

Т.В. Сухачева, Б.У. Абдувохидов, А.С. Лашнева, Р.А. Серов, А.И. Ким, Л.А. Бокерия

Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН, Москва, Российская Федерация

## Клинико-морфологические параллели в патологии митрального клапана у детей раннего возраста с открытым атриовентрикулярным каналом

Было проведено исследование биоптатов створок митрального клапана у детей в возрасте от 1 мес до 3 лет с полной (13 больных) и неполной (6 больных) формой открытого атриовентрикулярного канала. Биопсийный материал получен во время повторной операции на митральном клапане, проведенной в период от 2 дней до 1 года после радикальной коррекции порока в связи с сохранением остаточной регургитации 3–4-й степени на митральном клапане.

При выполнении гистологического исследования в створках митрального клапана этих больных обнаружили очаги миксоматозно измененной ткани, которые занимали более 50% площади створок митрального клапана у 6 (32%) из 19 больных. В этих очагах хаотично располагались клетки звездчатой формы, была нарушена архитектура эластических волокон, отмечено скопление кислых мукополисахаридов и повышенное содержание матриксной металлопротеиназы 13. Размеры очагов прямо коррелировали со степенью регургитации на митральном клапане.

После радикальной коррекции открытого атриовентрикулярного канала на створках и фиброзном кольце митрального клапана швы «прорезывались» достоверно чаще у больных с большей площадью зон миксоматозной дегенерации ткани створок клапана, что свидетельствовало о неблагоприятном прогностическом значении этого параметра.

По ультраструктурным признакам большинство клеток створок митрального клапана относилось к фибробластическому ряду; также были обнаружены клетки с признаками миогенной дифференцировки — миофибробласты и единичные гистиоциты. Иммуногистохимический фенотип клеток створок клапана соответствовал фибробластической и эндотелиальной дифференцировке; у некоторых больных встречались клетки гладкомышечного происхождения.

**Ключевые слова:** открытый атриовентрикулярный канал, митральный клапан, миксоматозная дегенерация, иммуногистохимический фенотип клеток.

(Вестник РАМН. 2012; 10: 18–28).

18

T.V. Sukhacheva, B.U. Abduvokhidov, A.S. Lashneva, R.A. Serov, A.I. Kim, L.A. Bokeriya

A.N. Bakoulev Scientific Centre for Cardiovascular Surgery, RAMS, Moscow, Russian Federation

## Clinical and Morphological Parallels in Mitral Valve Disorders in Infants with Atrioventricular Defect

Mitral valves tissue samplings from children with complete (13 patients) and partial (6 patients) atrioventricular defects at the age of from 1 month to 3 years old were examined. The biopsy material was received during the repeat surgical operation on mitral valve, performed due to residual mitral valve regurgitation grade 3–4 at the period of time from 2 days to 1 year after radical defect correction.

On histological examination the areas of myxomatous tissue degeneration occupying more than 50% of mitral valves surface were found in 6 (32%) of the 19 patients. There were dispersed star-shaped cells, architectonics disturbances, deposition of acid mucopolysaccharides and increased content of matrix metalloproteinase 13 in such areas of myxomatous degeneration. The sizes of these areas correlated with mitral valve regurgitation grade.

After the radical correction of atrioventricular defect the sutures on the folds and fibrous ring of the mitral valve “cut through” reliably more often in patients with wider areas of myxomatous degeneration, which indicates poor prognosis.

According to the ultrastructural classification the majority of mitral valve cells regarded as fibroblasts; there also were found cells with the signs of myogenic differentiation — myofibroblasts and isolated hystiocytes. According to the immunohistochemistry assay the cells phenotype regarded as fibroblastic and endothelial differentiation; in some patients there were found cells of smooth muscle origin.

**Keywords:** atrioventricular defect, mitral valve, myxomatous degeneration, immunohistochemical cells phenotype.

(Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2012. 10: 18–28).

## Введение

Дисплазия соединительной ткани у детей с врожденной недостаточностью митрального клапана (МК) — одна из причин, приводящих к рецидиву его недостаточности после реконструктивных операций на сердце. У больных с врожденной дисплазией соединительной ткани регистрируют утолщение створок МК, появление в нем очагов миксоматозно измененной ткани с ремоделированием внеклеточного матрикса, в т.ч. с нарушением структуры и расположения эластических волокон [1]. Утолщение створок миксоматозно измененного МК связывают с увеличением губчатого слоя (*spongiosa*) створки МК, в котором избыточно накапливаются протеогликаны (декорин, бигликан, версикан) [2, 3]. В ответ на гемодинамическую нагрузку в МК таких больных происходит дилатация фиброзного кольца, истончение и разрыв хорд, что требует хирургической коррекции. Вместе с тем рыхлая соединительная ткань створки МК, не обладающая необходимыми механическими свойствами, у части больных уже в первые дни после операции не выдерживает гемодинамической нагрузки и начинает «прорезываться» при натяжении швов [4]. В связи с этим у 21,2% пациентов раннего возраста с открытым атриовентрикулярным каналом (АВК) реконструктивные операции на МК оказываются неэффективными, и возникает необходимость повторного хирургического вмешательства для протезирования МК [5]. Выявление гистологического субстрата, определяющего свойства ткани МК и ее состоятельность при работе в условиях повышенной гемодинамической нагрузки, представляется важным для определения хирургической тактики лечения детей раннего возраста с открытым АВК.

**Цель работы:** установить морфологические особенности ткани створок МК у детей раннего возраста с открытым АВК и проанализировать полученные данные при их сопоставлении с клинико-функциональными параметрами пациентов.

## Пациенты и методы

### Участники исследования

В исследование были включены 19 больных с неполной (6 больных, 31,6%) и полной формами открытого АВК (13 больных, 68,4%). В группе пациентов с общим открытым АВК, в соответствии с классификацией Растелли [6], у 8 (61,6%) больных выявлен тип А, у 1 (7,6%) больного — тип В и у 4 (30,8%) больных — тип С АВК. Возраст пациентов варьировал от 1 мес до 3 лет, среди них было 8 мальчиков и 11 девочек. Всем больным спустя 2 дня — 1 год после радикальной коррекции порока была проведена повторная операция, причиной которой стала остаточная регургитация (3–4-й степени) на МК. Во время повторной операции трем больным с полной формой открытого АВК и двум — с неполной была выполнена повторная пластика МК с дозированной аннулопластикой с применением полоски «Gore-Tex» (США). 14 (74%) детям было произведено протезирование МК механическим клапаном в связи с грубыми морфологическими изменениями клапанного аппарата.

Состояние всех пациентов было расценено как тяжелое. У 10 (52,6%) детей недостаточность кровообращения соответствовала IIб, а у 9 (47,4%) — III стадии. У всех наблюдаемых после радикальной коррекции АВК аускультативно выслушивался систолический шум

митральной регургитации над верхушкой сердца, распространяющийся в левую подмышечную область и на спину, в межлопаточную область. У 5 (26,3%) больных с сочетанием стеноза и недостаточности МК одновременно выслушивался систолический и мягкий диастолический шум с превалированием систолического компонента, что свидетельствовало о гемодинамическом преобладании недостаточности МК.

При электрокардиографическом исследовании у всех детей диагностировали признаки комбинированной гипертрофии миокарда предсердий и желудочков. У 7 (37%) больных зарегистрировано замедление атрио-вентрикулярной проводимости, а у 2 (10%) отмечена полная поперечная блокада.

На рентгенограммах органов грудной клетки у 16 (84%) человек без стеноза легочной артерии были определены признаки выраженной гиперволеии легких с легочной гипертензией. Во всех случаях отмечена выраженная кардиомегалия. Увеличение кардиоторакального индекса (КТИ) I степени выявлено у 1 (5%), II степени — у 4 (21%), III степени — у 14 (74%) пациентов. Среднее значение КТИ составило  $62,5 \pm 4,5\%$ .

По данным эхокардиографии, у всех наблюдаемых фракция регургитации на МК превышала 75%. Регургитация на МК варьировала от 3+ до тотальной недостаточности. Фиброзное кольцо МК было дилатировано, его размер достигал 172,8% от возрастной нормы. Размер левого предсердия превышал возрастную норму в 2 и более раз, конечный систолический и конечный диастолический размер левого желудочка были увеличены на 40–65% от возрастной нормы. Среднее давление в системе легочной артерии у 4 (21%) пациентов было выше 50 мм рт.ст.

В качестве группы сравнения были исследованы створки и фиброзные кольца МК у 16 доношенных новорожденных, умерших от причин, не связанных с заболеваниями сердечно-сосудистой системы.

### Методы исследования

Полученные интраоперационно биоптаты створок и фиброзных колец МК фиксировали в 4% параформальдегиде (Immunofix, Bio-Optica, Италия), заливали в парафин, изготавливали парафиновые срезы толщиной 5 мкм. На светооптическом уровне исследовали морфологию соединительной ткани в створках МК. Для идентификации кислых мукополисахаридов препараты окрашивали альциановым синим с докраской реактивом Шиффа (Bio-Optica, Италия). Размеры очагов миксоматозно измененной ткани, содержащих кислые мукополисахариды, оценивали по 4-балльной шкале: 0 — зон миксоматоза не обнаружено; 1, 2 и 3 — зоны миксоматоза занимают менее 10, от 10 до 50 и более 50% площади ткани створки или фиброзного кольца МК, соответственно. Архитектонику эластических волокон изучали на препаратах, окрашенных по Вейгерту (Bio-Optica, Италия).

Методами иммуногистохимии определяли фенотип клеток створок МК. После депарафинирования срезы обрабатывали 3% раствором перекиси водорода и инкубировали с антителами к виментину (Vim) (ДАКО, Дания), маркеру эндотелия CD34 (Novocastra, Великобритания), десмину (Desm) (ДАКО, Дания), гладкомышечному  $\alpha$ -актину (SMA) (Novocastra, Великобритания), матриксной металлопротеиназе 13 (MMP13) (Acris, Германия), далее использовали детектирующую систему EnVision (ДАКО, Дания). После реакции с диаминобензидином срезы докрасивали гематоксилином. Регистрировали клетки,

содержащие определяемые маркеры, а также полуколичественно, по 3-балльной шкале, оценивали интенсивность иммуногистохимической реакции: 0 — нет реакции; 1 — слабая реакция более чем в 50% клеток или интенсивная менее чем в 10% клеток; 2 — интенсивная реакция более чем в 50% клеток.

Для одновременного выявления в ткани нескольких иммуногистохимических маркеров (Vim, Desm, SMA и CD34) срезы депарафинировали, обрабатывали раствором трипсина (Sigma, США) для демаскировки антигенов (30 мин при 37 °С) и инкубировали в течение 1 ч с раствором, блокирующим неспецифические реакции (5% бычий сывороточный альбумин, 0,5% тритон X100, 0,01% азид натрия на 0,1 М фосфатном буфере с pH 7,4). Затем в течение 2 ч препараты инкубировали со смесью (1:1:1) первичных антител к Vim (Chemicon, США), Desm (Abcam, Великобритания) и SMA (Novocastra, Великобритания) или со смесью (1:1:1) первичных антител к Vim (Chemicon, США), Desm (Abcam, Великобритания) и CD34 (Novocastra, Великобритания). Далее срезы обрабатывали смесью (1:1:1) вторичных антител (Alexa 488, Alexa 546, Alexa 633, Invitrogen, США), ядра докрашивали DAPI (Sigma, США) и заключали в Immu-mount (Thermo-Shandon, США). Препараты исследовали под конфокальным микроскопом Leica TCS SPE (Германия). Регистрировали клетки створок МК, в которых отмечена реакция с двумя или тремя иммуногистохимическими маркерами. Проверку специфичности иммуногистохимических реакций проводили с использованием внутренних тканевых позитивных и негативных контролей и с неиммунными сыворотками.

Для исследования ультраструктуры клеток МК небольшие фрагменты биоптатов створок МК 4 пациентов с открытым АВК фиксировали в растворе 2,5% глутарового альдегида и 1% параформальдегида в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,4), дофиксировали в 1,5% растворе четырехоксида осмия, обезжировали, заливали в аралдит. Ультратонкие срезы контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца и анализировали в электронном микроскопе Philips CM100 (Нидерланды). Изучали особенности ультраструктуры клеток створок МК, отмечая в них признаки, характерные для клеток фибробластического, эндотелиального, гладкомышечного ряда и других направлений дифференцировки клеток соединительной ткани.

### Статистическая обработка данных

Статистический анализ результатов проводили с помощью пакета программы Statistica 6.0 (StatSoft, США) с использованием методов параметрической и непараметрической статистики. Данные представляли в виде  $M \pm s$ , а в случае непараметрических параметров — медианы. Статистически достоверными считали различия при  $p < 0,05$ . Для определения взаимосвязи между несколькими переменными рассчитывали непараметрический коэффициент корреляции Спирмена при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Митральный клапанный аппарат у новорожденных из группы сравнения содержал нормально развитые переднюю и заднюю створки, к которым крепились хорды, отходящие от соответствующих сосочковых мышц (рис. 1а). К передней створке прикреплялось от 9

до 12 хорд, к задней — от 9 до 14. Число хорд варьировало в разных МК и было пропорционально числу сосочковых мышц. Обнаружено 3 варианта анатомического строения сосочковых мышц:

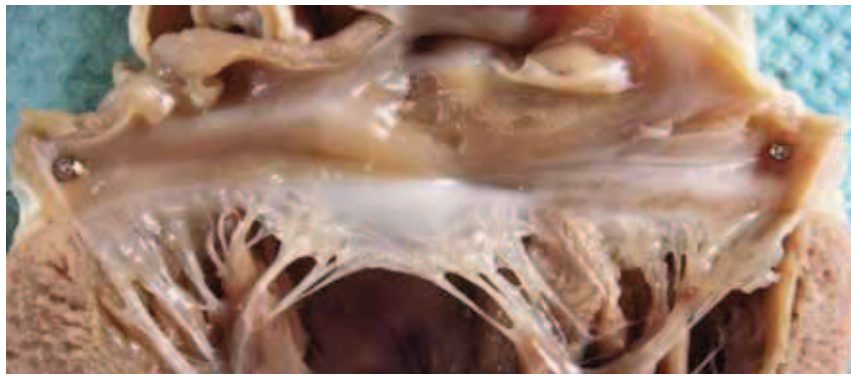
- одна верхушка располагалась на одном основании;
- одна верхушка располагалась на нескольких основаниях;
- несколько верхушек были расположены на одном основании.

Изменчивость анатомического строения МК характерна для нормально развитого сердца.

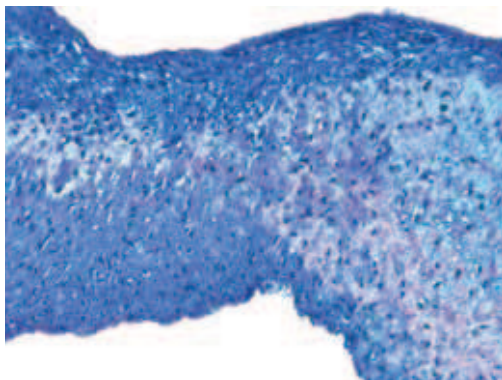
У всех пациентов с открытым АВК во время ревизии при повторной операции отмечена выраженная дилатация левого (митрального) компонента. У 15 (79%) пациентов обнаружены миксоматозные изменения створок клапана (рис. 2а), у остальных больных — грубое утолщение передней створки или выраженная гипоплазия задней створки с утолщением или сращением со свободной стенкой левого желудочка. Изменения в хордальном аппарате были представлены удлинением или укорочением хорд, что сопровождалось нарушением нормального соотношения между длиной хорд и сосочковых мышц. Среди аномалий развития сосочковых мышц отмечена их гипоплазия вплоть до аплазии, а также дистопия. У 14 (74%) детей с выраженной недостаточностью МК наблюдали изменения во всех структурах его клапанного аппарата.

В створке зрелого МК в норме гистологически различают 3 слоя: предсердный, желудочковый и губчатый (*spongiosa*). В исследованных МК новорожденных створки состояли из рыхлой неоформленной соединительной ткани, в которой не всегда определялись слои, характерные для зрелого клапана (рис. 1б). Очаги миксоматозного перерождения ткани створок МК наблюдали только у 1 из 16 (6,3%) новорожденных. В группе детей раннего возраста с открытым АВК створки МК большинства больных были неравномерно утолщены, рыхлые, с нарушенной архитектоникой гистологических слоев. Очаги миксоматозно измененной ткани с хаотично расположенными клетками звездчатой формы занимали более 50, от 10 до 50 и менее 10% площади ткани створок МК у 6 (32%), 6 (32%) и 3 (16%) из 19 больных, соответственно. Окраска этих зон алыциановым синим позволила обнаружить скопление кислых мукополисахаридов (рис. 2б). Размеры зон миксоматозно измененной ткани МК прямо коррелировали со степенью регургитации на МК ( $r = 0,52$ ,  $p = 0,03$ ). При этом операционные швы после радикальной коррекции МК «прорезывались» достоверно чаще именно у больных с большей площадью зон миксоматозной дегенерации створок МК ( $r = 0,65$ ,  $p = 0,003$ ), что свидетельствовало о неблагоприятном прогностическом значении данного параметра.

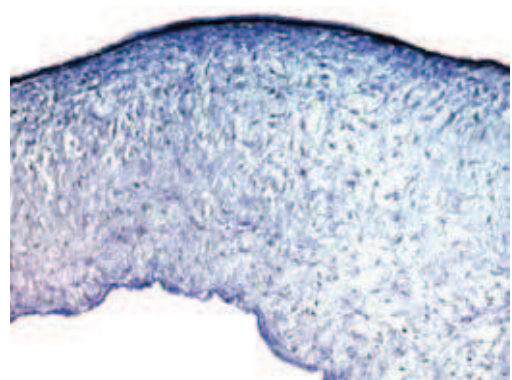
Механические и эластические свойства створок МК определяются свойствами внеклеточного каркаса их ткани: присутствием эластических и коллагеновых волокон. В нормальном МК взрослого человека локализация эластики имеет слоистый характер и ограничивается предсердным и, в меньшей степени, губчатым слоем [6]. В исследованных нами створках МК новорожденных из группы сравнения эластический компонент был представлен тонкими нитями, расположенными на предсердной, а в некоторых случаях и на желудочковой стороне створок МК (рис. 1в). У больных с открытым АВК наблюдали заметное разволокнение, беспорядочное расположение во всех слоях створок МК, а иногда и фрагментацию эластических



а



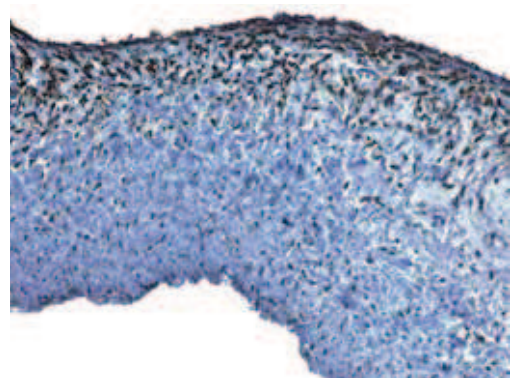
б



в



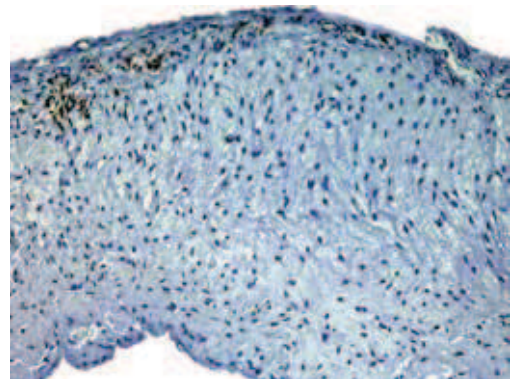
г



д



е



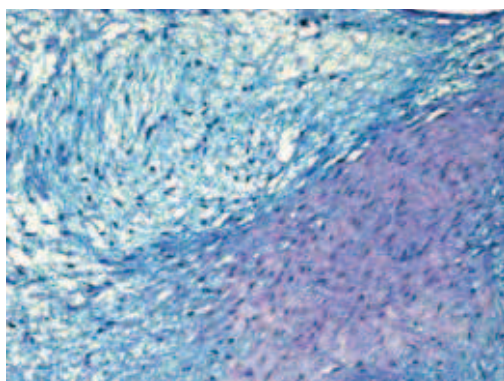
ж

**Рис. 1.** Митральный клапан новорожденных без сердечно-сосудистой патологии.

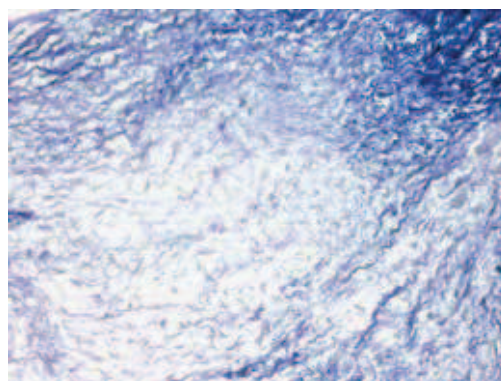
*Примечание.* а — передняя и задняя створка митрального клапана (макрофотография), б — незрелая соединительная ткань створки митрального клапана, содержащая гликозаминогликаны и небольшое количество коллагеновых волокон (окраска альциановым синим с докраской реактивом Шиффа), в — эластические волокна в предсердном слое створки митрального клапана (окраска по Вейгерту), г — умеренная иммуногистохимическая реакция на MMP13 в предсердной стороне створки митрального клапана, д–ж — клетки створки митрального клапана с фибробластическим (д — Vim), эндотелиальным (е — CD34) и гладкомышечным (ж — SMA) фенотипом.



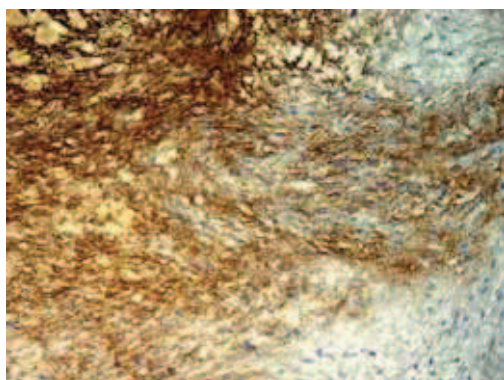
а



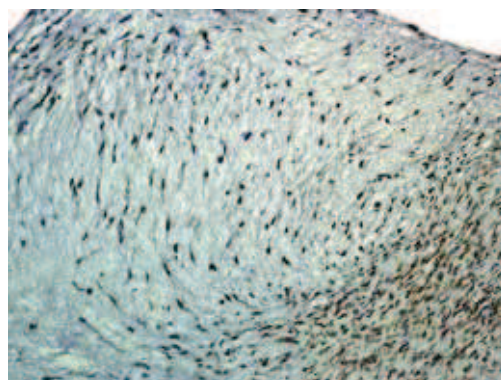
б



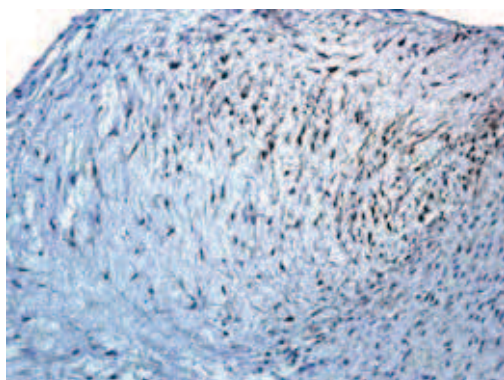
в



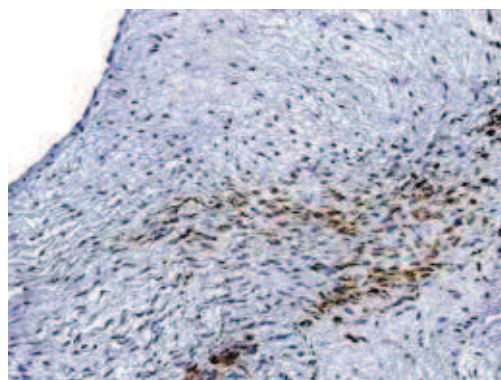
г



д



е



ж

**Рис. 2.** Митральный клапан детей раннего возраста с открытым атриовентрикулярным каналом.

*Примечание.* а — миксоматозно измененный общий атриовентрикулярный клапан (макрофотография, стрелками указаны места прорезывания швов), б — очаг миксоматозно измененной ткани, содержащей гликозаминогликаны, расположенный рядом с фиброзной тканью клапана (окраска альциановым синим с докраской реактивом Шиффа), в — разволокнение и фрагментация эластических волокон в очаге миксоматоза (окраска по Вейгерту), г — интенсивная иммуногистохимическая реакция на MMP13 в зоне миксоматоза, д–ж — клетки створки клапана с фибробластическим (д — Vim), эндотелиальным (е — CD34) и гладкомышечным (ж — SMA) фенотипом. Микрофотография (б–ж). Иммуногистохимическое окрашивание. Увелич. 20×10.

волокон, особенно выраженную в очагах миксоматозно измененной ткани МК (рис. 2в).

В ткани створок МК больных с открытым АВК и в единичных наблюдениях МК новорожденных из группы сравнения была выявлена очаговая повышенная иммуногистохимическая реакция на матриксную металлопротеиназу 13 (ММР13) — коллагеназу, ответственную за расщепление коллагена (рис. 1г, 2г), в то время как в других участках ткань створок МК была слабопозитивной или негативной в отношении ММР13. Наиболее интенсивное окрашивание ММР13 обнаружено по периферии очагов миксоматозной дегенерации, а также в ткани МК с выраженным нарушением архитектоники эластических волокон ( $r=0,75$ ,  $p=0,008$ ).

Гистологическая картина миксоматозной дегенерации ткани створок МК, в т.ч. распределение эластических волокон и содержание ММР13 у детей раннего возраста с открытым АВК оказались сходными с описанными в литературе случаями приобретенного миксоматоза ткани створок МК у взрослых больных [2, 7], а также с ситуациями экспериментально индуцированной миксоматозной дегенерации [8]. Вместе с тем наши данные о, как правило, слабой активности ММР13 в ткани створок МК новорожденных не совпадали с данными Rabkin-Aikawa и соавт. [9], которые показали, что активность ММР13 в ткани створок МК у эмбрионов повышена, в то время как у взрослого человека в норме не определяется.

Участки обызвествления в створках МК не были зафиксированы у новорожденных из группы сравнения, а в группе детей с открытым АВК в возрасте от 1 мес до 3 лет были обнаружены только у 1 (5,3%) больного в возрасте 2 г 11 мес. Вероятно, отложение солей кальция в створках МК происходит у больных детей в более старшем возрасте.

Ультраструктурное исследование ткани створок МК у больных с открытым АВК показало, что большинство ее клеток было представлено клетками фибробластического ряда с низкой или умеренной синтетической активностью, о чем свидетельствовало преобладание зон свободной от органелл цитоплазмы, содержащей редкие митохондрии и немногочисленные цистерны слабо развитого гранулярного эндоплазматического ретикулума. Обычно клетки имели характерную звездчатую форму с длинными выростами цитоплазмы (рис. 3а). В ядрах неправильной формы крупные глыбки гетерохроматина располагались фрагментарно по внутренней ядерной мембране. В некоторых клетках были отмечены ультраструктурные признаки, характерные для миофибробластов: наряду с элементами гранулярного эндоплазматического ретикулума в цитоплазме этих клеток присутствовали фибриллы (рис. 3б), а вдоль клеточной поверхности — фрагменты базальной мембраны (рис. 3а–в). Сходные ультраструктурные признаки, характерные для миофибробластов, описаны в клетках миксоматозно измененного МК собаки [10]. В ткани створок МК больных с открытым АВК наблюдали также малодифференцированные клетки, контуры которых выглядели неровными из-за вытягивающихся во многих местах маленьких псевдоподий (рис. 3в). Обнаруженные в створках миксоматозно измененных МК гистиоциты содержали разного размера вакуоли, фагосомы, слабо развитый гранулярный эндоплазматический ретикулум, электронноплотные гранулы и в некоторых случаях миелиновое тельца (рис. 3г). Содержание коллагеновых и эластических волокон в ткани створок МК у этих больных было сравнительно небольшим.

При исследовании иммуногистохимического фенотипа клеток МК новорожденных из группы сравнения в большинстве наблюдений установили низкую интенсивность реакции на маркер фибробластической дифференцировки Vim (оценка в баллах от 0 до 2, медиана =1) (рис. 1д) и более высокую — на маркер эндотелиальной дифференцировки CD34 (оценка в баллах от 1 до 2, медиана =2) (рис. 1е).

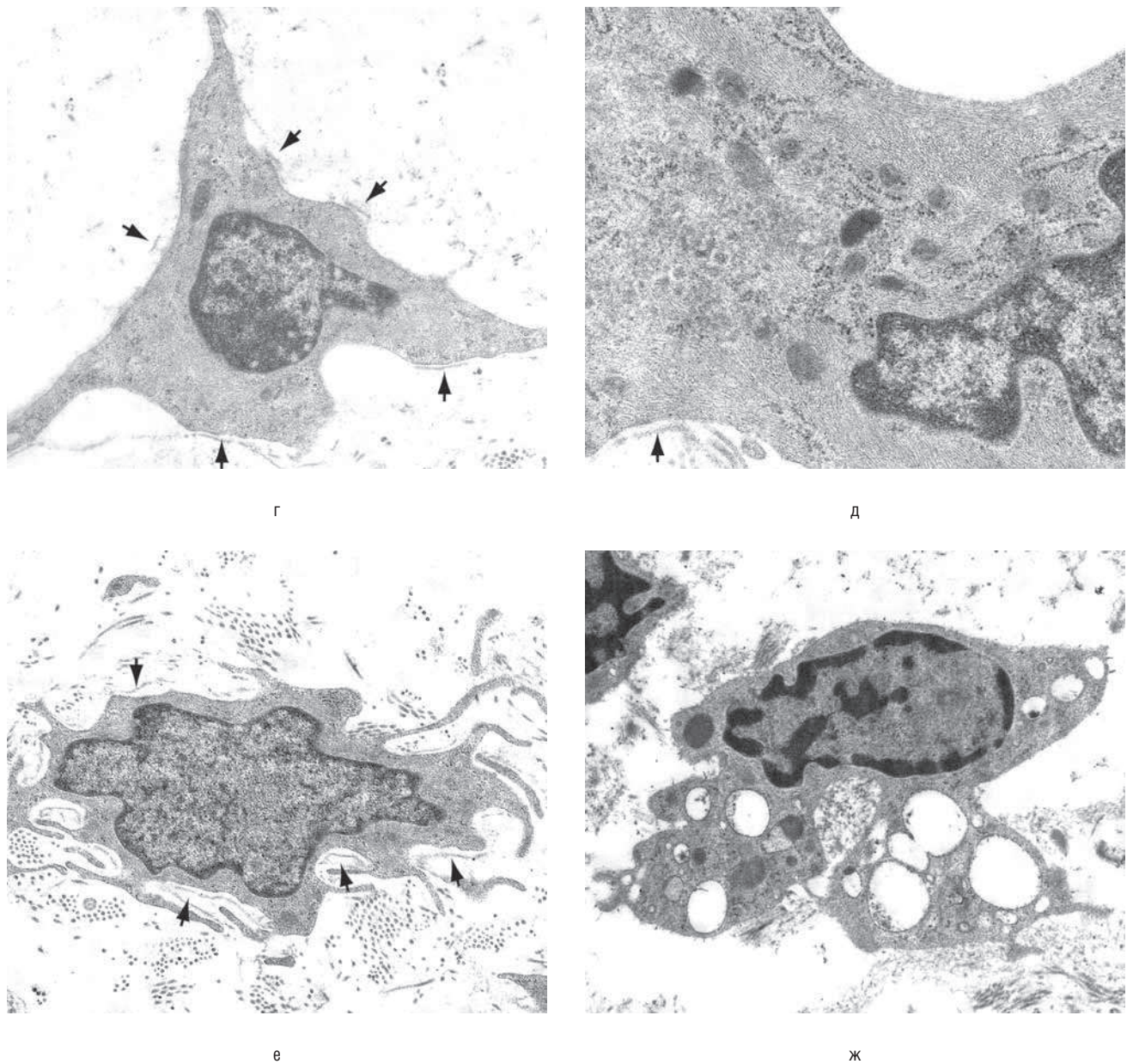
У детей раннего возраста с открытым АВК клетки МК в большинстве случаев демонстрировали слабую реакцию в отношении Vim (оценка в баллах от 0 до 2, медиана =1) и CD34 (оценка в баллах от 0 до 2, медиана = 1) (рис. 2д, е). При этом интенсивность иммуногистохимической реакции на указанные маркеры изменялась сочетанно ( $r=0,77$ ,  $p=0,002$ ). Интенсивность реакции на Vim и CD34 была достоверно выше в клетках МК новорожденных, чем у детей раннего возраста с открытым АВК ( $p=0,02$ ;  $p=0,005$ , соответственно). С помощью двойного иммуногистохимического окрашивания в большинстве клеток в обеих исследованных группах доказано одновременное присутствие Vim и CD34 (рис. 4 а–ж).

Фенотип клеток МК, характеризующийся присутствием антигенов сразу двух линий клеточной дифференцировки — эндотелиальной (CD34) и фибробластической (Vim), вероятно, объясняется происхождением этих клеток. Известно, что в эмбриогенезе клетки клапанов сердца претерпевают т.н. эндотелиально-мезенхимальную трансформацию. Эндотелиальные клетки, выстилающие «эндокардиальные подушки», мигрируют в толщу богатой гликозамингликанами рыхлой мезенхимальной ткани подушек, где приобретают черты клеток мезенхимы [11]. Вероятно, у новорожденных и детей раннего возраста с открытым АВК мы наблюдали сохранение антигена эндотелиального фенотипа в клетках фибробластического ряда, еще не завершивших свою трансформацию, что подтверждалось более интенсивной иммуногистохимической реакцией на маркер CD34 в МК новорожденных.

Помимо Vim+/CD34+-клеток в створках МК 9 из 16 (56%) новорожденных обнаружили также слой Vim+/SMA+-клеток (рис. 1ж, рис. 5а–г), а у 1 из 16 (6,3%) больных выявили также Vim+/SMA+/Desm+-клетки. У 12 из 19 (63%) детей с открытым АВК в створках МК, как правило, с предсердной стороны наблюдали скопление SMA+-клеток (рис. 2ж), некоторые из которых имели иммуногистохимический фенотип Vim+/SMA+ (рис. 5д–ж), а у 3 из 19 (16%) пациентов также обнаружили единичные SMA+/Desm+-клетки. Скопления SMA+-клеток в створках МК у больных первых 3 лет жизни с открытым АВК встречали чаще, чем у новорожденных из группы сравнения ( $p=0,03$ ).

Очевидно, что среди клеток МК присутствуют переходные формы клеток фибробластического ряда, часть которых демонстрирует варианты иммуногистохимического фенотипа, характерные для миофибробластов (Vim+/SMA+, SMA+/Desm+ или Vim+/SMA+/Desm+). В литературе обсуждают гетерогенность популяции клеток клапанов, которая проявляется, например, в отношении способности к адгезии выделенной фракции этих клеток и различной экспрессии антигена SMA при их культивировании [12].

Интенсивность реакции клеток МК в отношении Vim была повышена у больных с открытым АВК при большей степени регургитации на МК ( $r=0,67$ ,  $p=0,009$ ), а в отношении CD34 — у больных с более высоким КТИ ( $r=0,52$ ,  $p=0,03$ ) и у пациентов, у которых слой SMA+-



**Рис. 3.** Ультраструктура клеток митрального клапана детей раннего возраста с открытым атриовентрикулярным каналом.

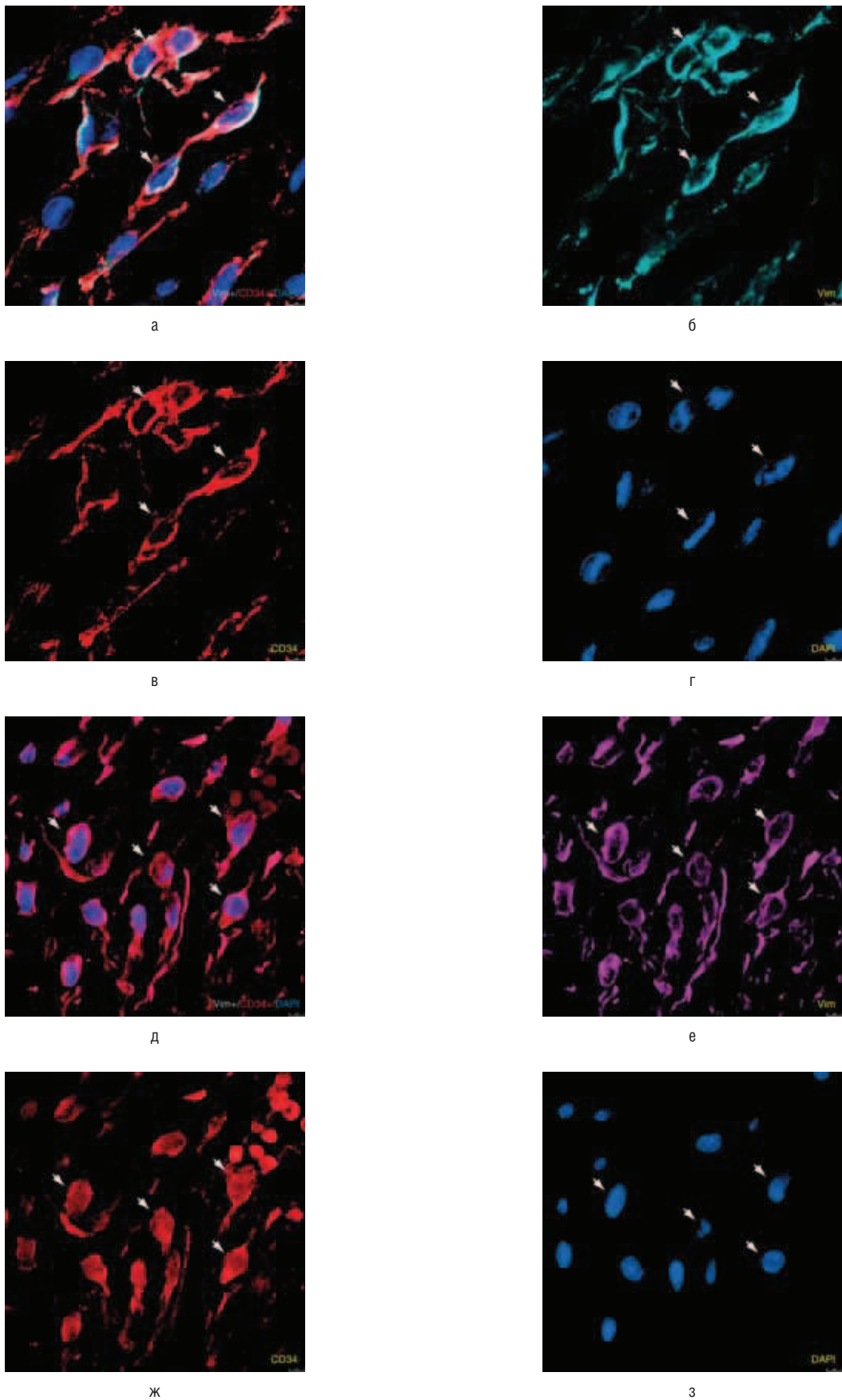
*Примечание.* а, б — фибробласты (а) и миофибробласты (б) звездчатой формы с фибриллами в цитоплазме, редкими цистернами гранулярного эндоплазматического ретикулума и единичными митохондриями, на поверхности клетки — фрагменты базальной мембраны (стрелки), что обычно не характерно для клеток фибробластического ряда; а — увелич. 11 000, б — увелич. 27 500; в — малодифференцированная клетка с отростками, подобными псевдоподиям, и фрагментами базальной мембраны на поверхности клетки (стрелки) — увелич. 8400; г — гистиоцит (макрофаг), содержащий вакуоли, фагосомы, электронно-плотные гранулы и слабо развитый гранулярный эндоплазматический ретикулум, увелич. 11 000.

клеток в створках МК встречался реже или был представлен единичными клетками ( $r = -0,72$ ,  $p = 0,008$ ). Таким образом, более интенсивная реакция клеток МК на маркер эндотелиальной дифференцировки отмечена у наиболее тяжелых больных с открытым АВК, что, вероятно, свидетельствовало о меньшей степени зрелости соединительной ткани МК. Подобный иммуногистохимический фенотип мы наблюдали в клетках МК новорожденных из группы сравнения.

Согласно данным литературы, в створках МК эмбрионов клетки обычно представлены активированными миофибробластами, при этом Vim<sup>+</sup>/SMA<sup>+</sup>-клетки составляют 60,3±9% [9]. Напротив, в МК взрослых

людей преобладающий в норме фенотип клеток соответствует покоящимся Vim<sup>+</sup>-фибробластам, а Vim<sup>+</sup>/SMA<sup>+</sup>-клетки составляют лишь 2,5±0,4% [9]. В миксоматозно измененной ткани МК взрослых больных наряду с Vim в клетках была зарегистрирована экспрессия десмина, α-актина, а также антигена SMemб, характерного для активированных мезенхимных клеток [2]. У взрослых пациентов с ревматическим пролапсом МК в предсердном или губчатом слое МК обнаруживают даже сосуды [13].

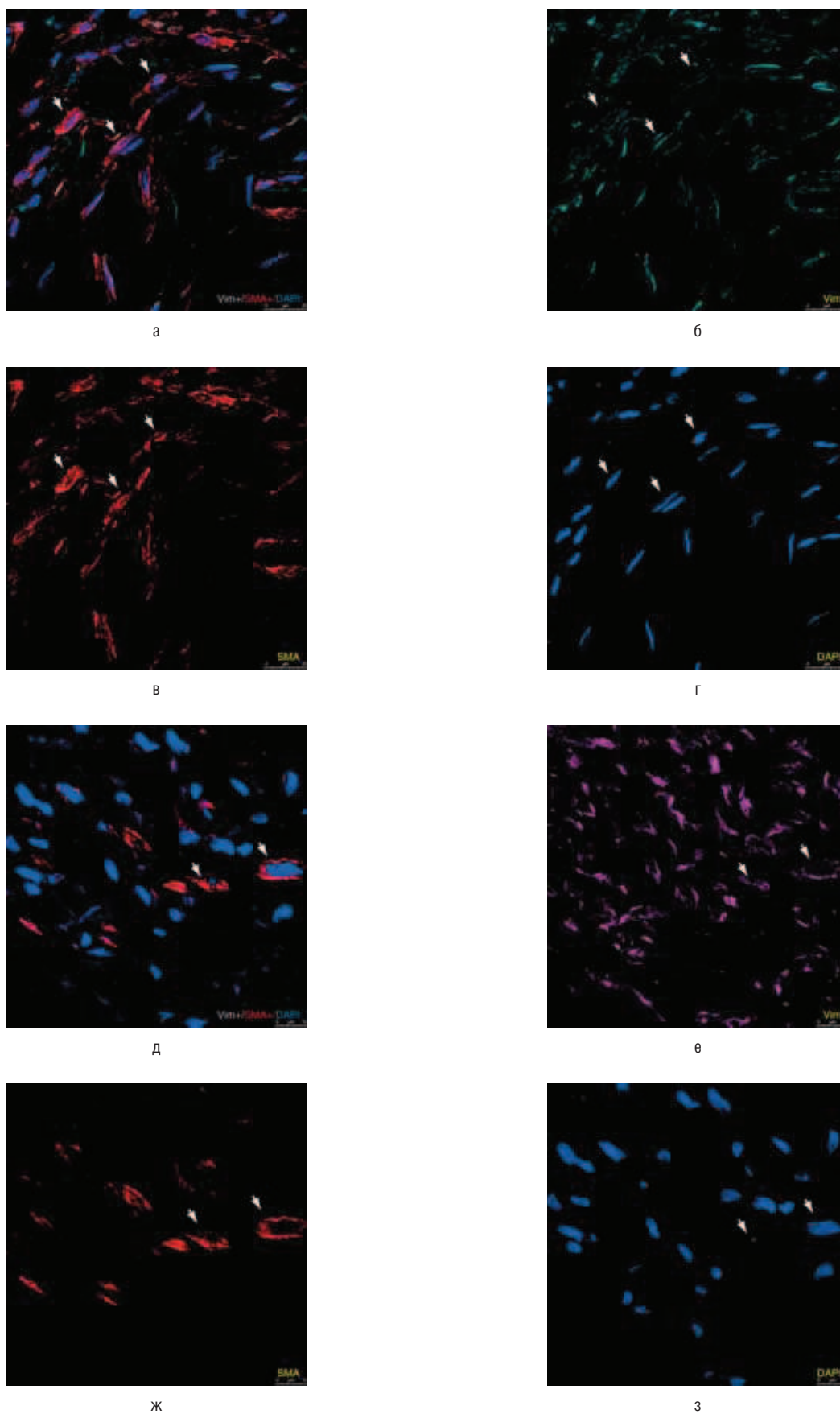
В условиях экспериментально индуцированного миксоматозного изменения ткани МК собаки выявлено уменьшение числа Vim<sup>+</sup>-клеток по сравнению



**Рис. 4.** Двойное (Vim+/CD34+) иммуногистохимическое окрашивание клеток створки митрального клапана новорожденных без сердечно-сосудистой патологии (а–г) и детей раннего возраста с открытым атриовентрикулярным каналом (д–з). Иммуноконфокальная микроскопия.

*Примечание.* а, д — Vim+/CD34+/DAPI+ флуоресценция; б, е — Vim+-клетки; в, ж — CD34+-клетки в створке митрального клапана; г, з — докраска ядер DAPI.





**Рис. 5.** Двойное (Vim+/SMA+) иммуногистохимическое окрашивание клеток створки митрального клапана новорожденных без сердечно-сосудистой патологии (а–г) и детей раннего возраста с атриовентрикулярным каналом (д–з). Иммуноконфокальная микроскопия.  
*Примечание.* а, д — Vim+/SMA+/DAPI+ флуоресценция; б, е — Vim+-клетки; в, ж — отдельные SMA+-клетки в створке митрального клапана; г, з — докраска ядер DAPI.

с контролем и появление SMA+ или SMA+/Desm+-миофибробластов [14, 15]. В некоторых работах обсуждается также присутствие среди клеток миксоматозных МК фибробластов звездчатой формы, экспрессирующих маркер эндотелиальной дифференцировки CD34+ [16] или CD31+/SMA+-клеток [8].

В ходе клинико-морфологических сопоставлений была установлена положительная корреляция между присутствием в створках МК SMA+/Desm+-клеток и длительностью периода между первичной операцией реконструкции МК и последующим протезированием МК этих же пациентов ( $r = 0,72$ ,  $p = 0,027$ ). Двум из трех больных, у которых в створках МК были обнаружены SMA+/Desm+-клетки, вторую операцию выполняли спустя более чем 300 дней после первой, а у больных без SMA+/Desm+-клеток в створках МК период между операциями составлял 2–64 дня. Можно предположить, что присутствие SMA+/Desm+-клеток в ткани МК, по-видимому, необходимо для сохранения механических свойств ткани створки клапана в условиях гемодинамической перегрузки.

### Заключение

Таким образом, в МК детей раннего возраста с открытым АВК обнаружены очаговые миксоматозные изменения створок, которые выражались в утолщении и изменении их внутренней структуры. В очагах миксоматозно измененной ткани МК присутствовали хаотично расположенные клетки звездчатой формы, фрагментация и разволокнение эластических волокон и аккумуляция кислых мукополисахаридов в межклеточном матриксе. По периферии очагов миксоматоза выявлено повышенное содержание MMP13.

На ультраструктурном уровне в ткани МК у больных с открытым АВК имеются клетки фибробластического ряда, клетки с признаками миогенной дифференцировки (миофибробласты), а также гистиоциты.

Иммуногистохимический фенотип клеток створок и фиброзного кольца МК больных с открытым АВК соответствовал фибробластической и эндотелиальной дифференцировке, а у части больных были обнаружены скопления клеток гладкомышечного происхождения.

### REFERENCES

1. Tamura K., Fukuda Y., Ishizaki M. Abnormalities in elastic fibers and other connective-tissue components of floppy mitral valve. *Am. Heart J.* 1984; 129: 1149–1158.
2. Rabkin E., Aikawa M., Stone J.R., Fukumoto Y., Libby P., Schoen F.J. Activated interstitial myofibroblasts express catabolic enzymes and mediate matrix remodeling in myxomatous heart valves. *Circulation.* 2001; 104: 2525–2532.
3. Gupta V., Barzilla J.E., Mendez J.S., Stephens E.H., Lee E.L., Collard C.D., Laucirica R., Weigel P.H., Grande-Allen K.J. Abundance and location of proteoglycans and hyaluronan within normal and myxomatous mitral valve. *Cardiovasc. Pathol.* 2009; 18 (4): 191–197.
4. Isakov S.V., Nemchenko E.V., Mitrofanova L.B., Gordeev M.L. Протезирование митрального клапана при мезенхимальной дисплазии: анатомо-морфологические аспекты и технические особенности. *Vest. khirurgii.* 2006; 165 (4): 15–19.
5. Bokeriya L.A., Kim A.I., Shatalov K.V., Abdovokhidov B.U., Vasilevskaya A.V., Rogova T.V., Boltabaev I.I. Протезирование митрального клапана у детей раннего возраста. *Detskije bolezni serdtsa i sosudov.* 2011; 1: 4–8.
6. Rastelli G.C., Kirklin J.W., Titus J.L. Anatomic observations on complete form persistent common atrioventricular canal with special reference to atrioventricular valves. *Mayo Clin. Proc.* 1966; 41: 296–308.
7. Nasuti J.F., Zhang P.J., Feldman M.D., Pasha T., Khurana J.S., Gorman III J.H., Gorman R.C., Narula J., Narula N. Fibrillin and other matrix proteins in mitral valve prolapse syndrome. *Ann. Thorac. Surg.* 2004; 77 (2): 532–536.
8. Dal-Bianco J.P., Aikawa E., Bischoff J., Guerrero J.L., Handschumacher M.D., Sullivan S., Johnson B., Titus J.S., Iwamoto Y., Wylie-Sears J., Levine R.A., Carpentier A. Active adaptation of the tendered mitral valve. Insights into a compensatory mechanism for functional mitral regurgitation. *Circulation.* 2009; 120: 334–342.
9. Rabkin-Aikawa E., Farber M., Aikawa M., Schoen F.J. Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves. *J. Heart Valve Dis.* 2004; 13 (5): 841–847.
10. Black A., French A.T., Dukes-McEwan J., Corcoran B.M. Ultrastructural morphologic evaluation of the phenotype of valvular interstitial cells in dogs with myxomatous degeneration of the mitral valve. *Am. J. Vet. Res.* 2005; 66 (8): 1408–1414.
11. Armstrong E.J., Bischoff J. Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation. *Circ Res.* 2004; 95: 459–470.
12. Blevins T.L., Carroll J.L., Raza A.M., Grande-Allen K.J. Phenotypic characterization of isolated valvular interstitial cell subpopulations. *J. Heart Valve Dis.* 2006; 15 (6): 815–822.
13. Iida T., Tamura K., Tanaka S., Asano G. Blood vessels in normal and abnormal mitral valve leaflets. *J. Nippon. Med. Sci.* 2001; 68 (2): 171–180.
14. Han R.I., Black A., Culshaw G.J., French A.T., Else R.W., Corcoran B.M. Distribution of myofibroblasts, smooth muscle-like cells, macrophages, and mast cells in mitral valve leaflets of dogs with myxomatous mitral valve disease. *Am. J. Vet. Res.* 2008; 69 (6): 763–769.
15. Disatian S., Ehrhart E.J. 3rd, Zimmerman S., Orton E.C. Interstitial cells from dogs with naturally occurring myxomatous mitral valve disease undergo phenotype transformation. *J. Heart Valve Dis.* 2008; 17 (4): 402–411.
16. Barth P.J., Koster H., Moosdorf R. CD34+ fibrocytes in normal mitral valves and myxomatous mitral valve degeneration. *Pathol. Res. Pract.* 2005; 201 (4): 301–304.

### КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Сухачева Татьяна Владимировна**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела патологической анатомии ФГБУ «НЦССХ им. А.Н. Бакулева» РАМН

Адрес: 121552, Рублевское шоссе, д. 135

Тел.: (495) 414-78-14

E-mail: tatiana@box.ru

**Абдувохидов Боходиржон Улмасович**, кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник отделения реконструктивной хирургии новорожденных и детей первого года жизни ФГБУ «НЦССХ им. А.Н. Бакулева» РАМН

**Адрес:** 121552, Рублевское шоссе, д. 135

**Тел.:** (495) 414-76-15

**E-mail:** abu1967@mail.ru

**Лашнева Анастасия Сергеевна**, младший научный сотрудник отдела патологической анатомии ФГБУ «НЦССХ им. А.Н. Бакулева» РАМН

**Адрес:** 121552, Рублевское шоссе, д. 135

**Тел.:** (495) 414-78-14

**E-mail:** elph78@mail.ru

**Серов Роман Андреевич**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом патологической анатомии ФГБУ «НЦССХ им. А.Н. Бакулева» РАМН

**Адрес:** 121552, Рублевское шоссе, д. 135

**Тел.:** (495) 414-78-53

**E-mail:** seroroman@yandex.ru

**Ким Алексей Иванович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением реконструктивной хирургии новорожденных и детей первого года жизни ФГБУ «НЦССХ им. А.Н. Бакулева» РАМН

**Адрес:** 121552, Рублевское шоссе, д. 135

**Тел.:** (495) 414-76-13

**E-mail:** orhn@yandex.ru

**Бокерия Лео Антонович**, академик РАН и РАМН, директор ФГБУ «НЦССХ им. А.Н. Бакулева» РАМН

**Адрес:** 121552, Рублевское шоссе, д. 135

**Тел.:** (495) 414-75-51

**E-mail:** info@heart-house.ru