

На правах рукописи

Гребенщикова Алина Сергеевна

**СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ
КРОВЕНОСНЫХ КАПИЛЛЯРОВ МИОКАРДА
ПРИ ОЖГОВОЙ СЕПТИКОТОКСЕМИИ**

3.3.2. Патологическая анатомия

1.5.22. Клеточная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор
доктор медицинских наук, профессор

Савченко Сергей Владимирович
Новоселов Владимир Павлович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор

Славинский Александр Александрович

(Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой патологической анатомии, г. Краснодар)

доктор биологических наук

Клиникова Марина Геннадьевна

(Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Институт молекулярной патологии и патоморфологии, главный научный сотрудник-руководитель лаборатории молекулярно-клеточных и ультраструктурных основ патологии, г. Новосибирск)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Челябинск)

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2022 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.046.05, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, д. 52)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, ул. Залесского, д. 4; тел. 8 (383) 222-68-35; <http://ngmu.ru/dissertation/514>)

Автореферат разослан «_____» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

С. В. Залавина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность избранной темы. Несмотря на эффективное комплексное лечение с использованием современных технологий, применяемых в комбустиологии, ожоговая септикотоксемия по-прежнему имеет высокие показатели летальности у пациентов с ожоговой болезнью (Жилинский Е. В. и др., 2014; Алексеев А. А. и др., 2016; Porter C. et al., 2016; Smolle C. et al., 2017; Gldoġan C. E. et al., 2019; Manning J., 2018; Abdel Wahab M. E. et al., 2018; Elkbuli A. et al., 2019; Temiz A. et al., 2020).

На фоне иммунодефицитного состояния, после перенесенных ожогового шока и токсемии, бактериальная флора инфицированных ожоговых ран, чаще представленная золотистым стафилококком, синегнойной палочкой, кишечной палочкой, протеем или их ассоциациями, вызывает прогрессирующее гнойное воспаление ожоговых ран (Chen H. et al., 2019; Elmassry M. M. et al., 2020; Moins-Teisserenc H. et al., 2021; Puca V. et al., 2021; Ladhani H. A. et al., 2021). Трудности, возникающие при лечении этой категории больных, связаны еще и с устойчивостью патогенной флоры к различным группам антибиотиков, а также вторичной (приобретенной) иммунологической недостаточностью, при которой подавлены основные клеточные механизмы иммунитета (Norbury W., 2016; Lachiewicz A. M. et al., 2017; Elamin W. F. et al., 2018; Vickers M. L. et al., 2018; Vinaik R. et al., 2019).

Для ожоговой септикотоксемии характерны высокая протеолитическая активность сыворотки крови, интенсивная активация липолиза и гликогенолиза, которые сопровождаются усиленным распадом плазменных и тканевых белков. В результате нарастающей септической и метаболической интоксикации в сочетании с гипоксией и выраженными микроциркуляторными расстройствами развивается полиорганная недостаточность (Hidalgo F. et al., 2016; Bergquist M. et al., 2019; Matsuura H. et al., 2019).

Одним из основных органов-мишеней, страдающих при развитии полиорганной недостаточности, является сердце, снижение морфофункциональных возможностей которого при ожоговой септикотоксемии

обусловлено прогрессирующими микроциркуляторными расстройствами и эндотелиальной дисфункцией (Colbert J. F. et al., 2016; Uchimido R. et al., 2019; Elkbuli A. et al., 2019; Wang M. et al., 2020; Sterling J. P. et al., 2021).

Следует отметить, что развитие микроциркуляторных расстройств и эндотелиальной дисфункции при ожоговой септикотоксемии связано со структурными изменениями эндотелиоцитов кровеносных капилляров (Colbert J. F. et al., 2016; Uchimido R. et al., 2019). Таким образом, недостаточность эндотелия и прогрессирующие микроциркуляторные расстройства в результате изменений структуры эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда следует рассматривать как один из существенных механизмов формирования сердечной недостаточности при ожоговой септикотоксемии с развитием летальных исходов.

С учетом этого одним из путей снижения летальности при ожоговой септикотоксемии является проведение комплексного морфологического исследования, позволяющего изучить патоморфологические, иммуногистохимические и ультраструктурные изменения эндотелия кровеносных капилляров миокарда при ожоговой септикотоксемии.

Степень разработанности темы исследования. Анализ сведений, изложенных в специальной литературе, свидетельствует об отсутствии информативных данных, касающихся структурных изменений кровеносных капилляров миокарда при ожоговой септикотоксемии, необходимых для более полного понимания механизмов развития микроциркуляторных расстройств при этой патологии (Colbert J. F. et al., 2016; Uchimido R. et al., 2019), что может быть полезным для разработки кардиопротекции с целью снижения летальности. Это определило цель и задачи настоящего исследования.

Цель исследования. Изучить патоморфологические изменения и молекулярные маркеры эндотелия кровеносных сосудов, а также ультраструктурную организацию эндотелиоцитов кровеносных капилляров мышцы сердца при летальной ожоговой септикотоксемии.

Задачи исследования

1. Изучить патоморфологические изменения миокарда, обусловленные развитием ожоговой септикотоксемии.
2. Оценить уровень экспрессии молекулярных маркеров эндотелия (CD31, CD34) кровеносных сосудов миокарда при ожоговой септикотоксемии.
3. Исследовать ультраструктурную организацию эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда при ожоговой септикотоксемии.
4. Провести сравнительный анализ ультраструктурных изменений эндотелиоцитов кровеносных капилляров с учетом локализации различных отделов левого желудочка сердца при ожоговой септикотоксемии.
5. Изучить развитие аутофагии в эндотелиоцитах кровеносных капилляров миокарда в передней, боковой и задней стенках левого желудочка сердца при ожоговой септикотоксемии.

Научная новизна. Впервые продемонстрировано, что при ожоговой септикотоксемии с летальным исходом патоморфологические изменения миокарда характеризуются острыми расстройствами кровообращения, пролиферацией эндотелия кровеносных капилляров, увеличением экспрессии общего лейкоцитарного антигена (CD45), острыми очаговыми повреждениями миокарда, развившимися на фоне выраженного повышения уровня лейкоцитарного индекса интоксикации и С-реактивного белка, а также снижения лимфоцитарного индекса, абсолютной лимфопении и стойкой артериальной гипотензии при коррекции вазопрессорными препаратами.

Впервые показано, что уровень экспрессии CD31 и CD34 эндотелиоцитами кровеносных сосудов миокарда при летальной ожоговой септикотоксемии характеризуется статистически значимым снижением, что свидетельствует о формировании эндотелиальной дисфункции.

Впервые при ожоговой септикотоксемии установлен комплекс ультраструктурных изменений эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда в различных отделах левого желудочка сердца, что свидетельствует о структурной реорганизации в виде внутриклеточного отека, деструкции

мембранных органелл, редукции везикулярного трансэндотелиального транспорта.

Впервые выявлено, что при ожоговой септикотоксемии имеет место активация аутофагии эндотелиоцитами с усилением эндоцитоза как закономерно развивающаяся компенсаторно-приспособительная реакция, направленная на сохранение эндотелиальных клеток кровеносных капилляров миокарда при ожоговой септикотоксемии.

Это является обоснованием развития сердечной недостаточности в результате прогрессирующих микроциркуляторных расстройств и эндотелиальной дисфункции.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в результате проведенного исследования новые данные расширяют представление о морфофункциональных особенностях эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда и их возможной роли в компенсаторных процессах, влияющих на микроциркуляцию миокарда при ожоговой септикотоксемии.

Установленные особенности экспрессии молекулярных маркеров (CD31 и CD34) эндотелиоцитами дополняют данные об особенностях микроциркуляторных расстройств и эндотелиальной дисфункции при развитии ожоговой септикотоксемии.

У больных с ожоговой септикотоксемией выявленные особенности ультраструктурных изменений эндотелиоцитов, связанные с аутофагией, позволяют высказаться о гетерогенности структуры эндотелия кровеносных капилляров в различных отделах миокарда левого желудочка и расширяют современные представления о развитии микроциркуляторных расстройств мышцы сердца.

Методология и методы диссертационного исследования. В основу методологии диссертационной работы положены принципы системного анализа полученных морфологических изменений, основанных на изучении данных медицинских карт стационарных больных с ожоговой

септикотоксемией, результатов световой и поляризационной микроскопии миокарда, а также иммуногистохимического и ультраструктурного исследования эндотелия кровеносных капилляров миокарда при аутопсии 32 ожоговых больных, умерших в период септикотоксемии. Полученные в результате проведенного исследования данные были проанализированы и обработаны корректными статистическими методами. Дизайн выполненного исследования в полной мере согласуется с принципами проведения современных работ и с полным соблюдением правил биоэтики.

Положения, выносимые на защиту

1. Патоморфологические изменения миокарда и особенности экспрессии CD31, CD34 эндотелиоцитами кровеносных сосудов при ожоговой септикотоксемии характеризуются острыми расстройствами кровообращения, пролиферацией эндотелиоцитов, образованием острых очаговых повреждений миокарда, а также снижением уровня белков-маркеров кровеносных сосудов.

2. Выявлен комплекс ультраструктурных изменений эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда левого желудочка при ожоговой септикотоксемии, который свидетельствует о нарушении структуры клетки в виде внутриклеточного отека, деструкции мембранных органелл, редукции везикулярного трансэндотелиального транспорта и активации аутофагии.

3. Изменения ультраструктурной организации эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда при ожоговой септикотоксемии имеют структурную гетерогенность, обусловленную различной выраженностью активации аутофагии и эндоцитоза и компенсаторными возможностями различных отделов миокарда левого желудочка сердца.

Степень достоверности. Использованные в работе методические приемы и способы статистической обработки соответствуют поставленным цели и задачам, что позволило получить репрезентативные результаты. Диссертация выполнена на достаточном по объему клинико-морфологическом материале с использованием сертифицированного оборудования, современных высокоинформативных методов морфологического исследования (световая и

поляризационная микроскопия, иммуногистохимическое и электронно-микроскопическое исследование, морфометрия) и системного анализа полученных результатов.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на: 11-й Российской (итоговой) научно-практической конкурс-конференции с международным участием студентов и молодых ученых «Авиценна-2020» (Новосибирск, 2020), научно-практической конференции «Судебная медицина: вопросы, проблемы, экспертная практика» (Новосибирск, 2020), 8-й Международной научно-практической конференции по клинической лимфологии «Лимфа-2020» (Казань, 2020), 2-й Международной научно-практической конференции «Бородинские чтения» (Новосибирск, 2020), 5-й Международной морфологической научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых «Морфологические науки – фундаментальная основа медицины» (Новосибирск, 2020), 12-й Российской (итоговой) научно-практической конкурс-конференции с международным участием студентов и молодых ученых «Авиценна-2021» (Новосибирск, 2021), научно-практической конференции межрегиональной общественной организации (ассоциации) «Судебные медики Сибири» (Горно-Алтайск, 2021).

Диссертационная работа апробирована на заседании проблемной комиссии «Морфологические основы компенсаторно-приспособительных реакций» Новосибирского государственного медицинского университета (Новосибирск, 2021).

Диссертация выполнена в соответствии с утвержденным направлением научно-исследовательской работы Новосибирского государственного медицинского университета по теме «Изучение закономерностей развития нормальных и патологических процессов в организме при действии факторов экзо- и эндогенной природы: межклеточные и межсистемные взаимодействия при остром и хроническом воспалении, репаративной регенерации, онкогенезе, фиброзировании, дисплазии соединительной ткани; возможности диагностики, профилактики, лечения», номер государственной регистрации 121061500014-3.

Внедрение результатов исследования в практику. Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры патологической анатомии, кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии им. проф. М. Я. Субботина, кафедры судебной медицины Новосибирского государственного медицинского университета, кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии, судебной медицины с курсом медицинского права Омского государственного медицинского университета, а также в экспертную практику судебно-гистологических отделений Новосибирского областного клинического бюро судебно-медицинской экспертизы (г. Новосибирск) и Бюро судебно-медицинской экспертизы (г. Омск).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе 4 статьи в журналах и изданиях, включённых в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, из них 1 статья в журнале, входящем в международную реферативную базу данных и систем цитирования (Scopus, Web of Science).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 146 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов полученных данных и их обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, списка иллюстративного материала. Список литературы представлен 303 источниками, из которых 201 – в зарубежных изданиях. Полученные результаты иллюстрированы 5 таблицами и 47 рисунками.

Личный вклад автора. Диссертационное исследование, статистическая обработка полученных результатов выполнены лично автором. Автор приносит благодарность заведующему лабораторией ультраструктурных исследований НИИКЭЛ – филиала ИЦиГ СО РАН доктору биологических наук, профессору Н. П. Бгатовой за бесценный опыт совместной работы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При выполнении исследования на первом этапе проводился анализ данных 94 заключений эксперта и медицинских карт стационарных больных, находившихся на лечении в Новосибирском областном ожоговом центре ГБУЗ НСО «Новосибирская областная клиническая больница» с заключительным клиническим диагнозом «Ожоговая болезнь, стадия септикотоксемия», за 5-летний период, с 2016 по 2020 год.

На втором этапе для морфологических исследований была сформирована основная группа, которую составили 32 трупа мужского и женского пола в возрасте от 18 до 74 лет, в среднем $(47,0 \pm 17,4)$ года. Материалом послужили фрагменты миокарда из области передней, задней и боковой стенок левого желудочка сердца при проведении ранней аутопсии через 2 часа после констатации биологической смерти, выполненной в танатологическом отделе ГБУЗ НСО «Новосибирское областное клиническое бюро судебно-медицинской экспертизы». Критерии включения в исследуемую группу: умершие от ожоговой болезни в период септикотоксемии с установленным судебно-медицинским диагнозом; причиной термических ожогов был контакт с пламенем, с горячими жидкостями, паром или с горячими предметами. Критерии исключения: дети (до 18 лет), старческий возраст (75–90 лет); электротравма с ожогами; наличие сопутствующих заболеваний органов кровообращения в стадии декомпенсации. Группу контроля составили 12 случаев скоропостижно умерших мужчин от «внезапной коронарной смерти», их средний возраст составил $(39,0 \pm 4,5)$ года ($p < 0,05$). Образцы миокарда из трех областей левого желудочка были забраны при проведении раннего секционного исследования через 2 часа после констатации биологической смерти. Критерии включения в контрольную группу: лица в возрасте 35–45 лет; доставлены машиной «Скорая помощь»; на аутопсии выявлены начальные поражения коронарных артерий атеросклерозом в стадии липоидоза и липосклероза; установлен судебно-медицинский диагноз

«внезапная коронарная смерть». Критерии исключения: наличие значимого стеноза венечных артерий и атеросклеротического кардиосклероза.

Для выполнения трансмиссионного электронно-микроскопического исследования из основной группы были взяты 5 случаев погибших в период ожоговой септикотоксемии, 3 случая из контрольной группы.

При проведении работы с трупным материалом соблюдались требования и условия в соответствии с законодательством РФ и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации. Исследование одобрено комитетом по этике Новосибирского государственного медицинского университета (протокол № 138 от 21.10.2021).

Для световой и поляризационной микроскопии фрагменты фиксировали в 10 % забуференном формалине, после чего проводили стандартную проводку материала в гистопроцессоре с последующим заключением в парафин. На ротационном микротоме изготавливали срезы толщиной около 5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. При помощи компьютерной программы Leica QWin («Leica», Германия) на световом уровне оценивали патоморфологические изменения в сердечной мышце при увеличении микроскопа $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$. Для определения некробиотических и дегенеративно-дистрофических изменений была выполнена микроскопия в поляризованном свете на микроскопе Leica DM 4000B («Leica», Германия), который был оснащен анализатором и поляризатором.

Для ИГХ-исследования парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм депарафинировали в сменах ксилола и этилового спирта, производили демаскировку антигенов тканей в цитратном буфере. ИГХ-окрашивание выполняли согласно рекомендациям, изложенным в руководствах по иммуногистохимическим исследованиям, и инструкциям фирм-производителей. Использовали антитела: Monoclonal Mouse Antibody CD31 Endothelial Cell (клон JC70, Cell Marque, США), Monoclonal Mouse Antibody CD34 Endothelial Cell (клон QBEnd/10, Cell Marque, США), Monoclonal Mouse Anti-CD45 (клон 2B11&PD7/26, Cell Marque, США). Экспрессию CD31 и

CD34 оценивали количественно путем подсчета объемной плотности позитивных клеток сосудов при увеличении $\times 400$ с использованием открытой тестовой системы в 15 полях зрения каждого препарата. Морфометрическая оценка проводилась с помощью компьютерной программы Image J (Wayne Rasband, США). Оценка интенсивности результата экспрессии CD45 проводилась качественным способом на всём протяжении исследуемых срезов.

Для проведения трансмиссионной электронной микроскопии биологический материал фиксировали в растворе параформальдегида, приготовленном на среде Хенкса, дофиксировали в растворе осмия тетраоксида на фосфатном буфере, дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон. Полутонкие срезы толщиной 1 мкм окрашивали толуидиновым синим, после чего проводили выборку определенных участков миокарда с капиллярами. Ультратонкие срезы толщиной 70–100 нм контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца. Цифровые микрофотографии фрагментов цитоплазмы эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда при увеличении $\times 30\,000$ морфометрировали с помощью компьютерной программы Image J, определяя объемные плотности (V_v) люминальных кавеол, аблюминальных кавеол, транспортных везикул, мультивезикулярных телец, митохондрий, цистерн гранулярной эндоплазматической сети, аутофагосом, аутолизосом, липидов при использовании открытой тестовой системы с шагом 60 нм. Суммарную объёмную плотность везикулярных структур получали, складывая объемные плотности люминальных, аблюминальных кавеол и транспортных везикул.

Статистическая обработка проведена с использованием лицензированного пакета программ Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, США) и STATISTICA v. 6 (StatSoft Inc., США). При оценке клинко-функциональных и лабораторных данных проведен расчет верхней и нижней границы 95 % доверительных интервалов для эмпирических средних значений исследуемых показателей с использованием распределения

Стьюдента. Проведена интервальная оценка значимости различий эмпирических средних значений с референсными значениями. Результаты в таблицах и диаграммах для количественных величин иммуногистохимических и ультраструктурных показателей представлены в виде средней величины (М) и стандартного отклонения (SD), для качественных величин – значения и проценты. Показатели исследования проверялись на нормальность распределения с помощью критерия Колмогорова – Смирнова. Межгрупповые различия оценивали, используя U-критерий Манна – Уитни, при уровне достоверной вероятности 95 % ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка клинико-функциональных и лабораторных данных при ожоговой септикотоксемии. При анализе медицинских документов осуществляли оценку клинико-функциональных проявлений и лабораторных данных, возникающих при ожоговой септикотоксемии, в период, предшествующий терминальному состоянию. Было выявлено, что у пострадавших с ожоговой болезнью в стадии ожоговой септикотоксемии прослеживалось статистически значимое снижение АДср на 21,98 % относительно нормальных референсных значений (Таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика клинико-функциональных и лабораторных показателей у больных с ожоговой септикотоксемией

Показатель	Нормальные значения показателей	Показатели при ожоговой септикотоксемии
АДср., мм рт. ст.	70–110	70,22 [95 % ДИ: 66,93–73,51]*
СРБ, мг/л	0–6	301,41 [95 % ДИ: 278,54–324,28]*
Лимфоциты, $\times 10^9$ /л	1,5–3,5	1,49 [95 % ДИ: 1,32–1,66]*
ЛИИ, усл. ед.	0,4–1,6	6,77 [95 % ДИ: 5,83–7,71]*
ЛИ, усл. ед.	0,38–0,44	0,11 [95 % ДИ: 0,095–0,13]
Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении с нормальными значениями.		

У каждого четвертого пациента в последние сутки пребывания в стационаре до наступления смерти наблюдалась артериальная гипотония, имеющая стойкий некупируемый сепсис-индуцированный характер, при котором АДср было < 60 мм рт.ст., несмотря на использование вазопрессорных препаратов. У больных с ожоговой септикотоксемией наблюдали статистически значимый рост количества С-реактивного белка в 100,47 раза относительно нормального референсного интервала. Абсолютное количество лимфоцитов у больных с ожоговой септикотоксемией было меньше на 40,4 %, чем нормальные референсные значения. По мере развития ожоговой септикотоксемии имела место незначительная тенденция к повышению ЛИИ до терминального периода. При этом средний показатель ЛИИ у ожоговых больных с септикотоксемией статистически возрастал в 6,77 раза относительно нормальных референсных значений. При анализе значений ЛИ было установлено его постепенное уменьшение при развитии ожоговой септикотоксемии на 73,17 % в сравнении с нормальными референсными значениями.

Оценка патоморфологических и иммуногистохимических изменений миокарда при ожоговой септикотоксемии. При исследовании срезов миокарда основной группы с использованием световой микроскопии были отмечены острые расстройства кровообращения в виде паретически расширенных, полнокровных вен, спазмированных артерий с вертикальным вытягиванием эндотелиоцитов в просвет, стазов эритроцитов, местами с явлением сладж-феномена. Эндотелиальные клетки кровеносных капилляров были резко набухшими, с признаками пролиферации. Наблюдали диапедезные и очаговые кровоизлияния, образование которых было связано с нарушением проницаемости сосудистой стенки. В просвете сосудов были обнаружены лейкостазы, местами краевое стояние лейкоцитов и их миграция в окружающую ткань. При ожоговой септикотоксемии просматривалась фрагментация кардиомиоцитов, волнообразная деформация некоторых мышечных волокон, цитоплазма отдельных кардиомиоцитов, преимущественно

в субэндокардиальных отделах миокарда, была неравномерной бледно-эозинофильной окраски.

При поляризационной микроскопии было обнаружено в сердечной мышце умерших в период ожоговой септикотоксемии сегментарные контрактуры I, II и III степени, чаще всего не более 2-3 контрактур в одном поле зрения. Преимущественно в субэндокардиальных слоях миокарда левого желудочка в отдельных мышечных волокнах просматривались единичные кардиомициты или небольшие группы клеток с первичным глыбчатым распадом и с признаками миоцитолизиса.

На фоне периваскулярного и стромального отека в большинстве исследуемых случаев ожоговой септикотоксемии наблюдали вокруг сосудов и между мышечными волокнами небольшие скопления лимфоцитов, макрофагов, нейтрофильных лейкоцитов, тучных клеток. ИГХ-окрашивание срезов миокарда основной группы показало повышение количества позитивно окрашенных клеток лимфоидного и миелоидного рядов с помощью белка CD45 в просветах кровеносных сосудов, в том числе в сосудах микроциркуляторного русла, по сравнению с контрольной группой. Кроме того, экспрессия общим лейкоцитарным антигеном была визуализирована в межмышечных пространствах и периваскулярно, что свидетельствовало о развитии межучточного миокардита. Показатель объемной плотности сосудов при оценке экспрессии CD31 у умерших от ожоговой септикотоксемии был достоверно ниже относительно площади сосудов контрольной группы на 23,9 % (Таблица 2).

Таблица 2 – ИГХ исследование объемной плотности (V_v , %) сосудов миокарда при экспрессии CD31 и CD34 в основной и контрольной группах ($M \pm SD$)

Параметры исследования	Контрольная группа	Основная группа
CD31	$3,73 \pm 1,38$	$(2,61 \pm 1,13)^*$
CD34	$10,27 \pm 2,39$	$(8,2 \pm 2,75)^*$
Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой.		

По результатам морфометрического исследования наблюдалось статистически значимое снижение объемной плотности CD34-позитивных клеток сосудов основной группы на 20,1 % по сравнению с объемной плотностью вышеуказанного показателя контрольной группы (см. Таблицу 2).

Ультраструктурная организация эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда при ожоговой септикотоксемии. В структуре кровеносных капилляров ЛЖ больных с ожоговой септикотоксемией отмечали наличие эндотелиоцитов с признаками отека цитоплазмы. Такие капилляры локализовались преимущественно в участках передней и задней стенок ЛЖ и в меньшей степени – боковой стенки. В результате развития ожоговой септикотоксемии в эндотелиоцитах капилляров миокарда боковой стенки ЛЖ сердца происходило увеличение объемной плотности люминальных кавеол на 40 % по сравнению с контрольной группой, в передней стенке уменьшение на 47 %, в задней стенке ЛЖ показатель был сопоставим с контролем (Таблица 3). Объемная плотность аблюминальных кавеол в эндотелиоцитах кровеносных капилляров миокарда передней стенки ЛЖ основной группы была больше на 81 %, чем объемная плотность аблюминальных кавеол в контрольной группе, в задней стенке – на 49 %, в боковой – на 34 %. Объемная плотность свободных транспортных везикул при ожоговой септикотоксемии в передней стенке была ниже на 59 %, в боковой – на 56 %, в задней – на 48 % относительно контрольной группы. При ожоговой септикотоксемии в эндотелиоцитах кровеносных капилляров миокарда задней стенки ЛЖ сердца наблюдалось увеличение объемной плотности МВТ в 7,5 раза по сравнению с объемной плотностью вышеуказанного показателя контрольной группы, в передней стенке – в 5,42 раза, в боковой – в 2,64 раза больше. Суммарная объёмная плотность везикулярных структур в эндотелиоцитах кровеносных капилляров миокарда передней стенки ЛЖ сердца ожоговых больных была меньше на 71 %, чем в эндотелиальных клетках контрольной группы, в задней стенке – на 42 %, в боковой – на 31 % (см. Таблицу 3).

Таблица 3 – Объемная плотность (V_v , %) органелл эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда в контрольной группе и при ожоговой септикотоксемии ($M \pm SD$)

Исследуемые органеллы	Контрольная группа	Ожоговая септикотоксемия		
		Передняя стенка ЛЖ	Боковая стенка ЛЖ	Задняя стенка ЛЖ
Люминальные кавеолы	$3,46 \pm 1,18$	$1,84 \pm 0,92$	$5,81 \pm 1,55$	$3,35 \pm 1,22$
Аблюминальные кавеолы	$10,88 \pm 2,79$	$(2,06 \pm 1,36)^*$	$(7,15 \pm 1,31)^*$	$(5,59 \pm 1,99)^*$
Транспортные везикулы	$12,18 \pm 2,74$	$(3,83 \pm 1,43)^*$	$(5,42 \pm 2,48)^*$	$(6,33 \pm 1,92)^*$
МВТ	$0,85 \pm 0,09$	$(4,61 \pm 2,33)^*$	$(2,24 \pm 1,05)^*$	$(6,38 \pm 1,19)^*$
Везикулярные структуры	$26,52 \pm 2,24$	$(7,73 \pm 1,25)^*$	$(18,38 \pm 1,78)^*$	$(15,27 \pm 1,71)^*$
Митохондрии	$5,75 \pm 1,75$	$9,55 \pm 4,71$	$6,24 \pm 2,68$	$5,76 \pm 2,05$
ГЭР	$6,11 \pm 1,48$	$5,77 \pm 1,09$	$5,15 \pm 1,71$	$5,72 \pm 1,93$
Аутолизосомы	$2,56 \pm 1,08$	$(5,18 \pm 2,37)^*$	$(3,61 \pm 0,83)^*$	$3,22 \pm 1,16$
Аутофагосомы	$0,82 \pm 0,35$	$(5,36 \pm 0,28)^*$	$(11,0 \pm 1,41)^*$	$(6,18 \pm 0,94)^*$
Липиды	$0,06 \pm 0,03$	$(1,49 \pm 0,63)^*$	$(3,43 \pm 0,75)^*$	$(2,36 \pm 0,58)^*$
Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой.				

Выявленное снижение объемной плотности люминальных и аблюминальных кавеол может свидетельствовать о повышении проницаемости эндотелиальных клеток кровеносных капилляров миокарда больных с ожоговой септикотоксемией. В совокупности со снижением объемной плотности транспортных везикул в трех отделах ЛЖ, можно предположить, что данные различия закономерно обусловлены снижением транспортной функции эндотелия кровеносных сосудов. Объемная плотность митохондрий в эндотелиоцитах капилляров миокарда передней стенки ЛЖ умерших от ожоговой септикотоксемии была на 66 % больше по сравнению с контрольной группой, в боковой – на 9 %, в задней стенке примерно равна объемной плотности вышеуказанного показателя контрольной группы. Объемная плотность ГЭР в эндотелиальных клетках кровеносных капилляров миокарда боковой стенки ЛЖ у ожоговых больных была на 19 % меньше, чем в

эндотелиоцитах контрольной группы; в задней стенке данный показатель уменьшался на 7 %, в передней – на 6 % (см. Таблицу 3). Показатели объемной плотности митохондрий и ГЭР достоверно не отличались от величин в контроле, что было связано с их набуханием. Объемная плотность аутолизосом в эндотелиоцитах капилляров миокарда передней стенки ЛЖ при ожоговой септикотоксемии была в 2,02 раза больше по сравнению с контрольной группой, в боковой стенке этот показатель увеличивался в 1,47 раза, в задней – в 1,26 раза, в среднем – в 1,56 раза. В аутолизосомах можно было идентифицировать частично деградированный материал липидов. Показатель объемной плотности аутофагосом больных с ожоговой септикотоксемией значительно превышал объемную плотность аутофагосом контрольной группы в боковой стенке ЛЖ в 13,41 раза, в задней стенке – в 7,54 раза, в передней стенке – в 6,54 раза, в среднем – в 9,16 раза. Аутофагосомы содержали фрагменты цитоплазмы, митохондрии, везикулы и липиды. В результате развития ожоговой септикотоксемии в эндотелиоцитах капилляров миокарда ЛЖ сердца происходило увеличение объемной плотности липидов по сравнению с контрольной группой в боковой, задней и передней стенках в 57,17 раза, в 39,33 и в 24,83 раза соответственно (см. Таблицу 3).

ВЫВОДЫ

1. Патоморфологические изменения миокарда при ожоговой септикотоксемии с летальным исходом характеризуются острыми расстройствами кровообращения, пролиферацией эндотелия кровеносных капилляров, острыми очаговыми повреждениями миокарда, увеличением экспрессии общего лейкоцитарного антигена (CD45), которые развиваются на фоне выраженного повышения показателя лейкоцитарного индекса интоксикации и С-реактивного белка, а также снижения лимфоцитарного индекса, абсолютной лимфопении и стойкой артериальной гипотензии при коррекции вазопрессорными препаратами.

2. Особенности экспрессии CD31 и CD34 эндотелиоцитами кровеносных сосудов миокарда при летальной ожоговой септикотоксемии

характеризуются статистически значимым снижением уровня белков-маркеров, что свидетельствует о нарушении барьерной функции эндотелия и истощении пула его регенерации.

3. Выявлен комплекс ультраструктурных изменений эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда левого желудочка при ожоговой септикотоксемии, который свидетельствует о нарушении структуры клетки в виде внутриклеточного отека и деструкции мембранных органелл, редукции везикулярного трансэндотелиального транспорта и активации аутофагии.

4. При сравнительном электронно-микроскопическом исследовании кровеносных капилляров отмечены более выраженные ультраструктурные изменения эндотелиоцитов кровеносных капилляров из участков передней и боковой стенок левого желудочка сердца, в меньшей степени изменения ультраструктуры были выявлены в эндотелиоцитах задней стенки левого желудочка, что может быть связано с гетерогенностью альтерации эндотелия и выраженностью компенсаторных возможностей различных отделов миокарда.

5. Активацию аутофагии с увеличением объемной плотности аутофагосом в среднем в 9,16 раза, аутолизосом – в 1,56 раза с усилением эндоцитоза, следует рассматривать как закономерно развивающуюся компенсаторную реакцию, направленную на сохранение клеточного пула эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда в ответ на альтеративное воздействие в результате ожоговой септикотоксемии, что служит обоснованием развития сердечной недостаточности, являющейся следствием прогрессирующих микроциркуляторных расстройств и эндотелиальной дисфункции.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные результаты микроскопического и иммуногистохимического исследования могут применяться в практической работе в судебно-гистологических лабораториях территориальных бюро судебно-медицинской экспертизы, используя световую и поляризационную микроскопии, а также молекулярных маркеров (CD31, CD34, CD45) для

выявления патоморфологических изменений миокарда и повреждений эндотелия кровеносных капилляров мышцы сердца в случаях ожоговой септикотоксемии.

2. Полученные данные о структурных изменениях эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда являются морфологическим обоснованием прогрессирующих микроциркуляторных расстройств и развития сердечной недостаточности при ожоговой септикотоксемии и могут быть положены в основу методических подходов к изучению механизмов развития сердечной недостаточности различного генеза.

3. Полученные новые знания об особенностях ультраструктуры эндотелия и активации аутофагии в эндотелиоцитах кровеносных капилляров миокарда могут быть использованы в учебном процессе кафедр патологической анатомии, судебной медицины, гистологии, эмбриологии и цитологии медицинских вузов России, а также при подготовке клинических ординаторов по специальностям «Патологическая анатомия» и «Судебно-медицинская экспертиза».

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Клинико-морфологический анализ сократительной способности миокарда левого желудочка при ожоговой септикотоксемии / С. В. Савченко, В. П. Новоселов, **А. С. Гребенщикова**, Е. В. Кузнецов // **Вестник судебной медицины.** – 2020. – Т. 9, № 3. – С. 4–7.

2. Патоморфология миокарда и ультраструктура эндотелиоцитов кровеносных капилляров мышцы сердца при ожоговой септикотоксемии / С. В. Савченко, **А. С. Гребенщикова**, Н. П. Бгатова [и др.] // **Современные проблемы науки и образования.** – 2021. – № 1. – С. 75–83.

3. Ультраструктура в эндотелиальных клетках кровеносных капилляров миокарда при ожоговой септикотоксемии / Ю. С. Таскаева, Н. П. Бгатова, С. В. Савченко [и др., в том числе **А. С. Гребенщикова**] // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2021. – Т. 171, № 3. – С. 379–385.

4. Особенности аутофагии в цитоплазме эндотелиоцитов кровеносных капилляров при тяжелой ожоговой септикотоксемии / С. В. Савченко, **А. С. Гребенщикова**, Н. П. Бгатова [и др.] // **Сибирский научный медицинский журнал**. – 2021. – Т. 41, № 3. – С. 64–70.

5. Ультраструктура эндотелия микрососудов миокарда при септикотоксемии / **А. С. Гребенщикова**, Ю. С. Таскаева, Н. Г. Ощепкова, Е. В. Кузнецов // Авиценна-2020 : материалы 11-й Российской (итоговой) научно-практической конкурс-конференции с международным участием студентов и молодых ученых. – Новосибирск, 2020. – Т. 2. – С. 318–319.

6. Клинико-анатомическая оценка дисфункции мышцы сердца при ожоговой септикотоксемии / С. В. Савченко, В. П. Новоселов, **А. С. Гребенщикова**, Е. В. Кузнецов // Судебная медицина: вопросы, проблемы, экспертная практика : материалы научно-практической конференции. – Новосибирск, 2020. – Т. 7, № 27. – С. 112–116.

7. Иммуногистохимическая оценка клеточных белков эндотелиоцитов лимфатических и кровеносных микрососудов при ожоговой болезни / С. В. Савченко, В. П. Новоселов, Н. Г. Ощепкова [и др., в том числе **А. С. Гребенщикова**] // Лимфа-2020 : тезисы к 8-й Международной научно-практической конференции по клинической лимфологии. – Казань, 2020. – С. 80–81.

8. Иммуногистохимическая оценка морфологии эндотелиоцитов лимфатических и кровеносных микрососудов при ожоговой септикотоксемии / С. В. Савченко, **А. С. Гребенщикова**, Ю. С. Таскаева [и др.] // Бородинские чтения : материалы 2-й Международной научно-практической конференции. – Новосибирск, 2020. – Т. 2. – С. 146–154.

9. **Гребенщикова, А. С.** Ультраструктура эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда при ожоговой септикотоксемии / **А. С. Гребенщикова** // Морфологические науки – фундаментальная основа медицины : материалы 5-й Международной морфологической научно-

практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых. – Новосибирск, 2020. – С. 65–67.

10. **Гребенщикова, А. С.** Клинико-морфологический анализ изменений мышцы сердца при ожоговой септикотоксемии / **А. С. Гребенщикова**, Е. Е. Кондратьева // Авиценна-2021 : материалы 12-й Российской (итоговой) научно-практической конкурс-конференции с международным участием студентов и молодых ученых. – Новосибирск, 2021. – Т. 2. – С. 239–240.

11. **Гребенщикова, А. С.** Ультраструктурная оценка транспортных функций эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда при ожоговой септикотоксемии / **А. С. Гребенщикова**, А. А. Барчук // Авиценна-2021 : материалы 12-й Российской (итоговой) научно-практической конкурс-конференции с международным участием студентов и молодых ученых. – Новосибирск, 2021. – Т. 2. – С. 241–242.

12. **Гребенщикова, А. С.** Клинико-функциональная и иммуногистохимическая оценка миокарда при ожоговой септикотоксемии / **А. С. Гребенщикова** // Актуальные вопросы современной медицинской науки и практики : сборник научно-практических работ с международным участием. – Новосибирск, 2021. – С. 39–43.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДср	– среднее артериальное давление
ГЭР	– гранулярный эндоплазматический ретикулум
ИГХ	– иммуногистохимия
ЛЖ	– левый желудочек
ЛИ	– лимфоцитарный индекс
ЛИИ	– лейкоцитарный индекс интоксикации
МВТ	– мультивезикулярные тельца
СРБ	– С-реактивный белок