

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

М.В.Еремеева, Т.В.Сухачева, В.А.Васковский, Р.А.Серов, А.Ш.Ревитшвили¹

УЧАСТИЕ MIR208A/B В СТРУКТУРНОМ РЕМОДЕЛИРОВАНИИ МИОКАРДА ПРИ ФИБРИЛЛЯЦИИ ПРЕДСЕРДИЙ

ФГБУ «НЦССХ им. А.Н. Бакулева» МЗ РФ, ¹ФГБУ «Институт хирургии им. А.В. Вишневского» МЗ РФ, Москва

С целью выяснения роли определенных микро рибоксинуклеиновых кислот в развитии и/или поддержании фибрилляции предсердий обследованы 23 взрослых пациента с длительно персистирующей формой аритмии, направленных на радиочастотную модификацию операции «лабиринт», и 12 пациентов группы сравнения с синусовым ритмом.

Ключевые слова: микро рибоксинуклеиновые кислоты, кардиомиоциты, фибрилляция предсердий, синусовый ритм, левое предсердие, амилоид, фиброз, липоматоз, полимеразная цепная реакция.

To clarify the role of certain micro-ribonucleic acids in development and/or maintenance of atrial fibrillation, 23 adult patients with long-lasting persistent AF, referred for the radiofrequency modification of the "Labyrinth" procedure and 12 subjects of the control group with the sinus rhythm were assessed.

Key words: micro-ribonucleic acids, cardiomyocytes, atrial fibrillation, sinus rhythm, sinus rhythm, left atrium, amyloid protein, fibrosis, lipomatosis, polymerase chain reaction.

Фибрилляция предсердий (ФП) является часто встречающимся видом аритмий, особенно в пожилом возрасте. Известно, что механизм ФП включает в себя электрическое и структурное ремоделирование миокарда, и для понимания этих процессов необходимо учитывать эпигенетические факторы. В частности, малые нетранслируемые микро рибоксинуклеиновые кислоты (микроРНК), состоящие из 18-25 нуклеотидов, служат мощными посттранскрипционными регуляторами экспрессии генов. Они регулируют более 60% генов, кодирующих белки [35]. МикроРНК участвуют в негативной регуляции экспрессии генов путем ингибирования трансляции или стимуляции деградации мРНК [30]. Одна микроРНК может иметь несколько мРНК-мишеней и, таким образом, влиять на различные биологические процессы. МикроРНК принимают участие в дифференцировке, пролиферации, метаболизме, гибели клеток, обеспечивают гомеостаз всего разнообразия тканей, включая и ткани сердечно-сосудистой системы. Исследование функций определенных кардиоспецифических микроРНК подтверждает идею о том, что микроРНК контролируют множество как физиологических, так и патологических процессов в сердечно-сосудистой системе [17]. Поэтому целью настоящей работы явилось выяснение роли определенных микро рибоксинуклеиновых кислот в развитии и/или поддержании фибрилляции предсердий.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование было включено 23 взрослых пациента с длительно персистирующей (ДП) ФП и группа сравнения с синусовым ритмом (СР) - 12 пациентов с пороками аортального клапана, миксомами левого предсердия (ЛП), ишемической болезнью сердца, не имевшие в анамнезе ФП (табл. 1). Пациенты с ДПФП подвергались радиочастотной модификации операции «лабиринт» на работающем сердце в условиях

нормотермического искусственного кровообращения [1]. На этапе подготовки к операции всем пациентам было выполнены трансторакальная эхокардиография и компьютерная томография с целью определения параметров сократительной функции левого желудочка (ЛЖ) сердца, размера фиброзного кольца митрального клапана (МК), степени регургитации на митральном и трикуспидальном клапанах, объема и передне-заднего размера ЛП. Все пациенты имели показания к хирургическому лечению соответствующей патологии согласно рекомендациям ВНОА и АССХ. Интраоперационно выполняли биопсию миокарда ушек левого и правого предсердий (УЛП и УПП), исследовали их морфологию и определяли уровень экспрессии микроРНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (RT-PCR).

Таблица 1.

Клиническая характеристика пациентов

	СР (n=12)	ДПФП (n=23)
Возраст, лет	47,1±18,1	57,7±10,5
Мужской пол	7 (58,3%)	13 (56,5%)
Индекс массы тела	28,3±5,3	29,6±2,1
Объем ЛП, мл	-	131,7±25
Размер ЛП, см	4,6±8,3	4,95±7
Фракция выброса ЛЖ, %	61,2±5,4	60,6±8
Продолжительность ФП, лет	-	5,9±5
АГ, n (%)	4(33,3%)	10(43,5%)
ИБС, n (%)	2(16,7%)	1(4,3%)

здесь и далее, СР - синусовый ритм, ДП - длительно персистирующая, ФП - фибрилляция предсердий, ЛП - левое предсердие, ЛЖ - левый желудочек, АГ - артериальная гипертензия, ИБС - ишемическая болезнь сердца

Для определения экспрессии микроРНК методом ПЦР в реальном времени из фрагмента ткани выделяли тотальную РНК, используя TRIzol реагент (Invitrogen). С помощью реакции полиаденилирования и обратной транскрипции выделяли кДНК. Затем с использованием соответствующих праймеров (Eurogen) и набора miScript SYBR Green PCR Kit (200) (QIAGEN) проводили анализ экспрессии 9 микроРНК (miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-208a, miR-208b, miR-499, miR-195, miR-29a, miR-21) на приборе CFX96 Real Time System (BioRad). В качестве референсного гена использовали RNU19 (Eurogen), относительную экспрессию каждой микроРНК рассчитывали по формуле $2^{-\Delta Ct}$, где Ct - пороговый уровень сигнала амплификации, а $\Delta Ct = (Ct_{\text{микроРНК}} - Ct_{\text{референсной микроРНК}})$.

Исследование морфологии миокарда УЛП и УПП проведено на светооптическом и ультраструктурном уровнях. Фрагменты миокарда УЛП и УПП фиксировали формалином, обрабатывали по стандартной методике, заливали в парафин. Парафиновые срезы, толщиной 4-5 мкм окрашивали гематоксилином-эозином, полуколичественно по 4-х-балльной шкале оценивали распространенность липоматоза в миокарде предсердий: 0 - жировые клетки отсутствуют; 1 - единичные жировые клетки; 2 - единичные жировые клетки или небольшие их скопления в нескольких полях зрения; 3 - крупные скопления жировых клеток. На препаратах, окрашенных Массон трихромом (Bio-Optica) при увеличении $\times 100$ оценивали в процентах долю фиброза с использованием морфометрической программы ImagePro (Media Cybernetics, USA). Для выявления амилоидоза предсердий парафиновые срезы окрашивали Сириус красным (BioVitrum) и полуколичественно по 5-балльной шкале оценивали содержание депозитов амилоида: 0 - отложения отсутствуют; 1 - отмечены вокруг единичных кардиомиоцитов (КМЦ); 2 - вокруг небольших групп КМЦ; 3 - вокруг половины КМЦ и единичных сосудов; 4 - вокруг более 75% КМЦ и сосудов.

Для приготовления полутонких и ультратонких срезов небольшие фрагменты миокарда фиксировали в растворе 2,5% глютарового альдегида и 1% параформальдегида в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4), дофиксировали в 1,5% растворе четырехоксида осмия, обезвоживали, заливали в аралдит. Полутонкие срезы окрашивали по методу ШИК с докраской метиленовым синим. На продольных срезах, проходящих через ядро, не менее чем в 50 КМЦ для каждого больного на светомикроскопическом уровне при увеличении $\times 1000$ измеряли диаметр и длину КМЦ. В этих же КМЦ полуколичественно по 4-х-балльной шкале определяли размеры зон саркоплазмы, свободных от миофибрилл, которые составляли менее 10% (0), 10-50% (1), 50% (2) и более 50% (3) площади среза клетки. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, исследовали в электронном микроскопе Philips CM100 (Нидерланды).

Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 8.0. Соответствующие клинические, морфометрические и молекулярно-биологические данные пациентов с ДПФП и СР сравнивали с использованием непараметрического критерия

Манн-Уитни при уровне значимости $p < 0,05$. В группе с ДПФП определяли взаимосвязь между параметрами с использованием непараметрического коэффициента корреляции Спирмена (значения γ и ρ приведены в соответствующих таблицах) при $p < 0,05$.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ экспрессии 9 микроРНК выявил у пациентов с ДПФП в миокарде УЛП достоверное повышение экспрессии miR-208a в 44,2 раза по сравнению с группой с СР ($p < 0,05$), а также повышение экспрессии miR-208b (в УЛП - в 2,8 раза и в УПП - в 3,8 раза) по сравнению с группой с СР ($p < 0,05$) (табл. 2). При сравнении экспрессии микроРНК в УЛП и УПП различия были обнаружены только для miR-208a в группе с СР (УПП > УЛП, $p < 0,05$).

Анализ корреляций между экспрессией микроРНК и процессами структурного ремоделирования выявил взаимосвязь между определенными микроРНК (miR-208a, miR-195, miR-499, miR-29a, miR-133b) и выраженностью фиброза миокарда УЛП. Кроме этого, экспрессия нескольких микроРНК УЛП была повышена у пациентов с увеличенным размером ЛП и гипертрофией КМЦ (miR-208b), с дилатацией фиброзного кольца МК (miR-208b и miR-499). Также обнаружена обратная корреляция экспрессии микроРНК с выраженностью изолированного амилоидоза предсердий (miR-499-УЛП и miR-21-УЛП) (табл. 3).

Морфометрическое исследование препаратов миокарда УЛП и УПП, окрашенных по Массону, вы-

Таблица 2.

Уровень экспрессии микроРНК

	УЛП/ УПП	СР микроРНК, медиана, $2^{-\Delta Ct}$	ДПФП микроРНК, медиана, $2^{-\Delta Ct}$	p^*
miR-1	УПП	125,26	186,15	0,69
	УЛП	132,47	171,05	0,98
miR-133a	УПП	52,20	83,01	0,61
	УЛП	46,29	81,13	0,42
miR-133b	УПП	24,02	14,21	0,98
	УЛП	23,96	12,67	0,51
miR-208a	УПП	8,52	8,94	0,66
	УЛП	0,19	8,48	0,00
miR-208b	УПП	0,72	2,79	0,02
	УЛП	0,30	0,84	0,03
miR-195	УПП	16,09	13,03	0,78
	УЛП	13,43	12,28	0,81
miR-499	УПП	7,10	5,80	0,98
	УЛП	3,76	4,42	0,61
miR-29a	УПП	8,63	14,30	0,48
	УЛП	6,21	10,70	0,27
miR-21	УПП	25,98	19,19	0,53
	УЛП	24,06	19,47	0,58

здесь и далее, УЛП и УПП - ушко левого и правого предсердия, * - критерий Манна-Уитни

явило значительные колебания содержания фиброза как в группах с ДПФП, так и в группе с СР (табл. 4; рис. 1а). Выраженность фиброза в УЛП не отличалась между группами с ДПФП и СР, а в УПП пациентов с ДПФП даже была достоверно ниже, чем в группе с СР ($p < 0,05$). Кроме того, в интерстиции УЛП и УПП регистрировали как единичные жировые клетки, так и крупноочаговые их скопления (рис. 1б) как в группе с ДПФП, так и в группе с СР (табл. 4).

Окрашивание препаратов Сириус красным выявило в миокарде предсердий депозиты амилоида (рис. 1в). Наибольшее отложение амилоида отмечено в субэндомиокарде предсердий. Депозиты амилоида регистрировали в инвагинациях сарколеммы КМЦ, в интерстиции вокруг КМЦ и в стенках мелких интрамиокардиальных сосудов. На ультраструктурном уровне амилоидные массы были представлены скоплением хаотично расположенных прямых неветвящихся фибрилл (диаметр 8-10 нм) (рис. 1г). Амилоид наблюдали в миокарде УЛП пациентов с ДПФП и в миокарде обоих предсердий пациентов с ДПФП и СР, без достоверной разницы между УЛП и УПП (табл. 4). Депозиты амилоида чаще регистрировали в миокарде предсердий у женщин (УЛП: $r=0,47$; $p=0,038$). Выраженность амилоидоза прямо коррелировала с гипертрофией КМЦ (УЛП: $r=0,44$; $p=0,038$), утратой в КМЦ миофибрилл (УПП: $r=0,58$; $p=0,009$), обратно коррелировала фиброзом в миокарде (УПП: $r=-0,59$; $p=0,016$) и липоматозом (УПП: $r=-0,56$; $p=0,012$) (табл. 4).

В миокарде обоих предсердий пациентов с ДПФП выявлена умеренная гипертрофия КМЦ: диаметр КМЦ УЛП не отличался от диаметра КМЦ пациентов группы с СР, а диаметр КМЦ УПП - достоверно превышал соответствующий показатель у пациентов группы СР ($p < 0,05$) (табл. 4). Во многих КМЦ пациентов с ДПФП наблюдали обширные зоны саркоплазмы, не содержащие миофибрилл. В таких КМЦ остатки сократительного материала располагались под сарколеммой, в то

время как остальная саркоплазма была заполнена многочисленными митохондриями, гранулами гликогена, цистернами гранулярного эндоплазматического ретикулула (рис. 1д-ж). У пациентов с ДПФП увеличение диаметра КМЦ УЛП положительно коррелировало с дилатацией фиброзного кольца МК, увеличением размера ЛП, увеличением доли интерстициального фиброза в УЛП и выраженностью изолированного амилоидоза предсердий ($p < 0,05$, табл. 4). Кроме того, у пациентов с большей продолжительностью ФП в анамнезе отмечено увеличение длины КМЦ УЛП ($p < 0,05$, табл. 4). Увеличение диаметра КМЦ УПП коррелировало с дилатацией фиброзного кольца трехстворчатого клапана и утратой в КМЦ миофибрилл, причем наиболее выраженную утрату миофибрилл в КМЦ УПП регистрировали у пациентов с изолированным амилоидозом предсердий ($p < 0,05$, табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сравнительный анализ экспрессии 9 микроРНК выявил достоверное повышение экспрессии miR-208a/b при ФП по сравнению с экспрессией этих микроРНК в группе сравнения. Полученные результаты предполагают активное участие именно miR-208a/b в процессах аритмогенного ремоделирования миокарда предсердий. В то время как данные других исследователей о роли miR-208 при ФП противоречивы. Так, в работе [29] отмечено повышение экспрессии miR-208b (в 4,2 раза) и miR-21 (в 1,9 раза) в миокарде предсердий пациентов с постоянной и персистирующей ФП по сравнению с группой с СР, однако [38] наблюдали снижение экспрессии miR-208a при ФП. На модели сердечной недостаточности, вызванной перегрузкой объемом, продемонстрировано увеличение экспрессии miR-208a в миокарде ЛЖ [44]. Кроме того, у пациентов с ФП выявлено повышение экспрессии miR-1 [4], но снижение уровня экспрессии miR-133 и miR-21, по сравнению с пациентами без ФП [10]. В то же время в плазме пациентов с персистирующей ФП отмечено повышение уровня экспрессии miR-21 [25].

По данным литературы, в плазме здоровых людей miR-208a, miR-1, miR-499, miR-133a не были обнаружены [8, 46], однако длительная нагрузка (ходьба 42 км) приводила к достоверному возрастанию уровня экспрессии этих микроРНК непосредственно после нагрузки и восстановлением исходного уровня спустя 24 часа [8]. При развитии инфаркта миокарда содержание miR-208a в плазме повышено, считается, что эта микроРНК может служить маркером инфаркта миокарда с высокой степенью чувствительности (90,9%) и специфичности (100%) [46]. Повышение экспрессии других микроРНК (miR-1,

Таблица 3.

Экспрессия микроРНК и клинико-морфологические параметры у пациентов с ДПФП

Морфологические параметры	МикроРНК (коэффициент корреляции Спирмена, р)
Дилатация фиброзного кольца МК	↑ miR-208b УЛП ($r=0,45$; $p=0,03$); ↑ miR-499 УЛП ($r=0,46$; $p=0,02$)
Размер ЛП	↑ miR-208b УЛП ($r=0,56$; $p=0,01$)
Фиброз	↑ miR-499 УЛП ($r=0,57$; $p=0,01$); ↑ miR-133b УЛП ($r=0,47$; $p=0,05$); ↑ miR-208a УЛП ($r=0,48$; $p=0,04$); ↑ miR-195 УЛП ($r=0,52$; $p=0,03$); ↑ miR-29a УЛП ($r=0,63$; $p=0,01$)
Липоматоз	↑ miR-133b УПП ($r=0,62$; $p=0,00$)
Изолированный амилоидоз предсердий	↓ miR-499 УЛП ($r=-0,48$; $p=0,03$); ↓ miR-21 УЛП ($r=-0,59$; $p=0,01$)
Гипертрофия кардиомиоцитов	↑ miR-208b УПП ($r=0,44$; $p=0,05$); ↑ miR-208b УЛП ($r=0,43$; $p=0,05$)
Утрата миофибрилл в кардиомиоцитах	↑ miR-21 УПП ($r=0,45$; $p=0,04$)

где, МК - митральный клапан

miR-499, miR-133a) при инфаркте миокарда не столь значительно и степень чувствительности этих маркеров ниже (miR-1-33,3%; miR-499 - 36,4%; miR-133a -

15,2%) [46]. Показательно, что повышение экспрессии miR-208a, miR-133a отмечается спустя 1-2 сутки после трансплантации сердца [45]. Динамические изменения

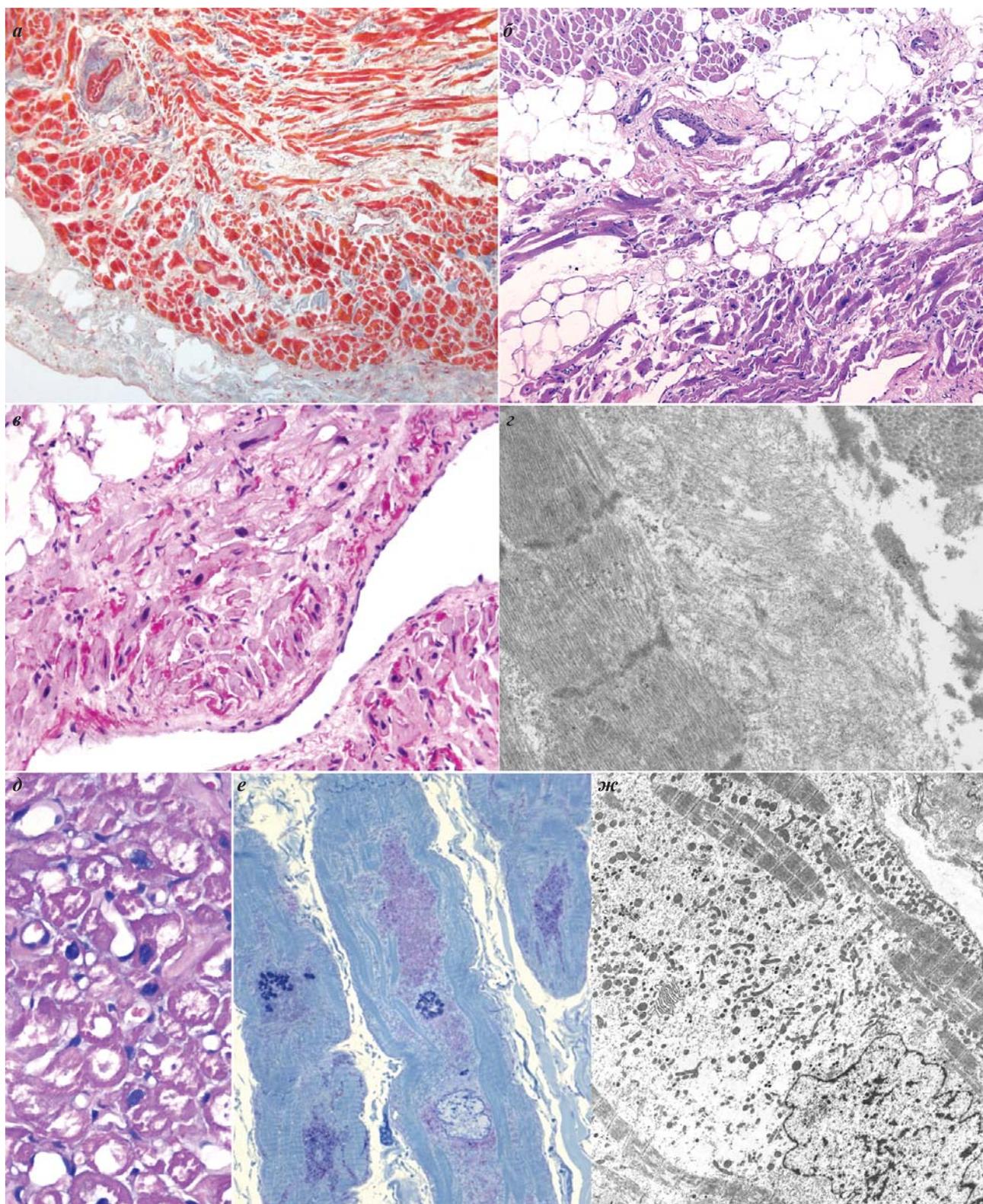


Рис. 1. Особенности морфологии миокарда предсердий пациентов с ДПФП: а - выраженный интерстициальный и периваскулярный фиброз (Массон-трихром, $\times 100$); б - липоматоз (гематоксилин-эозин, $\times 100$); в - изолированный амилоидоз предсердий при окраске Сириус красным ($\times 200$); г - ультраструктура фибрилл амилоида (электронная микроскопия, $\times 15000$); д - явление частичной утраты миофибрилл в кардиомиоцитах при разных методах обработки материала - оптически пустые зоны саркоплазмы при окрашивании гематоксилином-эозином ($\times 400$), е - гранулы гликогена, липофусцин при окраске ШИК-метиленовым синим полутонких срезов ($\times 1000$), ж - мелкие полиморфные митохондрии, гранулы гликогена, гранулярный эндоплазматический ретикулум в околоядерной зоне кардиомиоцитов (электронная микроскопия, $\times 2800$).

экспрессии miR-208a, miR-133a, miR-133b в течение 2-х недель после трансплантации сердца коррелировали с уровнем сердечного тропонина I в плазме крови, что позволило авторам рассматривать эти микро РНК в качестве адекватных маркеров ранних повреждений миокарда после трансплантации сердца [45].

Уровень экспрессии miR-208b и miR-499 также был повышен в плазме пациентов с острым коронарным синдромом и у пациентов с инфарктом миокарда (с подъемом ST-зубца и без него), по сравнению с больными без инфаркта миокарда (со стабильной и нестабильной стенокардией) и коррелировал с содержанием тропонина Т (спустя 3, 10 и 20 часов после операции) и со снижением фракции выброса ЛЖ [16]. Экспрессия miR-208b в плазме была значительно повышена у пациентов спустя 4-48 часов после развития инфаркта миокарда по сравнению с нормой. Таким образом, экспрессия miR-208b может рассматриваться в качестве потенциального маркера инфаркта миокарда, даже в случае инфаркта без подъема зубца ST [22].

Для определения роли отдельных микроРНК в развитии аритмогенеза в настоящей работе исследова-

ли взаимосвязь изменения спектра кардиоспецифических микроРНК с особенностями морфологии предсердий у больных с ДПФП. Так, нами выявлена высокая экспрессия miR-208a, miR-195, miR-499, miR-29a, miR-133b при выраженном фиброзе миокарда предсердий. Кроме того, уровень miR-208b коррелировал с увеличением размера ЛП и гипертрофией КМЦ ЛП, а miR-208b и miR-499 - с дилатацией фиброзного кольца МК. Очевидно, что обе изоформы miR-208 (miR-208a/b) активно вовлечены в регуляцию процессов структурного ремоделирования миокарда предсердий при ФП.

По данным литературы, miR-208a, которая кодируется интроном тяжелой цепи α -миозина, необходима не только для развития гипертрофии КМЦ и фиброза миокарда при гипотиреозидизме у взрослых мышей [9, 43], но и для обеспечения адекватной электрической проводимости миокарда [9]. У мышей, мутантных по miR-208a (miR-208a^{-/-}), в отличие от мышей дикого типа, снижена экспрессия тяжелых цепей β -миозина, но повышена экспрессия α -миозина, что приводит к уменьшению сократительной активности миокарда [9, 43]. Известно, что у этих

Таблица 4.

Морфологические параметры миокарда УЛП и УПП пациентов с СР и ДПФП, клиничко-морфологические корреляции в группе с ДПФП

Морфологические параметры	УЛП/УПП	СР	ДПФП	ДПФП (коэффициент Спирмена, $p < 0,05$)
Фиброз, Ме (min-max), %	УЛП	42,5 (38,8-42,6)	46,9 (13,2-60,1)	↑ Гипертрофия кардиомиоцитов ($r=0,48$; $p=0,036$)
	УПП	59,2 (54,2-60,3)	50,3 (22,3-74,7)*	↓ Размер ЛП ($r=-0,54$; $p=0,029$); ↓ Дилатация ТК ($r=-0,48$; $p=0,049$); ↓ Изолированный амилоидоз предсердий ($r=-0,59$; $p=0,016$)
Липоматоз, % пациентов	УЛП	33,3	52,6	-
	УПП	20	21,1	↓ Изолированный амилоидоз предсердий ($r=-0,56$; $p=0,012$)
Изолированный амилоидоз предсердий, % пациентов	УЛП	0	47,7	↑ Женский пол ($r=0,47$; $p=0,038$); ↑ Гипертрофия кардиомиоцитов ($r=0,44$; $p=0,038$)
	УПП	25	42,9	↑ Утрата миофибрилл в кардиомиоцитах ($r=0,58$; $p=0,009$); ↓ Фиброз ($r=-0,59$; $p=0,016$); ↓ Липоматоз ($r=-0,56$; $p=0,012$)
Гипертрофия кардиомиоцитов (диаметр клеток), мкм	УЛП	15,7 \pm 2,8	16,1 \pm 2,4	↑ Размер ЛП ($r=0,45$; $p=0,036$); ↑ Дилатация кольца МК ($r=0,74$; $p=0,0001$); ↑ Фиброз ($r=0,48$; $p=0,036$); ↑ Изолированный амилоидоз предсердий ($r=0,44$; $p=0,038$)
	УПП	12,6 \pm 2,3	16,0 \pm 2,3*	↑ Дилатация кольца ТК ($r=0,45$; $p=0,037$); ↑ Длина кардиомиоцитов ($r=0,69$; $p=0,0015$); ↑ Утрата миофибрилл в кардиомиоцитах ($r=0,63$; $p=0,002$)
Утрата миофибрилл в кардиомиоцитах (миолиз)**, % пациентов	УЛП	0	38,1	-
	УПП	37,5	50	↑ Изолированный амилоидоз предсердий ($r=0,58$; $p=0,009$); ↑ Гипертрофия кардиомиоцитов ($r=0,63$; $p=0,002$)

где, * - достоверное отличие от группы с СР (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$), ** - составляет 10-50% и более объема саркоплазмы

животных (miR-208a^{-/-}) также снижена экспрессия белка щелевых контактов Sx40, отвечающего за проведение электрических импульсов, что индуцирует развитие аритмии [9]. На модели сердечной недостаточности, вызванной перегрузкой объемом, также была продемонстрирована корреляция экспрессии miR-208a с фиброзом и гипертрофией миокарда ЛЖ [44]. Напротив, ингибирование активности miR-208a (путем подкожного введения анти-miR-208a) на модели хронической гипертензии и диастолической сердечной недостаточности у крыс приводило к достоверному снижению уровня гипертрофии КМЦ и периваскулярного фиброза в миокарде [28].

В литературе активно обсуждается участие и других микроРНК в регуляции процессов структурного ремоделирования миокарда, исследованных в настоящей работе. Так, в эксперименте на собаках с индуцированным фиброзом и ФП в миокарде предсердий было выявлено снижение экспрессии miR-133 [23]. Также обнаружена положительная корреляция miR-1 [4] и miR-21 [29] с фиброзом миокарда предсердий пациентов с ФП.

Развитие ФП сопровождается структурными изменениями в ткани предсердий. Высокий уровень фиброза и появление зон липоматоза в миокарде предсердий принято считать одними из возможных причин возникновения и/или поддержания ФП [2, 11, 12, 15, 31, 33, 34, 36, 37]. Известно, что при ФП происходит увеличение объемной фракции коллагена I типа в миокарде [47]. Разрастание соединительной ткани способствует изоляции отдельных КМЦ и групп клеток, приводит к нарушению межклеточных взаимодействий и отрицательно влияет на электрическую проводимость миокарда. Описано достоверное увеличение в 3-5 раз степени фиброза в предсердиях пациентов с ФП по сравнению с пациентами без ФП [5, 29, 31, 34, 41]. В настоящем исследовании также выявлен высокий уровень интерстициального и периваскулярного фиброза и липоматоза миокарда УЛП как в группе с ФП. Интересно, что нам не удалось обнаружить различий между этими параметрами в миокарде УЛП пациентов с ФП и пациентов с СР.

Более того, в миокарде УПП пациентов с ФП, по нашим данным, доля фиброза была достоверно ниже, чем в группе с СР. (табл. 4). Подобное отсутствие различий в содержании коллагенов I и III типов в миокарде предсердий пациентов с ДПФП по сравнению с группой с СР (пациенты с ИБС, клапанной патологией) было описано ранее [39]. Степень интерстициального фиброза в УПП и УЛП, по нашим данным, не коррелировала с возрастом пациентов, так же, как описано в работах [31, 34, 41]. Можно предположить, что увеличение интерстициального и периваскулярного фиброза является механизмом преобразования структуры миокарда предсердий в условиях перегрузки, непосредственно не связанным с инициацией ФП.

Присутствие депозитов амилоида описано в миокарде предсердий пациентов с разными типами предсердных аритмий [3, 6, 21, 32] с дефектом межпредсердной перегородки [26] у пациентов с ревматической болезнью сердца и пороками клапанов [2, 21, 26, 27,

32]. Скопление фибрилл амилоида вокруг КМЦ нарушает межклеточные контакты между миоцитами [14], индуцирует дилатацию каналов Т-системы КМЦ [2, 14, 18, 40]. Методом иммуногистохимии показано, что белок амилоида в миокарде УЛП и УПП при изолированной форме ФП представлен фибриллярной формой ANP [6, 3, 18, 19, 20, 32, 40]. По-видимому, отложение ANP в виде фибрилл в интерстиции миокарда предсердий свидетельствует о нарушении метаболизма этого пептида в ткани и может служить одним из объяснений снижения уровня ANP в плазме пациентов с длительной формой ФП [42]. Проведенный корреляционный анализ обнаружил в группе с ДПФП положительную взаимосвязь между выраженностью амилоидоза в УЛП и гипертрофией КМЦ, а также с фиброзом (УПП), подобно описанному ранее [3, 32].

Увеличение диаметра КМЦ предсердий, выявленное в настоящей работе, также было описано ранее у пациентов с ФП, а также у пациентов с ФП в сочетании с патологией МК [2, 5, 11, 12, 15, 34, 36, 37]. Степень гипертрофии КМЦ предсердий не превышала данных, представленных в литературе для КМЦ ПП [31, 36] и ЛП [5, 11, 31] пациентов с ФП. Только в УПП, по нашим данным, выявлено достоверное увеличение диаметра КМЦ по сравнению с группой с СР (табл. 4). Очевидно, КМЦ УЛП пациентов с группы сравнения (с аортальным пороком) тоже были гипертрофированы. Кроме того, у пациентов с ДПФП нами было выявлено достоверное увеличение длины КМЦ УЛП по сравнению с СР. Такой тип гипертрофии КМЦ с преимущественным увеличением длины КМЦ может объяснять развитие дилатации ЛП, характерной для миокарда предсердий пациентов с ФП.

Преобразование структуры КМЦ с частичной утратой миофибрилл и заполнением свободных зон саркоплазмы гранулами гликогена и митохондриями подробно описано в миокарде предсердий при ФП на световом и электронно-микроскопическом уровне [5, 11, 12, 15, 33, 36, 37], а также в эксперименте с индуцированной ФП у коз [7, 13]. В настоящее время подобные изменения рассматривают в качестве адаптивных, сопровождающихся частичным понижением уровня дифференцировки КМЦ [7, 13]. Сравнительный анализ клинико-морфологических корреляций в группе с ДПФП выявил положительную взаимосвязь между утратой миофибрилл в КМЦ с изолированным амилоидозом предсердий и гипертрофией КМЦ. Увеличение диаметра КМЦ было отмечено у пациентов с дилатацией ЛП, увеличенным размером фиброзного кольца МК, нарастанием интерстициального фиброза в УЛП. Подобная взаимосвязь между гипертрофией КМЦ, увеличением размеров и формы ядер КМЦ и увеличением доли фиброза ранее была описана в миокарде УЛП пациентов с хронической ФП [34].

Таким образом, в настоящем исследовании было продемонстрировано активное участие целого ряда микроРНК в регуляции процессов, определяющих аритмогенное структурное ремоделирование миокарда предсердий у пациентов с ДПФП (липоматоз, изолированный амилоидоз предсердий, гипертрофия КМЦ с явлениями частичной утраты миофибрилл). Анализ

клинико-морфологических корреляций определил ряд микроРНК (miR-208a, miR-195, miR-499, miR-29a, miR-133b), регулирующих развитие фиброза у паци-

ентов с ДПФП. Наиболее активная роль в регуляции процессов аритмогенного ремоделирования миокарда предсердий принадлежит miR-208a/b.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ревишвили А.Ш., Сергуладзе С.Ю., Кваша Б.И. с соавт. Ближайшие и отдаленные результаты хирургического лечения «изолированных» форм фибрилляции предсердий с помощью радиочастотной модификации операции «Лабиринт-V» // Вестник аритмологии. 2016; 83: 23-31.
2. Митрофанова Л.Б., Кудайбергенова А.Г., Антонова И.В. Фибрилляция предсердий, амилоидоз, миокардит и вирусная инфекция // Артериальная гипертензия. 2009; 15(2): 203-208.
3. Сухачева Т.В., Еремеева М.В., Ибрагимова А.Г. с соавт. Изолированный амилоидоз предсердий у пациентов с разными формами фибрилляции предсердий // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015; 12: 821-7.
4. Adam O., Löhlfelm B., Thum T. et al. Role of miR-21 in the pathogenesis of atrial fibrosis // Basic Res Cardiol. 2012; 107(5): 278.
5. Anné W., Willems R., Roskams T. et al. Matrix metalloproteinases and atrial remodeling in patients with mitral valve disease and atrial fibrillation // Cardiovasc Res. 2005; 67(4): 655-66.
6. Ariyaratnam V., Steiner I., Hájková P. et al. The association of atrial tachyarrhythmias with isolated atrial amyloid disease: preliminary observations in autopsied heart specimens // Cardiology. 2009; 113: 132-137.
7. Ausma J., Wijffels M., Thoné F. et al. Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat // Circulation. 1997; 96(9): 3157-63.
8. Baggish A.L., Park J., Min P.K. et al. Rapid upregulation and clearance of distinct circulating microRNAs after prolonged aerobic exercise // J Appl Physiol (1985). 2014 Mar 1; 116(5): 522-31. doi: 10.1152/jappphysiol.01141.2013.
9. Callis T.E., Pandya K., Seok H.Y. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice // J Clin Invest. 2009; 119(9): 2772-86.
10. Cooley N., Cowley M.J., Lin R.C. et al. Influence of atrial fibrillation on microRNA expression profiles in left and right atria from patients with valvular heart disease // Physiol Genomics. 2012; 44(3): 211-9.
11. Corradi D., Callegari S., Benussi S., Maestri R. et al. Myocyte changes and their left atrial distribution in patients with chronic atrial fibrillation related to mitral valve disease // Hum. Pathol. 2005; 36(10): 1080-9.
12. Corradi D., Callegari S., Maestri R. et al. Differential structural remodeling of the left-atrial posterior wall in patients affected by mitral regurgitation with or without persistent atrial fibrillation: a morphological and molecular study // J. Cardiovasc. Electrophysiol. 2012; 23(3): 271-9.
13. Driesen R.B., Verheyen F.K., Debie W. et al. Re-expression of alpha skeletal actin as a marker for dedifferentiation in cardiac pathologies // J. Cell. Mol. Med. 2009; 13(5): 896-908.
14. Fidziańska A., Walczak E., Bekta P., Chojnowska L. Are cardiomyocytes able to generate pre-amyloid peptides? // Folia. Neuropathol. 2011; 49 (1): 64-70.
15. Frustaci A., Chimenti C., Bellocci F. et al. Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation // Circulation. 1997; 96(4): 1180-4.
16. Gidlöf O., Smith J.G., Miyazu K. et al. Circulating cardio-enriched microRNAs are associated with long-term prognosis following myocardial infarction // BMC Cardiovasc Disord. 2013; 13: 12.
17. Goettsch C., Hutcheson J.D., Aikawa E. MicroRNA in cardiovascular calcification: focus on targets and extracellular vesicle delivery mechanisms // Circ Res. 2013; 112(7): 1073-84.
18. Johansson B., Westermark P. The relation of atrial natriuretic factor to isolated atrial amyloid // Exp. Mol. Pathol. 1990; 52(3): 266-78.
19. Kawamura S., Takahashi M., Ishihara T., Uchino F. Incidence and distribution of isolated atrial amyloid: histologic and immunohistochemical studies of 100 aging hearts // Pathol Int. 1995; 45(5): 335-42.
20. Kaye G.C., Butler M.G., d'Ardenne A.J. et al. Isolated atrial amyloid contains atrial natriuretic peptide: a report of six cases // Br. Heart J. 1986; 56(4): 317-20.
21. Leone O., Boriani G., Chiappini B. et al. Amyloid deposition as a cause of atrial remodeling in persistent valvular atrial fibrillation // European Heart Journal. 2004; 25: 1237-1241.
22. Li C., Chen X., Huang J. et al. Clinical impact of circulating miR-26a, miR-191, and miR-208b in plasma of patients with acute myocardial infarction // Eur J Med Res. 2015; 20: 58.
23. Li H., Li S., Yu B., Liu S. Expression of miR-133 and miR-30 in chronic atrial fibrillation in canines // Mol Med Rep 2012. V. 5. P. 1457-1460.
24. Lippi G., Mattiuzzi C., Cervellin G. MicroRNAs for diagnosing myocardial infarction. Advantages and limitations // Int J Cardiol. 2013; 168(5): 4849-50.
25. Liu Z., Zhou C., Liu Y. et al. The expression levels of plasma microRNAs in atrial fibrillation patients // PLoS ONE. 2012. 7(9): e44906.
26. Looi L.M. Isolated atrial amyloidosis: a clinicopathologic study indicating increased prevalence in chronic heart disease // Hum. Pathol. 1993; 24(6): 602-7.
27. Mandache E., Gherghiceanu M., Macarie C. et al. Telocytes in human isolated atrial amyloidosis: ultrastructural remodelling // J Cell Mol Med. 2010; 14(12): 2739-2747.
28. Montgomery R.L., Hullinger T.G., Semus H.M. et al. Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure // Circulation. 2011; 124(14): 1537-47.
29. Nishi H., Sakaguchi T., Miyagawa S. et al. Impact of microRNA expression in human atrial tissue in patients with atrial fibrillation undergoing cardiac surgery // PLoS One. 2013; 8(9): e73397.
30. Oliveira-Carvalho V., da Silva M.M., Guimarães G.V. et al. MicroRNAs: new players in heart failure // Mol Biol Rep. 2013; 40(3): 2663-70.
31. Platonov P., Mitrofanova L.B., Orshanskaya V., Ho

- S.Y. Structural abnormalities in atrial walls are associated with presence and persistency of atrial fibrillation but not with age // *J Am Coll Cardiol*. 2011; 58(21): 2225-32.
32. Röcken C., Peters B., Juenemann G., et al. Atrial amyloidosis: an arrhythmogenic substrate for persistent atrial fibrillation // *Circulation*. 2002; 106(16): 2091-7.
33. Rücker-Martin C., Pecker F., Godreau D., Hatem S.N. Dedifferentiation of atrial myocytes during atrial fibrillation: role of fibroblast proliferation in vitro // *Cardiovasc. Res*. 2002; 55(1): 38-52.
34. Saito T., Tamura K., Uchida D. et al. Histopathologica features of the resected left atrial appendage as predictors of recurrence after surgery for atrial fibrillation in valvular heart disease // *Circ J*. 2007; 71(1): 70-8.
35. Santulli G., Iaccarino G., De Luca N. et al. Atrial fibrillation and microRNAs // *Front Physiol*. 2014; 5:15: 1-7.
36. Schotten U., Ausma J., Stellbrink C., et al. Cellular mechanisms of depressed atrial contractility in patients with chronic atrial fibrillation // *Circulation*. 2001; 103(5): 691-8.
37. Sharma S., Sharma G., Hote M. et al. Light and electron microscopic features of surgically excised left atrial appendage in rheumatic heart disease patients with atrial fibrillation and sinus rhythm // *Cardiovasc Pathol*. 2014; 23(6): 319-26.
38. Slagsvold K.H., Johnsen A.B., Rognmo O. et al. Mitochondrial respiration and microRNA expression in right and left atrium of patients with atrial fibrillation // *Physiol Genomics*. 2014; 46(14): 505-11.
39. Smorodinova N., Lantová L., Bláha M. et al. Bi-optic study of left and right atrial interstitium in cardiac patients with and without atrial fibrillation: interatrial but not rhythm-based differences // *PLoS One*. 2015; 10(6): e0129124.
40. Takahashi M., Hoshii Y., Kawano H. et al. Ultrastructural evidence for the formation of amyloid fibrils within cardiomyocytes in isolated atrial amyloid // *Amyloid*. 1998; 5(1): 35-42.
41. Van Brakel T.J., van der Krieken T., Westra S.W. et al. Fibrosis and electrophysiological characteristics of the atrial appendage in patients with atrial fibrillation and structural heart disease // *J Interv Card Electrophysiol*. 2013; 38: 85-93.
42. Van Den Berg M.P., Crijns H. J.G.M., Van Veldhuisen D.J. et al. Atrial natriuretic peptide in patients with heart failure and chronic atrial fibrillation: Role of duration of atrial fibrillation // *Am Heart J*. 1998; 135: 242-4.
43. van Rooij E., Sutherland L.B., Qi X. et al. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA // *Science*. 2007; 316(5824): 575-9.
44. Wang B-W., Wu G.-Jh., Cheng W.-P., Shyu K.-G. MicroRNA-208a increases myocardial fibrosis via endoglybin in volume overloading heart // *PLoS One*. 2014; 9(1): e84188.
45. Wang E., Nie Y., Zhao Q. et al. Circulating miRNAs reflect early myocardial injury and recovery after heart transplantation // *J Cardiothorac Surg*. 2013; 8: 165.
46. Wang G.K., Zhu J.Q., Zhang J.T. et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans // *Eur Heart J*. 2010; 31(6): 659-66.
47. Xu J., Cui G., Esmailian F. et al. Atrial extracellular matrix remodeling and the maintenance of atrial fibrillation // *Circulation*. 2004; 109(3): 363-8.

УЧАСТИЕ MIR208A/B В СТРУКТУРНОМ РЕМОДЕЛИРОВАНИИ МИОКАРДА ПРИ ФИБРИЛЛЯЦИИ ПРЕДСЕРДИЙ

М.В.Еремеева, Т.В.Сухачева, В.А.Васковский, Р.А.Серов, А.Ш.Ревшвили

С целью выяснения роли определенных микро рибосинуклеиновых кислот (микроРНК) в развитии и/или поддержании фибрилляции предсердий (ФП) в исследование было включено 23 взрослых пациента с длительно персистирующей (ДП) ФП и 12 пациентов группа сравнения с синусовым ритмом (СР) с пороками аортального клапана, миксомами левого предсердия (ЛП), ишемической болезнью сердца, не имевшие в анамнезе ФП. Пациенты с ДПФП подвергались радиочастотной модификации операции «лабиринт» на работающем сердце в условиях нормотермического искусственного кровообращения. Все пациенты имели показания к хирургическому лечению соответствующей патологии согласно рекомендациям ВНОА и АССХ. Интраоперационно выполняли биопсию миокарда ушек левого и правого предсердий (УЛП и УПП), исследовали их морфологию и определяли уровень экспрессии микроРНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (RT-PCR).

Анализ экспрессии 9 микроРНК выявил у пациентов с ДПФП в миокарде УЛП достоверное повышение экспрессии miR-208a в 44,2 раза по сравнению с группой с СР ($p < 0,05$), а также повышение экспрессии miR-208b (в УЛП - в 2,8 раза и в УПП - в 3,8 раза) по сравнению с группой с СР ($p < 0,05$). При сравнении экспрессии микроРНК в УЛП и УПП различия были обнаружены только для miR-208a в группе с СР (УПП > УЛП, $p < 0,05$). Анализ корреляций между экспрессией микроРНК и процессами структурного ремоделирования выявил взаимосвязь между определенными микроРНК (miR-208a, miR-195, miR-499, miR-29a, miR-133b) и выраженностью фиброза миокарда УЛП. Кроме этого, экспрессия нескольких микроРНК УЛП была повышена у пациентов с увеличенным размером ЛП и гипертрофией кардиомиоцитов (КМЦ), с дилатацией фиброзного кольца митрального клапана (ФКМК). Также обнаружена обратная корреляция экспрессии микроРНК с выраженностью изолированного амилоидоза предсердий. В миокарде обоих предсердий пациентов с ДПФП выявлена умеренная гипертрофия КМЦ. У пациентов с ДПФП увеличение диаметра КМЦ УЛП положительно коррелировало с дилатацией ФКМК, увеличением размера ЛП, увеличением доли интерстициального фиброза в УЛП и выраженностью изолированного амилоидоза предсердий. Кроме того, у пациентов с большей продолжительностью ФП в анамнезе отмечено увеличение длины КМЦ УЛП.

Таким образом, в настоящем исследовании было продемонстрировано активное участие целого ряда микроРНК в регуляции процессов, определяющих аритмогенное структурное ремоделирование миокарда предсердий у пациентов с ДПФП (липоматоз, изолированный амилоидоз предсердий, гипертрофия КМЦ с явлениями частичной утраты миофибрилл). Анализ клинико-морфологических корреляций определил ряд микроРНК (miR-208a, miR-195, miR-499, miR-29a, miR-133b), регулирующих развитие фиброза у пациентов с ДПФП. Наиболее активная роль в регуляции процессов аритмогенного ремоделирования миокарда предсердий принадлежит miR-208a/b.

ROLE OF MIR208A/B IN STRUCTURAL MYOCARDIAL REMODELING IN ATRIAL FIBRILLATION

M.V. Ereemeeva, T.V. Sukhacheva, V.A. Vaskovsky, R.A. Serov, A.Sh. Revishvili

To clarify the role of certain micro-ribonucleic acids (microRNA) in development and/or maintenance of atrial fibrillation (AF), 23 adult patients with long-lasting persistent AF and 12 control group patients with the sinus rhythm and aortic valve disease, left atrial myxoma, or coronary heart disease without history of AF were included into the study. The patients with long-lasting persistent AF underwent the radiofrequency modification of the “Labyrinth” procedure on a beating heart under the conditions of normothermic extracorporeal circulation. All patients had indications to surgical treatment of the disease in accordance with the recommendations by the Russian Scientific College of Arrhythmology and Association of Cardiovascular Surgeons. The myocardial biopsy of the left and right atrial appendages (LAA and RAA) was performed; their morphology was assessed, and the level of microRNA expression was determined using polymerase chain reaction (PCR) in the real-time mode (RT PCR).

The analysis of expression of 9 [nine] microRNAs in the LAA myocardium in the patients with long-lasting persistent AF showed a 44.2 fold increase in expression of miR 208a as compared with the sinus rhythm subjects ($p < 0.05$), as well as an increased expression of miR 208b (2.8 times in LAA and 3.8 times in RAA) as compared with the sinus rhythm subjects ($p < 0.05$). The comparison of microRNA expression in LAA and RAA showed the difference only for miR 208a in the sinus rhythm subjects (RAA > LAA, $p < 0.05$). The correlation analysis between the microRNA expression and the structural remodeling process showed the association between certain microRNAs (miR 208a, miR 195, miR 499, miR 29a, and miR 113b) and the extent of the LAA fibrosis. In addition, expression of several microRNAs in LAA was increased in patients with the dilated LA and hypertrophy of cardiomyocytes, as well as in those with the dilated fibrous ring of the mitral valve. The negative correlation of the microRNA expression with the severity of isolated atrial amyloidosis was also observed. The moderate hypertrophy of cardiomyocytes was observed in the myocardium of both atria of patients with long-lasting persistent AF. In the patients with long-lasting persistent AF, an increase in the diameter of LAA cardiomyocytes had a positive correlation with dilatation of the mitral valve fibrous ring, enlargement of the left atrium, increased extent of interstitial fibrosis in LAA, and severity of isolated atrial amyloidosis. In addition, in patients with a longer duration of the AF history, longer LAA cardiomyocytes were revealed.

Thus, the current study showed an active involvement of a number of microRNAs in the control of processes which determine the arrhythmogenic atrial structure remodeling in patients with long-lasting persistent AF (lipomatosis, isolated atrial amyloidosis, hypertrophy of cardiomyocytes with partial loss of myofibrils). The analysis of clinical and morphological correlations revealed a number of microRNAs (miR 208a, miR 195, miR 499, miR 29a, and miR 113b) controlling development of fibrosis in patients with long-lasting persistent AF. The most active role in the control of arrhythmogenic atrial myocardial remodeling belongs to miR 208a/b.