în forma literei „C”, cu deschiderea către esofag, căruia îi permite astfel dilatarea din timpul procesului de deglutiție. Bronhiile primare sunt similare structural traheei, dar scheletul cartilaginos al acestuia este format din inele complete.

Vascularizația funcțională - aduce sânge deoxigenat de la cord pentru a fi oxigenat la nivelul parenchimului pulmonar - se realizează prin intermediul trunchiului arterial pulmonar, cu origine la nivelul ventriculului drept. Din acest trunchi pornesc cele două artere pulmonare, dreaptă și, respectiv stângă, câte una pentru fiecare pulmon, procesul de ramificare însoțind ramificația bronșică, astfel încât se descriu ramuri lobare, apoi segmentare și, în cele din urmă, o densă rețea capilară perialveolară.

Vascularizația nutritivă face parte din circulația sistemică, fiind asigurată de vasele bronșice, originând din aorta descendentă toracică și însoțind ramificațiile bronșice până la nivelul bronhiolilor respiratorii. Ele vor forma plexuri capilare în tunicile bronhiale mucoasă și musculară, acestea fiind conectate cu ramuri arteriale pulmonare și fiind drenate de venele pulmonare. De asemenea, unele dintre ramurile bronhice au ramificații la nivelul țesutului conjunctiv și se varsă în venele bronșice, altele, extern, dau naștere unui plex subpleural.

2.3. Histologie pulmonară

Unitatea morfofuncțională pulmonară - sediu al schimburilor gazoase - este acinul, a cărui definiție a variat în timp, cel mai frecvent fiind considerat a fi porțiunea de parenchim pulmonar deservită de o singură bronhiolă, astfel încât un lobul ar fi constituit de un număr variabil de acini, de obicei între 2 și 10.

Pereții alveolari sunt foarte subțiri, alcătuiți din 2 tipuri de celule epiteliale cu rol specializat, distinct între ele, numite pneumocite (alveolocite). Pneumocitele de tip I au morfologie scuamoasă, iar hematoza se realizează prin intermediul citoplasmei lor, în timp ce pneumocitele de tip II, cu morfologie cuboidală, sunt mai rare, apar intercalate printre celelalte ale căror progenitoare sunt și au rol de sinteză a surfactantului pulmonar, precum și de regenerare epitelială postraumatică.

Țesutul interstițial, de tip conjunctiv este bogat reprezentat în tot pulmonul, inclusiv - deși invizibil în microscopia optică - în pereții alveolocitari, unde sunt prezente fibre elastice și de colagen, celule mezenchimale și, rareori, elemente inflamatorii.

2.4. Fiziologie pulmonară

Sistemul respirator este destinat îndeplinirii procesului de respirație - schimb de gaze între mediul extern (atmosferă) și celulele organismului. În vederea îndeplinirii acestei funcții, toate componentele acestui sistem sunt spuse unor procese fizice de natură mecanică și, respectiv chimice, premergătoare, dar rolul central revine pulmonilor, la nivelul cărora se realizează hematoza. În ultimă instanță, oxigenul este utilizat în producerea de ATP, iar dioxidul de carbon, alături de alți produși metabolici va fi eliminat.

Din punct de vedere biomecanic, există patru componente implicate în dinamica respiratorie: complianța pulmonară și, respectiv, a peretelui toracic (noțiune definită ca schimbare a volumului per unitate de presiune modificată sau, practic, rezistența elastică), rezistența căilor aeriene și rata respiratorie.

Schimbul gazos propriu-zis are loc la nivel alveolar - o condiție sine qua non fiind a alveola să fie ventilată și perfuzată - ca urmare a unui proces de difuzie, prin intermediul unei structuri funcționale compuse din două elemente, fiecare dintre ele aparținând unui sistem diferit: pulmonar și, respectiv circulator: membrana alveolo-capilară. Astfel, succesul procesului depinde totodată și de integritatea morfofuncțională a sistemului cardio-circulator.

2.5. Surfactantul pulmonar: structură și fiziologie

Surfactantul pulmonar este o substanță complexă, cu proprietăți tensioactive, alcătuită din proteine și fosfolipide având funcția de reducere a tensiunii superficiale la interfața pulmonară aer-lichid.

La începutul anilor 1800, doi oameni de știință - francezul Pierre-Simon (marchiz de) Laplace, și britanicul Thomas Young, au recunoscut independent unul de celălalt relația dintre tensiunea superficială (γ), razele unei sfere (r_1 , r_2) și presiune (p), sub forma

unei ecuații care le va purta numele - ecuația Young-Laplace: $\Delta p = \gamma \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right)$. Consecutiv proprietăților surfactantului, tensiunea sa superficială are o valoare mare și, ca urmare, se extinde rapid, acoperind interfața aer-lichid, inclusiv la nivelul căilor aeriene cu calibru mai mare. Surfactantul se poate recolta deci chiar și de la nivelul căilor aeriene cu calibru mai mare, atunci când demersul este necesar pentru analizarea structurii biochimice.

Se remarcă faptul că fosfolipidele intră atât în componența structurii membranelor celulare, cât și, alături de alte lipide sau de proteine, fac parte dintre constituenții a numeroase fluide din organism: surfactantul pulmonar, dar și bila, secrețiile de la nivelul pleurei, peritoneului, a suprafeței trompei lui Eustachio sau cele gastrointestinale. Există și patru proteine specifice, asociate surfactantului: SP-A, SP-B, SP-C, SP-D.

Proteinele-surfactant B și C sunt peptide hidrofobe cu greutate moleculară mică - 14 și, respectiv 16 kDa - participă la definirea proprietăților biofizice ale surfactantului, fiind totodată implicate în pachetarea și reciclarea/refolosirea acestuia.

SP-B este esențial în menținerea suprafeței utile respiratorii și în procesul de împachetare a lipidelor necesar generării de corpi lamelari. Absența lui în surfactantul nou-născutului generează insuficiență respiratorie incompatibilă cu supraviețuirea.

Un număr mare de afecțiuni respiratorii din paleta sindroamelor de detresă respiratorie, la copii și la adulți - inclusiv decese perinatale - se leagă de absența sau reducerea cantitativă semnificativă a proteinei SP-C, confirmând rolul acesteia în homeostazia sistemului respirator, alături de mai recent descrisa și însă insuficient studiată implicare a acestei proteine în modularea răspunsului imun direct și indirect la agenții patogeni locali.

Actual se consideră că SP-A este implicată în trei procese fiziologice importante: reglarea homeostaziei surfactantului, scăderea tensiunii superficiale pulmonare la interfața aer-lichid alveolară, alături de celelalte proteine surfactant, precum și în activitatea imună înăscută nespecifică, de la nivel pulmonar.

Funcțiile SP-D se alătură rolului SP-A, având o importanță deosebită mai ales în procesele imunologice înăscute, nespecifice de la nivel pulmonar, unde recunoaște,

opsonizează și este promotor al fagocitozei și al eliminării agenților microbieni și, respectiv diferitelor micro sau nano particule ajunse în sistem prin inhalare.

3. Sarcina patologică. Mortalitate și tanatogeneză fetală

3.1. Sarcina patologică

Sarcinile patologice consecutiv prezenței anomaliilor de nidație vizează situațiile de implantare ectopică a zigotului și, respectiv, cazurile cu placentă praevia. Deși doar aproximativ 1% dintre sarcini se localizează în afara uterului, acest fapt duce la oprirea în evoluție a embrionului în primele săptămâni ale sarcinii și poate afecta prognosticul reproductiv sau chiar vital matern.

Nașterea prematură este definită ca având loc înainte de-a 37-a săptămână de amenoree, existând o oarecare variabilitate în literatura de specialitate privind limita de vârstă gestațională inferioară, care o diferențiază de avortul spontan. Incidența acestui fenomen este actual în creștere pe seama creșterii frecvenței de utilizare a tehnicilor de reproducere asistată. Deși aceste tehnici au ca rezultat creșterea numărului de sarcini cu număr multiplu de feți, inclusiv sarcinile unifetale obținute prin fertilizare in vitro (FIV) au risc crescut de naștere prematură comparativ cu cele obținute pe cale naturală.^[206,208] Impactul acestei entități patologice este major, fiind responsabilă de peste jumătate din morbiditatea post-natală pe termen lung și de 75% din mortalitatea perinatală.

Sarcinile patologice prin patologia maternă asociată reprezintă o categorie cu o foarte mare variabilitate. Deși este un fenomen fiziologic, sarcina afectează și modifică pe perioadă determinată parametrii homeostaziei materne, necesitând eforturi biologice adaptative specifice. Astfel, în situația existenței unei patologii materne preexistente sarcinii, aceasta sau tratamentul necesar pentru ea poate prezenta un risc pentru făt sau pentru desfășurarea fiziologică a gestației. De asemenea există posibilitatea ca instalarea sarcinii să agraveze patologia maternă.

Principalele patologii materne includ hipertensiunea arterială (preexistentă sau declanșată în sarcină), diabetul (preexistent sau instalat gestațional), anemia, tulburările neuro-psihiatrice, astmul (și patologia respiratorie), dar și patologia infecțioasă.

Patologia sarcinii cuprinde și anomaliile care țin de elementele ovulare. Astfel, polihidramniosul face parte dintre procesele patologice ale lichidului amniotic, fiind excesul de volum al acestui lichid, și care predispune la numeroase complicații perinatale, materne și fetale. Doar 20% dintre cazurile de exces patologic de lichid amniotic sunt legate de anomalii congenitale, până la 70% dintre situații fiind idiopatice. Oligohidramniosul

reprezintă scăderea volumului de lichid amniotic și se monitorizează ecografic facil, dat fiind că are o curbă specifică pe parcursul sarcinii, cu o creștere progresivă inițială, urmată de o perioadă de platou - aproximativ 400 ml de la 36 de săptămâni până la termen, începând să scadă după pragul de 40 de săptămâni.

Conform Consensului de la Amsterdam din anul 2016, actual sunt recunoscute patru tipare lezionale placentare: malperfuzia vasculară maternă, malperfuzia vasculară fetală, corioamniotita acută și vilita de etiologie neprecizată.

3.2. Mortalitate fetală. Mortalitate perinatală. Mecanisme tanatogenetice.

Mortalitatea fetală - decesul intrauterin al unui făt, indiferent de vârsta gestațională - reprezintă actual o problemă majoră de sănătate publică, la nivel global. Numai în Statele Unite ale Americii, în anul 2021, rata mortalității fetale a fost de 5.73 decese la o vârstă gestațională de peste 20 de săptămâni de amenoree, raportat la 1000 de nașteri cu făt viu. În 2022, față de anul anterior, cifra scade cu un procent de 5%, până la valoare de 5.45%.

Mortalitatea neonatală cuprinde totalitatea deceselor survenite la nou-născuții aflați în primele 28 de zile de viață. Perioada este recunoscută a fi de maximă vulnerabilitate vitală, primele 7 zile fiind cunoscute sub denumirea de perioadă neonatală precoce. În anul 2013, 36% dintre decesele neonatale la nivel global au loc în primele 7 zile de viață, cu 35% dintre acestea survenind în primele 24 de ore post-partum față de un procent de 27% decese survenite în intervalul dintre a 7-a și a 27-a zi de viață. Se notează însă o scădere semnificativă a ratei mortalității neonatale, cu 19,5 decese la o mie de nou-născuți vii: de la 36,8 în 1990, la 17,3 în 2022.

Principalul mecanism tanatogenetic intrauterin este reducerea cantității de oxigen disponibil pentru făt. Cauzele care stau la baza asfixiei fetale sunt variate, însă cel mai frecvent sunt incriminate: tulburările hipertensive materne, dezlipirea prematură de placentă normal inserată, accidente legate de cordonul ombilical (mai ales rupturile vasculare în situația inserției velamentoase), travaliul prelungit și/sau prezența pelviană, francă (cu fesele înainte) sau completă (cu picioarele înainte).^[286,287]

Principalele mecanisme tanatogenetice incriminate în cazul deceselor neonatale sunt, de asemenea infecțiile și asfixia, cărora li se alătură - fără a putea fi denumit mecanism - prematuritatea.^[288,294,304] Pe parcursul ultimelor decenii, mortalitatea neonatală a scăzut semnificativ, mai ales pe seama țărilor dezvoltate, în baza scăderii prevalenței unor afecțiuni cât și a ameliorării diagnosticului și terapiilor disponibile pentru alte afecțiuni.^[294]

3.3. Impactul tanatogenetic al prematurității. Implicațiile patologiei surfactantului în tanatogeneza fetală.

Principalele cauze de deces neonatal la pacienții prematuri includ: sindromul de detresă respiratorie (SDR) prin deficit de surfactant, hemoragia cerebrală intraventriculară, enterocolita necrotizantă și diferite infecții, dar și hipotermia sau icterul.

Diferite studii desfășurate au stabilit existența unor factori predictivi ai riscului de deces, printre care se numără: vârsta gestațională, scorul APGAR, sindromul de detresă respiratorie neonatală, asfixia perinatală și patologia malformativă.

Deficitul de surfactant pulmonar este un factor determinant, clar documentat în literatura de specialitate, pentru sindromul de detresă respiratorie neonatală, care este o cauză principală de morbiditate și mortalitate fetală. O cantitate insuficientă de surfactant se va traduce direct printr-o complianță pulmonară redusă și prin creșterea tensiunii superficiale, cu risc de colaps alveolar post-expir. Astfel, se reduc brusc și semnificativ suprafața de hematoză și capacitatea de difuzie alveolo-capilară, cu efect hipoxic și cu hipercapnie. Datorită calendarului de dezvoltare a aparatului pulmonar fetal, riscul de a dezvolta detresă respiratorie post-partum este cu atât mai mare cu cât vârsta gestațională este mai mică, astfel încât acest sindrom reprezintă una dintre etiologiile principale a mortalității la prematuri, chiar și după introducerea pe scară largă a introducerii administrării de surfactant exogen.

Astfel, atât deficitul de surfactant pulmonar, cât și deficitul fracțiunilor sale sunt implicate direct în tanatogeneza fetală și neonatală, dependent dar și independent de vârsta gestațională.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

4. Motivația, scopul și obiectivele studiului

Motivația prezentei cercetări derivă din faptul că studierea amănunțită a cauzalității și ale diferitelor secvențe patogenice tanatogeneratoare este de o importanță fundamentală în optimizarea atât a managementului acestor pacienți cât și în optimizarea resurselor medicale disponibile.

4.1. Scopul și obiectivele studiului

În lucrarea de față îmi propun ca scop identificarea unor noi factori de risc anatomo-clinici și morfologici, potențial modificabili prin mijloacele de prevenție disponibile actual

și care sunt implicați în tanatogeneza feților prematuri.

În vederea realizării scopului enunțat, am stabilit următoarele obiective generale:

- 1) Determinarea factorilor de risc anatomo-clinici și morfologici implicați în tanatogeneza feților unici prematuri, necropsiați în perioada 1 ianuarie 2018-31 decembrie 2022, în cadrul Serviciului Clinic de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic Județean de Urgență „Sf. Apostol Andrei”
- 2) Determinarea factorilor de risc anatomo-clinici și morfologici implicați în tanatogeneza feților proveniți din sarcini gemelare și decedați ante sau postnatal
- 3) Stabilirea potențialului de risc pentru mortalitatea fetală al fracțiunilor surfactantului pulmonar SP-A, SP-B și pro-SP-C.

5. Material și metodă

Această lucrare a fost realizată în cadrul Serviciului Clinic de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic Județean de Urgență „Sf. Apostol Andrei” Constanța. Au fost analizate, în două studii retrospective, cazurile feților unici născuți prematur și decedați ante sau postnatal și, respectiv cazurile feților proveniți din sarcini gemelare și decedați ante sau postnatal în secțiile de Obstetrică-Ginecologie și Neonatologie ale aceluiași spital, necropsiați în perioada 1 ianuarie 2018 – 31 decembrie 2022 în cadrul Serviciului Clinic de Anatomie Patologică, în vederea stabilirii cauzelor de deces, conform legislației în vigoare.

Procedura autopsierii are trei timpi de efectuare: examenul extern al cadavrului, examinarea după deschiderea acestuia și coaserea. Examenul extern se realizează într-o manieră generală și apoi pe regiuni, presupune observarea modificărilor cadaverice și a tipului constituțional. După deschiderea cadavrului, se realizează autopsierea următoarelor cavități: craniană și canal rahidian, bucală și regiunea gâtului, toraco- abdominală, pelvină, a membrelor superioare și inferioare.^[332]

Fragmente tisulare pentru examinarea histopatologică în colorație uzuală hematoxilin-eozină (HE) s-au recoltat din meninge, creier, plămâni, inimă, stomac, mezenter, intestine, ficat, splină, rinichi și glande suprarenale.

Piesele au fost descrise macroscopic și prelucrate, pentru a obține rezultatul final: lama colorată cu Hematoxilină-Eozină.

Aspectele evaluate macroscopic au fost: culoarea, dimensiunile, consistența, prezența sau absența leziunilor, aspectul omogen sau neomogen al organelor parenchimatoase, permeabilitatea organelor cavitare, prezența sau absența ariilor de hemoragie și necroză. În cazul decelării macroscopice de leziuni, fiecărei leziuni i-au fost

descrie culoare, dimensiuni, consistență, delimitare, aspect omogen sau neomogen.

Lama astfel pregătită este examinată microscopică pentru evaluarea structurii de organ și, respectiv a clasei morfologice a proceselor lezionale, precum și localizarea histologică a acestora, dimensiunile, tipul histologic al leziunii, arhitectura, eventuala prezență și severitate a atipiilor cito-nucleare, prezența sau absența hemoragiei, prezența sau absența necrozei.

În urma evaluării preparatelor microscopice, am selectat cele mai reprezentative blocuri de parafină pentru efectuarea testelor imunohistochimice. Blocurile de parafină au fost secționate la microtom la grosimea de 4 μ m. Au fost utilizați markerii: SP-A, SP-B și pro-SP-C de la NovusBio (Bio-Techne, SUA). Fiecare set efectuat a fost acompaniat de lamă de control pozitivă. Protocoalele de lucru utilizate în realizarea lamelor imunohistochimice sunt următoarele:

Analiza statistică a datelor a fost efectuată cu ajutorul programelor SPSS versiunea 26 (IBM Corporation, SUA) și Microsoft Office Excel 2019 (Microsoft Corporation, SUA). Au fost utilizați indicatori de tendință centrală (media aritmetică, mediana) și indicatori de dispersie (dispersia și abaterea standard).

6. Studiul 1 – Factorii de risc implicați în decesele prematurilor prin prisma proceselor tanatogene

6.1. Introducere

Nașterile premature cuprind toate sarcinile care se încheie înainte de vârsta gestațională de 37 de săptămâni. În 2020, aproximativ 1 din 10 nașteri a fost prematură, rezultând peste 13 milioane de copii născuți înainte de termen, și aproximativ 900000 de copii au murit din cauza complicațiilor prematurității.

Datele disponibile arată că aproximativ 90% dintre nașterile premature au loc în țările cu niveluri mici și medii de trai, în principal în Africa și Asia de Sud. Cu toate acestea, merită remarcat faptul că, odată cu progresele tehnicilor de reproducere asistată, chiar și țările bine dezvoltate se confruntă cu o creștere a apariției sarcinilor multi-fetale. Acest tip de sarcină vine cu un risc crescut de prematuritate și, consecutiv, de mortalitate neonatală asociată.

Copiii prematuri pot prezenta complicații atât pe termen scurt, cât și pe termen lung. Acestea includ dificultăți cu respirația și hrănirea, dar și riscul de paralizie cerebrală sau afectarea dezvoltării cerebrale pe parcursul vieții. În plus, deficiențele de vedere și de auz pot afecta prognosticul lor general. Bebelușii prematuri, ca și categorie de pacienți, au un

efect semnificativ din punct de vedere economic asupra indivizilor, familiilor și societății. Rata de supraviețuire a acestor copii în țările dezvoltate este mai mare în comparație cu țările în curs de dezvoltare. Diferența poate rezulta din infrastructura superioară de îngrijire neonatală și de niveluri mai scăzute de inegalitate psihosocială în țările cu venituri mai mari în comparație cu țările în curs de dezvoltare.

6.4. Rezultate

În perioada 2018-2022, în Spitalul Clinic Județean de Urgență „Sf Apostol Andrei” din Constanța a fost înregistrat un număr total de 18379 nașteri. Dintre acestea 17609 au fost nașteri la termen și 770 nașteri premature (sub 37 de săptămâni). Din numărul total de nou-născuți s-au fost decelat 303 decese, dintre care 140 la feții prematuri. Din cazurile de decese la prematuri, 85 de feți au fost născuți vii, iar decesul acestor a survenit până la împlinirea vârstei de un an. Restul de 55 de prematuri au decedat intrauterin, fiind născuți fie prin operație de cezariană, fie pe cale naturală.

Prematurii născuți vii au avut o evoluție în scădere din 2018 (22,35%) până în 2022 (16,47%).

Prin comparație, prematurii născuți morți au avut o evoluție în creștere constantă din 2018 (12,73%) până în 2022 (32,73%).

Cei mai mulți feți vii au fost nou-născuți foarte prematuri (VPT) (64,71%), iar vârsta gestațională medie a fost de 27,45 săptămâni (22-35 săptămâni, $\pm 0,37$).

Cei mai mulți feți decedați intrauterin se încadrează în categoria nou-născuți foarte prematuri (VPT) (41,82%), vârsta gestațională medie fiind de 30,73 săptămâni (22-35 săptămâni, $\pm 0,49$). Pentru prematurii decedați intrauterin, aspectele morfometrice au remarcat: lungime medie de 40,45 cm (24-54 cm, $\pm 0,83$), perimetrul cranian mediu de 28,30 cm (16-39 cm, $\pm 0,53$), perimetrul toracic mediu de 25,85 cm (14-39 cm, $\pm 0,63$) și circumferință abdominală medie de 22,34 cm (11-31 cm, $\pm 0,53$).

Am observat o diferență între gradul de prematuritate în funcție de vârsta gestațională și viabilitatea la naștere. Feții născuți morți au prezentat o vârstă gestațională crescută (prematuritate medie și prematuritate tardivă), pe când cei născuți vii au avut o vârstă gestațională mică (prematuritate extremă și nou-născuți foarte prematuri) ($p < 0,001$). De asemenea, o diferență similară am regăsit și între gradul de prematuritate raportat la greutatea feților și viabilitate ($p < 0,001$). O urmare a acestor aspecte se răsfrânge asupra unor parametri morfometrici. Perimetrul cranian și perimetrul toracic au prezentat o valoare mai crescută, în concordanță cu gradul de maturare și cu viabilitatea feților ($p < 0,001$, respectiv $p = 0,001$).

Durata medie de supraviețuire a fost 301,76 ore, $\pm 80,64$ (1-4380 ore), în cazul prematurilor născuți vii. Scorul APGAR la naștere cel mai des regăsit a fost 1 (1-8). Vârsta gestațională crescută s-a asociat cu un scor APGAR crescut ($p < 0,001$). De asemenea, vârsta gestațională s-a corelat direct proporțional cu greutatea, lungimea, perimetrul cranian, perimetrul toracic și circumferința abdominală a feților, aspect ce denotă dezvoltarea armonioasă a acestora ($p < 0,001$). În plus, greutatea și circumferința abdominală crescute s-au asociat cu supraviețuirea mai lungă a feților ($p = 0,023$, respectiv $p = 0,002$). Din păcate, scorul APGAR nu s-a asociat cu supraviețuirea ($p = 0,722$).

Analiza univariată nu a identificat factori de risc în rândul aspectelor demografice (sex, vârstă gestațională, scor APGAR, gradele de prematuritate). În schimb, în analiza multivariată a datelor am remarcat ca factori de risc implicați în mortalitate prematurii cu greutate extrem de scăzută ($HR = 5,141$, $p = 0,009$) și cei cu greutate foarte scăzută ($HR = 4,177$, $p = 0,018$).

Analiza univariată a datelor morfometrice a identificat factori de protecție: lungimea ($HR = 0,957$, $p = 0,027$), perimetrul toracic ($HR = 0,937$, $p = 0,008$) și circumferința abdominală ($HR = 0,922$, $p = 0,003$). Analiza multivariată a aspectelor morfometrice (greutate, lungime, perimetru cranian, perimetru toracic și circumferință abdominală) a remarcat ca factori de risc asupra mortalității perimetrul cranian – pentru fiecare centimetru $HR = 1,134$, $p = 0,018$, pe când circumferința abdominală rămâne factor protector (pentru fiecare centimetru $HR = 0,901$, $p = 0,041$).

În 45,45% din cazuri, mamele cu feți decedați intrauterin nu au prezentat antecedente patologice. La celălalt pol, cele mai frecvente afecțiuni ale mamei au constat în hipertensiune arterială indusă de sarcină (27,27%), uter cicatricial (10,91%), infecții ale tractului urinar (3,64%) și incompetență cervico-istmică (3,64%).

Prezența malformațiilor s-a corelat cu paritatea crescută ($p = 0,005$). Un aspect deosebit pe care l-am identificat este reprezentat de predictibilitatea datelor morfometrice asupra dezvoltării fetale. O greutate ≥ 1505 g la naștere are o predictibilitate sporită cu sensibilitate de 87,50% și specificitate de 80,50% ($AUC = 0,825$, $p = 0,003$).

De asemenea, se adaugă o lungime $\geq 41,5$ cm (sensibilitate de 87,50% și specificitate de 84,40%, $AUC = 0,876$, $p < 0,001$), perimetrul cranian $\geq 28,5$ cm (sensibilitate de 87,50% și specificitate de 77,90%, $AUC = 0,840$, $p = 0,002$), perimetrul toracic $\geq 25,75$ cm (sensibilitate de 87,50% și specificitate de 77,10%, $AUC = 0,793$, $p = 0,007$) și circumferința abdominală $\geq 22,5$ cm (sensibilitate de 87,50% și specificitate de 70,1%, $AUC = 0,770$, $p < 0,012$).

6.5. Discuții

La nivel global, 15% dintre bebelușii prematuri se nasc înainte de 32 de săptămâni, 10,4% între 28 și 32 de săptămâni și 4,2% înainte de 28 de săptămâni de sarcină. În studiul realizat de Kwasawneh W et al., rata de prematuritate a fost de 15,7%, majoritatea deceselor survenind la bebeluși născuți înainte de vârsta gestațională de 28 de săptămâni. În acest studiu, cei mai mulți prematuri s-au născut între 28-32 de săptămâni de sarcină (55,71%), urmați de cei prematuri târziu (15,71%), extrem de prematuri (15%) și prematuri moderati (13,57%).

În ceea ce privește născuții prematuri vii, am observat o tendință descendentă în cei cinci ani de la 22,4% la 16,5%, în timp ce în cazul născuților morți, evoluția acestora a avut un trend ascendent de la 12,7% la 32,7%. Datele acestei cercetări sunt în concordanță cu literatura disponibilă în prezent pe această temă, deși acest studiu nu acoperă pandemia COVID-19. Există multe studii europene referitoare la legătura dintre această patologie și anii de pandemie, iar majoritatea au indicat o scădere a ratelor de prematuritate în timpul pandemiei, sugerând poate un impact al măsurilor de urgență.

Mulți factori variabili asociați mamei pot fi legați de riscul de naștere prematură, inclusiv caracteristici socioeconomice și demografice, comportamente și obiceiuri, starea de sănătate, caracteristicile biologice și reproductive și complicațiile sarcinii. În ceea ce privește starea de sănătate, am observat diferențe semnificative statistic între patologia maternă și viabilitatea prematurilor. Astfel, prezența diabetului gestațional și a cerclajului uterin s-au corelat cu prematuri născuți vii, în timp ce celelalte patologii au fost asociate cu prematuri născuți morți.

De asemenea, de-a lungul timpului, au fost identificați și alți factori de risc matern a căror consecință este nașterea prematură, aceștia fiind: vârsta, etnia, primiparitatea, factorii de alimentație și stilul de viață - fumatul, consumul cronic de alcool, accesul limitat la îngrijiri obstetricale, și nivelurile scăzute de educație.

Conform studiului realizat de Schindler T et al., principalele cauze de deces identificate, indiferent de vârsta gestațională studiată, au fost hemoragia intraventriculară, patologia respiratorie acută și sepsisul. În studiul lor, cel mai important factor care a prezis moartea a fost numărul de săptămâni de sarcină la care a avut loc nașterea pentru toate cauzele identificate de deces. În mod similar, în studiul de față, am observat cauze similare de deces, cele mai frecvente fiind hemoragiile cu localizare diferită și patologia respiratorie acută.

În studiul realizat de Honein MA et al., malformațiile au fost de două ori mai

frecvente la prematuri comparativ cu feteșii născuți după 37 de săptămâni de sarcină, iar în cazul bebelușilor născuți foarte prematur, frecvența malformațiilor a fost de peste 5 ori mai mare la contrastul nașterilor la termen, cele mai importante asocieri fiind cu afectarea sistemului nervos central și a sistemului cardiovascular. În ceea ce privește legătura dintre această categorie de patologii și prematuritatea moderată, cele mai puternice asocieri pe care autorii le-au identificat au fost cu defecte ale sistemului nervos central și ale tractului gastrointestinal (în special cu atrezie esofagiană și intestin subțire). În acest studiu, malformațiile cerebrale (hipoplazie cerebeloasă, sindrom Dandy-Walker, holoprozencefalie totală) și cardiovasculare (defect septal atrial și ventricular) identificate au contribuit la moartea bebelușilor prin consecințele hipoxice determinate. Mai mult, am observat un model de date antropometrice la copiii malformați. Astfel, datele morfometrice care ar trebui să ridice suspiciunea pentru prezența unei malformații sunt greutatea mică sau normală la naștere, prematuritatea tardivă și medie (MPT), un perimetru cranian $\geq 28,50$ cm, o circumferință toracică $\geq 25,75$ cm și o circumferință abdominală $\geq 22,50$ cm.

Circumferința abdominală este unul dintre cei mai fideli factori predictivi ai creșterii fetale, fiind unul dintre parametrii de evaluare ai restricției de creștere intrauterină (RCIU).^[405] Astfel, pentru a face acest diagnostic, valoarea sa trebuie să fie sub percentila a 10-a. Mai mult, unul dintre factorii de risc pentru RCIU este hipertensiunea maternă, o comorbiditate găsită și în prezentul studiu. În plus, în timpul evaluării ecografice Doppler se observă modificări la nivelul arterelor cerebrale medii, cu scăderea presiunii oxigenului. De asemenea, hipoxia stă la baza fenomenelor de vasodilatație, cu scopul de a crește aportul de sânge la acest nivel. Pe de altă parte, factorii care influențează apariția hemoragiei intraventriculare la prematuri sunt hipoxia și vasodilatația. Această constelație de evenimente poate explica corelația dintre circumferința abdominală joasă și hemoragiile intraventriculare identificate în studiul de față. De asemenea, în această cercetare, am identificat asocierea dintre circumferința abdominală scăzută și atrofia cerebrală. O posibilă explicație constă în dezvoltarea hidrocefaliei la pacienții cu RCIU. Pe de altă parte, conform studiului lui Lemmers PM și colab., o saturație regională suboptimă prelungită de oxigen a fost asociată cu o scădere a volumului creierului.

6.6. Concluzii

Numărul prematurilor născuți vii a urmat o pantă descendentă pe parcursul celor 5 ani de studiu, de la 22,35% la 16,47%, în timp ce numărul prematurilor decedați intrauterin a fost ascendent în aceeași perioadă, de la 12,73% la 32,73%.

parametrilor morfometrici a identificat drept factori de protecție: lungimea la naștere (HR=0,957, $p=0,027$), circumferința toracică (HR=0,937, $p=0,008$) și, respectiv circumferința abdominală (HR=0,922, $p=0,003$). Analiza multivariată a parametrilor morfometrici a identificat circumferința craniană ca factor de risc pentru mortalitate, pentru fiecare centimetru HR=0,901, $p=0,041$.

7. Studiul 2 – Implicațiile proteinelor surfactantului în decesul gemenilor prematuri

7.1. Introducere

Din punct de vedere al incidenței, sarcinile cu făt unic sunt net dominante numeric față de cele multiple, însă această din urmă categorie devine, progresiv, mult mai bine reprezentată, ca urmare, mai ales, a creșterii utilizării tehnicilor de reproducere asistată (ART), dar și a vârstelor materne. Astfel, rata medie europeană în anul 2010 a fost de 16,8 nașteri gemelare, raportat la 1000 de nașteri, cu o variabilitate interstatală semnificativă.

Majoritatea studiilor efectuate până în prezent despre gestațiile multiple au în prim plan sarcinile gemelare și au arătat implicarea comună a factorilor de risc genetici și de mediu în etiopatogenia acestor boli, dar diferențele dintre feții unici și gemelari născuți la aceeași vârstă gestațională și, mai ales diferențele dintre evoluția membrilor aceleiași perechi nu sunt actual suficient studiate și, respectiv caracterizate în termeni de cauzalitate.

Imaturitatea pulmonară, anatomică și funcțională, a nou-născuților prematuri, tradusă prin erori în producerea surfactantului reprezintă etiologia primară a sindromului de detresă respiratorie (SDR). Totodată, se conturează din ce în ce mai clar ipoteza conform căreia un surfactant deficitar cantitativ și/sau calitativ are un impact semnificativ și asupra susceptibilității infecțioase pulmonare, cu răsunet asupra morbidității și mortalității neonatale.

7.4. Rezultate

În perioada de studiu, din totalul necropsiilor pediatrice ($n = 303$), au fost analizate fișele de autopsie ale cazurilor nou-născuților prematuri proveniți din sarcini gemelare ($n = 12$).

Vârsta maternă medie la momentul nașterii a fost de $27,25 \pm 1,69$ ani (interval, 21–38 ani).

Lungimea fătului la naștere a fost mai mică în populația de gemeni prematuri născuți din mame multigravida multipara comparativ cu cei născuți din primigravida nulipara.

Doar un caz de făt gemelar prematur a prezentat o malformație congenitală,

reprezentată de encefalocel gigant, asociată cu imperforație anală și dimorfism facial. Patru dintre cei șase feți născuți morți au fost născuți de femei multipare, cu vîrsta sub 30 de ani.

Examenul histopatologic al parenchimului pulmonar prelevat de la pacienții incluși în studiu a evidențiat frecvente modificări pulmonare: inflamatorii, hemoragice și atelectatice. S-au înregistrat, de asemenea, hemoragii meningeale și renale, colecții purulente circumscrie (la născuți vii) și malformații congenitale.

Toate cazurile au prezentat leziuni pulmonare, iar la 8 dintre pacienți au fost asociate și leziuni extrapulmonare. Cele mai frecvent au fost diagnosticate hemoragia pulmonară în 58,33% din cazuri și hemoragia meningeală și renală în 50% din cazuri.

Examenul imunohistochimic la SP-A a ilustrat un răspuns negativ în 6 cazuri, un răspuns slab pozitiv în 4 cazuri și un răspuns pozitiv intens în 2 cazuri.

În ceea ce privește imunoreactivitatea la SP-B, 4 cazuri (33,33%) au avut reacție negativă, 3 cazuri (25%) s-au pozitivat intens în zonele de alveolită leucocitară și atelectazie pulmonară, iar restul cazurilor au fost slab pozitive (41,67%).

Imunomarcajul țesutului pulmonar cu pro-SP-C a fost negativ în 7 cazuri (58,33%) și, respectiv, slab pozitiv în 5 cazuri (41,67%). Nu s-a obiectivat pozitivitate focală intensă.

Consecutiv analizării datelor obținute, s-a constatat corelarea pozitivă dintre SP-A și diagnosticul de bronhopneumonia ($p=0,695$; $p<0,05$) și, respectiv, dintre SP-A și scorul APGAR la 5" ($p=0,605$; $p<0,05$). De asemenea, s-a constatat că imunomarcajul SP-B s-a corelat pozitiv cu hemoragia pulmonară ($p=0,678$; $p<0,05$) în lotul studiat.

7.5. Discuții

SP-A are un rol în formarea mielinei tubulare, formarea peliculei de suprafață și contribuie la răspunsul inflamator prin legarea cu agenții patogeni microbieni care invadează plămânii, practic în trei procese fiziologice diferite, de importanță majoră: scăderea tensiunii superficiale pulmonare la interfața aer-lichid alveolară, activitate coordonată cu cea a celorlalte proteine surfactant, reglarea homeostaziei surfactantului și în procesele imunologice înnăscute, nespecifice, de la acest nivel. SP-A se găsește și în cantități mici în situsurile extrapulmonare precum precum intestinul subțire și gros, mezenter, epitelii, glandele salivare, prostată, timus, lichid amniotic și aparat lacrimal.

SP-B, membru al familiei saposin-like (SAPLIP), alcătuită din proteine cu greutate moleculară mică, având patru sau cinci α -helixuri amfipatice, stabilizate prin 3 punți disulfurice intramoleculare care implică 6 cisteine și, respectiv încă una care va forma

puntea disulfurică intermoleculară a homodimerului covalent de 18 kDa este produs în celulele Clara sub forma precursorului său - pro-SP-B - și în celulele alveolare de tip II sub formă matură.

SP-C este singura dintre proteinele surfactant care este produsă exclusiv în plămâni de către alveolocitele de tip II. Caracterizată din punct de vedere biochimic ca un monomer cu greutate moleculară de aproximativ 4,5 kDa și 35 de reziduuri care formează un singur α -helix, lung de 37 Å, al cărui segment central (23 Å) este intens hidrofob și se întinde pe grosimea unui dublu strat de dipalmitoilfosfatidilcolină cu orientare transmembranară, SP-C are rol în formarea și stabilizarea peliculei tensioactive, scăzând riscul colapsului alveolar, precum și în stabilizarea contactelor intermembranare. SP-C nu interacționează cu SP-A și nu este esențial pentru formarea tuburilor de mielină, dar acționând sinergic împreună cu SP-B, cele două proteine surfactant sunt responsabile de aranjarea corectă a rețelelor funcționale de membrană în complexe de surfactant.

SP-D este o moleculă cu localizare predominant pulmonară, pe suprafața luminală apicală a epitelului respirator, fiind secretată majoritar de alveolocitele de tip II, dar și, mult mai puțin, de către așa-numitele „celule club” - celulele bronhice non-ciliate. În cantitate semnificativ redusă comparativ cu nivelul secreției pulmonare, SP-D este întâlnită și extrapulmonar, la nivel tegumentar, în glandele parotidă, lacrimale și sudoripare, la nivelul colecistului și ductelor biliare, în pancreas, esofag, stomac și intestin subțire, rinichi și tract urinar, corticala suprarenaliană și hipofiza anterioară, în glandele endocervicale și în veziculele seminale.

Rezultatele studiului de față, au arătat că incidența SDR este invers proporțională cu GA, fapt confirmat de datele disponibile în literatura de specialitate, unde aproximativ 98% dintre nou-născuții cu vârstă gestațională între 22-24 de săptămâni dezvoltă acest sindrom, dar procentul scade la 25% pentru prematurii cu greutate între 1251g și 1500g, corespunzătoare unor vârste gestaționale superioare. Deși este o afecțiune foarte frecventă la această categorie de pacienți, nu orice detresă respiratorie la un prematur mai mic de 34 de săptămâni este SDR, existând și alte afecțiuni care pot „mima” acest sindrom, cum ar fi aspirarea de meconiu, retenția intrapulmonară de lichid, hipoplazia pulmonară sau hipertensiunea pulmonară persistentă. Diagnosticul precoce este esențial, întrucât SDR se agravează rapid post-partum, amenințând prognosticul vital prin insuficiență respiratorie progresivă.

Examenul imunohistochimic a arătat un răspuns negativ sau slab pozitiv la SP-A, SP-B și pro-SP-C în majoritatea cazurilor din lotul studiat (10 din 12; 83,33%), în

concordanță cu datele din literatura de specialitate. De exemplu, Khoor et al., arată în studiul său că, la nivel bronhiolar, imunoreactivitate pentru SP-A a apărut doar la nou-născuții la termen, în timp ce la nivelul epitelului căilor terminale, aceasta proteina fost detectabilă imunohistochimic după 20 de săptămâni de gestație. Studii efectuate pe șoareci de laborator arată faptul că, deși dezvoltarea structurală pulmonară este normală, șoarecii decedează postnatal în absența (sau cu un deficit mare) de SP-B.^[176] Pe de altă parte, nivelurile de SP-C nu doar că sunt scăzute la prematurii cu sindrom de detresă respiratorie, dar ventilarea cu concentrații crescute de oxigen, scade suplimentar expresia SP-C.

În acest studiu, 11 din 12 (91,66%) gemeni prematuri s-au născut cu greutate mică la naștere, dintre care 7 aveau ELBW (<1000 g). Greutatea la naștere nu a fost corelată cu un deficit specific de proteine surfactant, dar a fost în relație directă cu mortalitatea. Aceste rezultate sunt în concordanță cu studiile anterioare care au arătat că la sugarii cu greutatea la naștere <2500 g, riscul de deces a fost de aproximativ 200 ori mai mare în comparație cu sugarii cu greutate normală la naștere.

Din populația de gemeni prematuri decedați pe care am analizat-o, 8 din 12 (75%) au fost de sex feminin. Studiile efectuate au arătat că feții de sex masculin au un risc mai mare - aproximativ dublu - de a dezvolta SDR, comparativ cu exponenții de sex feminin având aceeași vârstă gestațională, fapt notat în literatura de specialitate sub numele de „dezavantajul masculin”.^[481-483] Această diferență nu se limitează la vârstele gestaționale mici sau la greutatea neonatală scăzută, ci poate fi obiectivat și în prematuritatea incipientă sau la feții la termen.

Pe parcursul celui de-al treilea trimestru de sarcină, fătul este expus hormonilor materni, estrogen și progesteron. Estrogenul are un efect pozitiv asupra sintezei surfactantului și secreției de SP-A și SP-B, prin creșterea numărului de celule alveolare de tip II. Însă expunerea fetală este întreruptă în cazul parturii premature. Corelând acest fapt și cu studiile care au dovedit o creștere a concentrației fosfolipidelor surfactantului în lavajul bronhoalveolar al animalelor de laborator consecutiv administrării materne de estradiol, expunerea naturală mai mare a fătului de sex feminin la estradiol, poate fi o cauză semnificativă care să explice „dezavantajul masculin”. În studiul de față, acest dezavantaj nu a fost relevat. În ceea ce privește sarcinile gemelare, s-a constatat că atunci când unul dintre gemeni este de sex feminin, prognosticul geamănului celălalt și, respectiv al sarcinii al sarcinii sunt îmbunătățite, aspect confirmat și de prezenta cercetare, prin faptul că VG medie a fost mai redusă în perechile băiat-băiat, decât în perechile băiat-fată și fată-fată.

În acest studiu, toți născuții vii au avut un scor APGAR de 5 minute <7 și a fost găsită o asociere pozitivă semnificativă între exprimarea negativă a SP-A și un scor APGAR

de 5 minute. Aceste rezultate au fost observate anterior și în studiul realizat de Chambliss et al. care a obiectivat faptul că un scor APGAR la 5 minute de ≤ 7 se constituie într-un factor de risc pentru dezvoltarea SDR. Aceste date au fost confirmate de studii conduse în diferite state, precum Marea Britanie, SUA, Camerun, China și chiar Adis Abeba, prematurii nou-născuți cu APGAR mai mare de 7 la 5 minute și având o evoluție semnificativ mai favorabilă. Aceasta a fost pus pe seama faptului că scorul APGAR ilustrează de fapt gradul de asfixie neonatală, corelat cu un număr redus de hematii, fapt ce interferează cu adaptarea cardio-respiratorie postpartum,

În situația morții fetale in-utero, rolul surfactantului în reducerea tensiunii superficiale la interfața aer-lichid alveolară nu are contextul biologic necesar pentru a se manifesta. În această situație, o deficiență calitativă și/sau cantitativă a surfactantului va avea impact asupra funcțiilor de protecție imună, și se pare, asupra inducerii travaliului prematur. Liganzii inflamatori (precum interleukina 1- IL1) sunt inductori ai travaliului prematur, dar surfactantul modulează răspunsurile inflamatorii severe în compartimentele fetale (și nu numai), ameliorându-le prin funcția de moderare a reacțiilor inflamatorii. Pe de altă parte, diferitele experimente transgenice și alte dovezi genetice, sugerează faptul că, la om, proteinele surfactant A, D sau C (SP-A, SP- D, SP- C), exprimate în țesutul fetal, influențează momentul de debut al travaliului - la termen sau prematur, deci integritatea structurală și quantumul cantitativ ar avea un rol semnificativ și în perioada antenatală. În aceasta cercetare, patru născuți morți au prezentat SP-A negativ, 2 SP-B negativ și 5 pro-SP-C negativ.

Mai multe alte studii au arătat că deficiența de SP-A crește apoptoza și scade viabilitatea celulelor, induce o reacție inflamatorie și provoacă leziuni pulmonare acute. Hemoragia pulmonară se asociază frecvent cu SDR, posibil din cauza presiunii capilare mari cauzate de hipoxie, insuficiență cardiacă, și supraîncărcare de volum. În urma leziunilor endoteliale, neutrofilele sunt eliberate, ceea ce va duce la creșterea valorilor proteazelor, citokinelor și radicalilor liberi de oxigen. Aceste componente vor deteriora celulele alveolare de tip II care produc SP, rezultând niveluri mai scăzute de proteine surfactant. Pe de altă parte, expunerea nou-născuților prematuri cu SDR la ventilație mecanică este un alt factor de risc important pentru hemoragia pulmonară. Conform studiul efectuat de Wiswell et al., hemoragia pulmonară este o afecțiune care agravează starea a 3-5% dintre prematurii cu SDR sever, supuși tehnicilor de ventilație mecanică. Justificarea fiziopatologică implică faptul că în hemoragia pulmonară, componentele exudatului (hemoglobină, proteine plasmatice, lipide membranare) pot duce la inactivarea

surfactantului endogen, inoportunând mecanica pulmonară. Astfel aportul de surfactant exogen ar avea o potențială utilitate, iar aspectul este la fel de valabil și pentru alte aspirate pulmonare, cum ar fi, de exemplu, meconiul, descriindu-se în literatură prezumția ca surfactantul exogen să joace un rol terapeutic în asemenea situații. În studiul de față, am observat o corelație semnificativă statistic, pozitivă, între expresia SP-A și hemoragia pulmonară. Din cele șapte cazuri cu hemoragie pulmonară studiate, cinci dintre ele au prezentat expresie negativă a SP-A.

Boala hemoragică a nou-născutului este una dintre principalele amenințări la adresa prognosticului feteilor prematuri, apariția și extinderea acestor leziuni aflându-se în relație invers proporțională cu vârsta gestațională și, respectiv, cu greutatea la momentul nașterii. La baza fenomenului stă efectul cumulativ dintre imaturitatea patului capilar și cea a sistemului de coagulare, acestora adăugându-se în mod posibil o paletă largă de alți factori de risc, printre care sindromul de detresă respiratorie, cu asfixia celulară asociată, expunerea la ventilație mecanică, sepsisul. Cele mai frecvente leziuni hemoragice extrapulmonare pe care le-am identificat în acest studiu sunt hemoragia renală (41.66%) și cea suprarenaliană (50%), urmate de hemoragia meningeală și cea pluriviscerală. Dintre cele 3 proteine surfactante pe care le-am analizat, SP-A a fost singura care s-a corelat cu hemoragia extrapulmonară

7.6. Concluzii

Vârsta medie a mamelor la momentul nașterii a fost de $27,25 \pm 1,69$ ani (21-38 ani), cu vârsta gestațională medie de $8,17 \pm 1,06$ săptămâni (23–36 săptămâni). Greutatea la naștere a variat între 600 și 2900 g, cu o medie de $(1132,5 \pm 189,03)$ g. 91,66% din cazuri s-au născut cu greutate mică, cei mai mulți fiind clasificați drept ELBW. Examenul histopatologic a relevat leziuni pulmonare în toate cazurile studiate și leziuni extrapulmonare la 8 dintre cei 12 pacienți. La nivel pulmonar, am identificat modificări inflamatorii, hemoragice și atelectazie pulmonară. Extrapulmonar, principalele diagnostice au fost reprezentate de: hemoragie meningeă, hemoragie renală, colecții purulente circumscrie - abcese (la născuți vii), malformații congenitale. Expresia proteinei surfactant SP-A s-a corelat pozitiv puternic cu scorul APGAR la 5 minute ($p = 0,605$; $p < 0,05$). Expresia proteinei surfactant SP-A s-a corelat pozitiv cu prezența bronhopneumoniei ($p = 0,695$; $p < 0,05$). Expresia imunohistochimică a SP-B s-a corelat pozitiv cu prezența hemoragiei pulmonare ($p = 0,678$; $p < 0,05$).

8. Concluzii

În prezenta cercetare am identificat un număr total 18379 nașteri, dintre care 770 au fost premature, cu un număr de 140 de decese în sarcinile unifetale și 12 decese în cazul celor gemelare. Am observat că prematuritatea este un fenomen frecvent în cazul sarcinilor cu făt unic și aproape omniprezent în cazul sarcinilor multifetale. Majoritatea cazurilor de mortalitate fetală neonatală sunt direct legate de prematuritate, ca o consecință a imaturității structurale și funcționale pulmonare și, respectiv ca urmare a susceptibilității crescute la infecții.

Principalele concluzii, pe care le-am identificat și le-am transpus în cadrul prezentei lucrări conturează un tablou morfologic complet al prematurilor decedați perinatal. Am identificat corelații fiziopatologice care pot fi utilizate ca factori prognostici, și am constatat și caracterizat impactul avut de prezența/absența diferitelor fracțiuni proteice ale surfactantului în țesutul pulmonar fetal.

Acestea sunt următoarele:

1. Pentru studiul feților unici, prematuri, decedați perinatal:

- Scăderea progresivă a frecvenței deceselor prematurilor născuți vii și, respectiv, creșterea frecvenței născuților morți, evidențiază optimizarea actuală a îngrijirilor neonatale și impune urmărirea mai frecventă a cazurilor cu patologie maternă ce amenință prognosticul vital al feților;
- Identificarea unui tipar al datelor morfometrice în asociere cu prezența malformațiilor duce la stabilirea unor praguri valorice de dezvoltare fetală, la depășirea cărora indicația de testare genetică pentru identificarea unor sindroame malformative devine esențială;
- Analiza aspectelor morfometrice a identificat circumferința craniană ca fiind un factor predictiv al riscului de mortalitate, prin asociere cu diagnostice de deces (precum hemoragia intracraniană) în timp ce circumferința abdominală reiese a fi un factor protector.

2. În urma studiului analizei expresiei imunohistochimice a fracțiunilor proteice ale surfactantului, am constatat că:

- Expresia proteinei surfactant SP-A s-a corelat pozitiv cu scorul APGAR la 5” și cu prezența bronhopneumoniei, iar expresia imunohistochimică a SP-B s-a corelat pozitiv cu prezența hemoragiei pulmonare, ambele sugerând o posibilă deficiență funcțională a acestor fracțiuni în rolul de modulare imunologică .
- 83,3% dintre născuții morți incluși în studiu au prezentat expresie imunohistochimică negativă pentru pro-SP-C, sugerând că absența acestei fracțiuni este implicată în alte mecanisme tanatogeneratoare decât SDR .

- Am identificat ca factori de risc pentru SDR cauzat de deficitul de proteine surfactant, următorii parametri: greutatea mică la naștere, greutatea și datele antropometrice la naștere, GA, scorul APGAR scăzut la 5 minute, multiparitatea și sexul feminin al fetei.

3. Respectând aspectele rezultate în urma cercetării persoanele, consider esențială implementarea următoarelor măsuri preventive și terapeutice, astfel:

- proiectarea, organizarea și implementarea unor programe de informare în masă a populației generale cu privire la nașterea prematură și la riscurile fetale asociate.
- proiectarea, organizarea și implementarea unor programe de screening ai factorilor de risc pentru naștere prematură în rândul gravidelor.
- implementarea unor protocoale de monitorizare cu frecvență crescută în cazul pacienților identificate cu factori de risc pentru nașterea prematură (multigravide- multipare, cu vârstă de peste 30 de ani, supuse tehnicilor de reproducere asistată, cu patologii preexistente sau asociate sarcinii) care să conducă la administrarea cât mai precoce a terapiei specifice pentru prelungirea gestației și pentru asigurarea viabilității fetale.

9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Originalitatea prezentei cercetări derivă din modalitatea de abordare a tematicii studiate, analizei statistice detaliate și complexe - ce cuprinde parametri gestaționali, fetal și materni - alăturându-i-se o analiză cu grad înalt de specificitate - imunomarcarea fracțiunilor proteinelor surfactant - pe un lot caracterizat de o trăsătură aparte: proveniența pacienților din sarcini gemelare.

În urma studierii literaturii de specialitate, am observat că la nivel național nu a fost cercetată această patologie într-o astfel de manieră, fără a identifica studii multi- cazuistice, efectuate post-mortem ale pacienților gemelari sau proveniți din sarcini multiple. La nivelul literaturii internaționale se remarcă paucitatea studiilor despre acest segment specific de pacienți.

Rezultatele studiilor prezentate au o mare adresabilitate atât pentru practica medicală pluridisciplinară - obstetricieni, neonatologi, pneumologi, anatomopatologi, imagiști - cât și pentru sfera viitoarelor cercetări, evidențiind rolul esențial al abordării complexe și al colaborării interdisciplinare atât în demersurile clinice și de diagnostic, cât și pentru reprezentativitatea viitoarelor cercetări.

Perspectivile viitoare de cercetare ce derivă din lucrarea de față sunt reprezentate de: studii retrospective sau prospective comparative asupra fracțiunilor proteinelor

surfactant la prematurii proveniți din sarcini unice și multiple, asupra fracțiunilor proteinelor surfactant la feții decedați perinatal, de orice vârstă gestațională, studii prospective care să vizeze stabilirea unor eventuale corelații între deficitul proteinelor surfactant și patologia placentară.