

tification of fetal genetic traits. *Lancet*, 2011, 357(9252), p. 310–331.

12. Бочков Н.П. Медико-генетическое консультирование по поводу мутагенных и тератогенных воздействий / Н.П. Бочков, Т.А. Рослова, И.И. Якушина // *Медицинская генетика*, 2009, Т. 8, № 1. с. 5.

13. Кречмар М.В. Особенности пренатально-

го медико-генетического консультирования / М.В. Кречмар // *Журн. акушерства и женских болезней*. 2007, Т. 1, вып. 1.-е. с.16-20.

14. Пренатальная диагностика наследственных и врожденных болезней / Под ред. акад. РАМН, проф. Э. К. Айламазяна, чл.-корр. РАМН, проф. В.С. Баранова. 2-е изд. Москва, 2007, 416 с.

© Lilia Sinițina, V. David, V. Petrovici, Șt. Samciuc, V. Boian, G. Boian

Lilia Sinițina, V. David, V. Petrovici, Șt. Samciuc, V. Boian, G. Boian
**EVALUAREA PARTICULARITĂȚILOR MORFOPATOLOGICE PRIN METODE CLASICE ȘI MOLECULARE
LA COPII CU VICII CONGENITALE INTESTINALE**

IMSP Institutul Mamei și Copilului (Director – dr. șt. med., conf. univ. S. Gladun)

SUMMARY

**EVALUATION OF MORPHOPATHOLOGIC PARTICULARITIES THROUGH CLASSICAL AND MOLECULAR METHODS
IN CHILDREN WITH CONGENITAL INTESTINAL MALFORMATIONS**

Key words: Congenital intestinal malformations, morphopathologic particularities, nerve plexus, primary monoclonal antibodies.

Background. *There are numerous clinical cases that demonstrate chronic colostasis and megacolon, when intestinal nerve plexus are present, having however defective anatomical and structural histopathological peculiarities. A research at molecular level of immunohistochemical expression of neurotrophic monoclonal antibodies presents an interest.*

Material and methods. *The study material was intestinal tissue samples taken intraoperatively from 117 patients who underwent surgery on congenital intestinal malformations. There have been used the hematoxylin-eosin and picrofucsin staining methods after van Gieson, trichrome Masson and primary monoclonal and polyclonal Neuron Specific Enolase (NSE), Neurofilament Protein (NFP), Chromogranin A (CGA), Synaptophysin (SYP) and Smooth Muscle Actin (SMA) antibodies.*

Results. *Classical methods of morphopathologic investigation offers a wide range of possibilities for evaluating structural and functional peculiarities of the colon within colon congenital malformations, including peculiarities of colonic nervous apparatus, as well as defining combined colon malformations. However, immunohistochemical researches allow evaluating histopathological particularities at molecular level, making possible the assessment of the resected colon functionality level, especially with regard to the areas visually and intraoperatively healthy.*

Conclusion. *Classical methods have a valuable impact on detecting tissue structures in time and in different variations of congenital structural disturbances, and the use of neurotrophic monoclonal antibodies provides data on neuronal and synaptic structural components, which without doubt promotes the use of these antibodies in differential diagnosis of intestinal transit disorders resulting in megacolon, as well as in assessing the quality of local nervous apparatus at level of resected intestine.*

РЕЗЮМЕ

**ОЦЕНКА MORFOPATOLOGИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ КИШЕЧНИКА У ДЕТЕЙ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛАССИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Ключевые слова: врожденные пороки кишечника, морфопатологические особенности, нервные сплетения, первичные моноклональные антитела.

Актуальность. Существует множество клинических случаев сопровождающихся хроническими запорами и мегаколоном при которых нервные сплетения кишечника присутствуют, однако при этом имеют нарушенную гистоанатомическую структуру. Представляет интерес исследование на молекулярном уровне иммуногистохимической экспрессии некоторых нейротропных моноклональных антител.

Материалы и методы. Материалом исследования послужили ткани толстого кишечника взятые интраоперационно у 117 пациентов оперированных в связи с врожденными кишечными пороками развития. Были использованы следующие методы окраски: гематоксилин-эозин, пикрофуксин по ван Гизону, трихром Массон и иммуногистохимический метод с применением первичных моно- и поликлональных антител Neuron Specific Enolase (NSE), Neurofilament Protein (NFP), Chromogranin A (CGA), Synaptophysin (SYP) and Smooth Muscle Actin (SMA).

Результаты. Классические морфологические методы предоставляют большую гамму возможностей оценки структурно-функциональных особенностей толстого кишечника, включительно состояние его нервного аппарата, а также выявление некоторых комбинированных пороков развития толстого кишечника. В тоже время иммуногистохимическое исследование позволяет оценить гистопатологические особенности на молекулярном уровне и установить функциональность на уровне рецептированного толстого кишечника, особенно в зонах визуально, интраоперационно здоровыми.

Заключение. Классические методы исследования имеют важное значение для выявления тканевых структур в норме и при разных вариантах врожденных структурных нарушений, а применение моноклональных нейротропных антител позволяет определить состояние нейрональных и синаптических структурных компонентов, что указывает на необходимость применения данных антител в дифференциальном диагнозе нарушений кишечного пассажа с развитием мегаколоном, а также в определении качества собственного нервного аппарата на уровне рецептированного толстого кишечника.

Introducere. Metodele clasice de investigație morfopatologică a pieselor chirurgicale postoperatorii prelevate de la pacienții cu vicii congenitale au stat la baza stabilirii tulburărilor inervației intestinale autohtone, în special a ageneziei plexurilor nervoase mienterice cu denumirea *maladia Hirshsprung*, descrisă încă în anul 1886 la nou-născuți cu constipații severe și megacolon. Totodată, există numeroase cazuri clinice ce manifestă colostază cronică și megacolon, în timp ce plexurile nervoase intestinale sunt prezente, având, însă, particularități defectuoase anatomostructurale manifestate prin devieri fie ale numărului de ganglioni nervoși – *hipoganglionoză* [3] sau *hiperganglionoză* [5, 6], fie ale numărului de celule neuronale în ganglionul neural: hiponeierie sau hiperneierie [1]. De asemenea, disfuncțiile ganglion neuronale includ un șir de particularități ale plexurilor neurale, ce se manifestă prin prezența neuronilor imaturi hipertrofiați localizați în submucoasă și/sau intermuscular [4], fiind atribuite noțiunii de displazie neurointestinală (DNI). Există opinii că DNI nu se limitează doar la afectarea neuronilor, dar se extinde și asupra fibrelor nervoase, ce efectuează conexiunea interganglionară a plexurilor intestinal-musculare [7]. Statutul inervației intramurale, în special al fibrelor nervoase și al nivelului acetilcolinesterazei, în constipații postoperatorii la copii cu atrezie anorectală, s-a cercetat prin colorația cu hematoxilină-eozină, picrofucsină, dar și histochemic după Bilschovschy-Gross și Karnovsky-Roos [1]. Necesitatea unor cercetări la nivel mai aprofundat ale aparatului nervos intestinal, a determinat investigații la nivel molecular prin metoda imunohistochemică, stabilindu-se la pacienții cu *maladia Hirschsprung* anomalii ale expresiei anticorpului monoclonal Anti-

Synaptophysin, care este o proteină a veziculelor sinaptice prezentă în toți neuronii și organitele neuron-specifice [2].

În acest context, prezintă interes cercetarea la nivel molecular a expresiei imunohistochemice a anticorpilor neurotropi responsabili de diverse verigi ale transmisiei impulsului nervos la copii cu vicii congenitale intestinale, în cadrul investigației complexe cu metode clasice.

Scopul studiului. Evaluarea particularităților morfopatologice prin metode clasice și moleculare la copii cu vicii congenitale intestinale.

Material și metode. Investigația morfopatologică s-a aplicat la 117 pacienți operați pentru vicii congenitale intestinale cu colostază cronică și megacolon. Material de studiu au servit probele tisulare prelevate intraoperator la diferite nivele: ampula rectală, porțiunile distală, medie și proximală ale colonului sigmoid, uneori ale colonului descendent și transvers. Probele tisulare erau fixate în sol. Formol tamponat (pH 7,2-7,4) timp de 12-24 ore, se procesau prin metoda clasică și se includeau în parafină. Se confecționau secțiuni parafinate cu grosimea 5μ și se colorau cu hematoxilină-eozină (H&E), histochemic cu picrofucsină după van Gieson (VG) și tricrom Masson. Cercetările la nivel molecular se efectuau prin reacția imunohistochemică, pentru care, după deparafinare și hidratare, se realiza demascarea antigenului la cuptorul cu microunde « LG » la temperatura 95°C. Timpul demascării varia între 10 și 20 minute, în funcție de anticorpul primar utilizat. Inhibarea peroxidazei endogene se realiza cu peroxidază. S-au utilizat anticorpii primari monoclonali și policlonali gata de utilizare (Dako): *Neuron Specific Enolase (NSE)*, *Neurofilament Pro-*

tein (NFP), Chromogranin A (CGA), Synaptophysin (SYP), Smooth Muscle Actin (SMA). Incubarea cu anticorpii primari se efectua conform timpului enunțat de către producător și varia între 10 și 30 minute. Vizualizarea se efectua prin utilizarea sistemului LSAB2 (Dako Cytomation) sau En Vizion TM Flex. Controlul negativ se realiza prin excluderea anticorpilor primari.

Rezultate și discuții. Investigația histopatologică prin metode clasice a stabilit diverse particularități structurale colonice, care reflectau procese inflamator-distrofice, displazice și proliferativ-fibroplastice. Procesele inflamator-distrofice erau manifestate neuniform la diferite nivele ale colonului, în majoritate fiind prezentate prin acumulări de limfocite de diversă intensitate în tunica mucoasă și submucoasă, pe alocuri însoțite de un edem moderat. Procesele displazice ganglioneuronale erau manifestate prin devieri ale numărului, dimensiunilor și localizării plexurilor neurale, dar și ale componenței lor celulare.

Lipsa totală a plexurilor neuronale (aganglioneză) atât a celor intermusculare (Auerbach), cât și a celor submucoase (Meissner) s-a atestat în 14 cazuri (12%)

(fig.1). Totodată, puteau fi observate fibre neurale displazice localizate pe arii conjunctive vaste, compacte sau laxe, în lipsa plexurilor neurale (fig. 2). Pe alocuri, unele plexuri neurale aveau formă de conglomerate de dimensiuni mari, cu prezența celulelor neuronale imature (fig. 3). În aceste zone, în tunica musculară, se atesta o hipertrofie de diversă intensitate, mai pronunțată în stratul extern, cu accentuarea rețelei conjunctive interstițiale, inclusiv în jurul vaselor sangvine de calibru mediu și mic. Uneori, plexurile neurale aveau aspect de fâșii solitare hipoplaziate displazice cu un component celular ganglionar monomorf, adesea cu reducerea considerabilă a numărului de neuroni și particularități ale fibrelor nervoase în formă de fragmentare sau îngroșare segmentară a acestora (fig. 4, 5). De asemenea, se detectau displazii ganglio-neuronale asociate cu heterotopii de mucoasă intestinală în stratul submucoas (fig. 6). În paralel cu modificările displazice, la copii cu colostază cronică de lungă durată, se atesta neoformarea țesutului conjunctiv, preponderent în submucoasă, sau modificări sclerozivo-cicatriceale muscular-infiltrative, adesea fiind predominante fibrele colagene (fig. 7, 8).

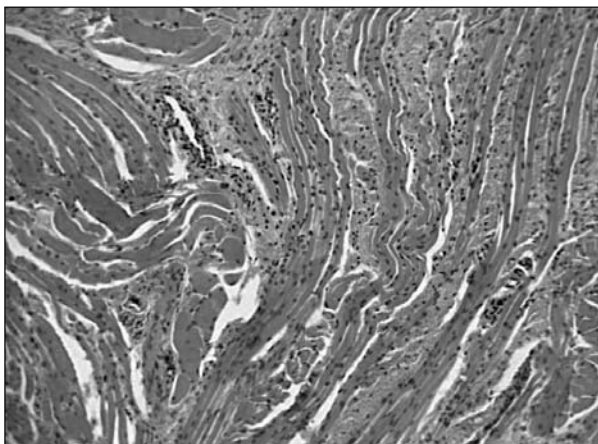


Fig. 1. Aganglioneză colonică. H&E. × 20

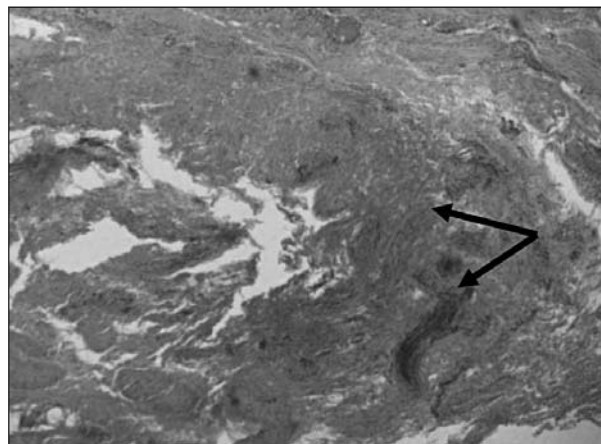


Fig. 2. Fibre neurale displazice în lipsa plexurilor neurale. H&E. × 10

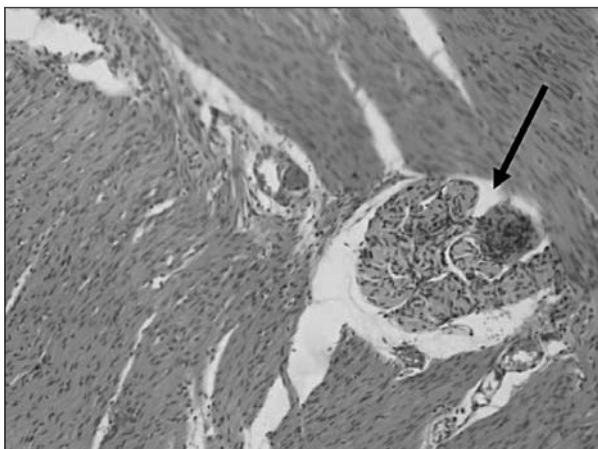


Fig. 3. Plex neural mienteric displazic, imatur, în formă de conglomerat. H&E. × 10

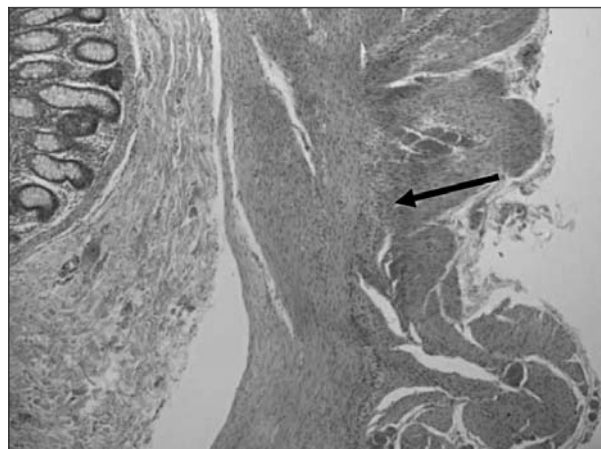


Fig. 4. Plexuri neurale mienterice displazice în formă de fâșii hipoplaziate. H&E. × 5

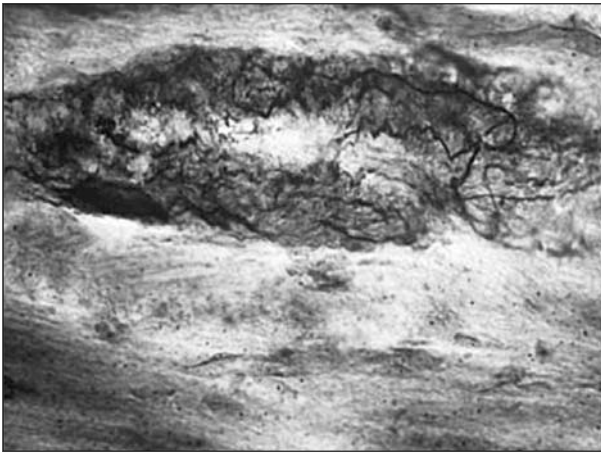


Fig. 5. Hiponeierie. Neuron solitar. Fragmentarea și îngroșarea segmentară a fibrelor nervoase. Impregnare argentică după Bielshowsky – Gross. X 20

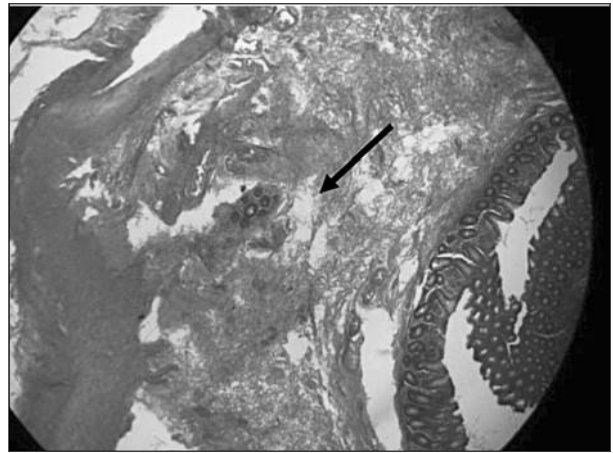


Fig. 6. Heterotopia mucoasei colonice în stratul submucos al colonului asociată cu hipoganglionoză și neoformare a țesutului conjunctiv. H&E. x 5



Fig. 7. Modificări sclerozic-cicatriceale muscular-infiltrative ale colonului. Colorație histochimică cu picrofucsină Van Gieson. × 15

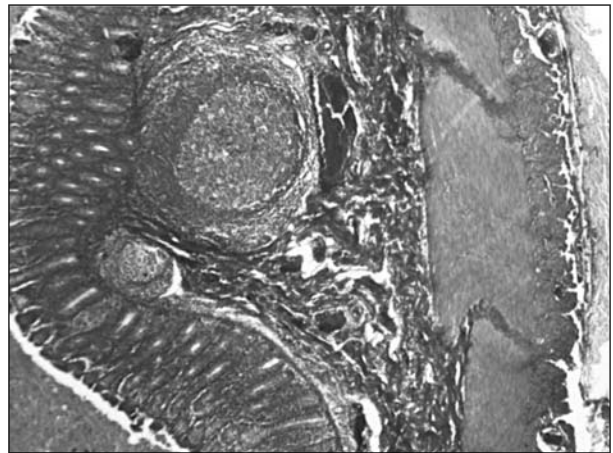


Fig. 8. Evidențierea structurilor colagene prin aspect color albastru. Colorație histochimică tricrom Masson. × 15

Efectuarea reacției IHCh cu anticorpii neurotropi *Neuron Specific Enolase (NSE)*, *Neurofilament Protein (NF)*, *Synaptophysin (SYP)*, *Chromogranin A (CGA)* a contribuit la cercetarea mai aprofundată a plexurilor neurale cu relevarea unor particularități morfopatologice la nivel molecular.

Astfel, la pacienții cu vicii congenitale de colon cu colostază cronică se putea releva lipsa expresiei anticorpilor, expresie focală sau expresie în limitele normei în plexuri nervoase hipertrofiate, formând diverse combinații ale expresiei anticorpilor, inclusiv în ganglionii neurali displazici și la nivel de sinapse ale joncțiunilor neuromusculare (fig. 9, 10, 11, 12, 13, 14).

Utilizarea anticorpului monoclonal *Smooth Muscle Actin (SMA)*, care este biomarkerul țesutului muscular, a relevat prezența expresiei penetrante periferice intraganglionare a acestui anticorp la 3 pacienți cu displazie a aparatului ganglioneuronal.

Discuții. Metodele clasice de investigație morfopatologică oferă o gamă vastă de posibilități de

evaluare a particularităților structural-funcționale ale colonului în vicii congenitale de colon, inclusiv în ceea ce privește particularitățile aparatului nervos colonic, dar și în stabilirea unor vicii combinate ale colonului. Totodată, cercetările imunohistochemice permit evaluarea particularităților histopatologice la nivel molecular făcând posibilă aprecierea funcționalității nivelului de colon rezecat, în special în secțiunile vizual, intraoperator, sănătoase. Un moment important, detectat prin cercetările imunohistochemice, este relevarea unei expresii diferite a anticorpilor monoclonali în unul și același sector intestinal, ceea ce conduce la supoziția că expresia diferită este bazată pe dereglările proteinelor (enzimelor) ce participă la transmiterea impulsului nervos în sistemul periferic atât intraganglionar, cât și la nivel intracelular și în sinapsele joncțiunilor neuromusculare, ceea ce este sugestiv pentru prezența leziunilor asociate: displazia aparatului ganglioneuronal și miopatia periganglionară colonică.

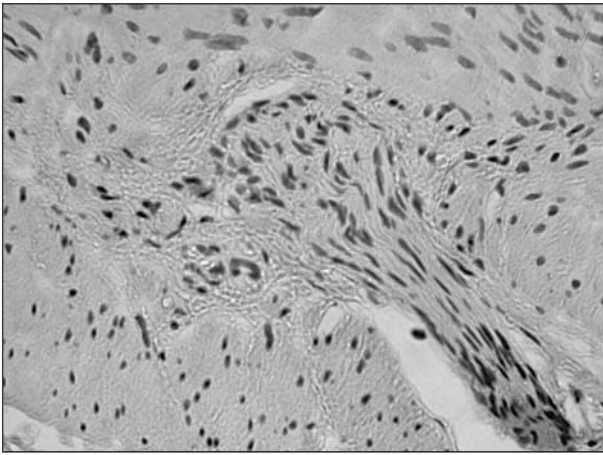


Fig. 9. Absența imunomarcajului cu NFP în plex neural displazic. $\times 10$

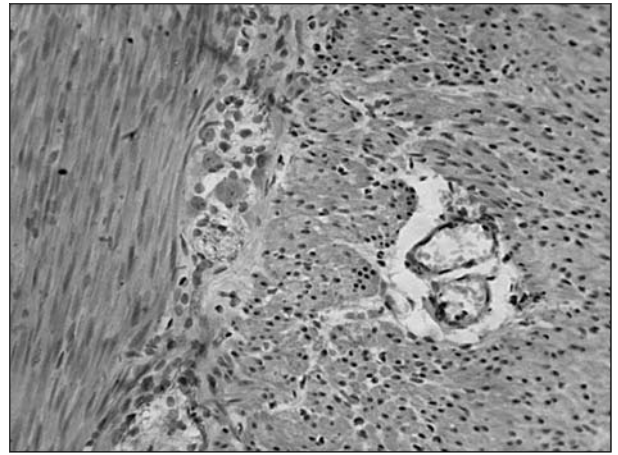


Fig. 10. Diminuarea expresiei anticorpului NSE. Reacție imunohistochimică. $\times 20$

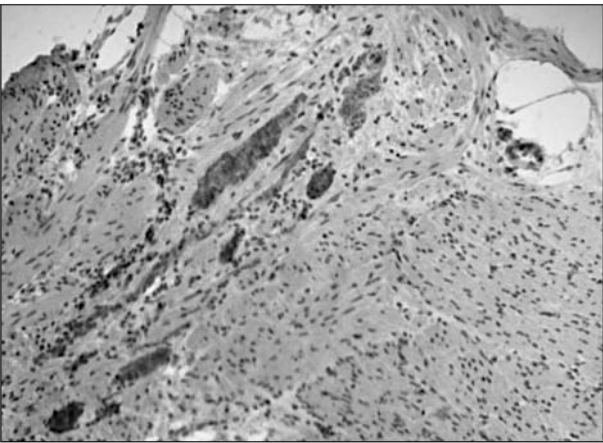


Fig. 11. Imunomarcaj segmentat zonal 3+ cu NFP. $\times 10$

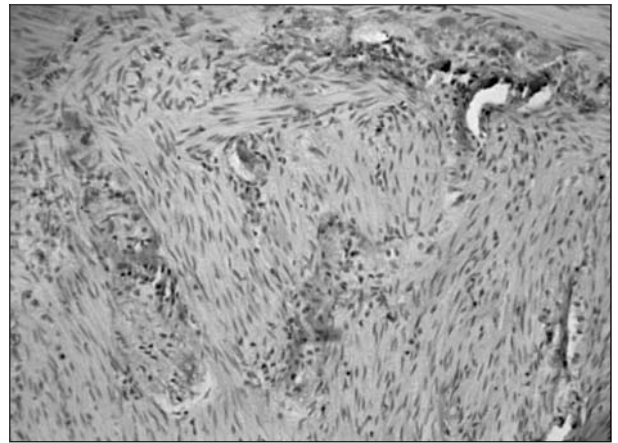


Fig. 12. Expresie 2+ pentru SYP în displazie ganglio-neuronală cu dereglarea expresiei la nivel de joncțiune neuromusculară. $\times 10$.

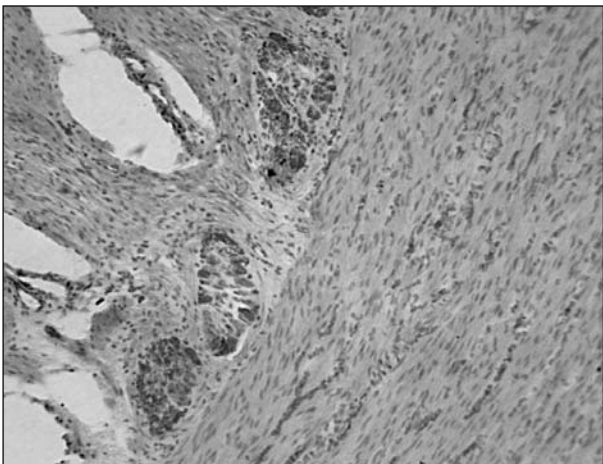


Fig. 13. Expresia NSE 3+ în plexurile neurale mienterice hipertrofiate. $\times 20$

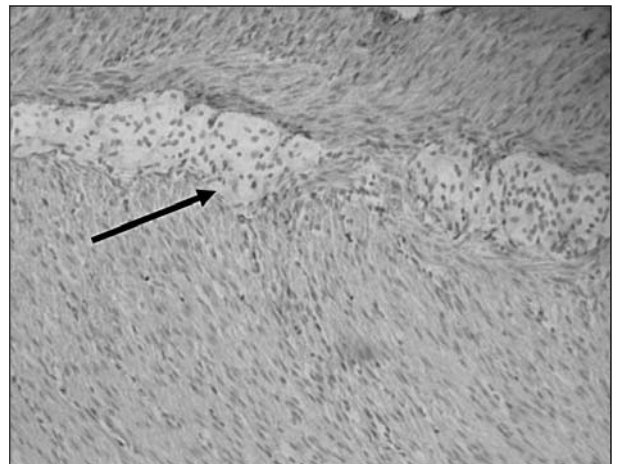


Fig. 14. Expresie 3+ pentru SMA. Reacție IHCh. $\times 10$.
→ plex nervos mienteric

Concluzii.

1. Metoda clasică are un impact valoros în detectarea structurilor tisulare normale și în diferite variații ale perturbărilor structurale congenitale, în special ganglioneuronale în patologia displaziilor structural-funcționale vicioase.

2. Evaluarea expresiei anticorpilor neurotropi monoclonali *Neuron Specific Enolase (NSE)*, *Neuron Filament Protein (NFP)*, *Cromogranin A (CGA)* și *Synaptophysin (SYP)* la diferite nivele ale colonului a stabilit un polimorfism vădit al nivelului expresiei anticorpilor în componentele structurale neuronale și sinaptice, ceea ce cu certitudine pledează în favoarea utilizării acestor anticorpi în diagnosticul diferențial al tulburărilor de tranzit intestinal soldate cu megacolon, precum și în aprecierea calității aparatului nervos autohton la nivelul intestinului resectat.

Bibliografie

1. **Boian G., Fuior I., Boian V., Bacalim M.** Displazia neuronală intestinală (DNI) adițional la alte malformații congenitale (MC) – opțiuni de diagnostic și

tratament la nou-născuți. Buletin de perinatologie. nr. 1, 2007, p. 19-23.

2. **Corsois L., Boman F., Sfeir R.** Anomalies d'expression de la synaptophysine dans la maladie de Hirschsprung. *Annales de Pathologie*. 2004, vol. 24, nr 5, p. 407-415.

3. **Garret J. R., Havard E. R.** Autonomic nerves in rectum and colon in Hirschsprung's disease. *Arch. Dis. Child.*, 1969, nr.44. p. 406-417.

4. **Komborozos V. A., Skrekas G. J.** Neuronal intestinal dysplasia: an entity of chronic intestinal pseudo-obstruction. *Annals of gastroenterology*. 2000, 13 (2), p. 95-97.

5. **Meier-Ruge W.** Hirschsprung's disease its aetiology, pathogenesis and differential diagnosis. *Current Topics in Pathology*. 1974, nr. 59, p. 131-179

6. **Puri P., Lake B. D., Nixon H. H. et al.** Newborn colonic dysplasia: an unusual association of Hirschsprung's disease. *J. Pediatr. Surg.* 1977, nr. 12, p. 681-685.

7. **Аруин Л. И., Капуллер Л. Л., Исаков В. А.** Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. Триада X. М., 1989, 483с.

© Iurii Dondiuc, Uliana Tabuica, Corina Cardaniuc, Alina Ușanli

Iurii Dondiuc, Uliana Tabuica, Corina Cardaniuc, Alina Ușanli MORTALITATEA MATERNĂ ÎN REPUBLICA MOLDOVA ÎN PERIOADA ANILOR 2009-2014

*USMF „Nicolae Testemițanu”, Catedra Obstetrică și Ginecologie FECMF
(Șefcatedră – prof.univ., dr. hab. med. Olga Cernețchi)*

SUMMARY

MATERNAL MORTALITY IN THE REPUBLIC OF MOLDOVA BETWEEN YEARS 2009 AND 2014

Key words: maternal mortality, risk factors, preventions.

Introduction: *The rate of maternal mortality is an important index for the country's economic development and also for the quality and effectiveness of gynecologic medical aid. The fact that the rate of maternal mortality in Moldova is characterized by instability grows awareness. Concerning the long-term demographic and economic crisis of the country, this issue appears even more disturbing.*

Aim: *The research conducted a complex analysis of the maternal mortality registered in Moldova between years 2009-2014 and the possible risk factors.*

Materials and Methods: *A prospective study and examination of medical documentations for 55 cases of maternal mortality in Moldova (btw. 2009-2014) has been carried out. This included specially elaborated inquiries. The collected data has been processed with the SPSS 20 and Microsoft Excel computer programs.*

Results: *After analyzing the age distribution of deaths occurred after pregnancy, the following can be stated: the majority of the maternal mortality cases happened for women of age 20-39 (83,64%). The results also prove that a high percentage of maternal mortalities, occur by the multiple pregnancies (78,17%). Each 3rd woman had extra-vaginal illnesses. There has also been registered a preponderance of pregnancies suffering complications from 2-3 pathologies simultaneously. The results of the investigations about maternal mortality in the Republic of Moldova (btw. 2009-1014), show that the majority*