

Ультраструктурный анализ изменений кровеносных микрососудов миокарда при тяжелом ожоговом шоке

С.В. Савченко¹, Н.Г. Ощепкова¹, Н.П. Бгатова², Ю.С. Таскаева², Е.В. Кузнецов¹,
В.П. Новоселов¹, А.Ю. Летягин²

¹ Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52

² НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН
630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

Резюме

Ожоговая травма является важной медицинской проблемой, так как сопровождается высокими показателями летальности при ожоговом шоке. Цель исследования – выполнить ультраструктурный стереологический анализ изменений кровеносных микрососудов миокарда левого желудочка при ожоговом шоке. **Материал и методы.** Образцы миокарда забирали во время ранней секции, через 2 часа после констатации биологической смерти у погибших от тяжелого ожогового шока (3 мужчины и 2 женщины), возрастная категория 32–44 года. Проведено ультраструктурное исследование эндотелиоцитов микроциркуляторного русла миокарда левого желудочка сердца. **Результаты и их обсуждение.** Развитие тяжелого ожогового шока сопровождается изменениями ультраструктуры эндотелиоцитов кровеносных микрососудов миокарда левого желудочка, что связано с внутриклеточной деградацией и экзоцитозом. Данные изменения могут свидетельствовать о нарушении везикулярного транспорта в эндотелии кровеносных микрососудов миокарда при ожоговом шоке. Особенностью ультраструктуры эндотелия явилась гетерогенность эндотелиоцитов кровеносных капилляров за счет выявляемых темных и светлых эндотелиальных клеток, различающихся насыщенностью цитоплазмы органеллами. Полученные новые данные могут быть информативными при разработке подходов к интенсивной терапии кардиопротективного направления у комбустиологических пациентов с ожоговым шоком.

Ключевые слова: ультраструктура, микроциркуляторное русло, ожоговый шок, миокард, эндотелиоциты.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Авторы благодарны Центру коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>) за предоставленное оборудование.

Автор для переписки: Ощепкова Н.Г., e-mail: 2060natasha@mail.ru

Для цитирования: Савченко С.В., Ощепкова Н.Г., Бгатова Н.П., Таскаева Ю.С., Кузнецов Е.В., Новоселов В.П., Летягин А.Ю. Ультраструктурный анализ изменений кровеносных микрососудов миокарда при тяжелом ожоговом шоке. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2021; 41 (3): 71–77. doi: 10.18699/SSMJ20210310

Ultrastructural analysis of changes in myocardial blood microvessels in severe burn shock

S.V. Savchenko¹, N.G. Oshchepkova¹, N.P. Bgatova², Yu.S. Taskaeva², E.V. Kuznetsov¹,
V.P. Novoselov¹, A.Yu. Letyagin²

¹ Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny ave., 52

² Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of SB RAS
630060, Novosibirsk, Timakov str., 2

Abstract

Burn injury is an important medical problem, as it is accompanied by high mortality rates in burn shock. Aim of the study was to conduct an ultrastructural stereological analysis of changes in the blood microvessels of the left ventricular myocardium in burn shock. **Material and methods.** Myocardial samples during the early section were collected 2 hours after the detection of biological death in the victims from severe burn shock (3 men and 2 women); age group 32–44 years. An ultrastructural study of endothelial cells of the microvasculature of the left ventricular myocardium was carried out. **Results and discussion.** The development of severe burn shock is accompanied by changes in the ultrastructure of the endothelial cells of the blood microvessels of the left ventricular myocardium, which is associated with intracellular degradation and exocytosis. These ultrastructural changes may indicate impairment of vesicular transport in the endothelium of the myocardial microvessels in burn shock. A feature of the ultrastructure of the endothelium was the heterogeneity of the endothelial cells of the blood capillaries due to the revealed dark and light endothelial cells, which differ in the saturation of the cytoplasm with organelles. The new data obtained on changes in the ultrastructure of the endothelium of the microvasculature of the left ventricular myocardium can be informative in the development of approaches to intensive therapy of cardioprotective direction in combustiological patients with burn shock.

Key words: ultrastructure, microcirculatory bed, burn shock, myocardium, endotheliocyte.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The authors are grateful to the Center for Shared Use of Microscopic Analysis of Biological Objects of Institute of Cytology and Genetics SB RAS (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>) for the equipment provided.

Correspondence author: Oshchepkova N.G., e-mail: 2060natasha@mail.ru

Citation: Savchenko S.V., Oshchepkova N.G., Bgatova N.P., Taskaeva Yu.S., Kuznetsov E.V., Novoselov V.P., Letyagin A.Yu. Ultrastructural analysis of changes in myocardial blood microvessels in severe burn shock. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2021; 41 (3): 71–77. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20210310

Введение

В настоящее время ожоговая травма остается значимой медицинской проблемой, так как сопровождается высокими показателями летальности [1]. Несмотря на достигнутые успехи в лечении ожоговой болезни, осуществляемом в специализированных комбустиологических центрах, развитие тяжелого ожогового шока является одной из основных причин летальности при термической травме [2].

Развитие ожогового шока связано с выраженной болевой импульсацией с ожоговых повреждений, которая приводит к активации симпатoadреналовой реакции [3]. Выраженная гиперкатехоламинемия в сочетании со снижением объема циркулирующей крови, развивающегося за счет значительной плазмопотери, а также наличие интоксикационного синдрома в результате резорбции продуктов распада в области раневых поверхностей приводят к развитию рефрактерного шока [1, 2]. Ожоговый шок принято относить к одному из самых тяжелых видов шока, что связано с быстро развивающимися после термического воздействия выраженными гемодинамическими и микроциркуляторными расстройствами [2, 3].

На современном этапе отсутствуют данные, посвященные особенностям ультраструктурных изменений эндотелия кровеносных микро-

сосудов при ожоговом шоке. Информативным для решения этого вопроса является проведение электронно-микроскопического трансмиссионного исследования эндотелиоцитов кровеносных микрососудов миокарда для выявления ультраструктурных изменений с целью обоснования механизмов развития микроциркуляторных расстройств при ожоговом шоке.

Цель исследования – выполнить ультраструктурный стереологический анализ изменений кровеносных микрососудов миокарда левого желудочка при ожоговом шоке.

Материал и методы

Материал исследования представлен образцами миокарда передней стенки левого желудочка сердца, полученными при проведении в областном комбустиологическом центре раннего секционного исследования умерших от тяжелого ожогового шока пациентов.

На вскрытии осуществляли забор образцов миокарда через 2 часа после констатации биологической смерти у погибших от тяжелого ожогового шока (3 мужчин и 2 женщины, возрастная категория 32–44 лет). Все погибшие имели термические ожоги 2–4-й степени, площадью от 50 до 80 %, полученные на пожарах, т.е. при действии пламени. Смерть всех пациентов наступила в первые двое суток с момента получения ожого-

вой травмы. В качестве контрольной группы использовали аутопсийный материал, который был забран при проведении раннего вскрытия через 2 часа после констатации биологической смерти у доставленных скорой помощью скоропостижно умерших от острой коронарной смерти мужчин ($n=3$, возраст 35–45 лет). Все аутопсии проводились в танатологическом отделе ГБУЗ НСО «Новосибирское областное клиническое бюро судебно-медицинской экспертизы», куда были доставлены тела умерших. Материал для настоящей работы был набран в течение пяти месяцев. При проведении работы соблюдены требования и условия, изложенные в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (ВМА, 2000 г).

Для исследования ультраструктурной организации фрагменты миокарда фиксировали в 4%-м растворе параформальдегида, приготовленном на среде Хенкса, дофиксировали в 1%-м растворе OsO_4 на фосфатном буфере (рН 7,4), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон. Полутонкие срезы толщиной 1 мкм окрашивали толудиновым синим и изучали под световым микроскопом Leica DME (Германия). Ультратонкие срезы толщиной 70–100 нм контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM 1400 (Япония). При увеличении $\times 30000$ получали электронограммы фрагментов цитоплазмы эндотелиальных клеток кровеносных капилляров сердца, морфометрировали при увеличении $\times 30000$ с помощью компьютерной программы Image J. Определяли объемные плотности люминальных и аблюминальных кавеол, транспортных

везикул, лизосом, митохондрий, цистерн гранулярной эндоплазматической сети при использовании открытой тестовой системы с шагом 60 нм.

Данные представлены в виде среднего арифметического и среднеквадратического отклонения ($M \pm SD$). Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента, достоверными считали результаты при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

При анализе полутонких срезов, окрашенных толудиновым синим, отмечено, что миокард контрольной группы сохранял характерное гистологическое строение. В большинстве полей зрения кардиомиоциты имели равномерную бледно-голубую окраску цитоплазмы и четкую очерченность ядер, которые окрашивались эозинофильно. Сосуды миокарда контрольной группы имели признаки неравномерного кровенаполнения, с тенденцией к полнокровию. При микроскопическом исследовании полутонких срезов мышцы сердца в случаях смерти от ожогового шока обнаружены острые расстройства кровообращения. Изменения сосудов представлены спазмом и малокровием артерий, включая мелкие интрамуральные сосуды. Просветы спазмированных артерий среднего и мелкого калибра неравномерно сужены, некоторые из них щелевидной формы. Внутренняя оболочка крупных артерий, находящихся в состоянии спазма, выглядела складчатой, при этом эндотелиоциты выбухали в просвет сосудов в виде частокола. Вены относительно малокровные, отмечались паретическое расширение и дистония сосудистой стенки, форменные элементы располагались компактно, некоторые имели четкие контуры, а часть элементов крови представлена в виде рыхлой массы без четких контуров.

На первом этапе электронно-микроскопического исследования проводили изучение ультраструктуры эндотелиальных клеток микроциркуляторного русла миокарда левого желудочка сердца контрольной группы. Эндотелиоциты имели типичное строение, характерное для капилляров непрерывного типа, в цитоплазме клеток просматривались везикулы и везикулоподобные органеллы (рис. 1). При этом их плазмалемма имела большое количество кавеол с люминальной и аблюминальной стороны (таблица), что свойственно клеткам с активной транспортной

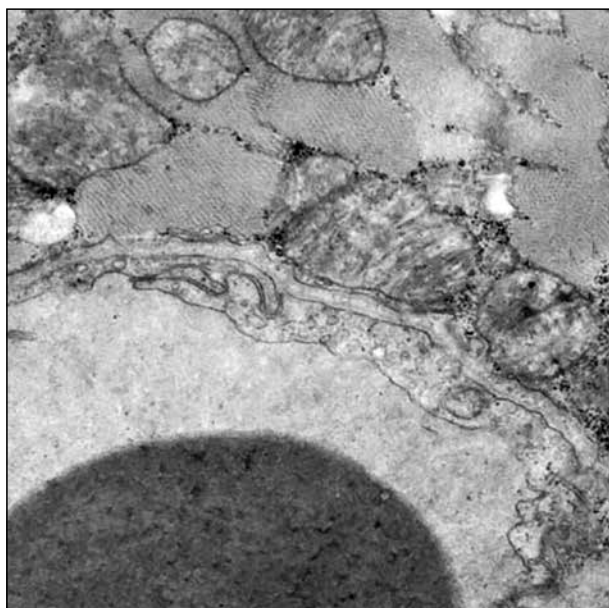


Рис. 1. Ультраструктура эндотелиоцитов кровеносного капилляра в контроле. Увеличение $\times 30000$

Fig. 1. Ultrastructure of endotheliocytes of blood capillary in the control. $\times 30000$

Таблица. Результаты морфометрии эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда в условиях ожогового шока**Table.** Results of morphometry of myocardial blood capillary endotheliocytes under conditions of burn shock

Параметр, Vv	Контроль	Ожоговый шок
Кавеолы люминальные	$3,46 \pm 1,18$	$7,67 \pm 2,71^*$
Кавеолы аблюминальные	$10,88 \pm 2,79$	$8,37 \pm 2,78$
Транспортные везикулы	$12,18 \pm 2,74$	$4,46 \pm 2,73^*$
Митохондрии	$5,75 \pm 1,75$	$4,6 \pm 3,06$
Гранулярный эндоплазматический ретикулум	$6,11 \pm 1,48$	$6,89 \pm 3,24$
Лизосомы	$2,56 \pm 1,08$	$1,42 \pm 1,23$

Примечание: Vv – объемная плотность структур; * – отличие от величины соответствующего показателя группы контроля статистически значимо при $p < 0,05$.

функцией и интернализацией веществ из внеклеточного пространства.

При оценке ультраструктурных изменений отмечали различные типы контактов эндотелиоцитов в кровеносных капиллярах – конец в конец, путем наложения и интердигитации. При ожоговом шоке выявлена структурная гетерогенность эндотелиоцитов кровеносных капилляров. Наблюдали клетки с различной электронной плотностью и разным содержанием органелл (см. таблицу). Среди эндотелиоцитов визуализировались темные и светлые клетки (рис. 2), темные отличались большей электронной плотностью и большей концентрацией внутриклеточных ор-

ганелл (рис. 3). В светлых клетках преобладали везикулы различной локализации. В основном эндотелиальные клетки содержали умеренно развитую гранулярную эндоплазматическую сеть, небольшое число мелких митохондрий и везикулы различной локализации.

При электронно-микроскопическом исследовании в просвете кровеносных микрососудов миокарда левого желудочка в случаях ожогового шока часто обнаруживали деформированные эритроциты и клетки лейкоцитарного ряда – нейтрофильные гранулоциты, плазматические клетки и др. (рис. 4). Выявление клеток лейкоцитарного ряда было обусловлено выраженным сгущением

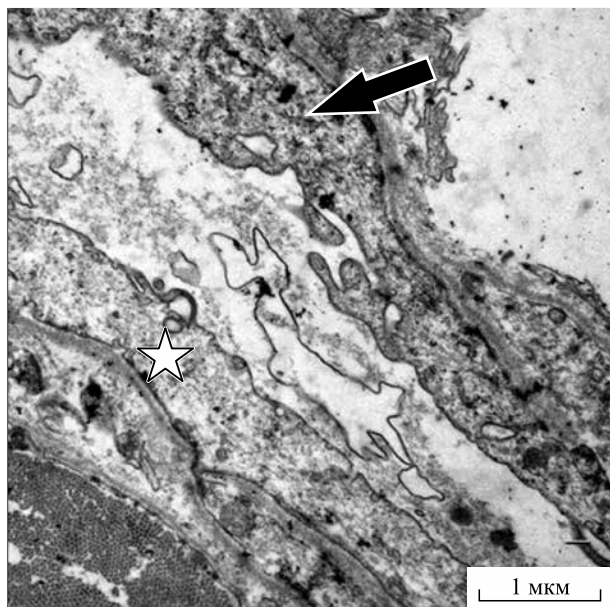


Рис. 2. Светлая эндотелиальная клетка (звездочка) и темный эндотелиоцит (стрелка) в структуре кровеносного капилляра миокарда при ожоговом шоке. Увеличение $\times 30000$

Fig. 2. Light endothelial cell (asterisk) and dark endothelial cell (arrow) in the structure of the myocardial blood capillary in burn shock. $\times 30000$

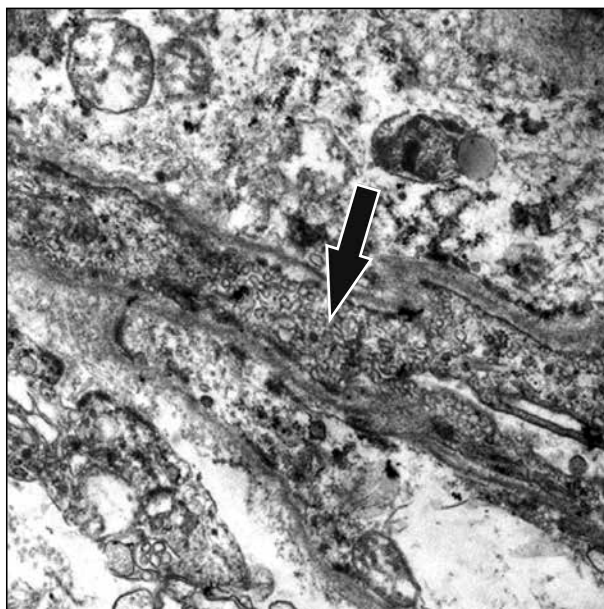


Рис. 3. Эндотелиальная клетка с высоким содержанием везикулярных структур (стрелка). Увеличение $\times 30000$

Fig. 3. An endothelial cell with a high content of vesicular structures (arrow). $\times 30000$

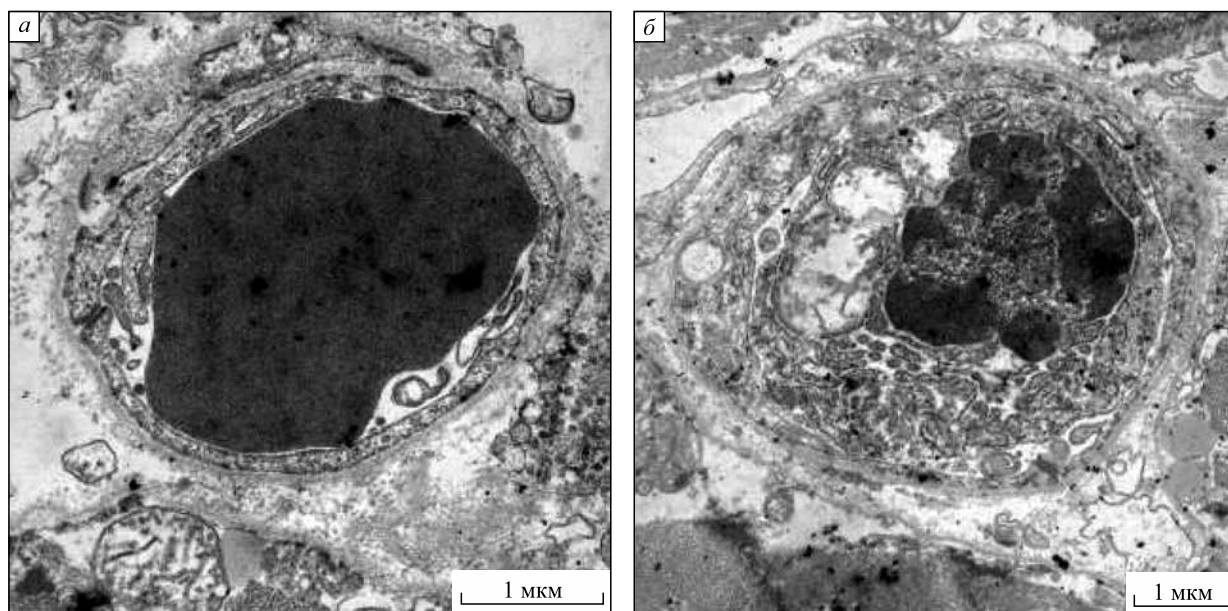


Рис. 4. Эритроцит (а) и плазматическая клетка (б) в просвете кровеносного капилляра миокарда при ожоговом шоке. Увеличение $\times 30000$

Fig. 4. Erythrocyte (a) and plasma cell (б) in the lumen of the myocardial blood capillary under conditions of burn shock. $\times 30000$

крови за счет массивной плазмопотери через обширные ожоговые раневые поверхности. Кроме того, сгущению крови способствовали развивающиеся при ожоговом шоке гемодинамические, микроциркуляторные и электролитные расстройства, которые сопровождаются нарушениями осмотического и онкотического давления, повышением проницаемости сосудистой стенки и выходом большого количества жидкой части крови в стромальные пространства [1–3].

Морфометрический стереологический анализ эндотелиоцитов кровеносных микрососудов при ожоговом шоке позволил выявить двукратное увеличение объемной плотности кавеол, связанных с люминальной поверхностью клеток (см. таблицу), по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Это связано с эндоцитозом, при котором происходит формирование из плазмалеммы кавеол, представляющих собой инвагинации плазматической мембраны колбовидной формы. На современном этапе принято считать, что основными функциями кавеол является не только эндоцитоз, но и транцитоз, а также ремоделирование внеклеточного матрикса, передача сигналов, участие в липидном обмене и регенерации [4]. Кроме того, кавеолы участвуют в миграции клеток [4]. При эндоцитозе кавеолы поглощают макромолекулярные комплексы, которые приносят в цитоплазму. На следующем этапе эти везикулы сливаются с эндосомами, после чего происходит деградация материала уже в лизосо-

мах. Однако процесс миграции может привести к рециркуляции материала, он может быть возвращен на плазматическую мембрану или в ходе транцитоза транспортироваться сквозь цитоплазму [5]. Эндоцитоз обеспечивает весь внутриклеточный транспорт, формируя при этом лизосомальную сеть, обеспечивающую перемещение интернализованного материала по различным внутриклеточным направлениям [6].

Наряду с описанными изменениями, при исследовании ультраструктуры эндотелиоцитов кровеносных микрососудов миокарда левого желудочка сердца при ожоговом шоке выявлено уменьшение на 63 % объемной плотности транспортных везикул, располагающихся в цитоплазме клеток в свободном виде. Величины объемной плотности остальных внутриклеточных органелл достоверно не отличались от соответствующих значений в контрольной группе (см. таблицу).

Таким образом, при развитии тяжелого ожогового шока оценка ультраструктуры эндотелия микроциркуляторного русла миокарда левого желудочка сердца позволяет высказаться о гетерогенности эндотелиоцитов кровеносных микрососудов за счет выявляемых темных и светлых эндотелиальных клеток, различающихся насыщенностью цитоплазмы органеллами. При этом следует отметить, что имели место все типы межэндотелиальных контактов — конец в конец, наложения и интердигитации.

Существенным при проведении ультраструктурного исследования в случаях ожогового шока является выявление эндоцитоза. Плазмалемма эндотелиальных клеток имела большое количество кавеол с люминальной и аблюминальной стороны. Отличительными особенностями эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда при ожоговом шоке по сравнению с контролем были достоверно более высокая объемная плотность кавеол, связанных с люминальной поверхностью клеток, и меньшая объемная плотность транспортных везикул, располагающихся в цитоплазме клеток в свободном виде. Представленные ультраструктурные изменения могут свидетельствовать о нарушении везикулярного транспорта в эндотелиоцитах кровеносных микрососудов миокарда левого желудочка при ожоговом шоке.

Развивающееся при ожоговом шоке выраженное сгущение крови за счет массивной плазмолитической гемолитической гемоглобинемии сопровождалось появлением в просвете кровеносных капилляров миокарда наряду с эритроцитами лейкоцитов. Отмечали наличие

микроворсинок и выростов люминальной поверхности эндотелиальной выстилки и явления клазматоза (рис. 5).

Закключение

Развитие тяжелого ожогового шока сопровождается изменениями ультраструктуры эндотелиоцитов кровеносных микрососудов миокарда левого желудочка, что связано с внутриклеточной деградацией и экзоцитозом и свидетельствует о нарушении везикулярного транспорта в эндотелии. Особенностью его ультраструктуры явилась гетерогенность эндотелиоцитов кровеносных капилляров за счет выявляемых темных и светлых клеток, различающихся насыщенностью цитоплазмы органеллами. Полученные новые данные об изменении ультраструктуры эндотелия микроциркуляторного русла миокарда левого желудочка сердца могут быть информативными при разработке подходов к интенсивной терапии кардиопротективного направления у комбустиологических пациентов с ожоговым шоком.

Список литературы / References

1. Pham T.N., Cancio L.C., Gibran N.S., American Burn Association. American Burn Association practice guidelines: burn shock resuscitation. *J. Burn Care Res.* 2008; 29 (1): 257–266. doi: 10.1097/BCR.0b013e31815f3876
2. Cochran A., Morriss S.E., Edelman L.S., Saffle J.R. Burn patient characteristics and outcomes following resuscitation with albumin. *Burns.* 2007; 33: 25–30. doi: 10.1016/J.BURNS.2006.10.005
3. Dries D. Management of burn injuries – recent developments in resuscitation, infection control and outcomes research. *Scand. J. Trauma Resusc. Emerg. Med.* 2009; 17: 14. doi: 10.1186/1757-7241-17-14
4. Sohn J., Brick R.M., Tuan R.S. From embryonic development to human diseases: the functional role of caveolae/caveolin. *Birth Defects Res. C. Embryo. Today.* 2016; 108 (1): 45–64. doi: 10.1002/bdrc.21121
5. Elkin S.R., Lakoduk A.M., Schmid S.L. Endocytic pathways and endosomal trafficking: a primer. *Wien. Med. Wochenschr.* 2016; 166 (7–8): 196–204. doi: 10.1007/s10354-016-0432-7
6. Parkar N.S., Akpa B.S., Nitsche L.C., Wedgewood L.E., Place A.T., Sverdllov M.S., Chaga O., Minshall R.D. Vesicle formation and endocytosis: function, machinery, mechanisms, and modeling. *Antioxid. Redox Signal.* 2009; 11 (6): 1301–1312. doi: 10.1089/ars.2008.2397

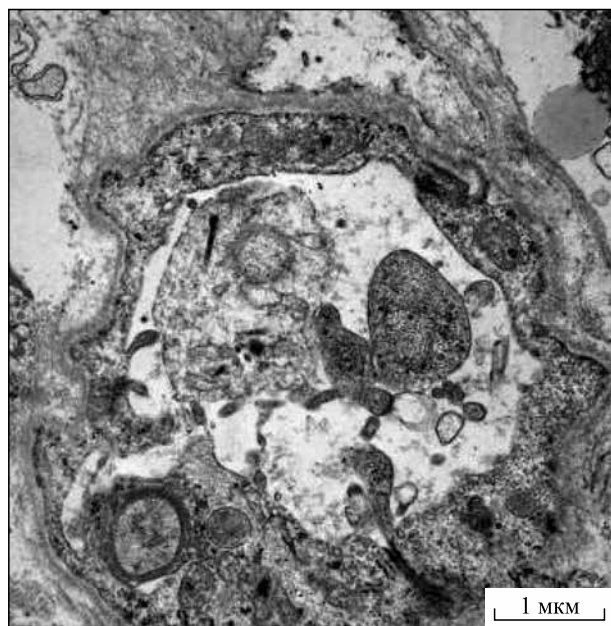


Рис. 5. Микроворсинки и выросты люминальной поверхности эндотелиальной выстилки и клазматоз эндотелия при ожоговом шоке. Увеличение $\times 30000$

Fig. 5. Microvilli and outgrowths of the luminal surface of the endothelial lining and the presence of the phenomenon of endothelial clasmatosis in burn shock. $\times 30000$

Сведения об авторах:

Сергей Владимирович Савченко, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0002-8525-5883, e-mail: dr.serg62@yandex.ru
Наталья Гавриловна Ощепкова, ORCID: 0000-0001-8976-8080, e-mail: 2060natasha@mail.ru
Наталья Петровна Бгатова, д.б.н., проф., ORCID: 0000-0002-4507-093X, e-mail: n_bgatova@ngs.ru
Юлия Сергеевна Таскаева, к.м.н., ORCID: 0000-0002-2812-2574, e-mail: inabrite@yandex.ru
Евгений Викторович Кузнецов, к.м.н., ORCID: 0000-0002-0240-1049, e-mail: drkuznetsov83@mail.ru
Владимир Павлович Новоселов, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0002-4702-2261, e-mail: sibsme@mail.ru
Андрей Юрьевич Лetyагин, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0002-9293-4083, e-mail: letyagin-andrey@yandex.ru

Information about the authors:

Sergey V. Savchenko, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0002-8525-5883, e-mail: dr.serg62@yandex.ru
Natalia G. Oshchepkova, ORCID: 0000-0001-8976-8080, e-mail: 2060natasha@mail.ru
Nataliya P. Bgatova, doctor of biological sciences, professor, ORCID: 0000-0002-4507-093X, e-mail: n_bgatova@ngs.ru
Yulia S. Taskaeva, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-2812-2574, e-mail: inabrite@yandex.ru
Evgeny V. Kuznetsov, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-0240-1049, e-mail: drkuznetsov83@mail.ru
Vladimir P. Novoselov, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0002-4702-2261, e-mail: sibsme@mail.ru
Andrey Yu. Letyagin, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0002-9293-4083, e-mail: letyagin-andrey@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.01.2021

После доработки 31.03.2021

Принята к публикации 20.04.2021

Received 15.01.2021

Revision received 31.03.2021

Accepted 20.04.2021