

## ОСОБЕННОСТИ МОФРОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ФИБРОЗА И ВОСПАЛЕНИЯ В УШКАХ ПРЕДСЕРДИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ФИБРИЛЛЯЦИЕЙ ПРЕДСЕРДИЙ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ

Григориади Н.Е.<sup>2</sup>, Василец Л.М.<sup>1</sup>, Туев А.В.<sup>1</sup>, Косарева П.В.<sup>1</sup>, Латышева С.Э.<sup>4</sup>, Гордийчук Р.Н.<sup>3</sup>, Щербенев В.М.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО Пермская Государственная Медицинская Академия им. ак. Е.А. Вагнера, Минздрава России, г. Пермь.

<sup>2</sup>Пермская краевая клиническая больница, г. Пермь.

<sup>3</sup>Пермская краевая клиническая больница №2 «Институт сердца», г. Пермь.

<sup>4</sup>НУЗ ОКБ на станции Пермь 2 ОАО РЖД, г. Пермь.

Изучены морфометрические особенности и выраженность тканевой экспрессии маркеров фиброза и воспаления в миокарде предсердий с помощью иммуногистохимических методов у больных с различными формами фибрилляцией предсердий, в том числе на фоне артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца. Основная группа включала биоптаты ушек предсердий 55 пациентов с фибрилляцией предсердий различной этиологии. Фиброзные изменения эндокарда предсердных ушек начинают формироваться у пациентов с идиопатической фибрилляцией предсердий, прогрессируя у больных артериальной гипертензией и фибрилляцией предсердий, и достигают максимума в группе с ИБС, АГ и ФП. В тканях ушек предсердий выявлена повышенная экспрессия иммуногистохимических маркеров фиброза и воспаления. Экспрессия матричной металлопротеиназы-9 и фактора некроза опухолей- $\alpha$  прогрессивно увеличивается у больных с артериальной гипертензией и ее сочетанием с ишемической болезнью сердца.

Ключевые слова: фибрилляция предсердий, кардиальный фиброз, фактор некроза опухолей- $\alpha$ , матриксная металлопротеиназа – 9, тканевый ингибитор металлопротеиназ – 1, морфометрия, иммуногистохимия.

## MORPHOMETRY OPTIONS AND THE IMMUNOHISTOCHEMICAL MARKERS OF FIBROSIS AND INFLAMMATION IN THE EARS ATRIUMS IN PATIENTS WITH ATRIAL FIBRILLATION OF DIFFERENT ETIOLOGY

Grigoriadi N.E.<sup>2</sup>, Vasilez L.M.<sup>1</sup>, Tuev A.V.<sup>1</sup>, Kosareva P.V.<sup>1</sup>, Latysheva S.Y.<sup>4</sup>, Gordiichuk R.N.<sup>3</sup>, Scherbenev V.M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Perm State Medical Academy. ak. EA Wagner, the Russian Health Ministry, Perm.

<sup>2</sup>Permskaya Regional Clinical Hospital, Perm.

<sup>3</sup>Permskaya Regional Clinical Hospital № 2 "Heart Institute", Perm.

<sup>4</sup>Regional Hospital RZD, Perm.

Studied the morphometric characteristics and severity of tissue expression of markers of fibrosis and inflammation in atrial myocardium by immunohistochemistry in patients with different forms of atrial fibrillation, including arterial hypertension and coronary heart disease progression. The main group included biopsies of the atrial appendages of 55 patients with atrial fibrillation of different etiologies. Atrial endocardial fibrosis ears begin to form, smiling in patients with idiopathic atrial fibrillation, progressing in patients with arterial hypertension and atrial fibrillation, and reach a maximum in the group with coronary artery disease, hypertension and AF. In the tissues of the atrial appendages revealed increased expression of immunohistochemical markers of inflammation and fibrosis. Expression of matrix metalloproteinase -9 and tumor necrosis factor - $\alpha$  progressively in-creases in patients with hypertension and its combination with coronary artery disease.

Keywords: atrial fibrillation, cardiac fibrosis, matrix metalloproteinase - 9, tissue inhibitor metalloproteinase-1, morphometry, immunohistochemistry.

### Введение

Известно, что фибрилляция предсердий (ФП) наблюдается при различных заболеваниях сердечно-сосудистой системы – артериальной гипертензии (АГ), ишемической болезни сердца (ИБС). Несмотря на большое количество исследований, проведенных в данной обла-

сти, патогенез ФП до конца не изучен [8]. В современных работах встречаются неполные данные по вопросу роли факторов воспаления в генезе аритмии и единичные, касающиеся проблемы кардиального фиброза [1]. Имеющиеся данные неоднозначны, нет единого мнения в интерпретации значений показателей, поэтому в нашем исследовании было решено оценить степень выраженности фиброза морфометрически и изучить показатели фиброза и воспаления в тканях предсердия при помощи реакций иммуногистохимии.

В литературе нам встретились немногочисленные работы, посвященные этой проблеме. Вообще, изменение архитектоники левого предсердия играет важную роль в поддержании ФП. Так, в работе Chiu Y.W., 2010 оценивались ткани предсердия, взятые от пациентов с ФП и синусным ритмом, перенесшие операции на открытом сердце путем проведения оптической микроскопии [4]. Авторы предполагают, что именно фиброз создает основу для возникновения ФП, оценивались количество и структура коллагеновых волокон. Было найдено, что в группе с ФП количество измененного коллагена значительно превышало содержание такового у больных с синусным ритмом.

Еще одно исследование было проведено Nakano Y., 2004, где исследователи при проведении иммуногистохимии показали, что экспрессия матриксной металлопротеиназы-9 (ММП-9) увеличилась в фиброзированной ткани предсердий, что, возможно, способствовало перестройке внеклеточного матрикса и дилатации предсердий во время ФП, этих изменений не было в предсердиях у пациентов с синусным ритмом [7]. Иммуногистохимический анализ показал, что ММП-9 была распределена периваскулярно под эпикардом предсердий.

Однако эти исследования немногочисленны, данные их противоречивы, не до конца ясно, какую роль тканевые маркеры фиброза и воспаления играют в патогенезе ФП. Все это определило актуальность нашего исследования.

**Цель работы:** Изучить морфометрические особенности и выраженность тканевой экспрессии маркеров фиброза и воспаления в миокарде предсердий с помощью иммуногистохимических методов у больных с фибрилляцией предсердий различной этиологии, в том числе на фоне артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца.

#### **Материалы и методы исследования**

Морфометрические и иммуногистохимические исследования были выполнены в отделе морфологических и патофизиологических исследований ЦНИЛ ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. ак. Е.А. Вагнера» Минздравсоцразвития России (зав. отделом – д.м.н. П.В. Косарева).

Основная группа включала 55 пациентов: 5 с идиопатической фибрилляцией предсердий (ИФП), 12 с сочетанием АГ и ФП и 38 с триадой нозологий (ИБС+АГ+ФП). Объектом морфологических исследований являлись ушки левого предсердия, которые удалялись у па-

циентов при проведении аорто-коронарного шунтирования и/или операции Maze. Для контроля были использованы 19 образцов, полученных при проведении аутопсий у здоровых ровесников – группа сравнения.

Обе группы были сопоставимы по гендерному распределению (критерий Фишера,  $p=0,51$ ) и возрасту (U-критерий,  $p=0,11$ ).

Критериями исключения из исследования стали: возраст старше 70 лет и младше 35 лет; заболевания печени, ХБП, пневмофиброз и тяжелая хроническая обструктивная болезнь легких, злокачественные опухоли, диффузные заболевания соединительной ткани, пациенты с установленным кардиостимулятором, кардиовертером-дефибриллятором, кардиомиопатии; клапанные пороки сердца; острый миокардит; перикардит; нарушение функции щитовидной железы; больные с недостаточностью кровообращения более II ф. к. NYHA (IIA стадии по классификации Стражеско Н.Д. и Василенко В.Х., 1935) и фракцией выброса левого желудочка менее 45%; сахарный диабет; острые воспалительные заболевания или обострения хронических воспалительных заболеваний в течение 2-х недель до включения в исследование.

Сразу же после резекции ушки левого предсердия помещали в 10% раствор забуференного по Лилли формалина ( $pH=7,2$ ) на 24 часа. Затем проводили вырезку – забирали фрагменты из 3 частей каждого ушка: основания, верхушки и срединной части. Далее фрагменты, фиксированные в формалине, обезвоживали и обезжировали в соответствии со стандартными гистологическими методиками, после этого осуществляли их заливку в гистамикс еще на 3-6 суток. Затем с парафиновых блоков готовили серийные (5-10 шт.) срезы толщиной 3-5 мкм и помещали их на предметные стекла. Количественный (морфометрический) анализ исследуемых гистологических образцов проводили при помощи окуляр-микрометра и с использованием программного пакета BioVision (Австрия). В каждом препарате проводили от 5 до 10 измерений, после чего вычисляли средние величины и стандартные отклонения для каждого случая и средние величины по группам.

В полученных образцах исследовали экспрессию маркеров: фактора некроза опухоли альфа (ФНО- $\alpha$ ) и ММР-9-позитивных клеток в оболочках сердца в верхушке, срединной части и основании ушка левого предсердия при увеличении  $\times 1500$  в 10-20 полях зрения. Выраженность экспрессии маркеров оценивали полуколичественным методом – «в крестах», просматривая подряд поля зрения под микроскопом (от 10 до 20 в каждом гистологическом срезе). В зависимости от интенсивности окрашивания поля зрения относили к 4-м группам: отрицательной реакцией (-), слабopоложительной (+), положительной (++) и резко положительной (+++).

Полученные результаты обрабатывались статистически с помощью компьютерной программы Statistica 6.1. Для выявления существующих различий по порядковым признакам использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. При  $p < 0,05$  различия считались статистически значимыми. Дизайн исследования представлен открытым контролируемым исследованием.

### **Результаты и их обсуждение**

У здоровых лиц фиброзных и воспалительных изменений с эндокарде, миокарде и эпикарде не было найдено, толщина эндокарда составила  $0,0252 \pm 0,011$  мм. В то же время в нашем исследовании обнаружено, что фиброзирование эндокарда предсердных ушек начинает формироваться уже у пациентов с идиопатической ФП (ИФП). Об этом говорят результаты количественного (морфометрического) анализа ( $0,0756 \pm 0,0039$  мм).

Фиброзные изменения миокарда прогрессивно становятся более значимыми у пациентов в группах с АГ и ФП ( $0,0994 \pm 0,056$  мм) и достигают максимума именно в группе с ИБС, АГ и ФП ( $0,121 \pm 0,022$  мм). Морфологически изменения миокарда при этом характеризуется уменьшением количества кардиомиоцитов, их реактивной гипертрофией (увеличение линейных размеров миоцитов – диаметра миоцитов и их длины) и фиброзными изменениями в миокарде. Наряду с фиброзом интерстициальной ткани, важна также гипертрофия кардиомиоцитов.

**Экспрессия ФНО- $\alpha$ .** У пациентов группы сравнения ФНО- $\alpha$  -позитивные клетки в препаратах не обнаруживались, так же, как и в группе больных с ИФП. В группе пациентов с сочетанием АГ и ФП слабоинтенсивная экспрессия ФНО- $\alpha$  (+) выявлена у всех пациентов группы (12 человек) – на ограниченных участках миокарда (окрашенные кардиомиоциты) (рис. 1). У части больных также выявлялась слабопозитивное окрашивание (+) эндокарда – в основном веществе и волокнах соединительной ткани.

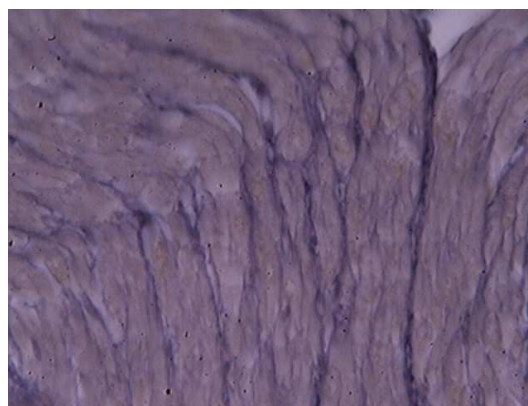


Рис. 1. Экспрессия TNF- $\alpha$  в кардиомиоцитах предсердного ушка у пациента с ФП и АГ х 600

В группе с сочетанием ФП+АГ+ИБС выбрано для иммуногистохимического исследования 16 препаратов. Экспрессия ФНО- $\alpha$  выявлена в цитоплазме кардиомиоцитов. При этом

интенсивность окрашивания в большинстве случаев оценивалась как «+»; у некоторых пациентов отмечалась интенсивная экспрессия цитоплазмы кардиомиоцитов (+++). Экспрессия ФНО- $\alpha$  в эндокарде выявлена у 1 пациента – в мышечно-эластическом слое, слабоположительная – «+».

**Экспрессия ММР-9.** У пациентов группы сравнения ММР-9-позитивные клетки в препаратах выявлены на отдельных участках в миокарде; выраженность экспрессии – слабоположительная «+». В группе с ИФП экспрессия ММР-9 также характеризовалась как слабоположительная (+) на отдельных участках миокарда. В группе с ФП и АГ экспрессия ММР-9 у пациентов этой группы оценивалась как слабоположительная (+) на отдельных участках в миокарде. У 1 пациента экспрессия ММР-9 отсутствовала. В группе с ФП, АГ и ИБС экспрессия ММР-9 выявлена в цитоплазме кардиомиоцитов. При этом интенсивность окрашивания оценивалась как «+++» у 10 пациентов (рис. 3); как «++» - у 6 пациентов. Экспрессия ММР-9 в эндокарде не выявлена.

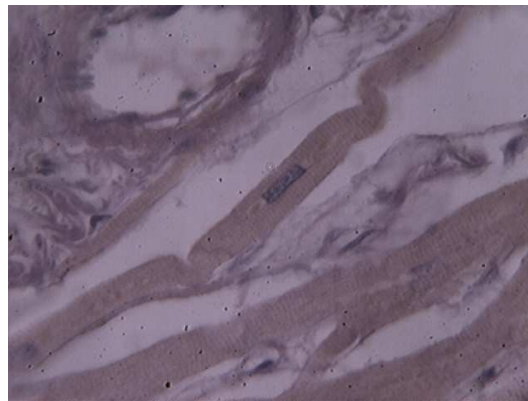


Рис.2. Выраженная экспрессия ММР-9 в миокарде предсердного ушка пациента III группы (ФП+АГ+ИБС); отмечается также отек соединительной ткани миокарда; поперечная исчерченность сохранена x 600

Суммируя полученные результаты, можно говорить о том, что у наблюдаемых пациентов отмечается прогрессивное увеличение экспрессии в миокарде предсердных ушек ММР-9, ФНО- $\alpha$  в ряду ИФП; ФП+АГ; ФП+АГ+ИБС. Полученные результаты не противоречат литературным данным. Повышение экспрессии металлопротеиназы ММР-9 и провоспалительного цитокина ФНО- $\alpha$  свидетельствует об активации системного воспалительного ответа при повреждении миокарда [2]. Аналогичные тенденции выявлены при исследовании экспрессии маркеров в эндокарде предсердных ушек. При этом экспрессия маркеров также выявлялась, в основном, в гладкомышечных клетках эндокарда предсердий.

Вообще, основываясь на полученных данных иммуногистохимии, можно утверждать, что развитие интерстициального фиброза играет важную роль в патофизиологии ремоделирования сердца и способствует прогрессированию его дисфункции [9]. По данным литературы, кроме того, фиброзное ремоделирование ухудшает анизотропную проводимость и спо-

способствует развитию и прогрессированию аритмии. Выраженный фиброз отмечается в гипертрофированном сердце [6]. В исследовании Ishizu T., 2014 было выявлено, что у пациентов с АГ и ФП имеет место предсердный фиброз [5]. В нем участки фиброза чередовались с участками гипертрофии в предсердиях и в левом желудочке, максимальный слой фиброза располагался субэндокардиально.

При сочетании ИБС, АГ и ФП мы наблюдали максимальное изменение структуры тканей в предсердных ушках, вероятнее всего, это непрерывный процесс. На ранней стадии индукция медиаторов воспаления происходит во время коротких эпизодов ишемии, которые не приводят к некрозу кардиомиоцитов, но приводят к миграции лейкоцитов в миокард. Острое воспаление может активировать эндогенные ингибирующие факторы, которые могут подавить воспалительный процесс, но могут и стимулировать внеклеточную экспрессию белкового матрикса, что приводит к формированию фиброзной ткани и необратимой дисфункции миокарда [3].

### **Выводы**

1. Фиброзные изменения эндокарда предсердных ушек начинают формироваться у пациентов с идиопатической ФП, прогрессируя у больных с АГ и ФП, и достигают максимума в группе с ИБС, АГ и ФП.
2. В тканях ушек предсердий выявлена повышенная экспрессия иммуногистохимических маркеров фиброза и воспаления. Экспрессия ММП-9 и ФНО- $\alpha$  прогрессивно увеличивается в ряду ИФП; ФП+АГ; ФП+АГ+ИБС с ИБС, АГ и ФП.

### **Список литературы**

1. Благова О.В., Недоступ А.В., Коган Е.А., и др. «Идиопатические» аритмии как симптом латентной болезни сердца: опыт постановки нозологического диагноза с помощью эндомиокардиальной биопсии // Кардиология. – 2010. - №1. – С.56-63.
2. Парнес Е.Я., Гаврилова С.А. и др. О возможности использования лорноксикама у больных инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST // Consilium Medicum. – Кардиосоматика. - №03. – 2011. – Электронная версия.
3. Bujak M., Frangogiannis N.G., et. al. The role of TGF- $\beta$  signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling // Cardiovascular Research. – 2007. – Vol. 74. – P.184–195.
4. Chiu Y.W, Lo M.T., Tsai M.R., et. al. Applying harmonic optical microscopy for spatial alignment of atrial collagen fibers. // PLoS One. – 2010 Nov. – Vol 17, № 9;5(11). – P. 139.

5. Ishizu T., Seo Y., Kameda Y., et. al. Left ventricular strain and transmural distribution of structural remodeling in hypertensive heart diseases // *Hypertension*. – 2014 Mar. – Vol.6. - №63 (3). – P. 500.
6. Khan R., Sheppard R., et. al. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia // *Immunology*. – 2006. – Vol.118. – P.10–24.
7. Nakano Y., Niida S., Dote K. et. al. Matrix metalloproteinase-9 contributes to human atrial remodeling during atrial fibrillation // *J Am Coll Cardiol*. – 2004. - №3. – P. 818-25.
8. Oral H., Pappone C., Chugh A., et al. Circumferential pulmonary-vein ablation for chronic atrial fibrillation. // *N Engl J Med* – 2006. – Vol.41, №354. – P.934.
9. Sun Y., Weber K.T., et. al. Animal models of cardiac fibrosis // *Methods Mol Med*. – 2005. – Vol. 117. – P. 273–290.

**Рецензенты:**

Некрутенко Л.А., д.м.н., профессор кафедры госпитальной терапии №1 ГБОУ ВПО Пермская Государственная Медицинская Академия им. ак. Е.А. Вагнера Минздрава РФ, г. Пермь.

Желобов В.Г., д.м.н., профессор кафедры госпитальной терапии ГБОУ ВПО Пермская Государственная Медицинская Академия им. ак. Е.А. Вагнера Минздрава РФ, г.Пермь.