

Ощепкова Наталья Гавриловна

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОКРАТИТЕЛЬНОГО АППАРАТА
МИОКАРДА ПРИ ОЖГОВОМ ШОКЕ**

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 медицинских наук,

Волков Александр Михайлович

(Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е. Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория экспериментальной хирургии и морфологии института экспериментальной биологии и медицины, ведущий научный сотрудник, г. Новосибирск)

доктор биологических наук,

Колдышева Елена Владимировна

(Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Институт молекулярной патологии и патоморфологии, лаборатория молекулярных механизмов патологических процессов, главный научный сотрудник-руководитель лаборатории, г. Новосибирск)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Барнаул)

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/515>)

Автореферат разослан «_____» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

С. В. Залавина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Термическая ожоговая травма на современном этапе является важной медицинской проблемой, что связано с высокой летальностью пострадавших (Алексеев С. А., 2014; Fomukong N. H. et al., 2019; Forbinake N. A. et al., 2020).

По данным Всемирной организации здравоохранения, термические ожоговые поражения занимают третье место среди всех видов повреждений, а в ряде стран, таких как Япония – второе место, уступая лишь транспортной травме (Belba M. et al., 2000; Владимиров И. В. и др., 2014).

Развивающийся при тяжелой термической травме ожоговый шок относят к одному из самых тяжелых видов шока, он развивается в первые часы, сразу после получения термической травмы (Jeschke M. G. et al., 2020; Саматов И. Ю., 2021). Ожоговый шок, наряду с септикотоксемией, является ведущей причиной смерти при тяжелой термической травме, летальность при нем может достигать 28 % (Bloemsma G. C. et al., 2008; Dokter J. et al., 2015; Щепин В. О., Шишкин Е. В., 2019).

Несмотря на определенные успехи в эффективном лечении ожогового шока, достигнутые при использовании методов интенсивной терапии и реанимации у ожоговых больных, включая PiCCO-мониторинг, по-прежнему остаются определенные трудности, связанные с быстро развивающимся критическим состоянием и летальным исходом (Mashreky S. R. et al., 2003; Hussain A., Dunn K., 2015). Большую часть летальных случаев составляют лица с ожогами, захватывающими 40–50 % и более поверхности тела (Panjeshahin M. R. et al., 2001; GÜldoğan C. E. et al., 2018).

Развивающаяся при ожоговом шоке выраженная болевая импульсация из области ожоговых ран, сопровождающаяся гиперкатехоламинемией, гиповолемией за счет плазмопотери с выраженным сгущением крови, сильнейшая интоксикация и микроциркуляторные расстройства приводят к снижению сократительной способности миокарда и летальному исходу (Цой Т. И., 2012; Гольдзон М. А. и др., 2012). Танатогенез при развитии тяжелого ожогового шока представлен развитием левожелудочкового варианта

сердечного типа терминального состояния как причина летального исхода (Тимофеев И. В., 1999; Саматов И. В., 2021).

Важным для снижения летальности при ожоговом шоке является получение новых данных об особенностях механизмов развития острой сократительной недостаточности миокарда. Это может быть информативным при разработке кардиопротекции для снижения летальности при ожоговом шоке.

Степень разработанности темы исследования. На современном этапе большая часть материалов научных исследований, касающихся изменений структуры кардиомиоцитов при ожоговом шоке, является немногочисленной и получена, преимущественно, в эксперименте (Abu-Sittah G. S. et al., 2012; Rong X. et al., 2012; Porter C. et al., 2014; Chao T. et al., 2019; Wen J. J et al., 2020). Это указывает на очевидную недостаточность данных для понимания фундаментальных механизмов снижения сократительной способности миокарда, приводящей к летальному исходу у ожоговых больных, что определило цель и задачи исследования.

Цель исследования. Изучить структурные основы снижения сократительной способности миокарда при ожоговом шоке на тканевом, ультраструктурном и молекулярном уровнях.

Задачи исследования

1. Изучить патоморфологические изменения миокарда и особенности экспрессии актина и десмина кардиомиоцитами, сопровождающиеся снижением его сократительной способности при ожоговом шоке.

2. Изучить характер изменений ультраструктуры кардиомиоцитов при ожоговом шоке.

3. Исследовать особенности ультраструктурных изменений субпопуляций митохондрий кардиомиоцитов при ожоговом шоке.

4. Выявить особенности экспрессии ассоциации микроРНК (miR-200с, miR-200b, miR-155 и miR-378a) в миокарде и плазме крови при ожоговом шоке.

Научная новизна. Впервые показано, что при ожоговом шоке снижение сократительной способности миокарда левого желудочка связано с

образованием острых очаговых повреждений миокарда и снижением экспрессии актина и десмина кардиомиоцитами.

Впервые продемонстрировано, что развитие ожогового шока сопровождается структурной реорганизацией кардиомиоцитов, обусловленной их деструкцией и отеком, а также активацией лизосом и изменением форм и структуры субпопуляций митохондрий. Впервые определено, что при ожоговом шоке отмечаются более выраженные ультраструктурные изменения перинуклеарной субпопуляции митохондрий.

Впервые установлено, что при ожоговом шоке возрастают показатели значений экспрессии miR-200c, miR-200b, miR-155 и miR-378a в мышце сердца и плазме крови, что связано с изменением синтеза белков на посттранскрипционном уровне.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты проведенного исследования расширяют современные представления об особенностях патогенеза, танатогенеза и морфологии миокарда у больных с ожоговой болезнью в стадии шока. Полученные данные об ультраструктурных изменениях кардиомиоцитов и характере ультраструктурных изменений основных субпопуляций митохондрий кардиомиоцитов могут быть полезны для понимания особенностей патогенеза ожоговой болезни в стадии ожогового шока, а также для разработки принципов кардиопротекции в лечении шока. У больных с ожоговым шоком выявленные особенности экспрессии ассоциации молекулярных маркеров плазмы крови могут быть использованы как дополнительные критерии для оценки тяжести шока, что может быть учтено при определении тактики лечения с использованием кардиопротекции у ожоговых больных.

Методология и методы исследования. В основу методологии диссертационной работы положены современные принципы системного анализа комплекса данных, включавших сведения медицинских карт стационарных больных, результаты световой, поляризационной микроскопии и оценки экспрессии микроРНК миокарда, а также иммуногистохимического и ультраструктурного исследования кардиомиоцитов, полученных при аутопсии умерших от ожогового шока. Полученные результаты исследования были

проанализированы и обработаны корректными статистическими методами. Дизайн работы согласуется с принципами проведения современных научных исследований с полным соблюдением правил биоэтики.

Основные положения, выносимые на защиту

1. При ожоговом шоке снижение сократительной способности миокарда обусловлено острыми очаговыми повреждениями миокарда и снижением экспрессии белков-маркеров кардиомиоцитами – актина и десмина.

2. Структурная реорганизация кардиомиоцитов при ожоговом шоке характеризуется уменьшением объемной плотности и деструкцией миофибрилл, повышением объемной плотности лизосом, развитием отека клеток с увеличением межфибриллярных пространств и объемной плотности цитоплазмы, деструктивными изменениями перинуклеарных митохондрий относительно субсарколеммальных и интермиофибриллярных субпопуляций органелл, что лежит в основе снижения сократительной способности миокарда.

3. Изменения миокарда у больных с ожоговым шоком, связанные со снижением сократительной способности, сопровождаются статистически значимым увеличением содержания микроРНК miR-200c, miR-200b, miR-155 и miR-378a в ткани миокарда и плазме крови.

Степень достоверности и обоснованности результатов. Все использованные методические приемы и способы статистической обработки соответствуют поставленным цели и задачам, позволяют получить достоверные и доступные анализу результаты. Диссертация выполнена на достаточном клинико-морфологическом материале с использованием сертифицированного оборудования, современных высокоинформативных методов морфологического исследования (световая и поляризационная микроскопия, морфометрия, иммуногистохимическое, молекулярно-биологическое и электронно-микроскопическое исследования) с последующим проведением анализа полученных данных.

Апробация результатов диссертации. Основные положения диссертации доложены на научно-практических конференциях «Судебная медицина: вопросы, проблемы, экспертная практика» (Абакан, 2017; Омск, 2019; Новосибирск, 2020), на научно-практической конференции «Судебная

медицина: вопросы, проблемы, экспертная практика», посвященной 25-летию межрегионального общественного объединения (ассоциации) «Судебные медики Сибири» (Новосибирск, 2018), на научно-практической конференции «Судебная медицина: вопросы, проблемы, экспертная практика», посвященной 100-летию судебно-медицинской службы Омской области (Новосибирск, 2019).

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

Диссертационная работа 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», № гос. регистрации 121061500014-3.

Внедрение результатов исследования в практику. Результаты исследования внедрены для практического применения в работу судебно-гистологических отделений КГБУЗ «Алтайское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы» (Барнаул) и ГБУЗ НСО «Новосибирское областное клиническое бюро судебно-медицинской экспертизы» (Новосибирск). Результаты исследования используются в учебном процессе кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (Томск), кафедры судебной медицины им. В. Н. Крюкова и патологической анатомии с курсом ДПО ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России (Барнаул), а также кафедры патологической анатомии, кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии, кафедры судебной медицины и кафедры анестезиологии и реаниматологии ФПК и ППВ

им. И. П. Верещагина ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (Новосибирск).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 17 научных работ, в том числе 5 статей в журналах и изданиях, включённых в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 167 страницах машинописного текста; состоит из введения, 3 глав, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и списка иллюстративного материала. Список литературы представлен 323 источниками, из которых 223 – в зарубежных изданиях. Полученные результаты проиллюстрированы с помощью 13 таблиц и 50 рисунков.

Личное участие автора. Все исследования проводились при непосредственном участии автора: анализ данных литературы по теме диссертационного исследования, сбор материала, морфометрия и анализ статистической обработки материала, подготовка научных докладов и диссертации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общая характеристика наблюдений ожоговых больных с летальным исходом в результате развития шока. Для проведения комплексного морфологического анализа сократительной способности миокарда при ожоговом шоке проведен анализ 62 случаев с ожоговым шоком, из которых 57 (91,9 %) умерших в острый период ожоговой болезни были доставлены из Новосибирского областного ожогового центра ГБУЗ НСО «Государственная Новосибирская областная клиническая больница», смерть 5 (8,1 %) умерших наступила в машине «Скорая помощь». Летальный исход наблюдался в периоды от нескольких часов до 3 суток. В структуре летальных случаев ожогового шока преобладали мужчины – 49 наблюдений (79 %), в 13 случаях (21 %) – женщины. Возраст больных колебался от 18 лет до 85 лет; средний возраст мужчин составил – $(45,2 \pm 13,6)$ года, средний возраст женщин –

($56,6 \pm 22,7$) года; преобладали пострадавшие молодого и среднего возраста – 47 случаев (75,8 %).

На первом этапе был проведен анализ данных 57 медицинских карт стационарных больных с ожоговым шоком. При анализе данных медицинской документации оценивали показатели центральной гемодинамики (сердечного индекса, ударного объема, глобальной фракции изгнания и индекса системного сосудистого сопротивления), полученные при проведении PiCCO-мониторинга.

Световая и поляризационная микроскопия миокарда. Забор образцов миокарда левого желудочка для морфологического исследования производили в процессе выполнения аутопсии в танатологическом отделе ГБУЗ НСО «Новосибирское областное клиническое бюро судебно-медицинской экспертизы». Для морфологического исследования из основной исследуемой группы были выбраны 34 случая умерших от ожогового шока мужчин (27) и женщин (7) в возрасте от 21 до 51 года. Забор образцов миокарда осуществляли при минимальных атеросклеротических изменениях венечных артерий, при котором стенозирование не превышало 20–25 % от просвета сосуда и при отсутствии этанола в крови. Фиксацию, проводку и окрашивание гематоксилином и эозином проводили согласно имеющимся рекомендациям. Исследование микропрепаратов проводили на микроскопе Axio Scope.A1 («Zeiss», Германия), снабженного анализатором и поляризатором, с фотокамерой AxioCam MRc5 («Zeiss», Германия) и программным обеспечением ZEN blue («Zeiss», Германия).

Иммуногистохимическое исследование миокарда. Для иммуногистохимического исследования производили окрашивание срезов миокарда в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя антител и согласно стандартам, изложенным в руководствах по иммуногистохимическим исследованиям (Buchwalow I., Bocker W., 2010; Dabbs D. G., 2010; Петров С. В., Райхлин Н. Т., 2012). Определение объемной плотности миофибрилл при оценке экспрессии актина и десмина проводили методом подсчета числа попаданий точек (пересечений тестовых линий) тестовой решетки на профили исследуемых структур в гистологическом срезе. Каждый параметр просчитывали по 25 изображениям с увеличением 40×10 .

Электронная микроскопия кардиомиоцитов.

Для

электронно-микроскопического анализа ультраструктуры кардиомиоцитов был проведен забор образцов миокарда левого желудочка сердца от 5 ожоговых больных (из основной исследуемой группы), при проведении ранней аутопсии – через 2 часа с момента констатации биологической смерти, среди которых было 3 мужчин и 2 женщины в возрасте 32–44 лет. После забора фиксацию, проводку и окрашивание срезов осуществляли в соответствии с имеющимися рекомендациями (Уикли Б., 1975). Биологический материал изучали в электронном микроскопе JEM 1 400 производства компании JEOL (Япония) в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. При увеличении $\times 8\,000$ получали цифровые микрофотографии фрагментов цитоплазмы кардиомиоцитов. Кардиомиоциты морфометрировали с помощью компьютерной программы Image J (Wayne Rasband, США) при использовании закрытой тестовой системы с 323 точками; определяли объемную плотность крист митохондрий, используя открытую тестовую систему с шагом 0,1 мкм. Электронная микроскопия проводилась на базе центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦИГ СО РАН (Новосибирск) при консультировании заведующим лабораторией ультраструктурных исследований НИИКЭЛ – филиала ИЦИГ СО РАН доктором биологических наук, профессором Н. П. Бгатовой.

Исследование микроРНК в миокарде и плазме крови у лиц, умерших от ожогового шока. Для оценки экспрессии микроРНК в миокарде и плазме крови у 25 ожоговых больных с летальным исходом от шока, выбранных из основной исследуемой группы, во время аутопсии был проведен забор образцов миокарда левого желудочка сердца и образцы крови. Забор материала осуществлялся у лиц обоего пола (18 мужчин и 7 женщин) в сроки, не превышающие 12 часов с момента констатации смерти. Обратную транскрипцию (ОТ) для получения комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (кДНК) по матрице микроРНК, выделенной из исследуемых образцов миокарда и плазмы крови, проводили с использованием stem-loop-праймеров. Использовали набор реагентов, полученный от компании БиоЛабМикс.

Протокол реакции: 50 мин при 42 °С, 10 мин при 70 °С, после чего полученные образцы кДНК хранили при –20 °С. Для определения уровня экспрессии микроРНК проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени с использованием реагентов, полученных от компании БиоЛабМикс, на амплификаторе CFX96. В качестве генов сравнения были использованы малые РНК U44, U48, которые стабильно экспрессируются в тканях. Олигонуклеотидные пробы, которые использовались в работе, приведены в данных таблицы 1.

Таблица 1 – Последовательности праймеров для ПЦР микроРНК

miRNA	Последовательности праймеров	
U ₄₈	Прямой	5'-CCCTGAGTGTGTCGCTGATG-3'
	Обратный	5'- AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGAGACGGTCAG-(BHQ1)-3'
U ₄₄	Прямой	5'-GCCGCTGATATGTTTGATATA-3'
	Обратный	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACAGGAATA-(BHQ1)-3'
miR-155	Прямой	5'-GCCGCTCTGTCCCTCTTG-3'
	Обратный	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACCTAAGGGC-(BHQ1)-3'
miR-200b	Прямой	5'- GCCGCTAGCTTATCAGACT-3'
	Обратный	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACTCAACATC-(BHQ1)-3'
miR-200c	Прямой	5'- GCCGCTCTCACACAGAAATCG- 3'
	Обратный	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Зонд	5'-(R6G)- TTCGCACTGGATACGACACGGGTGC -(BHQ1)-3'
miR-378a	Прямой	5'-GCCGCAACATTCAACGCTGT-3'
	Обратный	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACACTCACCG-(BHQ1)-3'

Протокол реакции ПЦР: предварительный прогрев 2 мин при 50 °С, 2 мин при 94 °С, после этого следовали 50 циклов: денатурация при 95 °С – 15 с, отжиг при 60 °С – 20 с, элонгация и сбор данных по флуоресценции при 72 °С – 30 с. Относительный уровень экспрессии микроРНК оценивали с

использованием значений пороговых циклов C_t по методу $2\Delta C_t$. Молекулярно-биологическое исследование проводилось на базе лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза Федерального исследовательского центра Фундаментальной и трансляционной медицины, при консультировании заведующим лабораторией молекулярных механизмов канцерогенеза доктором биологических наук, профессором Л. Ф. Гуляевой.

Характеристика контрольной группы. Контрольную группу для патоморфологического исследования миокарда и молекулярно-биологического исследования мышцы сердца и плазмы крови составили образцы, полученные от трупов лиц, умерших от внезапной коронарной смерти, что составило 25 случаев (19 мужчин и 6 женщин) в возрасте от 21 до 45 лет, у которых при исследовании сердца не было выявлено выраженных морфологических изменений, атеросклероз венечных артерий был представлен стадиями – липоидоза или липосклероза без значимых стенозирующих изменений, алкогольное опьянение отсутствовало.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных морфометрического исследования проводили с использованием лицензированного пакета программ прикладной статистики Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, США) и STATISTICA v. 6 (StatSoft Inc., США). Результаты для количественных величин представлены в виде средних значений и их ошибок, для качественных величин – значения и проценты. Полученные цифровые данные представлены в виде: $M \pm m$, где M – средняя арифметическая величина, m – средняя ошибка средней величины. Для клинических показателей, характеризующих центральную гемодинамику, провели расчет верхней и нижней границы 95 % доверительных интервалов для эмпирических средних значений исследуемых показателей с использованием распределения Стьюдента. Показатели патоморфологического и молекулярного исследования проверялись на нормальность распределения с помощью критерия Колмогорова – Смирнова. Учитывая, что распределение большинства полученных результатов было отличным от нормального, применяли методы непараметрической статистики. Различия между сравниваемыми показателями

оценивали, используя U-критерий Манна – Уитни, при уровне достоверной вероятности 95 % ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка клинико-функциональных показателей при летальном исходе у больных с ожоговым шоком. При анализе данных 57 медицинских карт стационарных больных с летальным исходом от тяжелого ожогового шока в Новосибирском областном ожоговом центре ГБУЗ НСО «Государственная Новосибирская областная клиническая больница» была проведена оценка функциональных показателей, отражающих сократительную способность миокарда, на основании данных, полученных при использовании PiCCO-мониторинга (Таблица 2).

Таблица 2 – Данные PiCCO-мониторинга показателей гемодинамики при ожоговом шоке

Показатель/ единицы измерения	Нормальное значение	При ожоговом шоке
Сердечный индекс (СИ), (л/мин/м ² /)	3,5–5,0	2,75 [95 % ДИ: 2,43–3,07]*
Индекс ударного объема (ИУО), (мл/м ²)	40–60	33,87 [95 % ДИ: 29,42–38,32]*
Глобальная фракция изгнания (ГФИ), (%)	25–35	18,8 [95 % ДИ: 18,43–19,17]*
Системное сосудистое сопротивление (ИССС), (дин × сек × см ⁻⁵ /м ²)	1 200–2 000	2 924,1 [95 % ДИ: 2 688,1–3160,1]*
Примечание. * – Статистически значимые отличия при ожоговом шоке от нормальных референсных значений при критическом уровне значимости $p < 0,05$.		

Как следует из представленных данных, с учетом референсных значений, развитие ожогового шока сопровождается снижением сердечного индекса на 35,3 %, уменьшением индекса ударного объема левого желудочка на 32,3 %, а также снижением глобальной фракции изгнания на 37,3 % и почти двукратным увеличением индекса системного сосудистого сопротивления.

Таким образом, при образовании глубоких, распространенных термических ожогов, осложнившихся тяжелым ожоговым шоком, развивается снижение сократительной способности миокарда левого желудочка, проявляющееся уменьшением сердечного индекса, индекса ударного объема левого желудочка и глобальной фракции изгнания левого желудочка.

Оценка патоморфологических и иммуногистохимических изменений миокарда при ожоговом шоке. При микроскопическом исследовании срезов миокарда, окрашенных гематоксилином и эозином, во всех случаях смерти от ожогового шока были обнаружены выраженные острые расстройства кровообращения в виде спазма и малокровия артерий, паретического расширения вен, сладжирования эритроцитов, отека стромы миокарда. При оценке состояния миокарда выявляли сочетание фрагментации мышечных волокон и их волнообразной деформации. При микроскопическом исследовании в поляризационном свете были выявлены различной степени контрактурные повреждения отдельных кардиомиоцитов, а также очаги первичного глыбчатого распада мышечных волокон и миоцитолизиса.

При иммуногистохимическом исследовании срезов миокарда отмечали снижение экспрессии актина в 2,4 раза ($p < 0,05$) и снижение экспрессии десмина в 2 раза ($p < 0,05$) в сравнении с группой контроля (Рисунок 1).



Примечание. * – Отличия от соответствующих значений в контроле $p \leq 0,05$.

Рисунок 1 – Сравнительная оценка экспрессии десмина и актина кардиомиоцитами левого желудочка при ожоговом шоке и в группе контроля

Полученные данные свидетельствуют о наличии острой ишемии миокарда, при которой происходит активация протеаз, разрушающих белки цитоскелета.

Оценка изменений ультраструктуры кардиомиоцитов при смерти от ожогового шока. При электронной микроскопии миокарда в результате развития ожогового шока были выявлены изменения ультраструктуры митохондрий кардиомиоцитов в виде набухания отдельных групп органелл, разрушения части крист митохондрий, носящие очаговый характер, не затрагивающие всю органеллу. В кардиомиоцитах наблюдали разволокненные миофибриллы, а также миофибриллы с измененной архитектоникой в виде возрастания размеров межфибриллярных пространств. Отмечали наличие вторичных лизосом, заполненных липофусцином, что может свидетельствовать о процессах очаговой деструкции ультраструктурных компонентов кардиомиоцитов вследствие гипоксического влияния при ожоговом шоке.

При проведении морфометрии при ожоговом шоке в сравнении с группой контроля на 63 % ($p < 0,05$) возрастала объемная плотность цитоплазмы клеток, что можно связать с развивающимся отеком кардиомиоцитов. За счет увеличения объема цитоплазмы снижалась объемная плотность миофибрилл на 36 % ($p < 0,05$) (Таблица 3). Обращало на себя внимание увеличение объемной плотности лизосом в сравнении с контрольной группой на 87 % ($p < 0,05$) (см. Таблицу 3).

Таблица 3 – Сравнительная морфометрия: объемная плотность (V_v) органелл кардиомиоцитов левого желудочка сердца при ожоговом шоке ($M \pm m$)

Группа	Митохондрии V_v	Цитоплазма V_v	Миофибриллы V_v	Лизосомы V_v
Контроль	$36,57 \pm 3,28$	$11,61 \pm 2,47$	$50,77 \pm 2,52$	$0,84 \pm 1,23$
Ожоговый шок	$33,72 \pm 3,77$	$(31,69 \pm 3,48)^*$	$(32,49 \pm 4,16)^*$	$(6,61 \pm 1,78)^*$
Примечания: 1. V_v – Объемная плотность структур (%). 2. * – Отличия от соответствующих значений в контроле $p \leq 0,05$. 3. Материал представлен как среднее (M) и стандартное отклонение (m).				

Анализ изменений морфологии митохондрий при ожоговом шоке. В результате морфометрического исследования всех митохондрий было выявлено, что в условиях ожогового шока они имели более вытянутую форму, о чем свидетельствовала тенденция к возрастанию величины соотношения диаметров митохондрий, при этом величина площади митохондрий имела тенденцию к уменьшению. Так, при ожоговом шоке на 13,5 % увеличилась величина соотношения диаметров митохондрий, а площадь митохондрий снизилась на 23,4 %. Концентрация крист всех митохондрий достоверно снижалась на 16 % ($p < 0,05$).

Согласно данным литературы (Kalkhoran S. B. et al., 2017), митохондрии в кардиомиоцитах подразделяются на три субпопуляции, согласно их локализации: на интермиофибриллярные, субсарколеммальные и перинуклеарные.

При исследовании отдельных субпопуляций митохондрий при ожоговом шоке выявлено, что наиболее мелкими и округлыми были перинуклеарные митохондрии, самыми вытянутыми и большими по площади – интермиофибриллярные митохондрии, средние размеры имели субсарколеммальные митохондрии.

При ожоговом шоке площадь перинуклеарных митохондрий была достоверно меньше на 38 % ($p < 0,05$), чем в контрольной группе, при этом на 17 % ($p < 0,05$) была достоверно снижена концентрация крист этой субпопуляции митохондрий. Субсарколеммальные митохондрии по размерам и форме достоверно не различались при ожоговом шоке, а концентрация крист митохондрий была достоверно меньше на 20 % ($p < 0,05$). Форма интермиофибриллярных митохондрий визуальна была более вытянутой, чем в контроле, площади митохондрий достоверно не различались от сравниваемой группы, при этом концентрация крист митохондрий данной субпопуляции была достоверно снижена на 13 % ($p < 0,05$) (Таблица 4).

Таким образом, можно сделать вывод о том, что обнаруженные изменения свидетельствуют о возрастании процессов внутриклеточной дегенерации в кардиомиоцитах при ожоговом шоке, протекающих на фоне выраженного внутриклеточного отека.

Таблица 4 – Морфологическая характеристика субпопуляций митохондрий различной локализации в кардиомиоците ($M \pm m$)

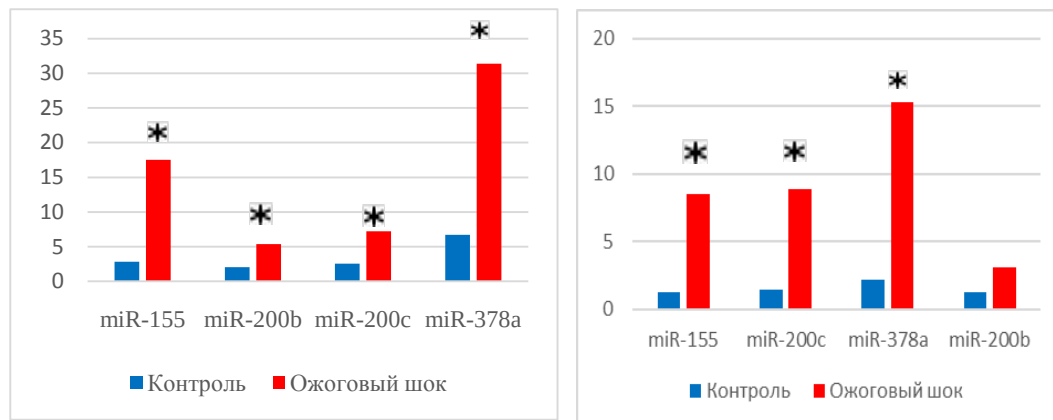
Субпопуляции митохондрий	Группы	Соотношение диаметров митохондрий, ($D1/D2$)	Концентрация крист митохондрий, $V_v \%$	Площадь митохондрий, $\mu\text{км}^2$
Интермиофибриллярные ($n = 30$)	Контроль	$1,98 \pm 0,35$	$63,0 \pm 1,80$	$3,32 \pm 0,77$
	Ожоговый шок	$2,33 \pm 0,67$	$(55,11 \pm 4,01)^*$	$3,20 \pm 1,62$
Субсарколеммальные ($n = 30$)	Контроль	$1,20 \pm 0,21$	$63,5 \pm 2,64$	$2,74 \pm 0,82$
	Ожоговый шок	$1,25 \pm 0,06$	$(50,66 \pm 0,57)^*$	$3,01 \pm 0,34$
Перинуклеарные ($n = 30$)	Контроль	$1,12 \pm 0,15$	$63,0 \pm 1,41$	$2,65 \pm 0,13$
	Ожоговый шок	$1,05 \pm 0,07$	$(52,5 \pm 0,71)^*$	$(1,64 \pm 0,37)^*$
Примечания: 1. V_v – Объемная плотность структур (%); 2. * – Отличие от контроля $p < 0,05$. 3. Материал представлен как среднее (M) и стандартное отклонение (m).				

Оценка экспрессии микроРНК в миокарде и плазме крови при летальных случаях от ожогового шока. На основе анализа литературных данных нами были выбраны две группы микроРНК, экспрессия которых, учитывая патогенетические особенности развития кардиальной дисфункции, могла быть измененной при исследовании образцов миокарда и в плазме крови в первой стадии ожоговой болезни. Первую группу составили микроРНК, ассоциированные с ожоговой болезнью: miR-200c, miR-378a. Вторую группу составили микроРНК, ассоциированные с гипоксией: miR-155, miR-200b.

При исследовании микроРНК в образцах миокарда при ожоговом шоке достоверно увеличивался уровень экспрессии miR-155 в 6,3 раза ($p = 0,034$), miR-200b – в 2,6 раза ($p = 0,046$), miR-200c – в 2,7 раза ($p = 0,049$) и уровень экспрессии miR-378a – в 4,7 раза ($p = 0,015$) по сравнению с группой контроля (Рисунок 2).

При оценке уровня экспрессии микроРНК в плазме крови у пациентов, умерших в стадии ожогового шока, как и в образцах миокарда, достоверно увеличивался уровень экспрессии miR-155 в 6,7 раза ($p = 0,025$), miR-200c – в

6 раз ($p = 0,041$) и уровень miR-378a повышался в 7 раз ($p = 0,023$) по сравнению с контрольной группой. Также отмечалось увеличение уровня экспрессии miR-200b в 2,5 раза ($p = 0,061$).



Примечание. * – Отличия от соответствующих значений в контроле $p \leq 0,05$.

Рисунок 2 – Сравнительная оценка экспрессии микроРНК в миокарде и плазме крови при ожоговом шоке и в группе контроля

ВЫВОДЫ

1. Снижение сократительной способности миокарда у ожоговых больных с шоком связано с образованием острых очаговых повреждений (множественных контрактур, очагового глыбчатого распада и миоцитолизиса кардиомиоцитов), статистически значимым снижением экспрессии белков-маркеров кардиомиоцитами – актина (в 2,4 раза; $p < 0,05$) и десмина (в 2 раза; $p < 0,05$) и сопровождается уменьшением сердечного индекса, ударного объема, глобальной фракции изгнания сердца и увеличением индекса системного сосудистого сопротивления.

2. Структурная организация кардиомиоцитов при ожоговом шоке характеризуется уменьшением объемной плотности (на 36 %, $p < 0,05$) и деструкцией миофибрилл, повышением объемной плотности лизосом (на 87 %, $p < 0,05$), развитием отека клеток с увеличением межфибриллярных пространств и объемной плотности цитоплазмы (на 63 %, $p < 0,05$), что лежит в основе снижения сократительной способности миокарда.

3. Ультраструктура кардиомиоцитов при ожоговом шоке характеризуется изменением форм митохондрий и снижением концентрации крист у всех субпопуляций митохондрий, которые менее выражены у интермиофибриллярных органелл (на 13 %, $p < 0,05$) в сравнении с субсарколеммальными (на 20 %, $p < 0,05$) и перинуклеарными (на 17 %, $p < 0,05$), что может свидетельствовать о более выраженной толерантности этой субпопуляции митохондрий при альтерации кардиомиоцитов в случаях развития ожогового шока. Наиболее значимые изменения ультраструктурной организации митохондрий были выражены у перинуклеарной субпопуляции органелл, где помимо снижения концентрации крист достоверно была снижена площадь митохондрий (на 38 %, $p < 0,05$).

4. Изменения мышцы сердца у больных с ожоговым шоком сопровождаются статистически значимым увеличением содержания микроРНК miR-200c (в 2,7 раза, $p < 0,05$), miR-200b (в 2,6 раза, $p < 0,05$), miR-155 (в 6,3 раза, $p < 0,05$) и miR-378a (в 4,7 раза, $p < 0,05$) в миокарде с достоверным увеличением микроРНК miR-200c (в 6 раз, $p < 0,05$), miR-155 (в 6,7 раза, $p < 0,05$) и miR-378a (в 7 раз, $p < 0,05$) в плазме крови.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Результаты выполненного комплексного морфологического исследования миокарда могут быть использованы в практической работе танатологических отделов и судебно-гистологических лабораторий территориальных бюро судебно-медицинской экспертизы при проведении аутопсий и микроскопических исследований миокарда в случаях ожогового шока, а также в судебно-биохимических лабораториях при исследовании образцов миокарда и плазмы крови для оценки тяжести ожогового шока.

2. Полученные данные о структурных изменениях миокарда при ожоговом шоке могут быть информативными для понимания особенностей патогенеза ожоговой болезни, для разработки кардиопротекции при лечении этой патологии и снижения летальности.

3. Полученные результаты о патоморфологических, иммуногистохимических изменениях миокарда и ультраструктуры кардиомиоцитов при ожоговом шоке могут быть использованы в учебном

процессе кафедр гистологии, патологической анатомии и судебной медицины медицинских ВУЗов РФ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Экспертная оценка клинических и морфологических изменений при термическом ожоговом шоке / С. В. Савченко, В. П. Новоселов, **Н. Г. Ощепкова** [и др.] // **Вестник судебной медицины**. – 2017. – Т. 6, № 4. – С. 15–19.
2. Ультраструктура кардиомиоцитов при тяжелом ожоговом шоке / С. В. Савченко, **Н. Г. Ощепкова**, В. П. Новоселов [и др.] // **Современные проблемы науки и образования**. – 2021. – № 2. – С. 130–137.
3. Ультраструктурный анализ изменений кровеносных микрососудов миокарда при тяжелом ожоговом шоке / С. В. Савченко, **Н. Г. Ощепкова**, Н. П. Бгатова [и др.] // **Сибирский научный медицинский журнал**. – 2021. – Т. 41, № 3. – С. 71–77.
4. Оценка экспрессии микроРНК в миокарде и в плазме крови при развитии тяжелого ожогового шока / С. В. Савченко, В. П. Новоселов, **Н. Г. Ощепкова** [и др.] // **Вестник судебной медицины**. – 2021. – Т. 10, № 3. – С. 4–8.
5. Ультраструктурные изменения подтипов митохондрий кардиомиоцитов при ожоговом шоке / С. В. Савченко, **Н. Г. Ощепкова**, Н. П. Бгатова [и др.] // **Современные проблемы науки и образования**. – 2021. – № 5. – С. 74–80.
6. Экспертная оценка морфологических изменений при ожоговом шоке / С. В. Савченко, **Н. Г. Ощепкова**, В. П. Новоселов [и др.] // **Journal of Siberian Medical Sciences**. – 2018. – № 2. – С. 10–18.
7. **Ощепкова, Н. Г.** Морфология миокарда при ожоговом шоке / **Н. Г. Ощепкова** // Морфологические науки – фундаментальная основа медицины : материалы 2-й Международной морфологической научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых. – Новосибирск, 2017. – С. 280–282.
8. **Ощепкова, Н. Г.** Патоморфология острых очаговых повреждений миокарда при ожоговом шоке / **Н. Г. Ощепкова** // Морфологические науки –

фундаментальная основа медицины : материалы 3-й Международной морфологической научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых. – Новосибирск, 2018. – С. 166–168.

9. **Ощепкова, Н. Г.** Оценка клинико-морфологических изменений при ожоговом шоке / **Н. Г. Ощепкова** // Авиценна-2018 : материалы 9-й Российской (итоговой) научно-практической конференции с международным участием студентов и молодых ученых. – Новосибирск, 2018. – Т. 2. – С. 274–275.

10. **Ощепкова, Н. Г.** Анализ показателей гемодинамики, патоморфологических и иммуногистохимических изменений миокарда при ожоговом шоке / **Н. Г. Ощепкова**, Е. В. Кузнецов // Морфологические науки – фундаментальная основа медицины : материалы 4-й Международной морфологической научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых. – Новосибирск, 2019. – С. 175–178.

11. **Ощепкова, Н. Г.** Клинико-морфологическая оценка миокарда при ожоговом шоке / **Н. Г. Ощепкова** // Авиценна-2019 : материалы 10-й Российской (итоговой) научно-практической конкурс-конференции с международным участием студентов и молодых ученых. – Новосибирск, 2019. – Т. 2. – С. 344–346.

12. **Ощепкова, Н. Г.** Оценка морфо-функционального состояния миокарда при термическом ожоговом шоке / **Н. Г. Ощепкова** // Авиценна-2020 : материалы 11-й Российской (итоговой) научно-практической с международным участием студентов и молодых ученых. – Новосибирск, 2020. – Т. 2. – С. 323–324.

13. **Ощепкова, Н. Г.** Оценка характера ультраструктурных изменений кардиомиоцитов миокарда при тяжелом ожоговом шоке / **Н. Г. Ощепкова** // Морфологические науки – фундаментальная основа медицины : материалы 5-й Международной морфологической научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых. – Новосибирск, 2020. – С. 177–180.

14. **Ощепкова, Н. Г.** Ультраструктурные изменения кардиомиоцитов при термическом ожоговом шоке / **Н. Г. Ощепкова**, Д. В. Бородулина // Авиценна-2021 : материалы 12-й Российской (итоговой) научно-практической

конференции с международным участием студентов и молодых ученых. – Новосибирск, 2021. – Т. 2. – С. 247–248.

15. **Ощепкова, Н. Г.** Изменения экспрессии микро-РНК при ожоговом шоке / **Н. Г. Ощепкова**, В. В. Конончук, В. С. Пукса // Авиценна-2021 : материалы 12-й Российской (итоговой) научно-практической конференции с международным участием студентов и молодых ученых. – Новосибирск, 2021. – Т. 2. – С. 250–251.

16. **Ощепкова, Н. Г.** Оценка данных экспрессионного анализа микроРНК при ожоговом шоке / **Н. Г. Ощепкова**, В. В. Конончук, В. С. Пукса // Актуальные вопросы современной медицинской науки и практики : сборник научно-практических работ с Международным участием. – Новосибирск, 2021. – С. 108–112.

17. **Ощепкова, Н. Г.** Анализ ультраструктурных изменений кардиомиоцитов при ожоговом шоке / **Н. Г. Ощепкова**, Е. В. Кузнецов // Актуальные вопросы современной медицинской науки и практики : сборник научно-практических работ с Международным участием. – Новосибирск, 2021. – С. 112–117.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГФИ	– глобальная фракция изгнания
ИГХ	– иммуногистохимия
ИССС	– индекс системного сосудистого сопротивления
ИУО	– индекс ударного объема
кДНК	– комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
ОТ	– обратная транскрипция
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
СИ	– сердечный индекс
PiCCO	– пульсовой интегральный контур сердечного выброса
Vv	– объемная плотность структур