

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский  
центр имени В.А. Алмазова»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Козырев Иван Александрович

РЕЗУЛЬТАТЫ РАННЕЙ РАДИКАЛЬНОЙ КОРРЕКЦИИ  
ТЕТРАДЫ ФАЛЛО

14.01.26 - Сердечно-сосудистая хирургия

03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:  
доктор медицинских наук  
профессор Гордеев М.Л.,  
кандидат биологических наук  
Малашичева А.Б.

Санкт-Петербург – 2019

**СОДЕРЖАНИЕ**

Введение.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	12
1.1 Тетрада Фалло (общие сведения).....	12
1.2 Клиническая картина, особенности гемодинамики, диагностика.....	14
1.3 Хирургическая коррекция тетрады Фалло.....	17
1.3.1 Ранняя радикальная коррекция тетрады Фалло.....	19
1.3.2 Предотвращение вентрикулотомии .....	22
1.3.3 Клапан-сохраняющие процедуры .....	24
1.4 Тактика лечения симптоматических пациентов.....	26
1.5 Расширение показаний для ранней радикальной коррекции.....	29
1.6 Этиологические факторы развития тетрады Фалло и роль Notch сигнального пути.....	31
1.7 Мезенхимные клетки сердца и клеточная терапия ВПС.....	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	42
2.1 Методы исследования .....	42
2.1.1 Клинические методы исследования.....	42
2.1.2 Клиническая характеристика пациентов.....	44
2.2 Экспериментальные методы исследования .....	49
2.2.1 Клеточные культуры .....	49
2.2.2 Выделение РНК из клеточных культур .....	52
2.2.3 Обратная транскрипция.....	53
2.2.4 ПЦР в реальном времени .....	53

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	55
3.1 РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	55
3.1.1 Интраоперационные данные .....	55
3.1.2 Послеоперационный период.....	60
3.1.3 Отдаленный период.....	67
3.2 РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	78
3.2.1 Сравнение экспрессии рецепторов и лигандов Notch-сигнального пути в мезенхимных клетках сердца от пациентов с ТФ и ДМЖП.....	78
3.2.2 Пролиферативная активность мезенхимных клеток сердца .....	80
3.2.2.1 Связь уровня пролиферативной активности мезенхимных клеток сердца с возрастом .....	80
3.2.2.2 Связь уровня пролиферативной активности мезенхимных клеток сердца с уровнем активности NOTCH сигнального пути.....	82
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	87
ВЫВОДЫ .....	97
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	98
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	99
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	100

## Введение

### Актуальность и степень разработанности темы исследования

Тетрада Фалло является одним из самых часто встречаемых цианотических врожденных пороков сердца. Несмотря на имеющийся обширный опыт лечения данной патологии, на сегодняшний день отсутствует общепринятая тактика введения пациентов с выраженным цианозом, не определен оптимальный возраст проведения радикальной хирургической коррекции тетрады Фалло (ТФ) у бессимптомных пациентов [1, 2]. В последних российских рекомендациях не указан возраст, в котором нужно проводить радикальную коррекцию [3]. В настоящий момент в детской кардиохирургии прослеживается общемировая тенденция более раннего выполнения хирургической коррекции врожденных пороков сердца (ВПС) [4]. Это обусловлено развитием анестезиологического пособия, методов проведения заместительного кровообращения, усовершенствованием кардиоплегических и кардиопротекторных методик. Восстановление нормальной физиологии внутрисердечного, легочного и системного кровообращения, устранение гипоксического влияния на организм в целом в раннем возрасте приводит к адекватному созреванию и развитию всех тканей в организме ребенка.

Наличие системного давления на протяжении времени в полости правого желудочка (ПЖ) при тетраде Фалло приводит к формированию патологической гипертрофии правого желудочка, в том числе к развитию фиброзных изменений в стенке желудочка [5]. Это снижает комплаинс правого желудочка, что крайне важно для пациентов с коррегированной тетрадой Фалло в долгосрочном периоде. В течение первых недель жизни степень цианоза у пациентов с тетрадой Фалло может нарастать. Это обусловлено увеличением степени обструкции в выносящем отделе правого желудочка (ВОПЖ) за счет мышечной гипертрофии правого желудочка. У большинства пациентов с тетрадой Фалло отмечается умеренная

гипоплазия фиброзного кольца (ФК) клапана легочной артерии [5]. Именно на этом уровне формируется основной градиент в ВОПЖ. Спустя несколько недель или месяцев, вследствие развития компенсаторной гипертрофии нарастает стеноз в ВОПЖ ниже клапана легочной артерии. Тем самым, устранение обструкции в раннем периоде жизни предотвращает ремоделирование правого желудочка [6].

Для пациентов с тетрадой Фалло одним из главных факторов, влияющем на общее состояние и функцию сердца в долгосрочном периоде является сохранение клапана легочной артерии во время выполнения радикальной коррекции. Выявление условий и хирургических методов для увеличения доли клапан-сохраняющей коррекции тетрады Фалло является важной и не решенной задачей в кардиохирургии. Одним из таких условий может стать выполнение радикальной коррекции в раннем возрасте с использованием специальных клапан-сохраняющих методов. Однако на данный момент не доказано, что радикальная коррекция в раннем возрасте не будет приводить к более длительному и тяжелому послеоперационному периоду.

Количество кардиомиоцитов удваивается к 21-му дню жизни, в дальнейшем их численность значительно не изменяется [7]. Известно, что в организме существует различные виды стволовых клеток. Одними из них являются локальные стволовые клетки сердца или, так называемые, клетки-предшественники кардиомиоцитов (КПК). Одним из подвидов этих клеток являются мезенхимные клетки сердца (МКС). У популяции КПК имеются признаки кардиомиоцитарной дифференцировки, однако, в них не экспрессируются саркомерные белки, характерные для кардиомиоцитов. В настоящее время идет активное изучение этого вида клеток [8, 9]. Исследуются механизмы, приводящие к врожденным порокам сердца на моделях этих клеток, изучается способность таких клеток участвовать в регенерации и репарации сердца, особенно у пациентов с врожденными пороками сердца. Было установлено, что клетки от новорожденных

пациентов с различными врожденными формами пороков сердца имеют более выраженный регенеративный и пролиферативный потенциалы по сравнению с аналогичными клетками от взрослых пациентов [10]. В другой работе демонстрировалось, что клетки от пациентов раннего возраста имеют более высокий регенеративный потенциал по сравнению с клетками пациентов более старших возрастных групп, в связи, с чем лечение пациентов с врожденными пороками сердца в более раннем возрасте, с точки зрения тканевой регенерации, представляется предпочтительным [11]. Таким образом, данный вид клеток является с одной стороны перспективным новым методом для клеточной терапии различных состояний при врожденных пороках сердца, с другой стороны объектом для активных исследований гомеостаза в миокарде при наличии различных патологий сердца.

Notch-сигнальный путь является высококонсервативной сигнальной системой, которая контролирует спецификацию клеток и тканевую организацию, как у эмбриона, так и у взрослого. Многочисленные исследования выявили участие Notch-сигнального пути в развитии сердца [12], формировании различных врожденных пороков [13] и регенерации сердца [14]. Однако следует отметить, что Notch-сигнальный путь принимает участие не только в кардиогенезе. Он также может быть вовлечен в пролиферативную активность клеток различных тканей и может участвовать в процессах дифференцировки [15, 16]. Активация Notch необходима для поддержания пролиферации кардиомиоцитов при рождении [17]. Таким образом, Notch-сигнальный путь является медиатором покоя, пролиферации и дифференцировки различных типов стволовых клеток, включая кардиогенные. В настоящее время существует довольно ограниченное количество работ, посвященных исследованию сигнального пути Notch в клеточных культурах из ткани миокарда пациентов с врожденными пороками сердца, и полностью отсутствуют работы, исследующие вовлеченность этого сигнального пути в уровень

пролиферации мезенхимных клеток сердца. Поэтому актуальность проведения данного исследования с применением клинических и молекулярно-генетических методов представляется несомненной. Все вышесказанное и предопределило постановку следующей цели исследования.

### **Цель исследования**

Оценить результаты радикальной коррекции тетрады Фалло, выполненной в различном возрасте, и охарактеризовать функциональное состояние мезенхимных клеток сердца в данной группе пациентов.

### **Задачи исследования**

1. Провести сравнительную оценку различных хирургических методик и их применение в различных возрастных группах при коррекции тетрады Фалло для выявления оптимальных условий для клапанно-сохраняющих операций.
2. Провести сравнительный анализ различных методов оценки состояния легочных артерий у пациентов с тетрадой Фалло раннего возраста по данным дооперационных методов обследования и операционным показателям.
3. Проанализировать особенности интраоперационного и раннего послеоперационного периодов при коррекции тетрады Фалло у пациентов раннего возраста в зависимости от сроков проведения операции.
4. Охарактеризовать пролиферативную активность мезенхимных клеток сердца в зависимости от возраста пациентов с тетрадой Фалло.
5. Охарактеризовать уровень экспрессии генов сигнального каскада Notch в мезенхимных клетках сердца у пациентов с различными септальными пороками.

### **Научная новизна исследования**

Получены новые данные, подтверждающие необходимость радикальной коррекции тетрады Фалло у пациентов младше 6 месяцев. Показана эффективность методов дилатации фиброзного кольца клапана легочной артерии при ранней радикальной коррекции тетрады Фалло для увеличения доли клапан-сохраняющих операций. Продемонстрировано различие в размерах центрального легочного русла по данным методам неинвазивной диагностики и измерений в операционной. Показана важность интраоперационной оценки истинных размеров ветвей легочной артерии, способствующая расширению показаний для выполнения первичной радикальной коррекции.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Получены новые данные, подтверждающие необходимость радикальной коррекции тетрады Фалло у пациентов младше 6 месяцев. Показана эффективность методов дилатации фиброзного кольца клапана легочной артерии при ранней радикальной коррекции тетрады Фалло для увеличения доли клапан-сохраняющих операций. Продемонстрировано различие в размерах центрального легочного русла по данным методам неинвазивной диагностики и измерений в операционной. Показана важность интраоперационной оценки истинных размеров ветвей легочной артерии, способствующая расширению показаний для выполнения первичной радикальной коррекции.

Показана взаимосвязь активности Notch сигнального пути с пролиферативной активностью мезенхимных клеток сердца у пациентов с тетрадой Фалло.

### **Методология и методы исследования**

Набор использованных методов исследования соответствует современному методическому уровню обследования кардиохирургических



больных. Примененные методы статистической обработки данных отвечают поставленной цели и задачам исследования.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Радикальная коррекция тетрады Фалло в возрасте до 6 месяцев ассоциирована с низким риском осложнений и летальности.
2. Ранняя радикальная коррекция тетрады Фалло с применением современных клапан-сохраняющих методик позволяет в большинстве случаев сохранить собственный клапан легочной артерии.
3. Показана зависимость функциональных свойств мезенхимных клеток сердца от уровня активации в них Notch-сигнального пути.

### **Степень достоверности и апробация работы**

Основные материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены: на Всероссийской молодежной медицинской конференции с международным участием «Алмазовские чтения – 2018», Санкт-Петербург; на научной конференции «Границы клеточных технологий: исследования и практика», Москва; на X Всероссийском Конгрессе «Детская кардиология 2018», Москва; на 51-м ежегодном съезде Европейского общества детских кардиологов (51<sup>st</sup> Annual Meeting of the Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPCC)), г. Лион, Франция; на 52-м ежегодном съезде Европейского общества детских кардиологов (52<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPCC)), г. Афины, Греция; на 26-м ежегодном азиатском съезде кардиоваскулярной и торакальной хирургии (26th Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery (ASCVTS)), Москва; на Всероссийской конференции с международным участием «Каспийские Встречи: диалоги специалистов о наджелудочковых нарушениях ритма сердца», Форум молодых кардиологов РКО, Астрахань; на международной конференции на

53-м ежегодном съезде Европейского общества детских кардиологов (53<sup>d</sup> Annual Meeting of the Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPCC)), г. Севилья, Испания.

По теме исследования опубликовано 5 печатных работ в том числе 5 работ в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей Аттестационной Комиссией Минобразования России. Работа «Notch signaling is abnormally activated in cardiac progenitor cells of tetralogy of Fallot patients» на английском языке является победителем международного конкурса молодых ученых на 51-м ежегодном съезде Европейского общества детских кардиологов (г. Лион, Франция).

### **Личный вклад**

Автором лично определены цели, задачи исследования, положения, выносимые на защиту. Проведен аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме. Автором лично были проведены эксперименты по культивированию клеточных линий, проведению ПЦР в реальном времени. Проведен анализ и оформление результатов исследования. Лично осуществлены все этапы клинического исследования. Получение данных исследований, их статистическая обработка, апробация результатов исследований, подготовка публикаций и докладов по проделанной работе выполнены автором лично. Анализ, изложение полученных данных, формулировка выводов и практических рекомендаций выполнены автором лично.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 123 страницах машинописного текста, иллюстрирована 6 таблицами, 33 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, выводов, практических

рекомендаций, списка использованной литературы, включающего 180 источников, из которых 25 отечественных и 155 иностранных.

### **Реализация работы**

Результаты исследования внедрены в клиническую работу отделения сердечно-сосудистой хирургии для детей ФГБУ «НИМЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России и могут быть рекомендованы к широкому применению в клинической деятельности кардиохирургических отделений.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Тетрада Фалло (общие сведения)

Врожденные пороки сердца (ВПС) представляют собой группу патологий, которая включает в себя широкий спектр аномалий, от простых септальных дефектов, до сложных комбинированных пороков. Традиционно, все ВПС делятся на цианотические (синие) и не цианотические (белые). Самым распространённым цианотическим пороком сердца является тетрада Фалло (ТФ) [18, 19]. ТФ составляет примерно одну десятую от всех ВПС и встречается в среднем у 3-6 детей на 10000 рождений [20]. Впервые данная врожденная аномалия сердца была описана в 1673 году N. Steno, при этом привычное название пороку было дано лишь в 1888 году [21]. ТФ является многокомпонентным пороком сердца, включающим дефект межжелудочковой перегородки (ДМЖП), стеноз выносящего отдела правого желудочка (ВОПЖ), декстراпозицию аорты и гипертрофию правого желудочка (ПЖ). Стеноз ВОПЖ чаще всего является сочетанным, представляет собой клапанный стеноз легочной артерии и мышечный инфундибулярный стеноз ПЖ. Декстрапозиция аорты при ТФ составляет 50%, таким образом, аорта расположена между правым и левым желудочками. Тем самым корень аорты находится в проекции межжелудочковой перегородки или непосредственно над дефектом межжелудочковой перегородки. При большем смещении аорты в сторону ПЖ, говорят уже о пороке, который принято называть двойное отхождение магистральных сосудов (ДОС) от ПЖ.

К терминологическим аспектам относятся такие понятия как триада и пентада Фалло. В триаду Фалло входят компоненты классической ТФ, за исключением декстрапозиции аорты, а к термину пентада Фалло, кроме

компонентов «классической» тетрады относится еще и дефект межпредсердной перегородки (ДМПП). В современной литературе данные термины являются историческими и не используются. В настоящее время может быть использована следующая классификация ТФ (Рис.1).

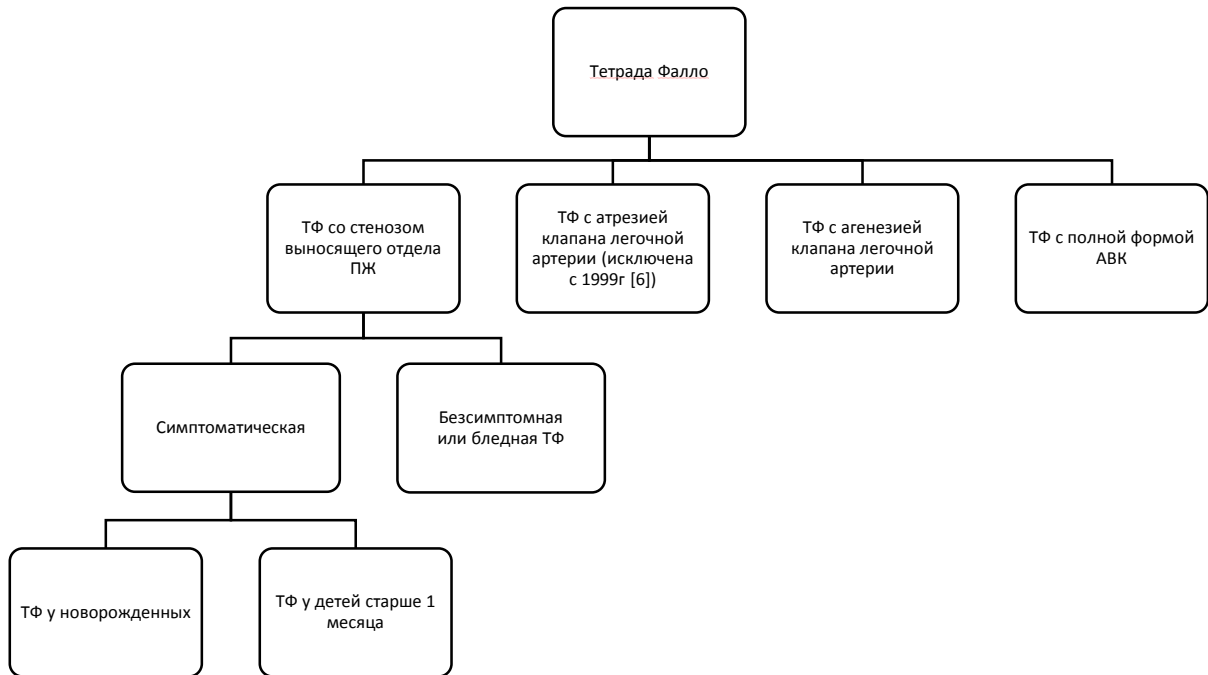


Рисунок 1 – Классификация тетрады Фалло

Ранее в понятие ТФ включалась и атрезия клапана легочной артерии с наличием ДМЖП. В связи с тем, что этот порок включает в себя чрезвычайно широкий спектр патологии, начиная от простой клапанной атрезии и заканчивая отсутствием истинного легочного русла, с одной стороны, и что лечение и результаты лечения этой когорты пациентов значительно различаются, в настоящее время во многих центрах эту патологию рассматривают отдельно от ТФ [22].

ТФ в сочетании с синдромом агенезии клапана ЛА является симптомокомплексом, при котором полностью отсутствует клапан ЛА. В результате тяжелой недостаточности в проекции фиброзного кольца (ФК) клапана ЛА, происходит выраженная дилатация центрального легочного русла, что приводит к сдавлению легочными сосудами рядом

расположенных структур, таких как трахея, главный и долевые бронхи [23]. Для данной патологии характерно, что легочные синдромы преобладают над кардиальными. Для синдрома отсутствия клапана ЛА характерно тяжелое клиническое течение. В настоящее время существуют несколько хирургических подходов для коррекции этого порока. Главной целью этих методик является коррекция внутрисердечных изменений и устранение компрессии со стороны легочных артерий на органы средостения. Одним из наиболее перспективных методов является классическая внутрисердечная коррекция с пластической редукцией размеров ЛА в сочетании с маневром Lecompte [24].

Сочетание ТФ с полной формой атривентрикулярного канала (АВК) является отдельной группой с комплексной внутрисердечной анатомией, которая встречается лишь у 2% пациентов с ТФ. Как правило, выполняется одномоментная коррекция, правда риск операции выше, чем при коррекции изолированной ТФ или АВК.

## **1.2 Клиническая картина, особенности гемодинамики, диагностика**

Степень выраженности симптомов у пациентов с ТФ и стенозом ВОПЖ может варьироваться. Эти пациенты клинически разделяются на две группы: бессимптомные и симптоматические. Клинические проявления определяют тактику ведения данной группы пациентов. Симптомы у пациентов могут проявляться в различном возрасте. В симптоматическую группу входят пациенты, у которых данный порок проявляется эпизодами десатурации, т.е. снижением уровня оксигенации крови. Чаще всего данный признак возникает у детей вследствие беспокойства или плача. Механизм действия обусловлен формированием выраженной обструкции в выносящем отделе правого желудочка (ВОПЖ). Данная обструкция может

быть, как динамической, так и статической. Механизм возникновения данных приступов заключается в развитии динамического мышечного стеноза ВОПЖ, в результате которого давление в ПЖ резко возрастает, и большая часть кровяного потока из ПЖ устремляется через ДМЖП в левый желудочек (ЛЖ) и аорту, тем самым являясь причиной возникновения выраженной гипоперфузии легких и цианотического приступа из-за снижения сатурации крови. Вторую подгруппу в группе симптоматической ТФ формируют новорожденные пациенты, у которых данный порок сердца проявляется сразу после рождения. Это происходит за счет закрытия открытого артериального протока (ОАП), который у таких пациентов является главным источником легочного кровообращения [25]. Наличие значимой обструкции создает выраженное препятствие току крови из ПЖ с гемодинамической нестабильностью пациента. По этой причине пациенты с данной патологией требуют срочного оперативного вмешательства.

Другую группу формируют пациенты с бессимптомной ТФ. У данной группы пациентов в раннем возрасте отсутствуют эпизоды десатурации и, как результат, цианоз. Данную группу ТФ называют «розовой тетрадой», что подчеркивает наличие близкой к нормальному уровню сатурации крови. Сатурация характеризует уровень насыщения кислородом гемоглобина крови, выраженный в процентах. Как правило, у пациентов с данной формой порока, происходит постепенное нарастание выраженности обструкции ВОПЖ, что проявляется снижением уровня оксигенации крови. Механизм развития обструкции ВОПЖ заключается в формировании компенсаторной гипертрофии ПЖ в ответ на препятствие току крови на клапанно-подклапанном уровне. В результате нарастает градиент давления в ВОПЖ, провоцируя снижение общего количества крови, попадающего в легочное русло. В конечном счете, происходит снижение оксигенации крови. В настоящее время остаётся открытым вопрос об оптимальном возрасте для радикальной коррекции у данной группы пациентов.

Системное давление в полости правого желудочка при ТФ приводит к формированию патологической гипертрофии ПЖ, в том числе к развитию механического ремоделирования ПЖ [26] и фиброзных изменений в стенке желудочка [5]. Все это снижает комплаинс ПЖ, что особенно важно для пациентов с коррегированной ТФ в долгосрочном периоде. После рождения степень цианоза у пациентов с ТФ может нарастать. Это обусловлено развитием обструкции в выносящем отделе правого желудочка за счет мышечной гипертрофии ПЖ. После рождения у большинства пациентов с ТФ отмечается умеренная гипоплазия фиброзного кольца (ФК) клапана ЛА [5]. Именно на этом уровне формируется основной градиент в ВОПЖ. И только спустя несколько недель после снижения легочного сосудистого сопротивления, происходит развитие компенсаторной гипертрофии ПЖ, тем самым увеличивая степень стеноза ВОПЖ в инфундибулярном отделе. Таким образом, можно говорить о том, что устранение обструкции в раннем периоде жизни позволяет предотвратить ремоделирование ПЖ.

Общепринято, что диагноз «тетрада Фалло» устанавливается по наличию клинической картины и данным ультразвукового исследования. Несмотря на то, что на ЭКГ возможно появление признаков гипертрофии правых отделов сердца и смещение оси сердца вправо, эти данные не являются ни специфическими, ни диагностическими. На рентгенограмме органов грудной клетки сердце имеет так называемую «форму ботинка», которая формируется в результате гипертрофии ПЖ и уменьшенного контура легочной артерии. Также на рентгенограмме обращают на себя внимание темные легочные поля вследствие относительной гипоперфузии. Комбинация М-режима и доплеровской эхокардиографии (ЭХОКГ) является самым информативным методом для полной оценки анатомии ТФ [27], включая оценку градиента в ВОПЖ и размеры фиброзного кольца клапана легочной артерии (КЛА). В большинстве случаев при помощи ЭХОКГ удается определить коронарную анатомию, включая отхождение передней нисходящей артерии от правой коронарной артерии [28]. Ранее



золотым диагностическим стандартом для пациентов с ТФ являлась ангиография. В настоящее время подавляющее большинство пациентов не нуждаются в этом обследовании перед хирургической коррекцией. Показанием для применения данного метода является определение анатомии ветвей ЛА после имплантации системно-легочного шунта и уточнение коронарной анатомии в сложных случаях. Более распространенными методами предоперационного обследования пациентов являются методы магниторезонансной томографии (МРТ) и компьютерной томографии (КТ). Эти методы позволяют детально оценить анатомию легочного русла перед радикальной коррекцией. В настоящий момент МРТ является самым информативным методом для оценки отдаленных результатов после коррекции ТФ [29].

### **1.3 Хирургическая коррекция тетрады Фалло**

История хирургического лечения начинается с системно-легочного анастомоза, выполненного А. Blalock в 1944 году [30]. Десятилетие спустя С.W. Lillehei с группой соавторов выполняют коррекцию тетрады Фалло в условиях перекрестного кровообращения [31], которое позже было заменено искусственным кровообращением [32, 33]. Большие изменения в лечении пациентов с ТФ начали происходить с 1970-х годов. Они заключались в появлении простагландинов, совершенствовании техники хирургической коррекции в более раннем возрасте и развитии методов неинвазивной диагностики, таких как ЭХОКГ.

До конца 1970-х годов общепринятая тактика лечения пациентов заключалась в наложении системно-легочного шунта, а затем спустя некоторое время в выполнении радикальной коррекции. В начале 1980-х годов было предложено и доказано, что выполнение одномоментной

радикальной коррекции не приводит к увеличению риска летального исхода у пациентов старше 4 лет [34]. В дальнейшем происходило смещение возраста выполнения радикальной коррекции (РК) к более раннему [35].

В 80-х годах стало понятно, что продленная резекция в ВОПЖ приводит к тяжелому раннему послеоперационному периоду вследствие выраженной недостаточности в проекции клапана ЛА и в дальнейшем негативно влияет на функцию ПЖ. Таким образом, происходит снижение глобальной функции ПЖ после венстрикулотомии и трансаннулярной пластики [36]. В качестве решения данной проблемы была предложена имплантация моностворки из синтетического или аутоматериала в дополнение к трансаннулярной пластике [37]. Данная створка выполняла запирающий механизм клапана легочной артерии и, тем самым, обеспечивала более стабильный ранний послеоперационный период [38]. Некоторые авторы демонстрировали преимущества имплантации моностворки в предотвращении выраженной легочной регургитации в среднесрочном периоде [39]. К преимуществам этого метода можно было отнести его безопасность, так как он не увеличивал риск стеноза ВОПЖ и не повышал риск эмболии легочной артерии [40]. Главным недостатком метода являлась функциональная недолговечность моностворки. У большинства пациентов ее функция была компетентна не более двух лет. Так в исследовании со средним периодом послеоперационного наблюдения 12 лет было показано, что использование моностворки не давало преимуществ в ранней выживаемости, во времени послеоперационного восстановления и снижения частоты реопераций [41]. Однако в другом исследовании было продемонстрировано, что имплантация моностворки приводит к меньшей степени регургитации в проекции клапана ЛА в раннем послеоперационном периоде, но это не сопровождается улучшением клинических послеоперационных показателей, таких как длительность искусственной вентиляции легких (ИВЛ), длительности госпитализации, частоты повторных вмешательств и показатели смертности [42]. Также

моностворка не препятствовала развитию дисфункции ПЖ, повышала риск обструкции в ВОПЖ и риск повторных вмешательств в отдаленные сроки после операции [43]. Имплантация моностворки в совокупности с ТАП может обеспечивать наиболее значимые преимущества в послеоперационном периоде пациентам неонатального возраста. При наличии физиологической легочной гипертензии новорожденных, предотвращение обратного тока крови в ПЖ при РК, представляется наиболее целесообразным. Было установлено, что частота повторных хирургических вмешательств в группе пациентов неонатального возраста, которым использовалась моностворка при реконструкции ВОПЖ, статистически не отличалась по сравнению с группой с классической ТАП [44]. Авторы данного исследования не смогли доказать наличие более стабильного течения раннего послеоперационного периода в группе пациентов с моностворкой. Таким образом, становится очевидным, что преимущества моностворки могут быть нивелированы путем выполнения лимитированной по протяженности венстрикулотомии у подавляющего большинства пациентов, если возникает необходимость рассечения фиброзного кольца клапана ЛА. Также нужно добавить, что летальность после коррекции ТФ в специализированных центрах в настоящее время составляет единичные случаи [45].

### **1.3.1 Ранняя радикальная коррекция тетрады Фалло**

Ранняя радикальная коррекция на протяжении последних лет является важным направлением в хирургическом лечении ТФ. Преимущества ранней коррекции заключаются в снижении пролонгированности цианоза, уменьшении длительности перегрузки давлением ПЖ, предотвращении стимулов развития аорто-легочных коллатералей и снижении опосредованной нагрузки на ЛЖ [46]. Помимо этого, восстановление нормального уровня сатурации способствует общему росту и развитию, улучшает мозговую деятельность, предотвращает развитие полицитемии,

которая увеличивает риск внутримозгового тромбоза [47]. В дополнении ранняя РК способствует лучшему развитию легких [48]. Н. Sadeghi с соавторами подчеркивают, что именно ранняя радикальная коррекция в возрасте до двух лет приводит в отдаленном периоде к лучшему развитию ёмкостных показателей легких. Ранняя коррекция, с точки зрения возможности сохранения целостности фиброзного кольца клапана ЛА и возможности применения методики сохранения ВОПЖ, является предпочтительным методом лечения.

На данный момент по данным литературы нет единого общепринятого возраста для проведения электроивной радикальной коррекции у пациентов с бессимптомной ТФ [1, 2]. Одной из главных задач при хирургической коррекции является возможность сохранения целостности фиброзного кольца клапана ЛА и в идеальном случае предотвращение резекции в ВОПЖ. У бессимптомных пациентов оптимальное время коррекции остается не определенным. По данным М. Cunningham ранняя радикальная коррекция у пациентов старше 2 месяцев имеет минимальные риски и не влечет за собой увеличение частоты повторных вмешательств [49]. Другая группа авторов при введении бессимптомных пациентов с ТФ акцентировала внимание на максимальной возможности сохранения целостности ВОПЖ и ФК клапана ЛА. Необходимыми условиями для электроивной коррекции авторы считают вес пациентов более 4 кг и возраст старше 4 месяцев [50]. Эти параметры определены ими при выполнении ранней РК для минимизации рисков резекции в ВОПЖ. В другой работе по данным S. Reeg и соавторов [51] было показано, что более ранний возраст коррекции ТФ не имел ассоциации с увеличенным временем ИВЛ, длительностью нахождения в реанимационном отделении и в стационаре. По данным авторов при выполнении ранней РК предикторами заболеваемости и удлиненного времени нахождения в стационаре были экстракардиальные аномалии, недоношенность, низкий вес на момент операции и хирургическая

коррекция по срочным и экстренным показаниям. Авторы в своей работе показывают, что ранняя РК может быть безопасно выполнена без увеличения заболеваемости и больших стационарных затрат. В стационарах, в рамках которых представлены результаты данного исследования, радикальная коррекция выполняется на рутинной основе всем пациентам с ТФ, в том числе неонатального возраста. Продолжая обсуждать вопрос безопасности выполнения ранней РК [52], следует подчеркнуть, что некоторые авторы показывают отсутствие госпитальной летальности у пациентов младше 4 месяцев, в том числе у новорожденных, при выполнении ранней РК [4]. Анализируя длительность нахождения в стационаре в одном из исследований ряд авторов во главе с L. Mercer-Rosa показали, что более длительный период госпитализации имеется у пациентов с низким весом при рождении (не на момент операции), с проведением РК в неонатальном периоде, при наличии двух и более эпизодов искусственного кровообращения и при длительном времени пережатия аорты [53]. На основании данного исследования авторы показывают отсутствие взаимосвязи между возрастными характеристиками и длительностью пребывания в стационаре. Имеются работы, в которых вес на момент операции является предиктором времени нахождения в условиях отделения реанимации [54, 55]. Однако, исследование A. Egbe с соавторами, в которое были включены пациенты с тетрадой Фалло всех возрастов, в том числе, и новорожденные, показывает, что оптимальным периодом для выполнения элективной радикальной коррекции является возраст с 3-х до 6-ти месяцев [56]. К таким выводам авторы приходят на основании анализа послеоперационного периода от 3-х лет и более, длительности пребывания в отделении интенсивной терапии, длительности искусственной вентиляции легких, пери- и послеоперационным осложнениям, частоты реопераций.

### 1.3.2 Предотвращение вентрикулотомии

Изначально радикальная коррекция ТФ заключалась в закрытии ДМЖП через расширенный вентрикулотомический доступ с последующей трансаннулярной пластикой [57]. Данный подход приводил у части пациентов к развитию правожелудочковой недостаточности, особенно при значительной протяженности вентрикулотомического доступа. Что касается пациентов, которые успешно перенесли операцию, и которым выполнялась трансаннулярная пластика то, со временем стало понятно, что у подавляющего большинства из них в подростковом возрасте происходит развитие систолодиастолической дисфункции и нарастание конечного диастолического объема ПЖ. Это возникало вследствие недостаточности в проекции отсутствующего клапана ЛА. Так же было показано, что в отдаленном периоде после коррекции ТФ возникают злокачественные желудочковые нарушения ритма, увеличивая тем самым риск внезапной смерти [58]. Причиной этого является формирование механизма реентри вокруг зон хирургических рубцов и заплат, а также значимое увеличение размеров ПЖ. Все вышеперечисленное способствовало необходимости модификации и усовершенствования хирургических методик коррекции.

Одно из направлений для модификации хирургической техники заключалось в попытке отказаться выполнять вентрикулотомию. Это по мнению разных авторов в отдаленном периоде с одной стороны способствовало бы сохранению более правильного геометрического каркаса ПЖ и препятствовало бы развитию ПЖ недостаточности, а с другой – предотвращало бы развитие рубцовых изменений в передней стенке ПЖ и как результат ликвидировало бы субстрат для возникновения желудочковых нарушений ритма и уменьшало бы риск внезапной смерти и частоту желудочковых аритмий в отдаленном периоде [59]. Данная концепция заключалась в замене трансаннулярного доступа (ТАД) для устранения стеноза ВОПЖ и закрытия ДМЖП комбинацией

трансатриального/транспульмонального или изолированного трансатриального доступов (ТАД) [60]. Эта концепция показала свою эффективность для возможности сохранения функции ПЖ в среднесрочном периоде [61]. G. Sun с соавторами показали, что радикальная коррекция ТФ, с использованием трансатриального\транспульмонального доступов при сравнении с трансвентрикулярным приводит к более короткому времени инотропной поддержки, длительности нахождения в условиях реанимации и меньшей частоте желудочковых аритмий [62]. С другой стороны, имеются данные о том, что в группе трансатриального доступа на коротко- и среднесрочном периодах частота резидуальных и вновь возникших стенозов в ВОПЖ немного повышается по сравнению с трансвентрикулярным доступом [63]. В другом исследовании также освещалась методика «сохранения выносящего тракта ПЖ» [64]. Данная методика применялась у пациентов раннего возраста. Стратегия авторов была направлена на предотвращение выполнения вентрикулотомического разреза, либо при невозможности этого, выполнения его минимальной протяженностью. Это тактика приводит к сохранению функции ПЖ в среднесрочном периоде, при минимальных рисках повторных вмешательств и осложнений. В отдаленном периоде (более 15 лет после операции) протезирование клапана ЛА в группе с трансатриальным доступом встречалось меньше со статистически значимым различием по сравнению с группой трансвентрикулярного доступа [65]. Представленные данные позволяют сделать вывод, что при выполнении РК в раннем возрасте, трансатриальный и транспульмональный доступ позволяют эффективно и безопасно устранить стеноз ВОПЖ с оптимальными гемодинамическими показателями и выполнить закрытие ДМЖП с низкими оперативными рисками, что дополнительно было показано в нескольких работах [66, 67]. Таким образом, именно ранняя радикальная коррекция с использованием трансатриального и транспульмонального методов позволяет снизить риск

использования классического трансвентрикулярного подхода.

### **1.3.3 Клапан-сохраняющие процедуры**

Существует мнение, что выполнение ранней РК приводит к увеличению частоты ТАП и в результате к потере клапана ЛА. Парадигма использования трансаннулярной пластики, как было сказано выше, сейчас пересматривается и подвергается изменениям [68, 69]. Нужно отметить, что в настоящее время по результатам анализа Европейской ассоциации кардиоторакальной хирургии (European Association for Cardio-Thoracic Surgery), в базу которой входило более 6,5 тысяч операций радикальной коррекции ТФ, почти в 60% была выполнена ТАП с вентрикулотомией [70]. Другими словами, в большинстве случаев не удаётся сохранить собственный клапан ЛА. Потеря клапана ассоциирована с большими рисками после операции. Так, например, в одном мультицентровом исследовании, посвящённом отдалённым результатам коррекции ТФ, 25-тилетняя выживаемость составила 94,5% [71]. Авторы делают заключение, что помимо этапной хирургической коррекции, потеря клапана ЛА негативно ассоциирована с летальностью в раннем периоде после операции. Таким образом, во многих клиниках пытаются найти способы сохранения клапана ЛА. В мировой литературе представлены несколько возможных методов. Один из них заключался в увеличении фиброзного кольца клапана ЛА рассечением и последующим вшиванием биологического материала и пластики створок клапана ЛА этим же материалом [68, 72]. Авторы называют этот способ клапан-сохраняющей трансаннулярной коррекцией. Однако спустя 20 месяцев только у 20% пациентов не отмечалась выраженная степень легочной регургитации. Следовательно, данный метод в среднесрочном периоде не имеет значимого преимущества перед классической ТАП. Схожим методом является методика, заключающаяся в выполнении трансаннулярного разреза с частичным рассечением части передней



створки клапана ЛА, пластикой этой створки заплатой из аутоматериала [73]. Другой метод заключался в применении интраоперационной баллонной пластики для эффективного увеличения фиброзного кольца клапана ЛА. Первичные и краткосрочные результаты этого метода являются крайне обнадеживающими [74-76]. Вместе с техникой баллонной дилатации одна группа авторов акцентирует внимание на дополнительных сочетанных методах пластики клапана ЛА [77, 78]. Эти методы заключались в выполнении деламинации створок, пластики створок аутозаплатами и дополнительной фиксации створок по комиссурам. Авторы применяли эти методы в зависимости от степени гипоплазии ФК. Однако по данным среднесрочных результатов применения этой методики, было показано постепенное увеличение степени регургитации после интраоперационной баллонной дилатации ФК клапана ЛА в течение пятилетнего периода наблюдения [79]. Необходимо отметить, что описанная техника устранения мышечного компонента стеноза ВОПЖ заключалась в выполнении Т-образного разреза в инфундибулярной (подклапанной) зоне ПЖ, резекции мышечного компонента стеноза и пластике заплатой из аутоперикарда этой области ПЖ. Данная методика с одной стороны минимизирует вероятность сохранения остаточного градиента между ПЖ и ЛА в послеоперационном периоде. С другой стороны, она приводит к отсутствию опорного мышечного каркаса для фиброзного кольца клапана ЛА и, возможно, создаёт предпосылки для его дилатации в долгосрочном периоде. Это может являться одним из объяснений увеличивающейся регургитации на клапане ЛА в отдаленные сроки после операции. Также существует мнение, что постепенно нарастающая регургитация формируется из-за дисплазии собственных створок клапана. Так, например, у пациентов с одностворчатым клапаном, была отмечена самая низкая свобода от реинтервенций [80]. Другими словами, морфология, количество и геометрия створок могут иметь наиболее важное значение для сохранения функции клапана ЛА в отдаленном периоде после коррекции.

Была предложена техника ограниченной ТАП при невозможности выполнения аннуло-сохраняющей процедуры для уменьшения степени регургитации в ВОПЖ [81]. Авторы показали, что при использовании данной методики размеры ПЖ у пациентов в среднесрочном периоде сопоставимы с пациентами с сохранённым фиброзным кольцом клапана ЛА. В недавней работе E. Hickey и соавт. показали, что процент трансаннулярных процедур в когорте 400 пациентов с ранней РК ТФ снизился до 30% [82]. Авторы указывают, что такой процент им удалось достигнуть при применении комбинации методов пластики клапана ЛА: комиссуротомии, выделении с мобилизацией комиссуральных «столбиков» и резекции значительно утолщенных частей створок. Однако в работе не приводятся данные, каким именно образом получалось расширить площадь клапана ЛА при выраженной гипоплазии ФК. Авторы подтверждают, что в группе с сохранённым кольцом клапана, дилатация ПЖ была значительно меньше по сравнению с группой ТАП на протяжении десятилетнего периода наблюдения.

В целом, сохранения ФК клапана ЛА у пациентов с ТФ приводит к более стабильному раннему послеоперационному периоду по сравнению с ТАП и в отдаленном периоде предотвращает развитие диастолической дисфункции ПЖ [83].

#### **1.4 Тактика лечения симптоматических пациентов**

Отдельную группу составляют симптоматические пациенты, тактика которых отличается от пациентов с бессимптомной ТФ. Наличие цианоза в раннем возрасте в большинстве случаев требует выполнения инвазивных процедур, направленных на повышение уровня кислорода в крови. В настоящее время возможно несколько вариантов лечения симптоматических пациентов, а именно наложение системного-легочного

шунта (СЛШ), стентирование открытого артериального протока (ОАП), баллонирование и стентирование выносящего отдела правого желудочка, выполнение радикальной операции, в том числе и в неонатальном возрасте.

Паллиативная коррекция в виде наложения СЛШ известна более 50-ти лет, и как методика получила широкое распространение во всем мире [84-86]. Однако, при относительной простоте и эффективности, существуют серьезные осложнения данного метода, такие как легочная гипер- и гипоперфузия, тромбоз шунта и деформация легочных артерий. Одним из самых серьезных осложнений является летальность, уровень которой достигает 16-18% в группе маловесных пациентов [87, 88]. Также важно отметить, что СЛШ может влиять и на сократительную функцию ПЖ [89].

Стентирование ОАП является относительно новым методом паллиативного лечения пациентов неонатального возраста с цианозом [90]. Этот метод привлекает своей малой травматичностью и относительной простотой, особенно для пациентов со сложной комплексной патологией сердца [91, 92]. При применении стентирования ОАП при сравнении с наложением СЛШ у новорожденных пациентов с дуктусзависимым легочным кровотоком было отмечено более стабильное течение в раннем послеоперационном периоде, и более высокая общая выживаемость в отдаленном [93]. Однако, при изолированном стентировании протока сложно контролировать объем легочного кровотока. В результате может возникать гиперперфузия легких, которая влечет за собой с одной стороны формирование легочной гипертензии (в исключительных ситуациях приводит к отеку легких), с другой стороны данный метод может приводить к обкрадыванию системного кровотока. Таким образом, этот метод тоже сложно отнести к идеальному.

Еще одним методом паллиативной коррекции симптоматической ТФ является интервенционные вмешательства в ВОПЖ. Так рядом авторов было предложено выполнение баллонной вальвулопластики клапана ЛА у пациентов, у которых стеноз ВОПЖ находится в большей степени на

клапанном уровне [94]. К недостаткам этого метода можно отнести относительно узкие показания, т.к. большинство пациентов имеют сочетанный стеноз ВОПЖ (подклапанный мышечный компонент и клапанный). Другим недостатком может быть сложность выполнения процедуры, для которой требуется опытная интервенционная служба. В упомянутом выше исследовании был представлен случай перфорации ПЖ, который повлек за собой развитие тампонады. Последним, но не менее важным недостатком этого метода может являться повреждение клапана ЛА во время процедуры, которое в дальнейшем может препятствовать выполнению клапан-сохраняющей радикальной коррекции.

Схожим методом, который решает проблему многоуровневого стеноза, является метод стентирования ВОПЖ [95, 96]. Данный метод был изначально предложен для неонатальных пациентов высокого риска. Этот метод представляется наиболее перспективным для неонатальной группы пациентов с критическим стенозом [97, 98]. Как упоминалось выше, для метода баллонирования ВОПЖ, этот метод также требует высокоспециализированной интервенционной службы. И не каждый эндоваскулярный хирург сможет выполнить данное вмешательство. Главным недостатком является потеря клапана ЛА после имплантации стента. Однако важно понимать, что наличие критического стеноза ВОПЖ в большом количестве случаев сочетается с выраженной гипоплазией ФК клапана ЛА, что неумолимо приводит к потере целостности клапана ЛА при хирургической коррекции [99].

Методы паллиативной коррекции имеют относительные преимущества и серьезные недостатки. К основному важному преимуществу можно отнести меньшую травматичность по сравнению с радикальной коррекцией. Существенным недостатком этих методов является паллиативный характер этих процедур, что усложняет послеоперационное ведение этих пациентов и может приводить к различным осложнениям, в том числе, и к летальному исходу.

Другим вариантом лечения пациентов с ТФ является метод ранней радикальной коррекции [4]. Радикальная коррекция одномоментно решает сразу две задачи: восстановление физиологической внутрисердечной гемодинамики и обеспечение пульсового потока в легочном русле. С. Lee с соавторами показали относительную безопасность выполнения радикальной коррекции у пациентов неонатального возраста [100]. По сравнению с паллиативными коррекциями или двухэтапным подходом, радикальная коррекция у симптоматических новорожденных приводит к более длительному нахождению в реанимационном отделении после операции и, следовательно, более длительной госпитализации. Однако, в дальнейшем эти показатели выравниваются при сравнении с двухэтапным подходом. В одном крупном исследовании было показано, что РК в неонатальном возрасте у симптоматических пациентов приводила к увеличению рисков повторных вмешательств по сравнению с паллиативными катетерными методами лечения [101]. Однако в этой же работе центральным заключением авторов является то, что уровень летальности, рост легочных артерий и гемодинамические параметры сопоставимы в группах ранней РК и транскатетерных паллиативных методов у пациентов с симптоматической ТФ. Подводя итог, можно заключить, что метод ранней радикальной коррекции и интервенционные паллиативные методы имеют свои преимущества. Для определения наилучшей тактики лечения симптоматических пациентов имеется необходимость в проведении мультицентровых рандомизированных исследований, которые смогут доказать преимущества одного или другого метода в отдаленном периоде после радикальной коррекции.

### **1.5 Расширение показаний для ранней радикальной коррекции**

При классической ТФ со стенозом ВОПЖ и отсутствием больших аорто-легочных коллатеральных артерий, единственным источником легочного кровотока является антеградный поток крови из правого

желудочка. В этой ситуации отмечается гипоперфузия и, как результат, недозаполнение и недонагрузка легочных артерий объемом крови. По данным Y. Shimazaki и соавторов на основании проведенных ангиографических исследований было показано, что у подавляющего большинства пациентов с диагнозом ТФ и медианой возраста 6 месяцев размер легочных артерий близок к нормальному [102]. Однако, несмотря на недогруженность легочного русла объемом, не происходит формирование истинной гипоплазии ветвей ЛА, что позволяет в большинстве случаев в послеоперационном периоде «вместить» полный объем сердечного выброса [5]. Одним из существенных критериев для определения степени развитости легочного русла, и таким образом, возможность выполнения радикальной коррекции порока, является легочно-артериальный индекс (Nakata index) [103]. По данным ряда работ показания данного индекса более 150 мм/м<sup>2</sup> свидетельствует о достаточном развитии легочных артерий с точки зрения «вместимости» сердечного выброса. Однако определение истинных размеров легочных артерий в условиях лимитированного легочного кровотока может иметь тенденцию к их недооценке, что в свою очередь, может уменьшать доступность первичной радикальной коррекции для ряда больных. Таким образом, используемые методы неинвазивной дооперационной визуализации легочных артерий не позволяют точно оценить потенциальный размер центрального легочного русла.

Также важным вопросом является эффективность хирургической пластики относительно небольших легочных артерий при коррекции ТФ в отдаленном периоде [104]. В работе T.J. Wilder проведено сравнение нескольких таких групп пациентов. В одной из них выполнялась пластика центрального легочного русла заплатой до корня легкого, в другой группе была ограниченная пластика ветвей легочной артерии, в третью группу входили пациенты без вмешательств на легочной артерии. По данным авторов, несмотря на улучшение геометрии легочного русла в краткосрочном периоде в группе с заплатой, в долгосрочном периоде

пластика ветвей приводит к развитию отдаленных стенозов легочной артерии и сопровождается более высокой частотой повторных вмешательств, при сравнении с другими группами. Аналогичные выводы были сделаны после анализа длительного периода (более 20 лет) после первичной коррекции [41]. Пластика ветвей легочной артерии увеличивала риск повторных вмешательств. Таким образом, с учетом возможной “псевдогипоплазии” легочных артерий, интраоперационное измерение диаметра легочных артерий позволяет сузить рамки необходимости проведения пластики легочных артерий при проведении хирургического лечения пациентов с ТФ.

Подводя итог всему вышесказанному, можно предполагать, что ранняя радикальная коррекция является методом выбора для лечения пациентов с бессимптомной ТФ. В настоящий момент идеальным способом ее выполнения считается сохранение целостности клапана легочной артерии, предотвращение резекции в ВОПЖ на всю глубину стенки правого желудочка, что позволит в дальнейшем обеспечить наилучшее сохранение его функции, а также будет способствовать предотвращению различных осложнений в отдаленном периоде.

## **1.6 Этиологические факторы развития тетрады Фалло и роль Notch сигнального пути**

Сердце представляет собой сложный внутренний орган, который развивается из первичной трубки. После серии морфогенетических изменений, таких как скручивание и септация, при нормальном развитии формируются четыре камеры сердца и два артериальных сосуда. Развитие сердца контролируется многими сигнальными путями: Notch, BMP, TGF $\beta$ , SMAD. Особую роль играет Notch сигнальный путь. Он получили своё название из-за мутации в гене Notch1, которая вызывала зазубринку на

крыльях мухи (с англ. Notch - зазубринка) [105]. Notch-сигнальный путь является высококонсервативным, контролирует спецификацию клеток и тканевую организацию у эмбриона и взрослого организма. Сигнальный путь Notch вовлечен в дифференцировку, пролиферацию и апоптоз клеток, тем самым обеспечивает общий инструмент развития, влияющий на морфогенез и формирование органов [106]. Notch сигналинг включает 4 трансмембранных рецептора (Notch1, -2, 3, -4) и 5 лигандов, включающих в себя Jagged1 (JAG1), Jagged2 (JAG2) и дельта-подобные лиганды (Delta-like ligands) (DLL1, DLL3 и DLL4) у млекопитающих [107]. Специфическая эндокардиальная активность Notch сигналинга регулирует морфогенез сердца посредством взаимодействия с множественными сигналами, полученными из миокарда, эпикарда и клеток нервного гребня. Мутации в элементах сигнального пути Notch приводят к различным ВПС у людей и мышей, демонстрируя, важную роль данного пути в развитии сердца. Различные исследования выявили участие Notch сигналинга в развитии сердца, врожденных пороках сердца и регенерации сердца [14, 108]. Сигнальный путь Notch моделирует эмбриональный эндокард на будущих областях образования клапанов и камер, а затем регулирует процессы передачи сигналов, участвующих в морфогенезе желудочков и морфогенезе клапана, а также в уплотнение трабекулярности желудочков. Кроме того, было показано, что широкий спектр сердечно-сосудистых патологий, связанных с развитием выносящего отдела левого желудочка, связан с нарушением регуляции всего пути Notch даже без значимых мутаций в генах, связанных с этим сигнальным путем [109-111]. Мутации в *NOTCH1* могут приводить к такому дефекту развития как бicuspidальный аортальный клапан [112].

Причины появления многих ВПС, в том числе ТФ, до сих пор остаются неясными. На данный момент не выявлено ни одного изолированного гена, который был бы ассоциирован с ТФ. В одной из работ использовался метод полноэкзомного сиквенирования для поиска новых



генов, участвующих в развитии ВПС [113]. Мутации ряда генов, кодирующих транскрипционные факторы, и сигнальные молекулы, такие как *NOTCH1*, *FLT4*, *TBX1*, *RYR1*, *ZFPM1*, *SAMTA2*, *DLX6* и *PCM1*, были ассоциированы с ТФ.

Всех пациентов с ТФ условно разделяют на 2 группы: синдромальные и не синдромальные. Синдромальные пациенты составляют примерно 20% всех случаев ТФ и ассоциированы с генетическими синдромами/заболеваниями такими как: Синдром ДиДжорджи, Трисомия 21, синдром Алажиля, синдром Нунана и другие. Так, например, у 13% пациентов с синдромом Алажиля встречается ТФ [20, 114]. Мутации в компонентах Notch-сигнального пути, таких как *NOTCH2*, *JAGGED1* и *HEY2* также ассоциированы с этим синдромом [115]. Остальные, около 80% случаев ТФ, являются несиндромальными без выявленной причины, во многом благодаря их не-Менделеевским паттернам наследования [116].

Риск повторного возникновения ТФ в одной семье составляет около 3%. Мутации в генах *NOTCH1*, *NOTCH2*, *JAG1* семейства Notch, также связаны с ТФ, но чаще вызывают другие пороки сердца [112, 117]. По данным литературы локус *NOTCH1* является частым участком генетических вариантов, предрасполагающих к несиндромальной форме тетрады, причем у 6% пациентов наблюдаются редкие варианты [118]. Так, например, *JAG1* хотя и не является кардио-специфичным, однако, ассоциирован с развитием сердца в виде лиганда в Notch сигналинге [119]. Также у пациентов с ТФ были найдены определенные копии альтераций, которые изменяли *JAG1* и *NOTCH1* [120].

Анализ группы пациентов с ТФ выявил миссенс-мутации, приводящие к нарушениям в функциональной мРНК и возникновению нефункциональных поверхностных белков [121]. Такие мутантные белки проявляют модифицированные посттрансляционные свойства, препятствующие правильному прохождению через мембрану ядра клетки.

Notch сигнальный путь принимает участие не только в кардиогенезе. Его компоненты, часть из которых являются трансмембранными рецепторами, вовлечены в судьбу клеток и во взрослом организме [122]. Он также может быть вовлечен в пролиферативную активность клеток различных тканей и может участвовать в процессе дифференцировки [15, 16]. В миокарде Notch сигналинг необходим для регуляция ключевых механизмов, задействованных в формировании трабекул сердца, а последовательная активация ряда генов Notch, поддерживает формирование, созревание и уплотнение сердечной мышцы. Активация Notch необходима для поддержания пролиферации при рождении [17]. По данным исследования G. Felician с соавторами трансфекция внутриклеточного домена Notch1 может пролонгировать пролиферативный потенциал кардиомиоцитов новорожденных крыс. Но при этом активация пути Notch неэффективна в миокарде взрослого человека, так как чувствительные к Notch промоторы находятся в заблокированном хроматине, характеризующемся наличием репрессивных меток [123]. В другой работе было показано, что Notch1 участвует в регуляции репаративной способности клеток, происходящих из костного мозга, перенесенных в зону инфаркта миокарда. У мышей с полной делецией Notch1 отмечалась бóльшая зона инфаркта и более выраженное снижение функции сердца в постинфарктном периоде, в то время как сверхэкспрессия внутриклеточного домена Notch1 улучшала их репаративную способность [124]. Таким образом, Notch-сигнальный путь является мощным медиатором покоя, пролиферации и дифференцировки стволовых клеток, в том числе в мезенхимных клетках сердца. Принимая во внимание важность Notch для развития и формирования паттерна сердца [111, 125, 126], можно предположить, что Notch сигналинг может быть дисрегулирован в тканях сердца пациентов с ТФ, и эта дисрегуляция может быть ответственна за ремоделирование миокардиальной ткани у пациентов с ТФ.

Таким образом, Notch сигнальный путь с одной стороны ассоциирован с развитием различных ВПС, в том числе, тетрады Фалло. С другой стороны, он влияет на регуляцию способности к пролиферации и дифференцировке стволовых клеток, в том числе мезенхимных клеток сердца и зрелых кардиомиоцитов.

### **1.7 Мезенхимные клетки сердца и клеточная терапия ВПС**

В настоящее время имеются данные о том, что сердце у позвоночных может регенерировать. Процесс регенерации значительно активнее происходит у земноводных и менее выражен у млекопитающих [127]. Недавние исследования показали, что кардиомиоциты могут в значительной степени восстанавливаться в раннем возрасте и что эта способность снижается с течением времени [128]. В последнее время клеточная терапия как дополнение к общепринятой консервативной и хирургической коррекции рассматривается как наиболее перспективный способ для снижения заболеваемости и проявлений сердечной недостаточности у широкого спектра ВПС на разных сроках после оперативного вмешательства. Несмотря на то, что у организма присутствует собственная способность по восстановлению миокарда, она как правило значительно ограничена у людей и ее механизмы до сих пор полностью не известны. В связи с чем в настоящее время проводится несколько клинических испытаний у пациентов с ВПС при использовании различных видов стволовых клеток. В целом сейчас описано несколько возможных стратегий клеточной терапии у детей и взрослых с ВПС.

Первым из рассматриваемых вариантов будет методика применения соматических стволовых клеток. Рассматриваются различные виды таких клеток, в том числе мезенхимные стволовые клетки из таких органов как костный мозг, сердце, мышечная и жировая ткань, а также циркулирующие стволовые клетки, которые могут способствовать регенерации миокарда и

могут быть задействованы в клинических исследованиях [129]. На животных моделях перегрузки давлением правого желудочка интрамиокардиальное введение таких клеток положительно влияло на сохранение глобальной и локальной сократительных функций сердца, а также уменьшало ремоделирование миокарда [130].

Еще одним из возможных объектов для клеточной терапии рассматриваются стволовые клетки пуповинной крови. Была доказана безопасность и возможность применения таких клеток, однако, наличие функциональных улучшений нельзя было объяснить дифференцировкой этого вида стволовых клеток непосредственно в кардиомиоциты [131]. Данный вид клеток использовался при терминальной сердечной недостаточности у пациентов с различными видами ВПС и показал обнадеживающие результаты [132-134]. Таким образом, по предварительным данным было отмечено наличие потенциала у терапии стволовыми клетками для лечения детей, о чем свидетельствует заметное улучшение сердечной функции и снижение статуса сердечной недостаточности.

Другим из источников для кардиорегенерации может служить самообновляющаяся пул резидентной популяции стволовых клеток сердца или клеток-предшественников кардиомиоцитов (КПК). В данных клетках экспрессируются специфичные для кардиомиоцитарной линии дифференцировки гены, при этом отсутствует экспрессия генов, кодирующих саркомерные белки. Все это указывает на наличие у этих клеток признаков кардиомиоцитарной линии и указывает на их незрелость. Этот вид клеток является мультипотентным, они могут дифференцироваться в гладкомышечные клетки и эндотелиальные клетки *in vitro*, а также могут способствовать *de novo* образованию сосудов *in vivo* [135]. В настоящее время эти клетки рассматриваются, как возможный источник для частичной внутренней регенерации сердечной мышцы. По данным литературы описано несколько видов таких клеток (рис.2).

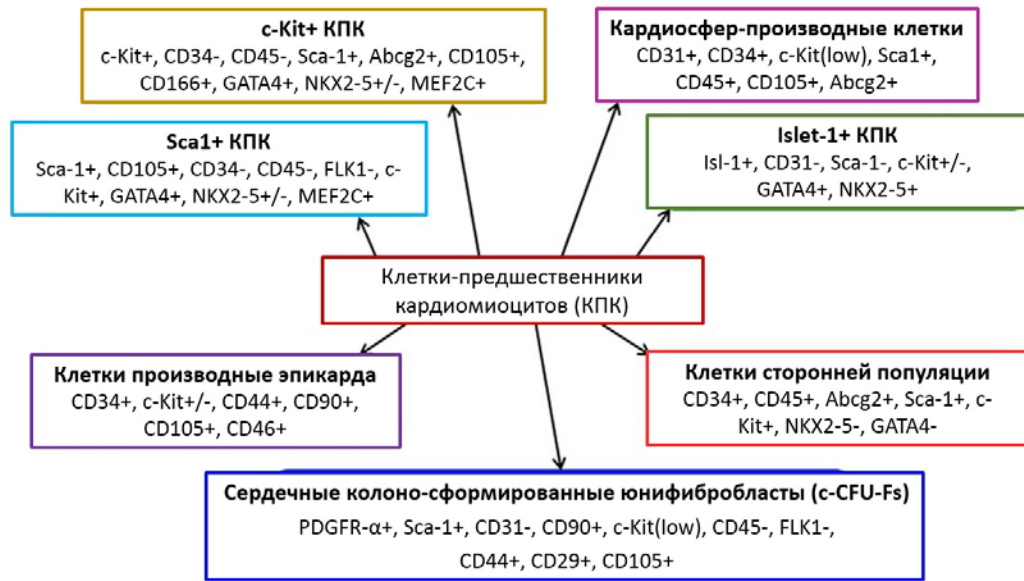


Рисунок 2 – Виды клеток-предшественников кардиомиоцитов и их маркеры [136]

Около 15 лет назад были описана популяция клеток в сердце, которая обладала стволовыми свойствами и экспрессировала маркер c-kit [137]. Однако, стоит упомянуть, что большая часть исследователей в последнее время относится скептически к возможности замещения поврежденных кардиомиоцитов c-kit+ клетками и их специализации в кардиомиоциты [138-140]. Несколько исследований показали, что c-kit экспрессирующие клетки скорее способствуют образованию эндотелиальных клеток и васкулогенезу, чем образованию функционально активных кардиомиоцитов при ишемическом повреждении миокарда [139, 140]. Было показано, что возможно получение, культивирование и изучение линии жизнеспособных предшественников кардиомиоцитов с целью потенциального применения во время кардиохирургического вмешательства у пациентов [141].

Как было упомянуто выше, существует несколько подвидов КПК. Одним из них являются клетки, происходящие из кардиосфер (cardiosphere-derived cells). Данный тип клеток показал значимую эффективность в

эксперименте при инфаркте миокарда и наличии потенциала у этих клеток для дифференцировки в кардиомиоциты [142], ангиогенеза и секреции паракринных факторов [143]. В настоящее время проводится исследование, направленное на изучение возможности клеточной терапии на основе этого вида клеток у взрослых пациентов с дилатационной кардиомиопатией при использовании аллогенной трансплантации клеток [144]. Также использование этого вида клеток показало хорошие результаты при интракоронарном введении на животных моделях правожелудочковой недостаточности, тем самым моделировалось состояние после коррекции ТФ с потерей клапана ЛА. По результатам работы отмечались функциональные улучшения сердца, регенерация кардиомиоцитов и уменьшение фиброза миокарда [145].

В последнее время все чаще оказывается в научном фокусе репаративная способность КПК у пациентов различного возраста с патологией сердца. Так, например, показывалась активация стволовых клеток сердца при ишемическом повреждении миокарда [146]. После рождения к 21-му дню жизни количество кардиомиоцитов удваивается [7]. Прямая количественная стереологическая оценка показала, что количество кардиомиоцитов в первый год жизни примерно один миллиард, а у взрослого примерно четыре миллиарда, что соответствует количеству кардиомиоцитов, которые будут генерироваться из клеточных делений [147]. Клеточный регенеративный потенциал был наглядно показан на экспериментальных моделях млекопитающих. Было установлено, что более высокие репаративные свойства наблюдаются в более раннем возрасте. Одним из показательных примеров может служить то, что у новорожденных мышей может полностью регенерировать верхушка сердца при ее трансмуральном повреждении или ампутации, если это происходит в сроки до 5-7-ми дней после рождения [148, 149]. Также было установлено, что восстановление происходит с минимальной гипертрофией и фиброзом за счет локальных предсуществующих кардиомиоцитов. Однако некоторые

авторы акцентируют внимание на том, что это лишь ограниченный транзиторный эффект, который значительно снижается после 7-ого дня жизни. Другие авторы утверждают, что этот период значительно меньше у мышей и не превышает 2-х суток жизни [150]. В 2012 году в одной из работ было продемонстрировано, что неонатальные МКС от пациентов с различными формами ВПС имеют более высокий регенеративный потенциал по сравнению с аналогичными клетками от взрослых пациентов [10]. Одна из работ фокусировалась на исследовании пролиферативного потенциала МКС от пациентов с ВПС различных возрастов [151]. Было установлено, что количество данных клеток с возрастом в правом предсердии (ПП) снижается с 8,9% до 3,2%, а в ПЖ с 0,4% до 0,1%. C-kit+ клетки в три раза чаще обнаруживались у новорожденных по сравнению с детьми старше 2-х лет. Пролиферативный и дифференцировочный потенциалы также были выше у пациентов неонатального возраста. Показательным можно считать случай, в котором у новорожденного пациента сразу после рождения произошел тромбоз передней нисходящей артерии, и, несмотря на проведение тромболизиса, произошло развитие тяжелой сердечной недостаточности, потребовавшей подключения аппарата вспомогательного кровообращения [152]. Однако в дальнейшем произошло постепенное полное морфологическое восстановление сократительной способности миокарда без морфологических изменений.

Ряд работ показывают, что клетки от пациентов неонатального возраста имеют более высокий регенеративный потенциал по сравнению с клетками от пациентов более старших возрастных групп. По данным литературы, существует ограниченный период времени сразу после рождения, при котором наблюдается высокий репаративный и регенеративный потенциал в миокарде, который, начинает снижаться после двухлетнего возраста. Но к настоящему времени нет единого мнения о точном возрасте, при котором у детей наблюдается более активные регенеративные способности миокарда.

В настоящее время остается открытым вопрос о возможности использования повышенных регенеративных и репаративных свойств миокарда при более ранней хирургической коррекции ВПС. Широко известно, что чем младше пациент, тем выше риск различных осложнений при хирургическом вмешательстве, особенно это касается неонатального возраста. В одной из работ было показано наличие возраст - опосредованной репаративной активности у КПК у новорожденных пациентов и пациентов в возрасте до 5-ти лет [11]. Авторы продемонстрировали, что КПК от новорожденных пациентов при применении в экспериментальной модели ювенильной сердечной недостаточности *in vivo* имели наиболее выраженный репаративный эффект, который имел возраст-опосредованное действие. В другой работе анализировалась пролиферативная активность от пациентов с ДМЖП от 1-ого до 12-ти месяцев [153]. Было установлено, что кардиомиоциты от пациентов младше 3-х месяцев имели более высокую пролиферативную способность как *in vivo* так и *in vitro*. Авторы делают вывод, что с точки зрения клеточной сердечной регенерации, лечение пациентов до 3-х месяцев является более оптимальным. Также была показана возможность индуцирования активной пролиферации кардиомиоцитов в возрасте до 6-ти месяцев, что также может указывать на временной рубеж активной пролиферации [148].

Суммируя данные литературы можно утверждать, что в сердце имеется пул локальных стволовых клеток, который участвует в регенерации, репарации сердечной мышцы и который вовлечен в локальный ангиогенез. Активность этих клеток, в том числе пролиферативная, снижается с возрастом, при этом регенеративная способность у новорожденных превосходит данную способность у более старших детей и взрослых. Таким образом, данный вид клеток может рассматриваться в качестве дополнительного нового метода для клеточной терапии ВПС. С другой стороны, можно предполагать, что лечение пациентов с ВПС в более



раннем возрасте с точки зрения тканевой регенерации и пролиферации более предпочтительно.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Методы исследования

#### 2.1.1 Клинические методы исследования

Эхокардиографическое исследование проводилось всем пациентам до операции, сразу после операции, ежедневно после операции и в отдаленном периоде на протяжении 4 лет. При выполнении данного исследования измерялись размеры фиброзного кольца клапана легочной артерии, значения пикового и среднего градиента, степень регургитации клапана. Эхокардиографическое исследование проводилось по стандартизированной методике с использованием ультразвуковых систем «Vivid-i C 257» (США) и «Phillips iE-33» (США) с использованием фазово-электронного сканирующего датчика с частотой от 3,5 до 7,0 МГц с возможностью цветного доплеровского картирования и импульсной непрерывной спектральной доплерографии.

Компьютерная томография выполнялась всем пациентам перед хирургической коррекцией для оценки степени развитости легочного русла и исключения значимых аорто-легочных коллатералей. Компьютерная томография с контрастированием в режиме ангиографии выполнялась по протоколу со сниженной лучевой нагрузкой на аппарате Siemens Somatom Definition 128.

Показатель Z-score вычислялся на основе весо-ростовых характеристик при использовании системы данных детского госпиталя Бостона ([zscore.chboston.org](http://zscore.chboston.org)). Индекс Nakata вычислялся по формуле суммы площади поперечного сечения левой и правой легочных артерий, разделенной на площадь поверхности тела

$$\text{Индекс Nakata} = \frac{S_{\text{ЛЛА}} + S_{\text{ПЛА}}}{S_{\text{ППТ}}}, \quad (1)$$

где  $S_{ЛЛА}$  – площадь поперечного сечения левой легочной артерии;

где  $S_{ПЛА}$  – площадь поперечного сечения правой легочной артерии;

где  $S_{ППТ}$  – площадь поверхности тела.

Для анализа операционных характеристик собирались следующие данные: сохранение собственного клапана легочной артерии (КЛА) во время оперативного вмешательства или выполнение трансаннулярной пластики (ТАП) с / без моностворки. Также заносились данные времени пережатия аорты, времени искусственного кровообращения, уровня гипотермии и общей длительности операции.

Для оценки раннего послеоперационного периода оценивались длительность применения инотропных препаратов (дофамина и адреналина), инотропный индекс на 24 и 72 часа, длительность искусственной вентиляции легких (ИВЛ). Для оценки общего статуса пациентов после операции оценивалась длительность госпитализации.

**Статистический анализ.** Сравнение непараметрических вариационных рядов (2 независимые группы) производилось с помощью U-критерия Манна – Уитни, трех групп с помощью рангового анализа вариаций по Краскелу-Уоллису с последующим парным сравнением групп тестом Манна-Уитни с применением поправки Бонферрони при оценке значения  $p$ . Значение  $p < 0,05$  принималось как статистически значимое. Данные представлены в виде медианы вариационного ряда и интерквартильного размаха (25 и 75 процентиля). На диаграммах размаха горизонтальными линиями внутри прямоугольников обозначены медианы; верхняя и нижняя границы прямоугольников отражают 25-75 процентиля соответственно; вертикальные линии от прямоугольников показывают диапазоны минимальных и максимальных значений. Корреляционный анализ выполнялся с использованием непараметрического критерия

Спирмена. Корреляцию считали высокой при  $R=0,5-0,7$ , средней при  $R=0,3-0,5$ . Данные представлены в виде  $M \pm SD$  (при нормальном распределении значений) или  $Me (Q1;Q3)$  при распределении значений, отличных от нормального. Надежность используемых статистических оценок принималась не менее 95%. Использовались программные пакеты Microsoft Office Excel 2010, STATISTICA 10.0 (Statsoft, USA), Graphpad Prism ver.5.0 (GraphPad Software, Inc).

### **2.1.2 Клиническая характеристика пациентов**

В настоящее исследование были включены 63 пациента с диагнозом тетрада Фалло, находившиеся на лечении в НМИЦ им. В.А. Алмазова с января 2014 по декабрь 2018 г, которым была выполнена плановая (элективная) радикальная коррекция порока. Изначально было сформировано 2 группы пациентов: первая - ранняя радикальная коррекция до 6 месяцев и вторая - в возрасте старше 6 месяцев. Распределение осуществлялось в зависимости от возраста поступления пациентов на отделение (пациенты более старшего возраста направлялись на хирургическое лечение из регионов). Пациенты, которые были проконсультированы после рождения в нашем центре, поступали в более раннем возрасте на плановую операцию. В процессе анализа клинического материала было принято решение разделить дополнительно первую группу на две подгруппы: до 3 месяцев и 3-6 месяцев. Выделение дополнительной подгруппы было обусловлено следующими факторами: уменьшение рисков оперативного вмешательства после 2-3 месяцев вследствие адаптации функций органов и тканей пациента, уменьшение явлений физиологической легочной гипертензии, а также существующей гипотезе о более вероятном сохранении целостности КЛА при хирургической коррекции.

В результате все пациенты были разделены на 3 группы в зависимости от возраста радикальной коррекции. Первую группу исследования составляли пациенты возрастом до 3 месяцев, вторую – 3-6 месяцев, третью

– старше 6 месяцев. Операция у пациентов в первых двух групп трактовалась как ранняя радикальная коррекция. Пациентам в 3 группе выполнялась первичная радикальная коррекция или радикальная коррекция с предшествующей паллиативной операцией.

Клинические примеры ЭХОКГ приведены на рисунках 3 и 4.

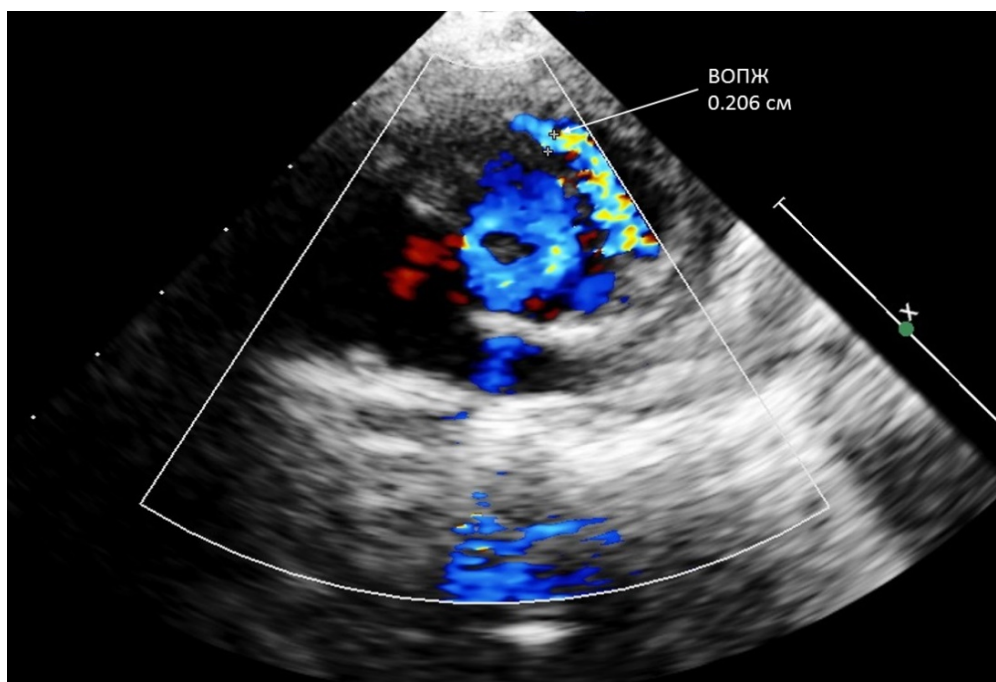


Рисунок 3 – Выраженный стеноз выносящего отдела правого желудочка (ВОПЖ) по данным 2-D эхокардиографии с цветным доплеровским картированием

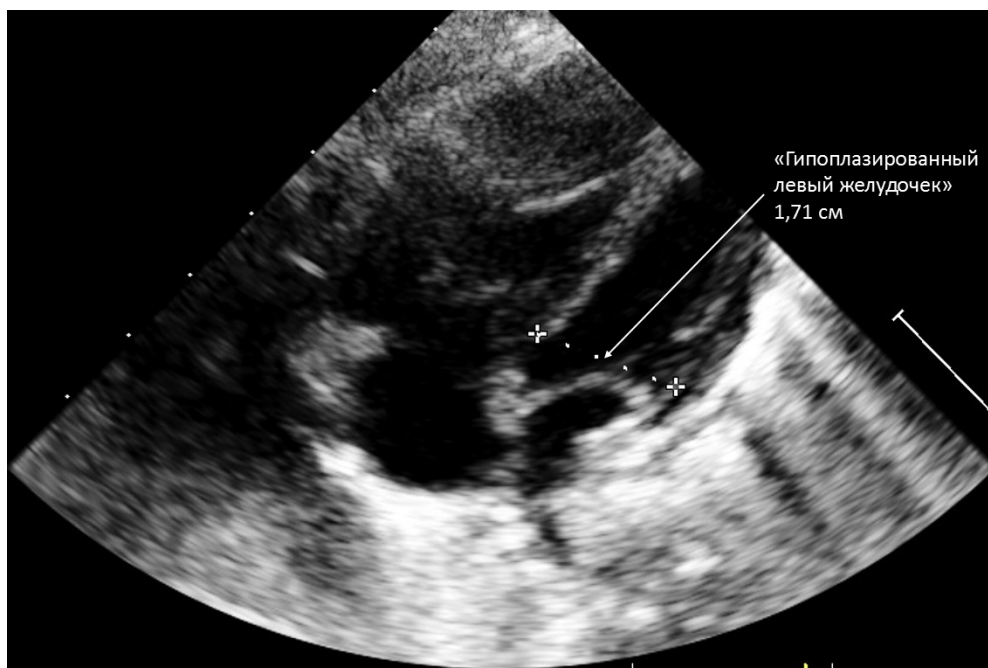


Рисунок 4 – «Гипоплазированный левый желудочек» и его соотношение с правым желудочком. 2-D эхокардиография

Выполняемая перед операцией компьютерная томография показывала степень развитости легочного русла и в некоторых случаях относительную гипоплазию ветвей легочной артерии (рис. 5-7).



Рисунок 5 – Гипоплазия ствола легочной артерии (Z-score - 4,21)

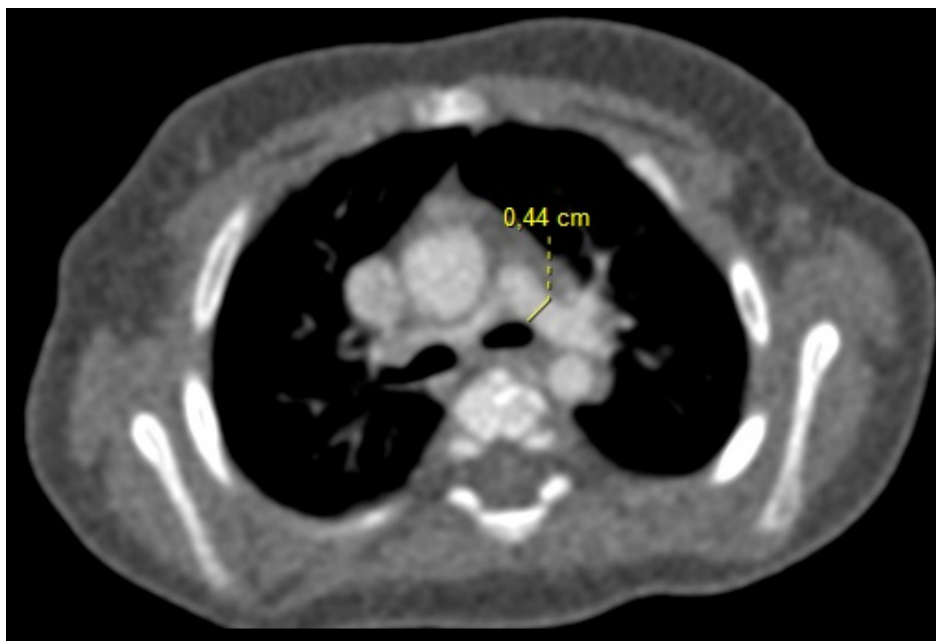


Рисунок 6 – Гипоплазия левой легочной артерии (Z-score -1,58)

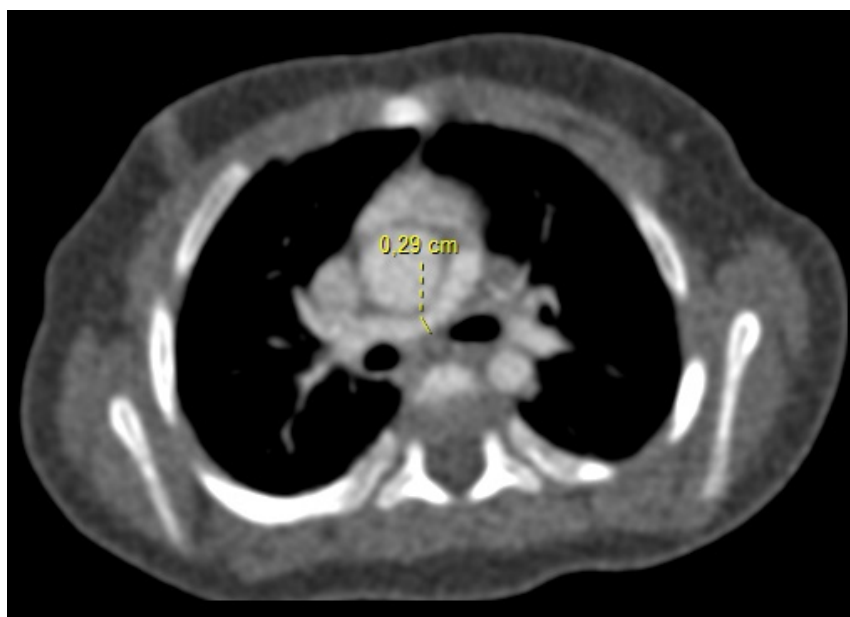


Рисунок 7 – Гипоплазия правой легочной артерии (Z-score -3,24)

Всем пациентам производилось измерение размеров ветвей ЛА тремя различными методами: по данным ЭХОКГ, КТ и интраоперационно с использованием сайзеров (дилататоров DeBakey) (Рис. 8)

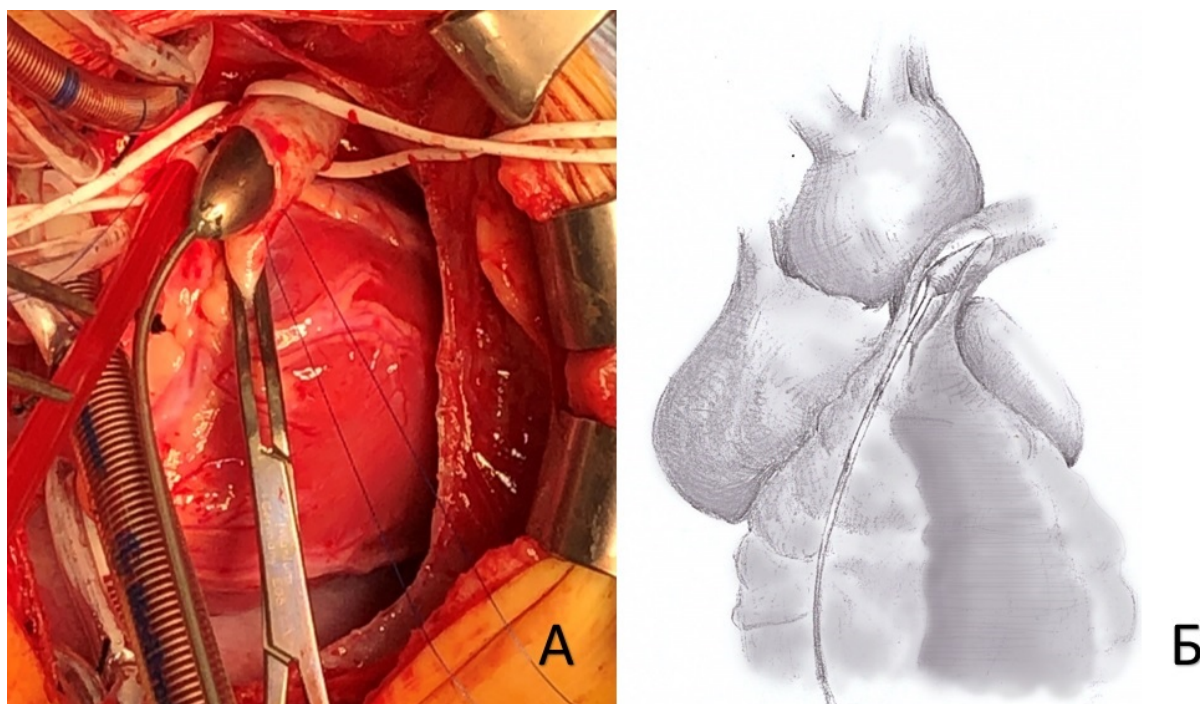


Рисунок 8 – А. Интраоперационное изображение измерения размера левой ЛА дилататором DeVakey. Б. Схематическое изображение измерения левой ЛА

Критериями для оценки эффективности коррекции являлись значение пикового градиента между ПЖ и стволом легочной артерии, измеренное в мм рт. ст., а также отношение давления в ПЖ к давлению в ЛЖ в процентном соотношении.

Инотропный индекс (ИИ) показывал тяжесть инотропной поддержки после коррекции. Инотропный индекс вычислялся по следующей формуле:

$$\text{Допамин (мкг/кг/мин)} + \text{Добутамин (мкг/кг/мин)} + 100 \times \text{Адреналин (мкг/кг/мин)} \quad (2)$$

Значения ИИ оценивались через 24 и 72 часа после операции.

Критерии включения в исследование:



- пациенты с тетрадой Фалло, которым выполнялась радикальная коррекция порока;
- плановая (элективная) коррекция без экстренных показаний;
- возраст старше одного месяца.

Критерии исключения из исследования:

- пациенты, которым на момент сбора данных была выполнена только паллиативная коррекция и не выполнена радикальная коррекция, до окончания исследуемого периода;
- пациенты с ТФ в сочетании с атрезией клапана легочной артерии, с агенезией клапана легочной артерии и с полной формой атриовентрикулярного канала.

## **2.2 Экспериментальные методы исследования**

### **2.2.1 Клеточные культуры**

Для проведения экспериментальной работы с клеточными культурами было получено разрешение локального этического комитета. Все эксперименты проводились в соответствии с принципами Хельсинской декларации.

Для исследования использовались клеточные культуры клеток миокарда правого желудочка от 42 пациентов с ТФ и 16 пациентов с ДМЖП в качестве контрольной группы. Фрагменты миокарда ПЖ и ПП (правого предсердия) пациентов получали в ходе плановых операций по радикальной коррекции порока, осуществляемых в ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России. Забор операционного материала проводился после подписания законными представителями пациентов информированного согласия. Первичные культуры получали путем измельчения фрагмента

ткани миокарда и последующей ферментативной обработки коллагеназой II (0,7 мг/мл) в течение 120 минут при температуре 37°C [154]. Через 1 сутки среду заменяли на свежую, удаляли крупные остатки и затем культивировали до достижения конфлюэнтного состояния (приблизительно через 5-7 суток). По достижению конфлюэнтного состояния культура состояла из мелких однородных быстроделющихся клеток.

**Культивирование клеток.** Суспензию клеток просеивали через 40 мкм фильтр, центрифугировали при скорости 300 g в течение 5 минут, затем клетки ресуспендировались в питательной среде (22,5 % EGM-2 (Stem Cell, США), 67,5 % M199, 10% телячьей эмбриональной сыворотки (Hyclone), 1x неспецифических аминокислот, 50 ед/мл пенициллина and 50 мкг/мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific). После этого клетки высевались на покрытые 0,1% желатином культуральные планшеты и доводили культуры до состояния конфлюэнтности. Клеточные культуры культивировали при 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> и 99%-ой влажности. Полученная культура популяции клеток была однородна. Клеточную среду меняли каждые 2 суток. В работе использовали клетки 4 - 8-го пассажей.

**Пролиферативная активность.** Пролиферативная активность клеток оценивалась в реальном времени при использовании xCELLigence RTCA S16 (Agilent). 5000 клеток в 100 мкл раствора вносили в каждую из лунок специальных культуральных планшетов. Затем было добавлено по 100 мкл раствора в каждую ячейку. Значения импеданса каждой ячейки автоматически мониторировались в течение 72 часов и были перенесены на график как CI (Cell Index – клеточный индекс), который вычислялся автоматически программным обеспечением по следующей формуле:

$$CI(t) = \frac{R(f_n, t) - R(f_n, t_0)}{Z_n}, \quad (3)$$

где CI (t) – клеточный индекс;

$f_n$  - частота, на которой выполняется измерение импеданса;

$R(f_n, t)$  - измеренное сопротивление на частоте  $f_n$  в момент времени  $t$ ;

$R(f_n, t_0)$  - измеренный импеданс на частоте  $f_n$  в момент времени  $t_0$ ;

$t_0$  - время, когда измеряется фон;

$Z_n$  - это соответствующий частотный коэффициент  $f_n$ .

Все образцы анализировались в дубликатах. Для анализа данных использовалось программное обеспечение RTCA Software (версия 1.0.0.1304).

**Праймеры.** Для анализа экспрессии генов в работе использовали праймеры, синтезированные в компании Евроген (Россия) и Applied Biosystems (США). Последовательности использованных праймеров приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Праймеры, использованные в ПЦР в реальном времени

Название праймера	Последовательность (5'→3')
Праймеры для эндогенного контроля	
GAPDH	F: AATGAAGGGGTCATTGATGG
	R: AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA
Праймеры для генов Notch сигналинга	
HEY1	F: TGGATCACCTGAAAATGCTG
	R: CGAAATCCCAAACCTCCGATA
HES1	F: AGCACAGAAAGTCATCAAAG

	R: AGGTGCTTCACTGTCATTTTC
NOTCH1	F: GTCAACGCCGTAGATGACC
	R: TTGTTAGCCCCGTTCTTCAG
NOTCH2	F: ATGGTGGCAGAACTGATCAAC
	R: TTGGCAAAATGGTCTAACAGG
NOTCH3	F: GGAGCCAATAAGGACATGCAGGAT
	R: GGCAAAGTGGTCCAACAGCAGC
NOTCH4	F: GTTGTGACAGGGTTGGGACT
	R: CAGCCCAGTGGGTATCTCTG
DLL4	F: AGGCCTGTTTTGTGACCAAG
	R: CTCCAGCTCACAGTCCACAC
JAGGED1	F: TGCCAAGTGCCAGGAAGT
	R: GCCCCATCTGGTATCACACT

### 2.2.2 Выделение РНК из клеточных культур

Выделение РНК из клеток проводили при помощи реагента для экстракции тотальной РНК (Евроген, Россия). Из чашек отбирали среду для культивирования, клетки промывали PBS, добавляли реагент для выделения РНК и, при помощи скребка, снимали клетки с чашки. Центрифугировали и добавляли к супернатанту хлороформ для разделения фаз (0,1 мл на 0,5 мл реагента), центрифугировали, отбирали водную фазу. Для осаждения РНК к водной фазе добавляли изопропиловый спирт (0,25 мл на 0,5 мл реагента). Инкубировали при  $-20-40^{\circ}\text{C}$  в течение 12-24 часов, затем промывали осадок РНК в 75% растворе этанола (0,5 мл на 0,5 мл реагента). Спирт удаляли и

осадок сушили в течение 30 минут. Затем осадок растворяли в 20 мкл стерильной воды, очищенной от нуклеаз. Количество выделенной РНК оценивали с помощью спектрофотометра Nanodrop (Thermo scientific, США) в концентрации нг/мкл, также оценивали чистоту образцов – соотношение пиков поглощения 260 нм/280 нм – соответствие примесям белков и аминокислот; 260 нм/230 нм – примесям солей и фенола. Оценку качества выделенной РНК проводили при помощи метода электрофореза в агарозном геле при силе тока 70 – 90 мА с использованием электрофоретических приборов (BioRad, США).

### **2.2.3 Обратная транскрипция**

Реакция обратной транскрипции необходима для получения из РНК кДНК. Для этого использовали набор для обратной транскрипции (Евроген, Россия). Для осуществления реакции брали следующие компоненты: 1 или 2 мкг РНК (в зависимости от концентрации) разбавляли стерильной водой до 8 мкл, добавляли 1 мкл рандомных праймеров, 4 мкл 5x буфера (First Strand buffer), 2 мкл воды из набора, 2 мкл 10 мМ нуклеотидтрифосфатов, 2 мкл дитиотреитола (DTT) и 1 мкл M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) обратной транскриптазы.

### **2.2.4 ПЦР в реальном времени**

Для количественного анализа изменения уровня экспрессии исследуемых генов использовали коммерческие системы ПЦР в реальном времени SYBR Green (Евроген, Россия). Из расчета на 1 реакцию использовали 13 мкл воды SQ, по 1 мкл прямого и обратного праймеров, 5 мкл буфера с флуоресцентным красителем (qPCRmix-HS SYBR+ROX) и 5 мкл (разбавленной до 100 мкл водой) кДНК матрицы, полученной в результате реакции обратной транскрипции. В случае проведения ПЦР в реальном времени с использованием системы TaqMan, из расчета на 1 реакцию использовали: 14 мкл воды SQ, 1 мкл специфического зонда, 5 мкл

буфера (qPCRmix-HS ROX) и 5 мкл (разбавленной до 100 мкл водой) кДНК матрицы, полученной в результате реакции обратной транскрипции. Реакцию проводили в 96-луночных оптических платах (Applied Biosystems, США). Режим работы амплификатора: 5 минут 95°, затем 45 циклов, включающих денатурацию по 15 секунд при 95°C и отжиг праймеров с амплификацией 60 секунд при 60°C. Температура отжига всех праймеров составляла около 60°C. Праймеры для ПЦР в реальном времени подбирали с использованием программы “Oligo 6” (Molecular Biology Insights, США). Для анализа данных, полученных в ходе количественной ПЦР в режиме реального времени, в качестве метода представления относительной экспрессии гена использован сравнительный Ct метод (2- $\Delta\Delta$ Ct метод), в модификации «относительное околичествление», при котором оценка экспрессии гена интереса производилась относительно экспрессии внутреннего контрольного гена. В ходе анализа для каждой реакции рассчитывали следующие показатели: значение Ct ( $\Delta$ Ct), значение  $\Delta$ Ct ( $\Delta\Delta$ Ct) для репликатов, показатель  $2\Delta\Delta$ Ct, кратность отношения уровней экспрессии в образцах (в сравнении индивидуальных экспериментальных групп со средним значением для внутреннего контрольного образца). Уровень экспрессии исследуемого гена нормализовали по уровню экспрессии гена домашнего хозяйства GAPDH. Серии экспериментов повторяли трижды (биологические репликаты), для каждого эксперимента проверку уровня экспрессии соответствующего гена повторяли дважды (технические репликаты).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1 РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1.1 Интраоперационные данные

Всего в исследование было включено 63 пациента: в 1 группу – 10 пациентов, во 2-ю группу – 30 пациентов, в 3-ю – 23 пациента. При проверке данных на нормальность распределения по  $W$  критерию Шапиро-Уилка было установлено, что симметричное распределение, близкое к нормальному, имеют только показатели времени искусственного кровообращения и времени пережатия аорты. Поэтому в дальнейшем при анализе индивидуальных показателей использовались только непараметрические методы статистического анализа: две независимые группы сравнивались с помощью  $U$ -критерия Манна – Уитни. Медиана возрастов составила 88 (44;94) дней для 1-й группы, 132 (98;172) дней для 2-й группы и 256 (182;1859) дней для 3-й группы. Вес пациентов статистически отличался между группами ( $p < 0,05$ ). Медианы размеров фиброзных колец клапана легочной артерии составили: для 1-й группы - 5,0 (4,0; 8,0) мм, для 2-й группы – 7,0 (3,0; 11,0) мм, для 3-й группы – 7,8 (4,5; 12,0) мм. Статистическое различие было получено только между 1 и 3 группами ( $p < 0,05$ ) (Рис. 9).

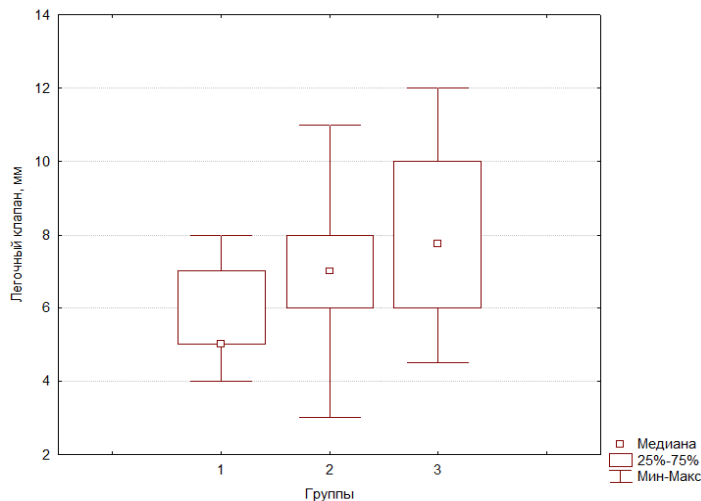


Рисунок 9 – Размер клапана легочной артерии у пациентов

различных групп

После индексации размеров клапана ЛА к весо-ростовым характеристикам, было получено, что показатели индекса Z-score КЛА не отличаются статистически между группами (Рис. 10).

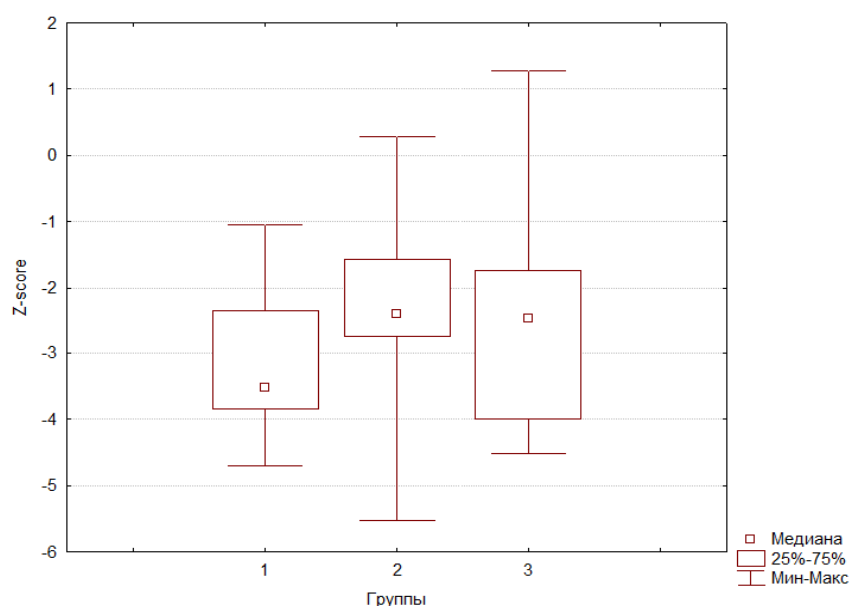


Рисунок 10 - Z-score клапана легочной артерии у пациентов различных групп

Оперативные данные представлены в таблице 2. В данной таблице приведены медианы и интерквартильные интервалы пикового градиента между ПЖ и ЛА после коррекции, соотношение систолического давления в ПЖ к ЛЖ после коррекции, времени искусственного кровообращения, пережатия аорты, температуры охлаждения и времени операции.

Таблица 2 – Оперативные данные

Группы	1	2	3
Сохранение КЛА, n (%)	4 (40%)	18 (60%)	10 (43%)
Трансаннулярная пластика, n (%)	6 (60%)	12 (40%)	13 (57%)



Имплантация моностворки	1	11	8
Баллонирование КЛА	4	8	0
Механическая дилатация КЛА, n	0	5	0
Градиент ПЖ/ЛА, мм рт. ст.	24 (20; 35)	18 (10; 25)	14 (11; 27)
Давление ПЖ/ЛЖ, %	51 (45-72)	48 (35-69)	34 (30-57)
Искусственное кровообращение, мин	132 (89;235)	128 (56;239)	154 (81;191)
Пережатие аорты, мин	68 (43;102)	67 (31;122)	79 (38;144)
Температура охлаждения, °С	27 (24;32)	28 (24;32)	28 (24;32)
Время операции, мин	220 (185;390)	223 (135;365)	283 (170;360)

*Примечание.* КЛА - клапан легочной артерии, ЛА – легочная артерия, ПЖ – правый желудочек, ЛЖ – левый желудочек

Важно, что при ТАП в большинстве случаев выполнялась одновременная имплантация моностворки. Во всех группах значения пикового градиента между ПЖ и стволом ЛА, а также отношение давления ПЖ/ЛЖ были приемлемы в конце операции.

В таблице 3 представлена совокупность до- и интраоперационных измерений диаметров ЛА у всех пациентов индексированных в Z-score.

Таблица 3 – Предоперационные и операционные результаты измерения ЛА (Z-score)

	ЭхоКГ	КТ	Операция
Левая легочная артерия	-1,63 (-2,24; -0,66)	-0,06 (-1,17; 1,07)	-0,48 (-0,74; -1,29)

Правая легочная артерия	-1,57 (-2,2; -0,72)	-0,69 (-1,45; -0,81)	-0,34 (-0,33; -0,89)
-------------------------	---------------------	----------------------	----------------------

При анализе результатов были выявлены различия в размерах легочных артерий между показателями, полученными по данным дооперационных визуализирующих методов обследования, и данными из операционных протоколов (Рис. 11). При проведении статистического анализа полученных данных при помощи критерия Манна-Уитни выявлено, что Z-score правой и левой ветви легочной артерии по данным ЭхоКГ были существенно меньше при сравнении с данными МСКТ ( $p < 0,01$ ). В свою очередь, сравнительная оценка дооперационных и интраоперационных размеров ЛА выявила различие между размерами ЛА на основании данных КТ по сравнению с интраоперационными измерениями, однако статистически незначимую ( $p = 0,05$ ). У 10 пациентов с индексом Nakata по данным КТ менее  $150 \text{ мм}^2/\text{м}^2$  и показателями Z-score ветвей ЛА от -3,41 до -0,43 после измерения размеров ЛА в операционной была выполнена радикальная коррекция. Таким образом, чувствительность предоперационных методов составила 63%, а специфичность 86%

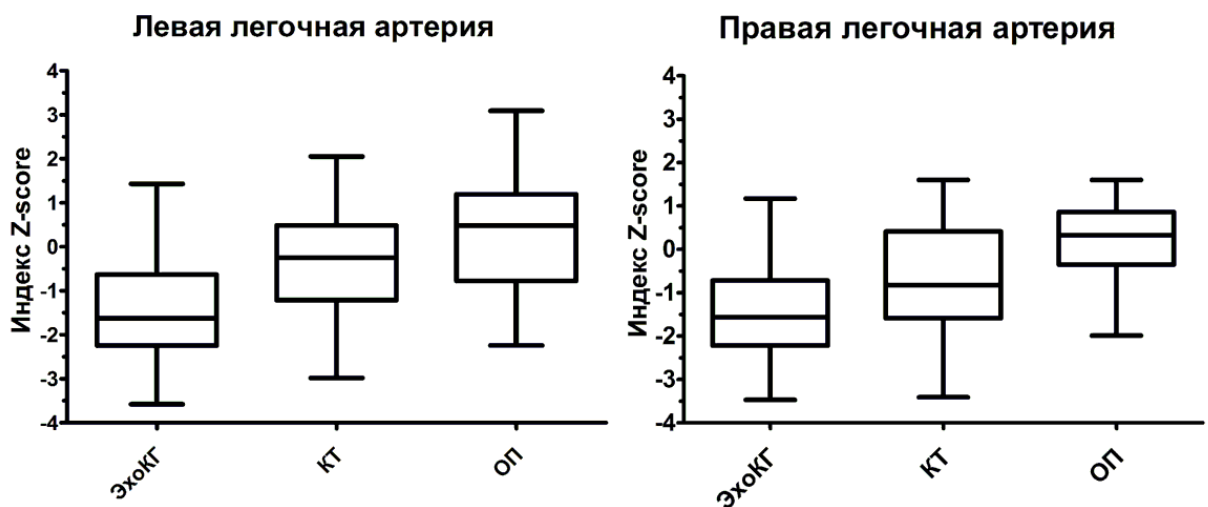


Рисунок 11 - Z-score правой и левой легочных артерий в зависимости от метода оценки, диаграммы размаха. (ЛЛА – левая легочная артерия, ПЛА

– правая легочная артерия, ЭхоКГ – эхокардиография, КТ – компьютерная томография, ОП – операционные данные)

Расчет индекса Nakata дополнительно иллюстрирует выявленную закономерность, отражая статистическую значимость полученных данных между группами ЭхоКГ и КТ ( $p < 0,01$ ). После применения поправки Бонферрони для преодоления проблем множественных сравнений статистическая значимость между показателями, полученными методами КТ и операционными данными, не была установлена ( $p > 0,05$ ). Использование данных трёх методов оценки размеров ЛА привело к получению трёх различных результатов при расчёте индекса Nakata. При использовании эхокардиографических данных индекс Nakata составил 106,8 (74,36; 154,7) мм<sup>2</sup>/м<sup>2</sup>, данных КТ - 187,6 (118,2; 245,9) мм<sup>2</sup>/м<sup>2</sup>, интраоперационных данных - 223,0 (161,3; 277,2) мм<sup>2</sup>/м<sup>2</sup>. Для большей наглядности результаты полученных расчетов представлены графически (Рис. 12). Полученные нами гемодинамические данные подчеркивают ценность проведения интраоперационной оценки ЛА, позволяя сделать вывод о влиянии данного метода на выбор радикальной коррекции порока в качестве первичного оперативного вмешательства.

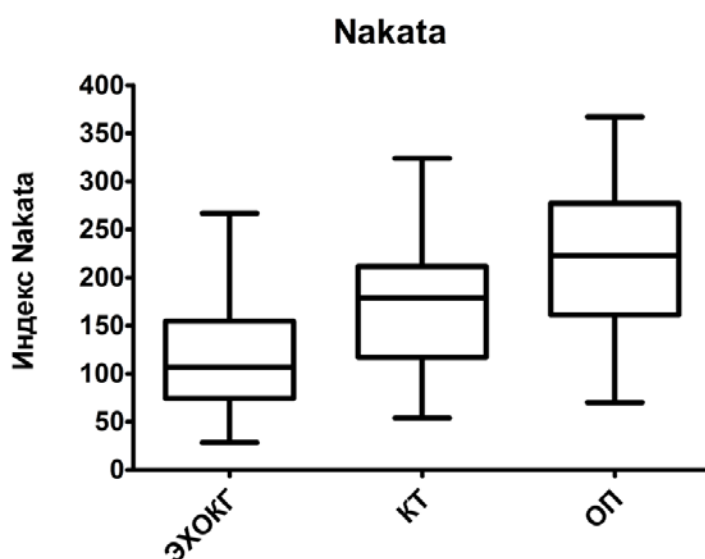


Рисунок 12 – Индекс Nakata (ЭхоКГ-эхокардиография, КТ-

компьютерная томография, ОП-операционный протокол)

### 3.1.2 Послеоперационный период

Ранний послеоперационный период характеризовался следующими показателями: инотропный индекс через 24 и 72 часа после коррекции, общая длительность потребности применения инотропных препаратов (адреналина и дофамина) (в сутках). Параметр длительности инотропных препаратов в нашей работе характеризует период, при котором отмечались явления гемодинамической и клинически значимой сердечной недостаточности. Также анализировалась длительность искусственной вентиляции легких (ИВЛ) в часах и итоговое время госпитализации в сутках.

Инотропный индекс через 24 часа и 72 часа представлен в таблице 4.

Таблица 4 - Инотропный индекс

Инотропный индекс	Группа 1	Группа 2	Группа 3	p	Различия (группы)
24 часа	17,5 (10; 25)	13,5 (10; 19)	10 (5; 15)	0,03	1 и 3
72 часа	0,5 (0; 4,5)	0,3 (0; 3,5)	0,1 (0; 2,5)	0,11	-

Как видно из таблицы, было установлено что между 1 и 3 группами отмечается статистически значимые различия по значению инотропного индекса через 24 часа после операции ( $p=0,003$ ). Однако различия между группами к 72 часам нивелируются.

Длительность общего периода применения дофамина составила 2,0 (2,0; 2,5) суток, 2,3 (1,6; 4) суток и 1,0 (0,7; 1,5) суток для первой, второй и третьей группы, соответственно. Однако нужно отметить, что нами было найдено статистически значимое различие в длительности применения дофамина между пациентами из первой и третьей группами ( $p=0,004$ ) и пациентами между второй и третьей группами ( $p=0,041$ ). Статистического различия в длительности применения дофамина между первой и второй группами получено не было.

Длительности общего периода применения адреналина составила 3,0 (1; 25) суток, 1,3 (0,5; 4,0) суток и 1,0 (0,8; 2,0) суток для первой, второй и третьей группы соответственно. Статистически значимого различия между группами получено не было.

Медиана времени ИВЛ составила 23 (8; 45) часов для первой группы, 16 (6; 45) часов для второй группы и 6,3 (6; 32) часа для третьей группы. Статистически значимого различия между группами получено не было. Сравнение длительности госпитализации пациентов в различных группах приведены на рисунке 13.

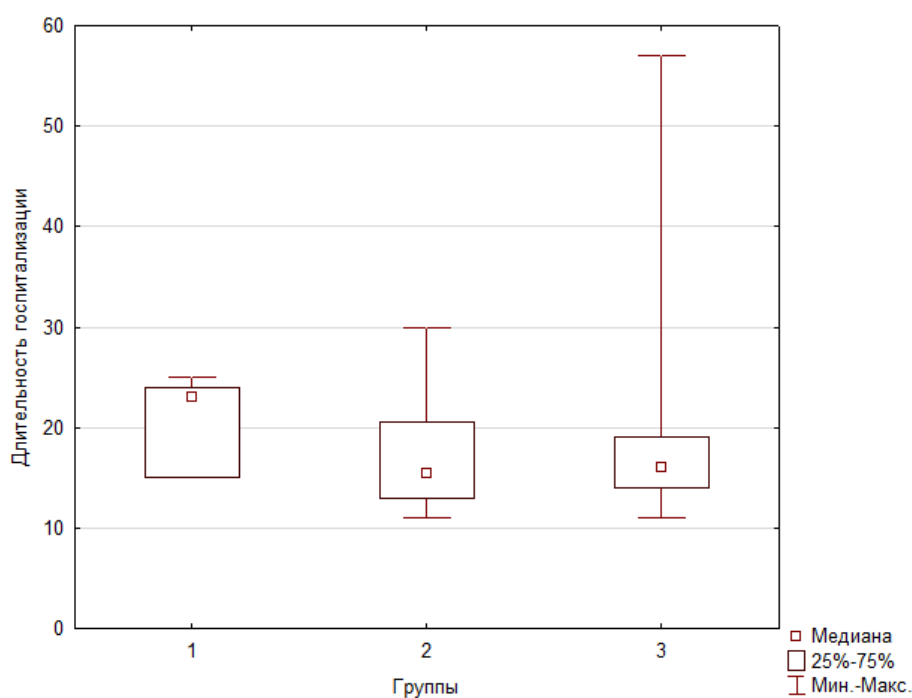


Рисунок 13 – Сравнение длительности госпитализации пациентов в

различных группах

В таблице 5 приведены все сводные сведения интраоперационных и послеоперационных параметров, участвующих в анализе. Приведены медианы, квартили, значения  $p$  по критерию Краскела-Уоллиса и пары групп, различия между которыми оказались статистически значимыми.

Таблица 5 – Интра- и послеоперационные параметры

Показатель	Группа 1	Группа 2	Группа 3	$p$	Различия
Сатурация, %	85; (80; 96)	96; (92; 98)	91; (87; 96)	0,04	—
Клапан ЛА, мм	4; (5; 7)	7; (6; 8)	6; (8; 10)	<b>0,03</b>	1 и 3 группы
Z-score	-3,52; (-3,84; - 2,34)	-2,39; (-2,86; - 1,58)	-2,46; (-3,99; - 1,74)	0,25	—
Длительность ИВЛ, час	23; (8; 45)	16; (6; 45)	6; (6; 32)	0,46	—
Длительность дофамина, сут	2,0; (2,0; 2,5)	2,3; (1,6; 4,0)	1,0; (0,7; 1,5)	<b>0,004</b>	1 и 3 гр, 2 и 3 гр
Длительность адреналина, сут	3,9; (1,0; 25,0)	1,3; (0,5; 4,0)	1,0; (0,8; 2,0)	0,36	—
Время ИК, мин	132; (104; 158)	128; (111; 160)	154; (118; 167)	0,67	—

Время пережатия аорты, мин	68; (43; 74)	68; (58; 83)	79; (63; 84)	0,22	—
Температура, °	27; (26; 30)	28; (27; 30)	28; (25; 28)	0,68	—
Длительность операции, мин	220; (190; 240)	223; (200; 298)	283; (215; 310)	0,19	—
Длительность госпитализации, сут	23; (15; 24)	16; (13; 21)	16; (14; 19)	0,11	—

Для применения многомерного анализа шесть показателей с сильной положительной асимметрией (возраст, вес, длительность вентиляции, длительность применения допамина, адреналина и длительность госпитализации) были симметризованы с помощью логарифмирования. К их кодам прибавлен символ  $p$  ( $p_{\text{Возраст}}$ ,  $p_{\text{Вес}}$ ,  $p_{\text{ИВЛ}}$ ,  $p_{\text{Допамин}}$ ,  $p_{\text{Адреналин}}$  и  $p_{\text{Госпитализация}}$ ). Для выявления связей между показателями была использована процедура иерархической кластеризации методом Варда с выбором меры связи показателей, равной  $(1-r)$ , где  $r$  - коэффициент корреляции Пирсона. На рисунке 14 хорошо видно распределение показателей на две слабо связанные группы - кластера.

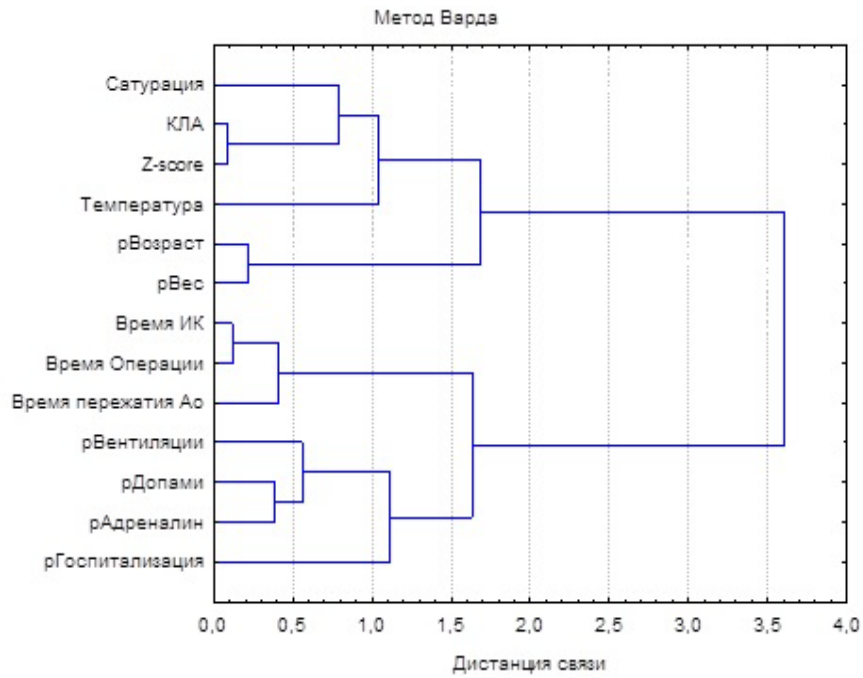


Рисунок 14 – Иерархическая кластеризация методом Варда с выбором меры связи показателей, равной  $(1-r)$ , где  $r$  - коэффициент корреляции Пирсона

На рисунке 15 представлена диаграмма главных компонент, на которой: два пучка образуют так называемую «корреляционную плеяду».

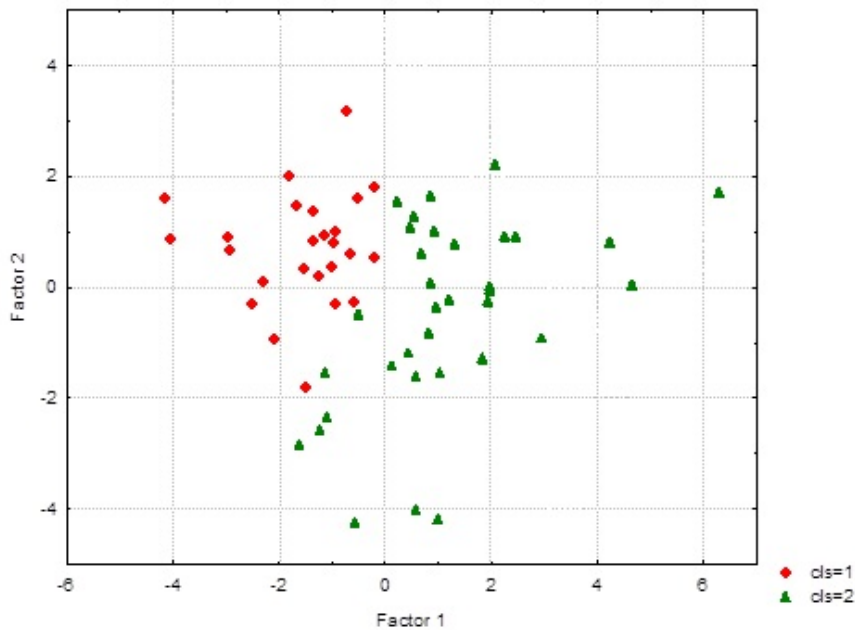


Рисунок 15 – Диаграмма корреляционных плеяд главных компонент на основании иерархической кластеризации методом Варда



Для выяснения, какие именно из семи показателей этой плеяды определяют различие между кластерами, был проведен дискриминантный анализ. Пошаговая процедура оставила только три сильно значимых показателя: Z-score, Temper и Optime. Их влияние на различие между кластерами оказалось примерно равным (коэффициенты корреляции Пирсона между ними и оптимальной дискриминантной функцией равны, соответственно, -0,41, -0,52 и 0,57). Вероятность правильной классификации оказалась равной 93,2%.

В таблице 6 приведены медианы, квартили и р-значения.

Таблица 6 – Сравнение кластеров

Показатель	Кластер 1	Кластер 2	р
Возраст	146; (117; 202)	164; (112; 268)	0,51
Вес	6,4; (5,6; 7,3)	6,5; (5,8; 7,8)	0,36
SpO2	96; (92; 98)	91; (85; 96)	0,03
КЛА	8,0; (7,0; 8,8)	6,5; (5,0; 7,5)	<b>0,002</b>
Z-score	-1,93; (-2,59; -1,10)	-2,76; (-3,99; -2,20)	<b>0,0008</b>
ИВЛ	7; (5; 17)	22; (6; 72)	<b>0,01</b>
Дофамин	1,3; (1,0; 2,0)	2,0; (1,3; 4,0)	<b>0,02</b>
Адреналин	1,8; (0,5; 3,0)	1,0; (0,8; 4,0)	0,77
ИК	110; (100; 121)	159; (137; 177)	<b>&lt;0,0001</b>
Ишемия	57; (48; 64)	83; (72; 96)	<b>&lt;0,0001</b>
Температура	29; (28; 31)	27; (25; 28)	<b>&lt;0,0001</b>

Время ОП	200; (190; 215)	288; (235; 330)	<b>&lt;0,0001</b>
Госпитализация	15; (13; 19)	16; (15; 23)	0,10

По результатам многомерного анализа вышеперечисленных критериев установлено, что не возникает распределение на группы по возрасту, а возникает по клинической тяжести проявления порока, а именно по уровню сатурации артериальной крови и размеру ФК клапана легочной артерии. Можно утверждать, что у пациентов более раннего возраста интраоперационные, ранние и поздние послеоперационные данные сопоставимы со старшими пациентами. Таким образом, более ранние сроки выполнения операции не утяжеляет общее течение интра- и послеоперационного периодов: не увеличивается длительность операции, реанимационного и госпитального периодов.

Летальность была зафиксирована в 3 случаях. Один летальный случай был отмечен в 2014 году и два летальных случая в 2015 году. Первый пациент 5 месяцев имел сопутствующие периферические стенозы легочной артерии. После выполнения первичной радикальной коррекции и бужирования периферических стенозов легочной артерии отмечались эпизоды десатурации, потребовавшие подключение аппарата экстракорпоральной оксигенации. В дальнейшем происходило нарастание признаков полиорганной недостаточности и через 7 дней после операции наступил летальный исход. Второму пациенту 2 месяцев с синистрокардией была выполнена ранняя радикальная коррекция с трансаннулярной пластикой, вентрикулотомией и имплантацией моностворки. В связи с явлениями остаточного стеноза в ВОПЖ потребовалось повторное проведение дополнительной объемной резекции мышечного компонента стеноза ВОПЖ, что отрицательно сказалось на насосной функции ПЖ. В дальнейшем присоединились явления полиорганной недостаточности,

приведшие к летальному исходу на 15 сутки после операции. У третьего пациента возрастом 1 год 8 мес. с гипоплазией центрального легочного русла, на первом этапе выполнялась паллиативное вмешательство – реконструкция пути оттока из ПЖ. На момент радикальной коррекции отмечалось сохранение умеренной гипоплазии правой ЛА. Была выполнена радикальная коррекция с расширенной трансаннулярной резекцией и пластикой ВОПЖ и имплантация моностворки. В связи с развитием миокардиальной слабости правого желудочка, на фоне высокого сопротивления в малом круге кровообращения в раннем послеоперационном наступил летальный исход.

За последние три года летальных исходов у пациентов, входящих в исследование, не было.

### **3.1.3 Отдаленный период**

После выписки из стационара было обследовано 28 пациентов с периодом отдаленного наблюдения до 4 лет. В первую группу было включено 6 пациентов, во вторую - 8 пациентов, в третью - 14 пациентов. На рисунке 16 представлены медианы показателей градиента в ВОПЖ в разных группах.

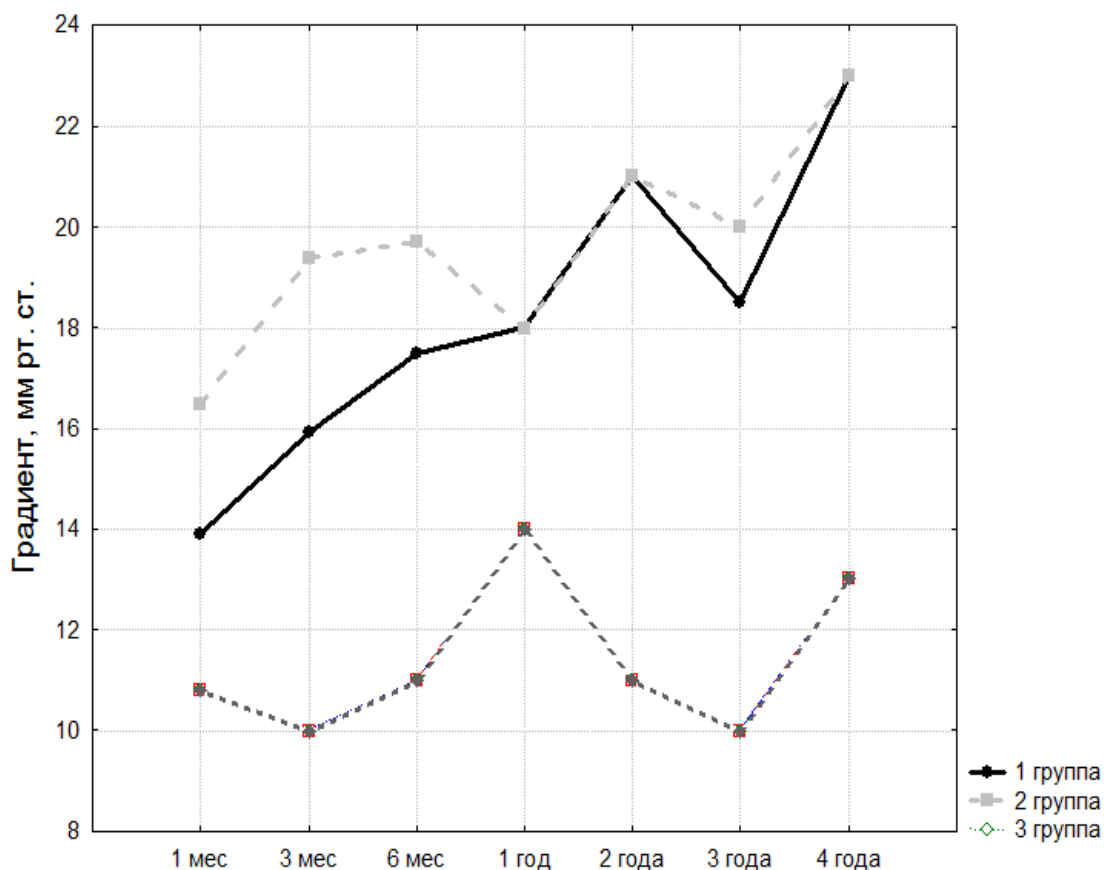


Рисунок 16 – Значения градиентов в выносящем отделе правого желудочка в отдаленном периоде

Было установлено, что среди всех обследованных пациентов максимальный градиент в ВОПЖ среди пациентов с сохраненным клапаном ЛА в отдаленном периоде составил 40 мм рт ст, что является приемлемым значением. Во всех группах наблюдалось увеличение градиента к 6 месяцам после операции. В дальнейшем было зафиксировано незначительное увеличение градиента в первых двух группах, где было выполнено больше клапан-сохраняющих операций. На рисунке 17 показаны медианы значений степени регургитаций в проекции клапана легочной артерии.

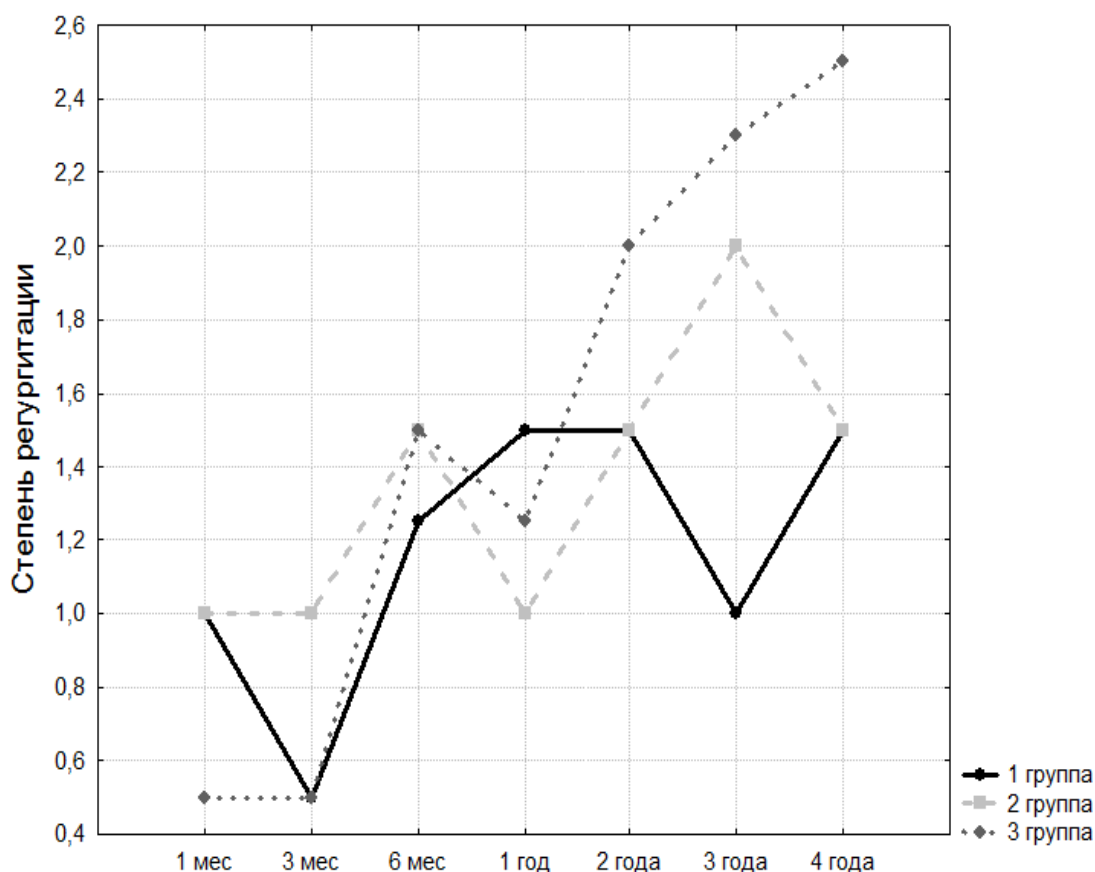


Рисунок 17 – Значения степеней регургитации КЛА в отдаленном периоде

Обращает на себя внимание, что в третьей группе происходило постепенное нарастание степени регургитации, начиная с трехмесячного возраста. Это может быть объяснено наличием имплантированной синтетической моностворки при трансаннулярной пластике и потерей ее функции в большинстве случаев через год после операции.

Подводя итог нужно отметить, что в первых двух группах ранней РК в госпитальном периоде наблюдения значения пикового градиента в выносящем тракте правого желудочка были приемлемыми, а степень регургитации была меньше, чем в группе более поздней коррекции.

## Клинический случай 1

Пациент М., 3 месяца с тетрадой Фалло.

Пациент М. поступил в возрасте 3 мес. с весом 4,8 кг, ростом 60 см для плановой хирургической коррекции ТФ. ВПС был поставлен внутриутробно. После рождения диагноз подтвержден. Было рекомендовано выполнение радикальной коррекции порока в возрасте до 3 месяцев. Во время динамического наблюдения отмечались эпизоды цианоза во время плача. При поступлении в отделение детской кардиохирургии по данным ЭХОКГ размер дефекта межжелудочковой перегородки составляет 9 мм, Выходной отдел правого желудочка в самом узком месте сужен до 5 мм, пропускное отверстие клапана ЛА 4,5 мм, диаметр кольца клапана ЛА 7 мм. Показатель Z-score клапана ЛА -1,92, расчётный размер клапана ЛА 10,5 мм. После срединной стернотомии и подключения аппарата искусственного кровообращения по стандартной бикавальной методике, было начато искусственное кровообращение (ИК) с постепенным охлаждением до температуры 30°C. В условиях параллельного ИК наложен зажим на ствол ЛА на 7 мм выше клапана ЛА. Ствол ЛА продольно вскрыт. В правую и левую легочные артерии проведен дилататор DeVakey расчётного размера 6 мм (Рис. 18. А, Б).

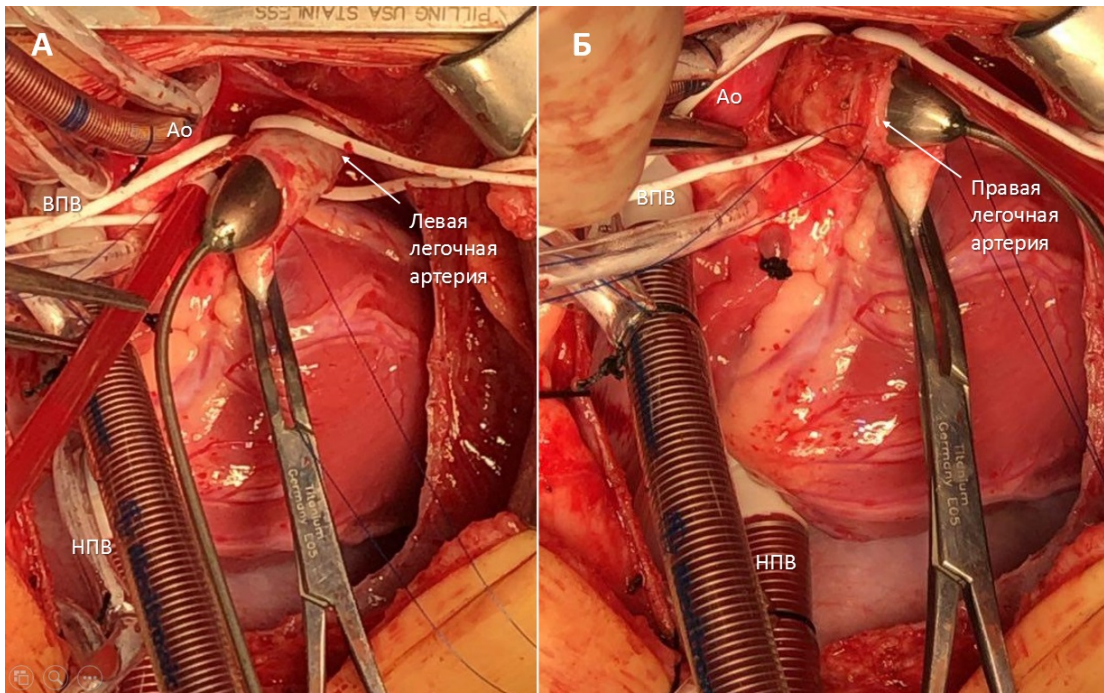


Рисунок 18 – А. Измерение размера левой легочной артерии. Б. Измерение размера правой легочной артерии. (Ао –Аорта, ВПВ – верхняя полая вена, НПВ – нижняя полая вена)

После проведения кардиоплегии, выполнена ревизия ДМЖП и клапана ЛА. Субаортальный ДМЖП находился в типичном месте, диаметр дефекта составил 9 мм. Клапан ЛА двухстворчатый, передне-заднее расположение створок, створки с небольшими фиброзными изменениями, сращения по обеим комиссурам, пропускное отверстие клапана 5 мм, фиброзное кольца клапана 7 мм (Рис.19). Выполнена комиссуротомия с обеих сторон с небольшим заходом на фиброзное кольцо клапана, пропускное отверстие увеличено до 7 мм.

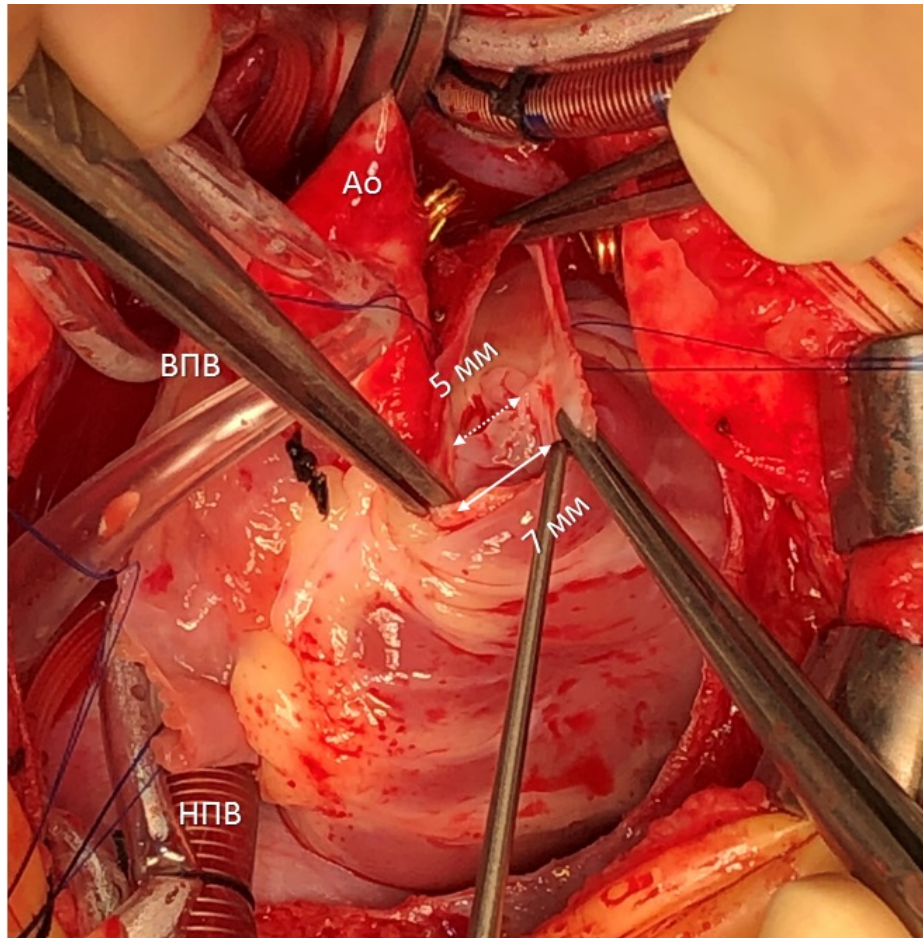


Рисунок 19 – Оценка клапана легочной артерии. Пунктирной стрелкой обозначено эффективное пропускное отверстие клапана. Сплошной стрелкой обозначено фиброзное кольца клапана

Трансатриально и транспульмонально выполнено рассечение, частичное иссечение аномальных септо-париетальных трабекул в ВОПЖ. После этого через правое предсердие и правый желудочек проведен баллонный катетер в ствол ЛА (Рис. 20).



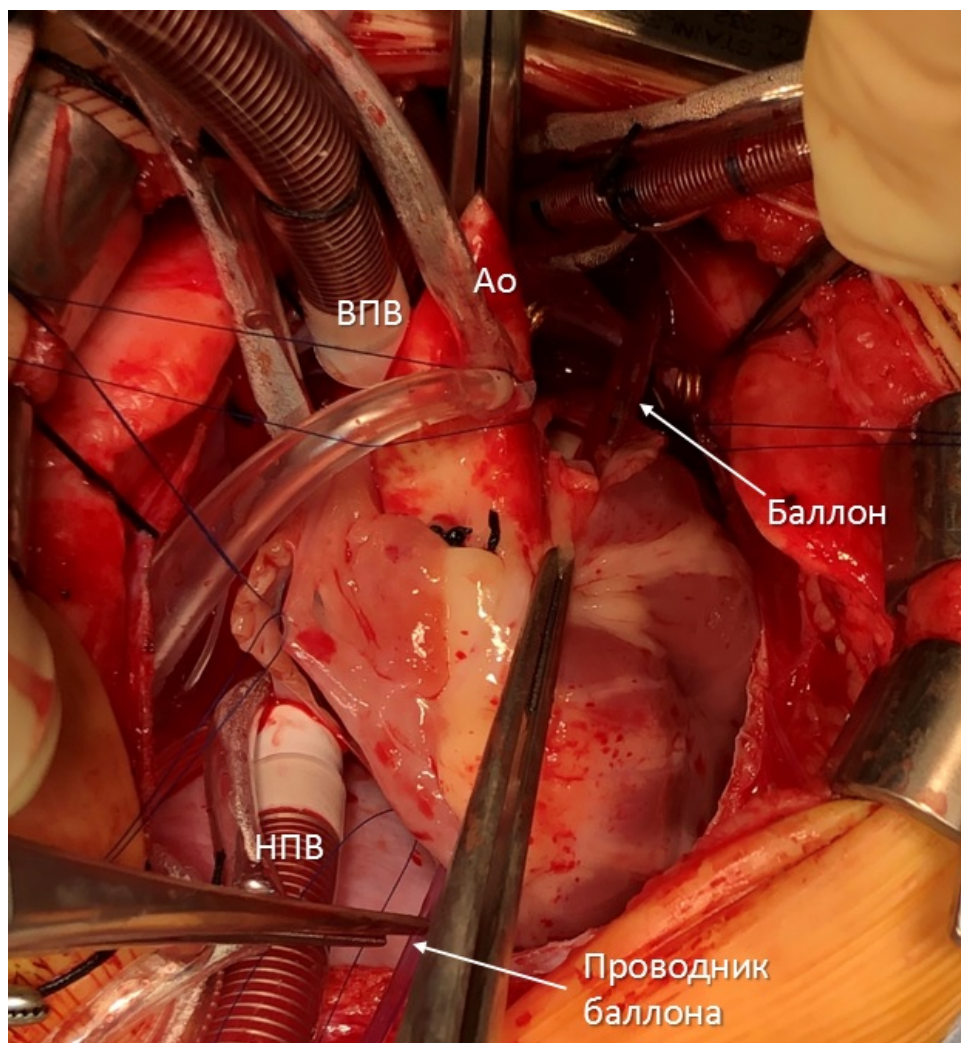


Рисунок 20 – Проведение проводника баллонного катетера через правый отделы сердца в выходной отдел правого желудочка

После позиционирования баллонного катетера таким образом, чтобы его середина располагалась в проекции клапана ЛА, баллон раздут три раза до достижения расчётных размеров (10,5 мм) для фиброзного кольца КЛА (Рис. 21). Также на рисунке 4 можно оценить, что раздутый баллон сопоставим по диаметру с аортой.

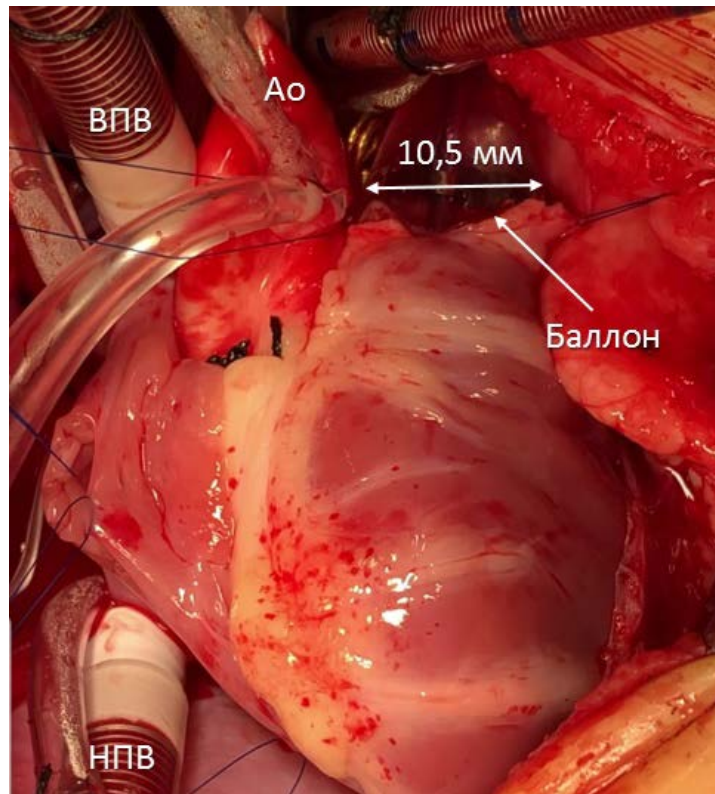


Рисунок 21 – Раздувание баллона до достижения расчётных размеров для КЛА

После удаления баллонного катетера выявлен разрыв передней створки КЛА по средней линии (Рис. 22)

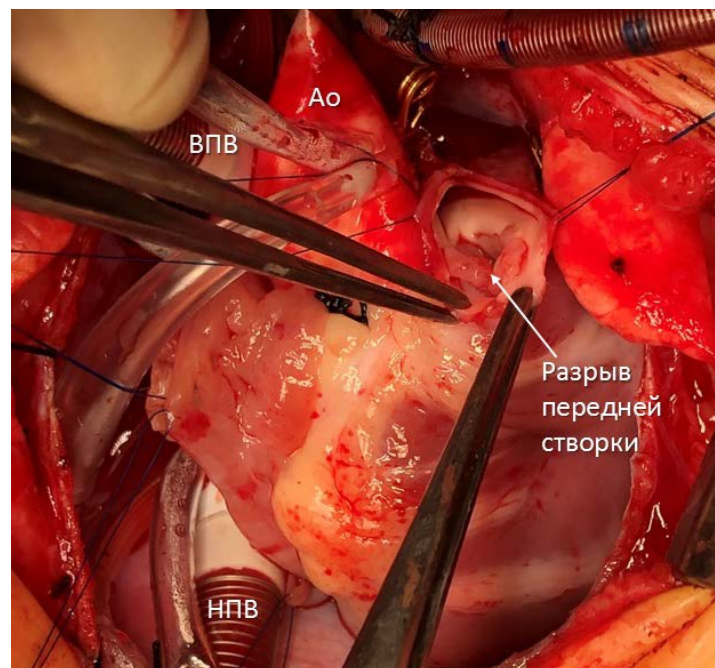


Рисунок 22 – Ревизия разрыва передней створки клапана

Через увеличенное ФК клапана выполнено дополнительное иссечение мышечных трабекул в выносящем отделе ПЖ. В связи с тем, что парусность передней створки была достаточной, пластику створки принято решение выполнить прямым швом без использования заплаты. Целостность передней створки восстановлена отдельными швами (Рис 23. А, Б).

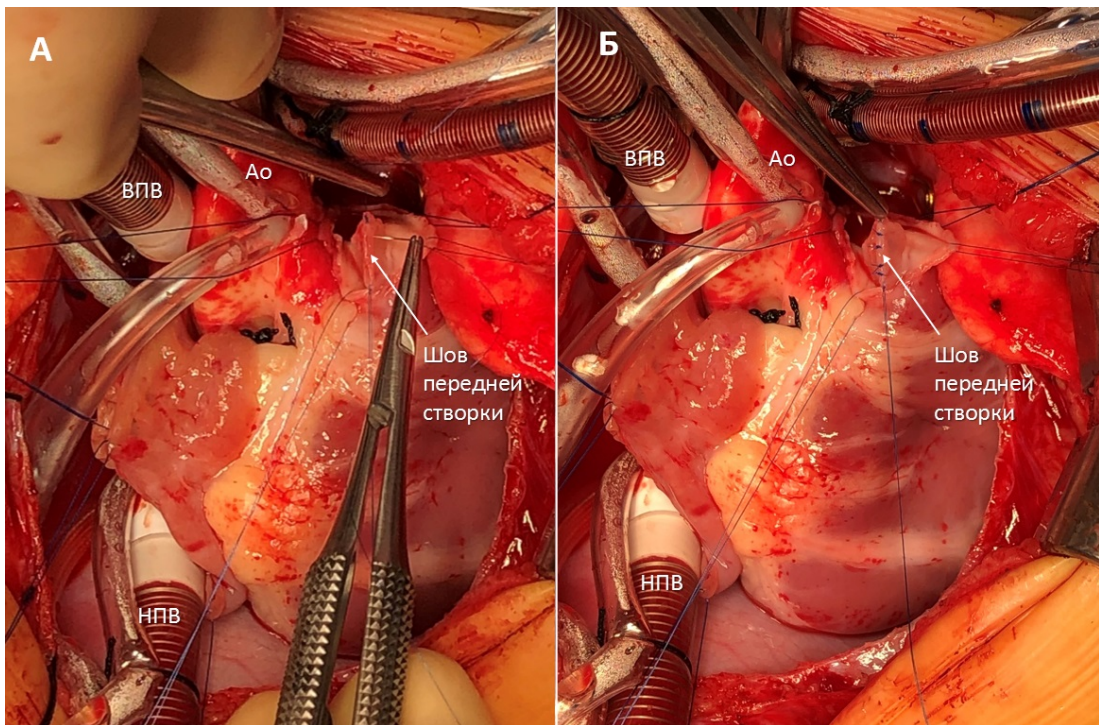


Рисунок 23 – А. Начальный этап восстановления передней створки клапана. Б. Конечный этап восстановления целостности передней створки клапана

Дефект межжелудочковой перегородки закрыт заплатой из ксеноперикарда непрерывным швом. После герметизации правого предсердия, выполнена пластика ствола ЛА заплатой из нативного аутоперикарда. После окончания ИК пациент с синусовым ритмом был переведен в отделение реанимации. По результатам послеоперационного УЗИ контроля пиковый градиент в ВОПЖ составил 23 мм рт ст, I степень регургитации на клапане ЛА, резидуальные токи на перегородках сердца не выявлены. Пациент находился в отделении реанимации 2 суток, был выписан из стационара на 13 сутки после операции. На УЗИ контроле через

1 год функция клапана ЛА состоятельна, пиковый градиент составил 19 мм рт ст в сочетании с I степенью недостаточности клапана ЛА.

### Клинический случай 2

Пациент А., 3,5 месяца с тетрадой Фалло.

Пациент А. поступила в возрасте 3,5 мес. с весом 4,5 кг, ростом 55 см для плановой хирургической коррекции ТФ. ВПС был установлен после рождения. Во время динамического наблюдения отмечались эпизоды цианоза во время плача и кормления с уменьшением сатурации до 85%, в спокойном состоянии сатурации около 92%. При поступлении в отделение детской кардиохирургии по данным ЭХОКГ размер дефекта межжелудочковой перегородки составляет 10 мм, Выходной отдел правого желудочка в самом узком месте сужен до 5 мм, пропускное отверстие клапана ЛА 6 мм, диаметр кольца клапана ЛА 6 мм. Показатель Z-score клапана ЛА -2,82, расчётный размер клапана ЛА 9,5 мм. После срединной стернотомии выполнена радикальная коррекция по методике, описанной в предыдущем случае. Мышечный стеноз ВОПЖ устранялся через трансатриальный и транспульмональный доступы, клапан ЛА был сохранен. Через КЛА и ВОПЖ свободно прошел дилататор №10. После окончания ИК и выполнения модифицированной ультрафильтрации, остаточный градиент между полостью ПЖ и стволом ЛА составил 40 мм. рт. ст. В связи с тем, что с одной стороны отсутствовал разрез ПЖ, с другой стороны была уже выполнена объемная резекция в ВОПЖ, было принято решение об окончании операции. В палате реанимации был назначен дополнительно анаприлин. Через 7 суток в связи с подозрением остаточного значимого градиента между полостью ПЖ и стволом ЛА (пиковый градиент по данным ЭХОКГ 70 мм. рт. ст.) выполнена манометрия и ангиография (Рис. 24).

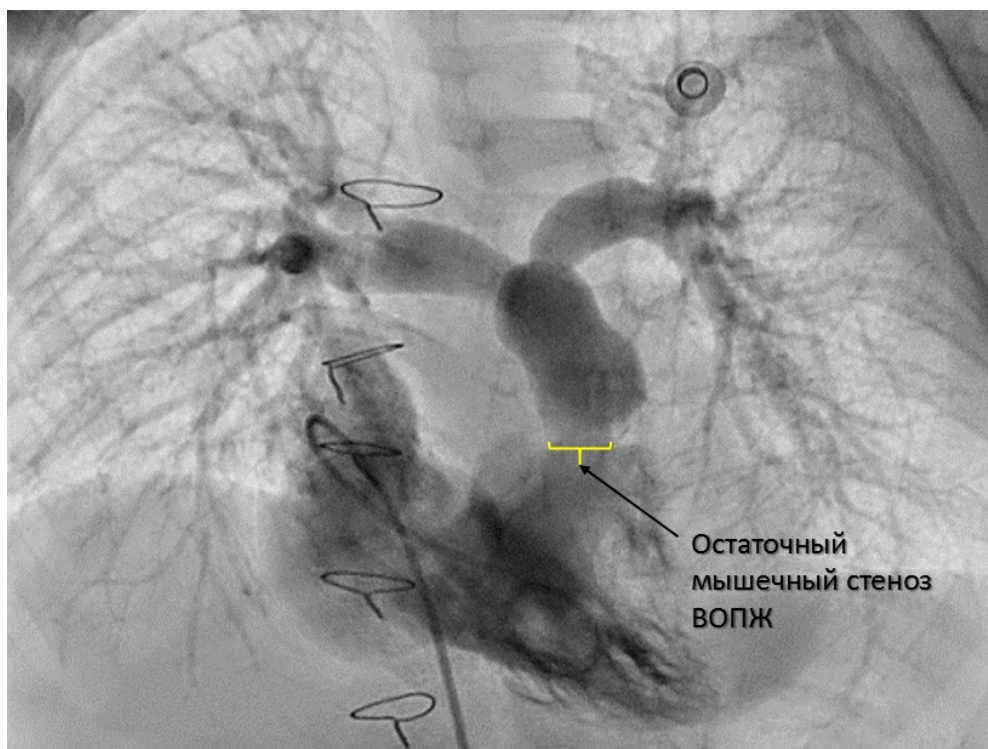


Рисунок 24 – Вентрикулография правого желудочка и ангиография легочного русла. Фигурной стрелкой обозначено самое узкое место в выносящем отделе правого желудочка

При манометрии установлено: ствол ЛА 38/19/27, ПЖ 63/3/7, АД 92/47/6 мм. рт. ст. В связи с удовлетворительными параметрами гемодинамики пациент был выписан за 14 сутки после операции. При контрольном обследовании через 12 месяцев, остаточный градиент между ПЖ и стволом ЛА по данным ЭХОКГ составил 15 мм. рт. ст.

## 3.2 РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.2.1 Сравнение экспрессии рецепторов и лигандов Notch-сигнального пути в мезенхимных клетках сердца от пациентов с ТФ и ДМЖП

В нашей работе мы использовали мезенхимные клетки сердца от пациентов с тетрадой Фалло, как модель для изучения пролиферативной способности этих клеток и исследования вовлеченности Notch-сигнального пути в ТФ. Мы предположили, что Notch-сигнальный путь может быть дисбалансирован в тканях сердца пациентов с ТФ, и эта дисрегуляция может быть ответственна за ремоделирование тканей сердца у пациентов с ТФ. Хотя репаративный потенциал клеток предшественников кардиомиоцитов остается неизвестным, эти клетки представляют собой удобный и относительно доступный источник клеток сердца человека и могут быть использованы для выявления механизмов и процессов, связанных с развитием сердца. Таким образом, в дополнении к основным задачам, мы анализировали активность Notch-сигнального пути в мезенхимных клетках сердца, полученных из образцов ПЖ у пациентов с ТФ. В качестве группы сравнения мы использовали МКС из тканей пациентов с изолированным дефектом межжелудочковой перегородки (ДМЖП), поскольку этот изолированный дефект не ассоциирован с вовлеченностью Notch-сигнального пути. В качестве экспериментальной части работы нами проводилась оценка уровня мРНК ключевых генов пути Notch *NOTCH1-4* и Notch-лигандов *JAG1*, *DLL4*, Notch-генов-мишеней *HES1*, *HEY1* (рис. 25).

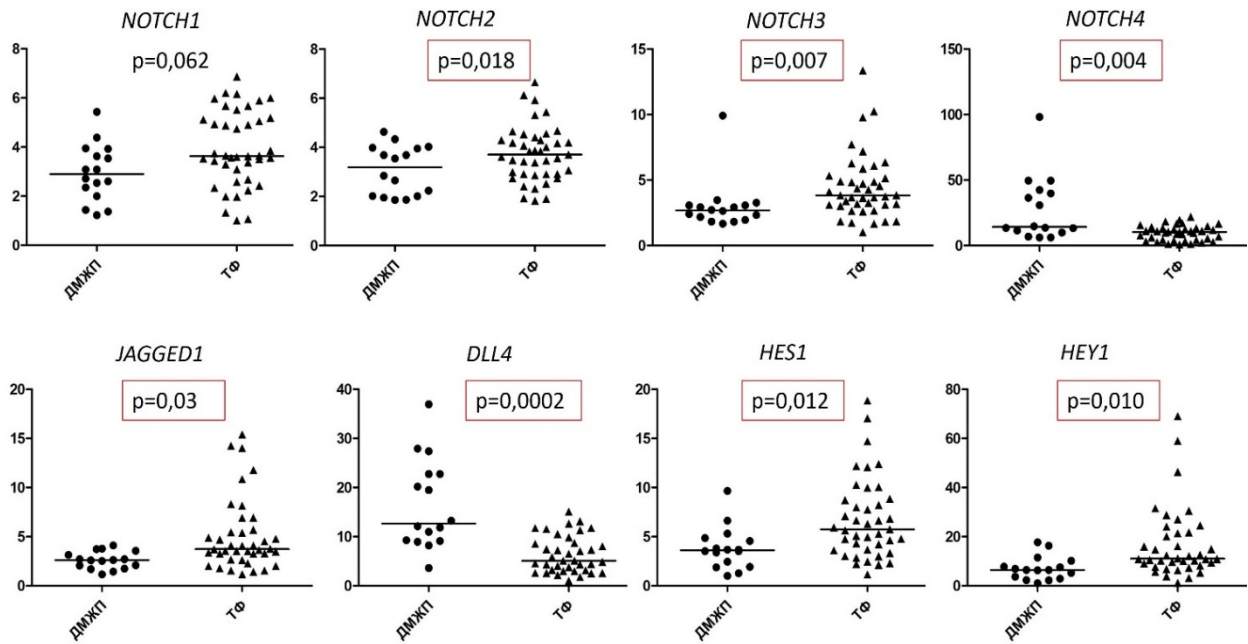


Рисунок 25 – Уровень экспрессии основных рецепторов Notch и мишеней в мезенхимных клетках сердца, от пациентов с дефектом межжелудочковой перегородки (ДМЖП) и с тетрадой Фалло (ТФ). Вертикальная ось представляет относительное содержание мРНК. Группы сравниваются с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни; горизонтальные линии представляют медиану

Экспрессия *NOTCH4* и *DLL4* была снижена в клетках ТФ по сравнению с клетками ДМЖП, тогда как экспрессия *NOTCH2*, *NOTCH3*, *JAG1* была увеличена, также как экспрессия транскрипционных генов-мишеней Notch *HES1*, *HEY1*. Таким образом, наши данные показывают нарушения в Notch сигналинге в МКС у пациентов с ТФ.

Для оценки общего уровня активации передачи сигналов Notch в МКС у пациентов с ТФ мы оценили корреляции между генами-мишенями Notch и *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3* (рис.26). Мы нашли корреляции между уровнями *NOTCH1* и их целевыми генами *HES1*, *HEY1*; уровень *NOTCH3* коррелирует с *HES1*. Это говорит о том, что *NOTCH1* и *NOTCH3*, скорее всего, связаны с повышенным уровнем передачи сигналов Notch, который реализуется повышением уровня экспрессии *HES1*, *HEY1* в МКС ТФ. Мы не

обнаружили каких-либо ассоциаций высокого/низкого Notch ни с какими клиническими показателями, в т.ч. с возрастом пациентов.

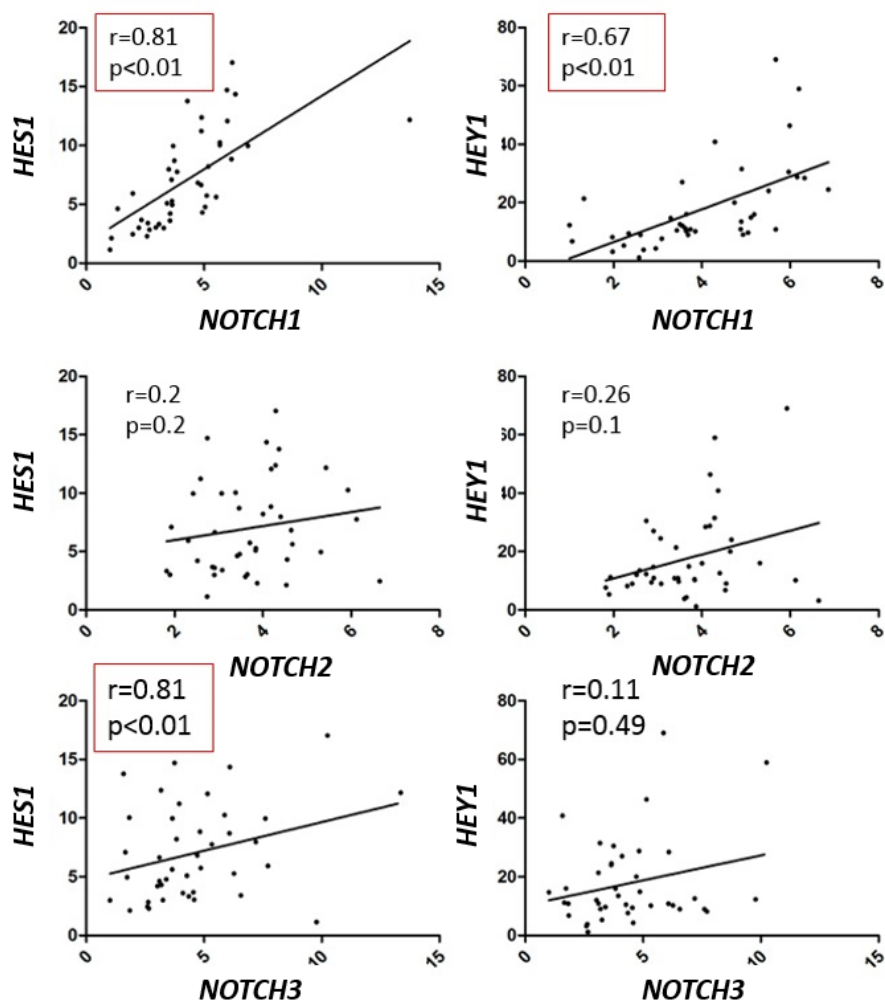


Рисунок 26 – Анализ корреляции между экспрессией генов Notch и генов, являющихся транскрипционными мишенями Notch (*HES1*, *HEY1*) в мезенхимных клетках сердца, полученных у пациентов с ТФ

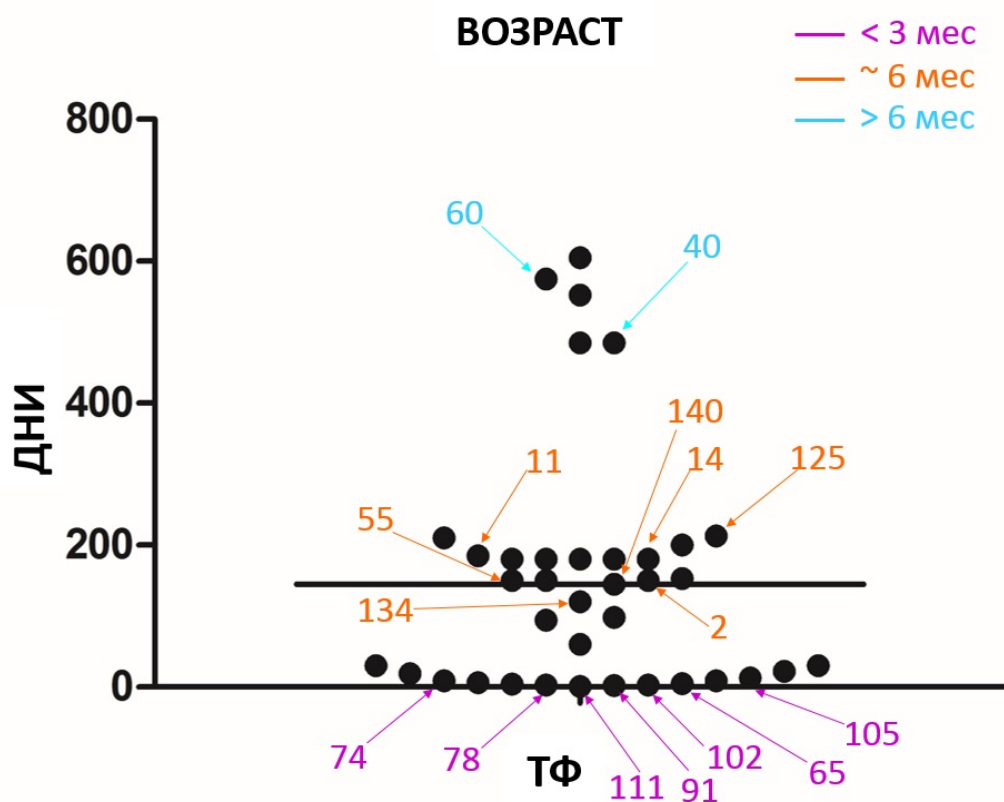
### 3.2.2 Проллиферативная активность мезенхимных клеток сердца

#### 3.2.2.1 Связь уровня пролиферативной активности мезенхимных клеток сердца с возрастом

Следующим шагом выполнялось определение связи возраста пациентов с ТФ с пролиферативной активностью (ПА) МКС, полученных



от 16 пациентов из разных возрастных групп. На рисунке 27 представлен график распределения пациентов по возрасту.



Рисунке 27 – Распределение пациентов по возрасту. Номерами обозначены образцы, которые участвовали в эксперименте по определению уровня пролиферативной активности. Цвет обозначений соответствует возрасту

На рисунке 28 представлен график пролиферативной активности МКС. Кривые роста обозначены цветами, соответствующими группам распределения по возрасту на рисунке 27.

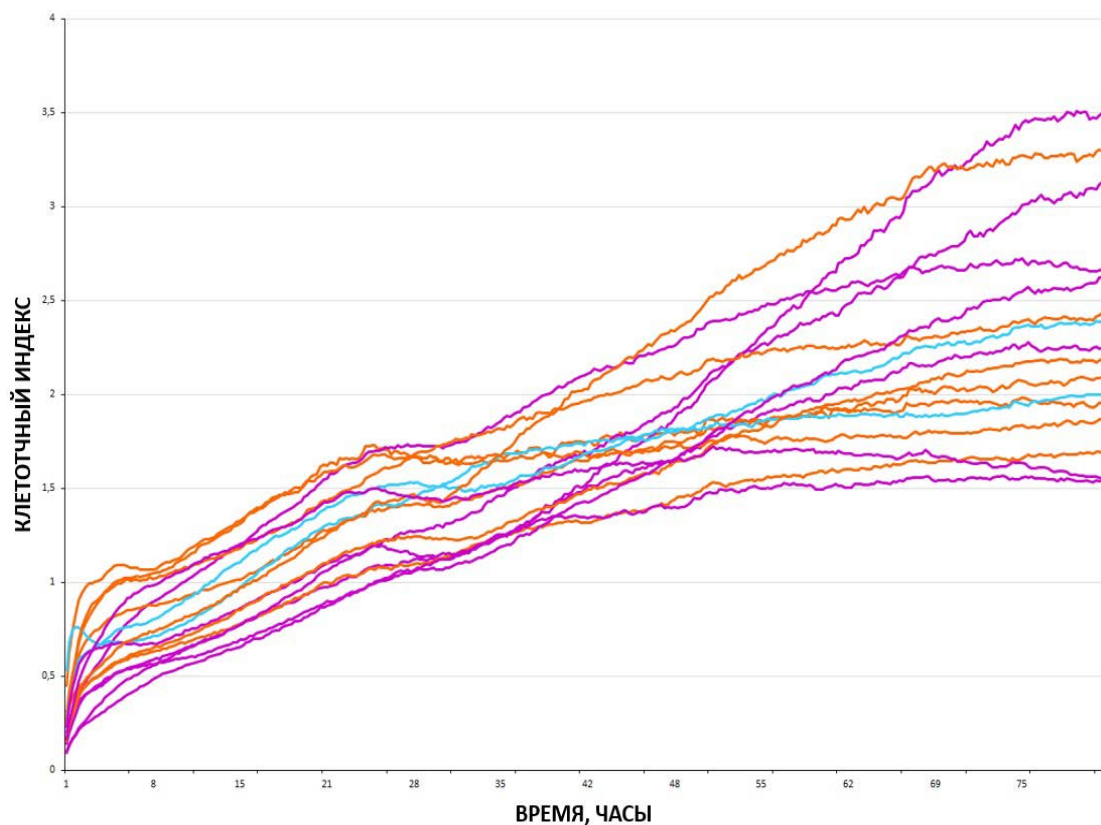


Рисунок 28 – Кривые роста, отражающие пролиферативную активность МКС

Нами не было выявлено ассоциации между возрастом и уровнем пролиферативной активности МКС пациентов (рис. 28). Также в нашей работе определялась связь клинических данных с пролиферативной активностью МКС. Нами не было установлено связи пролиферативной активности этих клеток ни с одним из клинических параметров (уровень сатурации, выраженность гипертрофии ПЖ).

### 3.2.2.2 Связь уровня пролиферативной активности мезенхимных клеток сердца с уровнем активности NOTCH сигнального пути

После того, как не было получено связи ПА с возрастом, была сформирована гипотеза, что уровень ПА клеток может быть связан с уровнем активности Notch сигнального пути. Для определения уровня

активности Notch сигналинга у пациентов с ТФ были оценены уровни экспрессии двух генов - *HEY1* и *HES1*. Белки, кодирующие эти гены, являются генами-мишенями и важными составляющими Notch сигналинга. На рисунке 29 представлены уровни экспрессии этих генов.

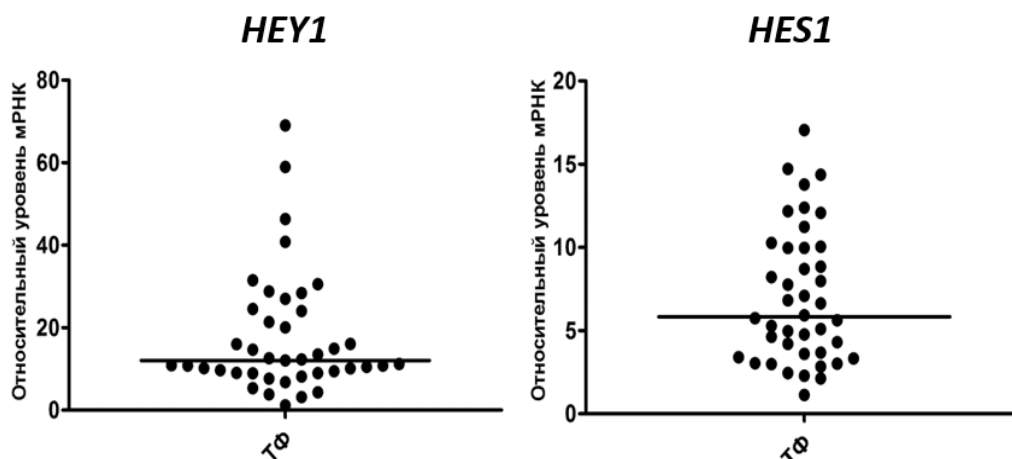


Рисунок 29 – Экспрессия генов *HEY1* и *HES1*. Горизонтальной линией обозначена медиана

При анализе корреляционной взаимосвязи *HEY1* и *HES1*, нами было обнаружено наличие значимой взаимосвязи между этими параметрами (рис. 30).

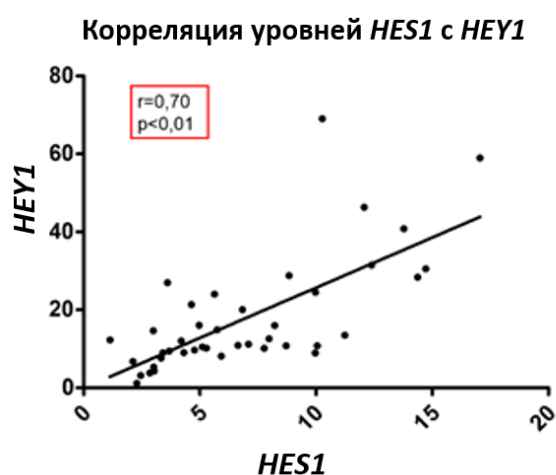


Рисунок 30 – Корреляционная взаимосвязь уровней экспрессии *HES1* и *HEY1* ( $r$  – коэффициент корреляции Спирмена)

В дальнейшем, после того, как было установлено, что уровни экспрессии генов этих двух компонентов коррелируют между собой, были взяты образцы с высокими и низкими уровнями экспрессии обоих генов (рис. 31).

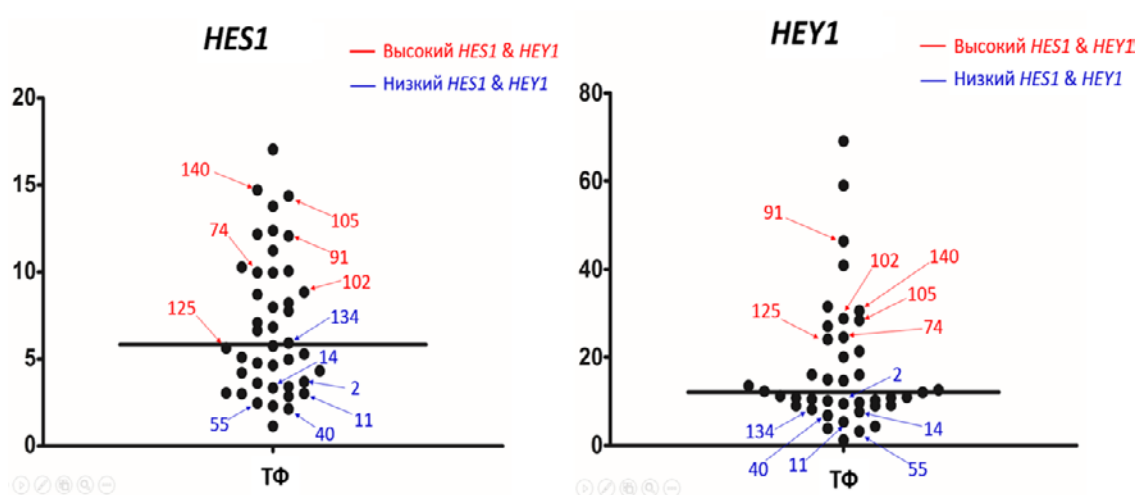


Рисунок 31 – Уровни экспрессии генов *HEY1* и *HES1*. На графиках обозначены номера образцов с высоким и с низким уровнями экспрессии, красным и синим цветом соответственно

На рисунке 32 представлен график пролиферативной активности МКС. Кривые роста обозначены цветами, соответствующие группам распределения по уровню экспрессии *HEY1* и *HES1* на рисунке 31.

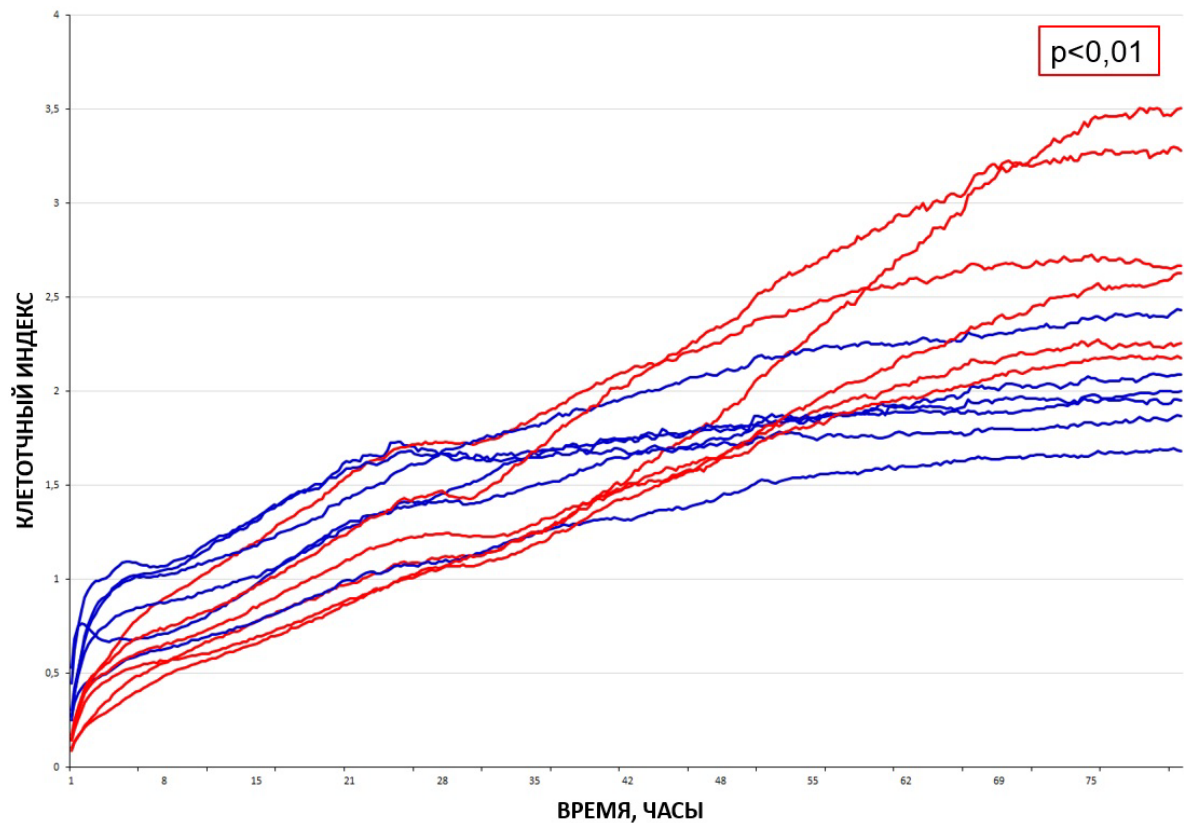


Рисунок 32 – Кривые роста, отражающие пролиферативную активность МКС.  $p$  демонстрирует статистическое различие при сравнении клеточных индексов между группами с «низким уровнем» (синий цвет) и «высоким уровнем» (красный цвет) экспрессии *HEY1* и *HES1*

В результате была установлена прямая связь между активностью Notch сигнального пути и активностью пролиферации ( $p < 0,01$ ). Также проверялось наличие корреляции между уровнем экспрессии *HEY1* и пролиферативной активностью МКС через 24, 48 и 72 часа. Корреляция была выявлена только через 72 часа эксперимента (рис. 33).

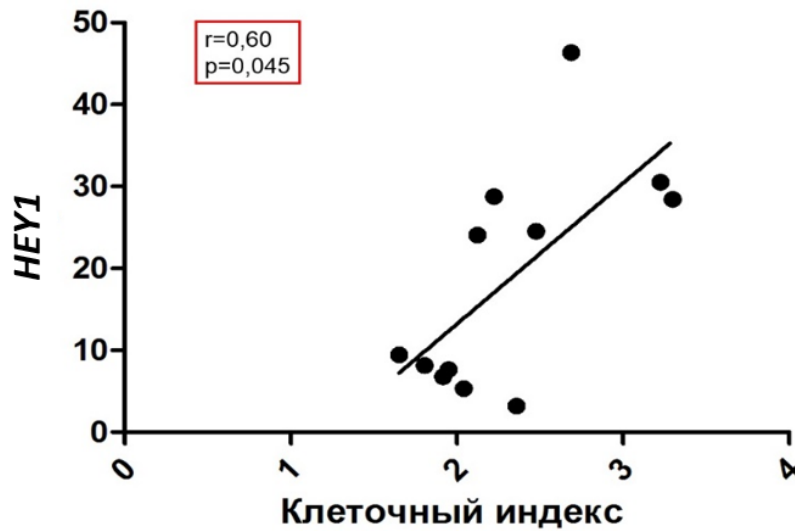


Рисунок 33 – Корреляционная взаимосвязь уровней экспрессии *HEY1* и пролиферативной активности, выраженной в виде клеточного индекса ( $r$  – коэффициент корреляции Спирмена)

Таким образом, не установлена взаимосвязь возраста пациентов с уровнем пролиферацией мезенхимных клеток сердца, однако обнаружена ассоциация уровня активности Notch сигнального пути с уровнем пролиферацией этих клеток.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящее время во многих центрах, которые занимаются лечением детей с врожденной патологией сердца, происходит смещение тактики лечения пациентов в сторону ранней радикализации тетрады Фалло. В некоторых центрах противопоказанием к выполнению ранней радикальной коррекции является наличие условной гипоплазии центрального легочного русла и «гипоплазии» левого желудочка. Однако, как показал наш опыт, который совпадает с данными других авторов, эти сочетания встречаются крайне редко при классической форме ТФ без значимых аорто-легочных коллатералей [5]. Другими словами, у подавляющего числа пациентов центральное легочное русло может «вместить» в себя системный выброс, а относительно небольшие размеры ЛЖ, присутствующие у некоторых пациентов по данным исследования на предоперационном этапе, не имеют клинического значения. Нами было установлено, что у пациентов с ТФ отмечается недооценка размеров диаметра легочных артерий на дооперационном этапе на основе визуализирующих методов диагностики. Таким образом, при принятии решения о тактике лечения пациентов в сомнительных случаях нам представляется обоснованным и необходимым интраоперационное измерение размеров ветвей легочной артерии.

Также стоит обратить внимание на эффективность пластики относительно небольших легочных артерий. В нашем опыте все реже встречается необходимость пластики ветвей или устьев легочных артерий у пациентов с ТФ при выполнении РК. Мы полагаем, что легочные артерии, не подвергнутые хирургическим манипуляциям имеют наилучший стимул для развития и минимальные риски повторных вмешательств. Эта позиция также совпадает с данными Т. Wilder и соавт. [104]. По результатам представленной работы, хирургическая пластика легочных артерий улучшала краткосрочные показатели, однако в отдаленном периоде приводила к увеличению риска стенозирования [104]. Таким образом, с

учетом возможной “псевдогипоплазии” легочного русла интраоперационное измерение диаметров легочных артерий позволяет не только выявить истинные размеры, но и уменьшить необходимость проведения пластики легочных артерий при хирургической коррекции ТФ. В нашем опыте мы использовали этот метод при выполнении РК на рутинной основе.

Постепенное увеличение числа пациентов взрослого возраста, которым была выполнена радикальная коррекция ТФ, приводит к возрастанию числа больных, которым требуется выполнение повторных хирургических вмешательств. Также увеличивается доля пациентов, которые в отдаленном периоде после РК ТФ имеют различные нарушения ритма сердца. Это связано с выраженной регургитацией в ВОПЖ при потере клапана ЛА при РК, приводящей к дилатации правых отделов сердца, а также наличию хирургических заплат в ВОПЖ и рядом расположенных фиброзных полей миокарда. В начальные годы хирургической коррекции ТФ недостаточность в проекции КЛА считалась достаточно доброкачественным состоянием, которое хорошо переносилось. Сейчас становится очевидным, что длительно существующая недостаточность КЛА приводит к патологическому увеличению размеров правого желудочка [155], ухудшению функции сердца и усилению аритмогенеза с течением времени [156, 157], а также риску внезапной смерти [158]. Одним из путей для снижения рисков отдаленных осложнений являются методики трансатриального/транспульмонального доступов и сохранение клапана легочной артерии при радикальной коррекции ТФ [159]. Авторы процитированной работы делают акцент на том, что трансатриальный-транспульмональный доступ для устранения стеноза ВОПЖ приводит к сохранению клапана ЛА в одной трети случаев. На основании этого следует вывод, что клапансохраняющая хирургия приводит к более низкой частоте легочной регургитации, что в свою очередь уменьшает риски развития отдаленных осложнений. Для увеличения частоты сохранения КЛА



возможно применение ранней радикальной коррекции в совокупности с клапан-сохраняющими методиками. Было показано, что у более 75% пациентов с ТФ в возрасте до 3 месяцев фиброзное кольцо клапана легочной артерии незначительно отличается от индивидуальной возрастной нормы [160]. Другими словами, у большинства пациентов с ТФ в течение нескольких месяцев после рождения отмечается умеренный «дефицит» размера фиброзного кольца КЛА. По мере прогрессирования мышечной гипертрофии ПЖ, в особенности, если обструкция на уровне ВОПЖ представлена в большей степени мышечным компонентом стеноза, сразу после рождения происходит снижение объема крови, который поступает в легочное русло (за счет прогрессирования стеноза). В связи с тем, что ребенок начинает активно расти и прибавлять массу тела, а размер фиброзного кольца КЛА не изменяется, «формируется» более значимая относительная гипоплазия КЛА. Исходя из выше изложенного, ранняя РК позволяет увеличить долю клапан-сохраняющих процедур. В подтверждении этого в одной из работ было показано, что у пациентов после клапан-сохраняющей РК ТФ размер фиброзного кольца КЛА был статистически значимо меньше по сравнению с нормальными значениями при оптимальных гемодинамических параметрах после операции [161]. Таким образом, оптимальный размер КЛА для клапан-сохраняющей хирургии может быть гораздо меньше расчётных параметров.

Не менее важной особенностью раннего возраста является то, что все ткани организма, в том числе фиброзное кольцо КЛА, представляет собой более эластичную структуру. На это направлены ряд современных методик сохранения клапана легочной артерии. Наиболее простым способом является сочетание комиссуротомии с механическим жестким растяжением дилататорами Гегара [162]. Метод был применён у 5 пациентов в нашей работе. Показанием к данной методике являлись предпочтения оперирующего хирурга и значения  $Z\text{-score} > -2$ . К недостаткам данного метода можно отнести узкие показания для применения (только

незначительная гипоплазия клапана ЛА), вероятность механического повреждения створок клапана и повышенный риск стеноза в среднесрочном и отдаленном периодах. В большинстве случаев (12 пациентов), когда удалось выполнить клапан-сохраняющие операции, использовался метод интраоперационного баллонного дилатирования фиброзного кольца КЛА в совокупности с различными манипуляциями со створками клапана. По нашему мнению интраоперационное применение баллонирования фиброзного кольца клапана легочной артерии является наиболее перспективным методом для сохранения КЛА при радикальной коррекции ТФ. Полученные нами данные совпадают с мировым опытом [78, 80, 156], демонстрирующим, что баллонная дилатация обеспечивает максимально щадящее увеличение размеров клапанного кольца, по всей видимости, путем постепенного растяжения эластических и соединительнотканых волокон равномерно по всей окружности ФК. Таким образом, минимизируется риск надрыва или разрыва, как створок клапана, так и самого фиброзного кольца. Однако, при выраженной гипоплазии КЛА ( $z$ -score  $< -2,5$ ) существует достаточно высокий риск повреждения самих створок. Для минимизации риска разрыва (отрыва) створок и для улучшения запирающего механизма клапана мы выполняли расширенную комиссуротомию с заходом на ФК клапана, краевую резекцию фиброзного утолщения створок. При наличии фиброзных сращений - рассечение фиброзной ткани под телами створок, деламинацию створок от стенки легочной артерии. После баллонного расширения кольца клапана и при наличии повреждения его, створки реконструировались, в т.ч. с использованием заплат. После увеличения эффективного пропускного размера КЛА улучшается визуализация мышечного компонента стеноза выходного тракта ПЖ. При необходимости не представляет сложности проведение дополнительной мышечной резекции в этой зоне. Также нужно отметить, что в нашем опыте протяженный тубулярный стеноз ВОПЖ часто ассоциировался с выраженной гипоплазией клапанного кольца ЛА. В таких

случаях мы предпочитали выполнение РК в раннем возрасте около 2 месяцев, для предотвращения формирования вторичной гипертрофии ПЖ.

В настоящее время после радикальной коррекции ТФ особенности госпитального периода являются важными хирургическими показателями, в том числе продолжительность пребывания в стационаре [163]. Длительность госпитализации и тяжесть раннего послеоперационного периода не только показатели непосредственных хирургических результатов, но и они также связаны с долгосрочными последствиями развития нервной системы у детей с врожденными пороками сердца по данным ряда авторов [164, 165]. В нашем опыте выполнение ранней РК не удлиняло длительность ИВЛ и длительность инотропной поддержки, продолжительность госпитализации, а также не увеличивало риск летальности по сравнению с коррекцией в более старшем возрасте. На протяжении последних трёх лет среди пациентов, удовлетворяющих критериям включения в исследование, не было отмечено летальных исходов. Полученные нами данные, подтверждаются результатами исследования S. Peeg с соавторами [51].

Одним из перспективных направлений в качестве дополнительной опции лечения сложных ВПС является использования различных видов стволовых клеток, в том числе резидентных стволовых клеток [166]. Клеточная терапия рассматривается как наиболее перспективный метод в качестве дополнения к хирургическому и консервативному. В одной из работ анализировались пациенты с комплексными ВПС, которым в дополнении к стандартному хирургическому протоколу выполнялось введение локальных стволовых клеток. Авторы отметили, что у пациентов в группе со сниженной фракцией выброса, которым производилось введение такого типа клеток, отмечалось значительное улучшение общего клинического состояния по сравнению с пациентами, которые получали только стандартное хирургическое лечение [167].

Мезенхимные клетки сердца, называемые в литературе также клетками-предшественниками кардиомиоцитов, в последнее время начали использовать в ряде клинических испытаний. В 2011 стартовала 1 фаза клинического проспективного исследования TISCAR, направленного на изучения влияния КПК у пациентов с гипоплазией левого желудочка [168]. Не было отмечено серьезных осложнений ни на раннем, ни на позднем этапах после внутрикоронарного введения клеток. По результатам работы отмечалось наличие значимого улучшения функции желудочка и уменьшение диаметра трикуспидального клапана, а также объема желудочка. Значимые улучшения сохранялись также по истечению трехлетнего периода в экспериментальной группе [169].

Во 2 фазе рандомизированного исследования PERSEUS, также была выявлена эффективность введения КПК [170]. Функциональные преимущества, которые были выявлены в экспериментальной группе, могли наблюдаться за счет уменьшения фиброза миокарда, который приводил к уменьшению жесткости желудочков за счет процесса обратного ремоделирования. Также после 12 месяцев наблюдения в экспериментальной группе отмечалось значительное снижение проявлений сердечной недостаточности и уровня костного морфогенетического белка BMP2. В настоящее время проводится 3 фаза исследования APOLLON и еще несколько исследований у пациентов с одним желудочком, гипоплазией левого желудочка и дилатационной кардиомиопатией [171, 172].

Мы в нашей работе использовали МКС, как модель для исследования пролиферативных свойств этих клеток у пациентов с ТФ, а также как модель для исследования вовлеченности Notch-сигнального пути в ТФ. В нашей работе мы не обнаружили каких-либо ассоциаций высокого или низкого уровня экспрессии Notch сигналинга с какими-либо из клинических параметров, в том числе с возрастом пациентов. В отношении корреляции активности Notch сигнального пути и пролиферативной способности, наши данные свидетельствуют о том, что чем выше уровень активности Notch

сигнального пути, тем больше способность к пролиферации в МКС у пациентов с ТФ. Наши результаты хорошо согласуются с исследованиями, демонстрирующими участие пути Notch в пролиферативных и дифференцировочных свойствах стволовых клеток. Пролиферация и рост стволовых клеток в ответ на активацию передачи сигналов Notch варьирует в зависимости от типа клетки, контекста и сигнальной дозы [173]. Также было показано, что подавление передачи сигналов Notch у незрелых неонатальных кардиомиоцитов блокирует пролиферацию и индуцирует апоптоз, что позволяет предположить, что передача сигналов Notch может стимулировать деление клеток в ранних кардиомиоцитах [174]. В другой работе было показано, что активация Notch1 способствует дифференцировке КПК в гладкомышечные клетки *in vitro*, что может указывать на значительное вовлечение этих клеток в ангиогенез [175]. Аналогично сверхэкспрессия внутриклеточного домена Notch1 в изолированных КПК от новорожденных мышей стимулировала дифференцировку в транзиторийный амплифицирующийся пул ранних миоцитов [176].

Таким образом, остается вопрос, почему не было получено связи пролиферативной способности МКС с возрастом пациентов. С одной стороны, на это может влиять ограниченное число наблюдений и достаточно ограниченные рамки возраста пациентов, которые участвовали в исследовании. С другой стороны, также не было получено тенденции уменьшения ПА с возрастом. Следующие факторы могут иметь значения при поисках ответа на данный вопрос. Во-первых, то факт, что в опубликованных работах, участвовали другие группы сравнения. Например, демонстрировалось влияние возрастных характеристик на различные стволовые клеточные компоненты, пролиферативную способность сравнивали между новорожденными и взрослыми пациентами [10]. Таким образом, между сравниваемыми группами были значительный возрастной промежуток. В другой работе показывалось различие между

стволовыми клеточными компонентами здоровых индивидуумов и пациентов с простым септальным пороками [177]. Также было показано различие в пролиферативной активности в зависимости от возраста среди детей с простыми врожденными пороками сердца, такими как дефект межжелудочковой перегородки [153]. В последнем исследовании приводятся данные о том, что процент пролиферирующих кардиомиоцитов у пациентов в 3 месяца в 11 раз выше, чем у пациентов в 6 месяцев, и в 27 раз выше, чем у пациентов в возрасте 1 год. На животных моделях также изучалась пролиферативная способность клеток миокарда. Недавнее исследование выявило, что в течение первой недели жизни пролиферация предшественников кардиомиоцитов у мышей была очень разнообразной, так в возрасте одного месяца было вдвое больше кардиомиоцитов с маркером стволовости НЗР, чем у четырехдневных образцов. После стимуляции рекомбинантным фактором роста нейрегулином-1 (neuregulin-1) кардиомиоциты у мышей в возрасте менее 7 дней и клетки миокарда человека в возрасте менее 6 месяцев активировали пролиферацию, в то время как кардиомиоциты от пациентов старше 6 месяцев не показали увеличения её уровня [148, 178]. Для трансляции данных от животных моделей на людей были опубликованы данные старения у животных. Мыши в возрасте 0–1 месяца стареют со скоростью, которая в 150 раз выше, чем у людей. В некоторых аспектах развития 1-месячные мыши сопоставимы с 12-летними людьми [179]. Хотя нет исследований, показывающих параллели между возрастом людей и возрастом мышей на тканевом и клеточном уровне, есть предположение, что кардиомиоциты от пациентов с простыми ВПС младше 3 месяцев, могут быть сравнимы с кардиомиоцитами мышей в возрасте менее 3 дней [179]. Таким образом, в предыдущих работах, где показывалась ассоциация возраста с пролиферативной способностью, участвовали клетки от животных моделей и здоровых людей, или клетки от пациентов с простыми формами пороков сердца. Во-вторых, различные пороки сердца являются генетически разнородными патологиями.

Множество генов, ассоциированных с пролиферацией, могут играть роль в формировании ВПС [180]. Таким образом, пролиферативная способность в клетках миокарда у здоровых людей может отличаться при сравнении с кардиомиоцитами людей с ВПС. Возможно, что механизмы, участвующие в формировании или адаптации организма к такому комплексному пороку сердца, как тетрада Фалло, также задействованы в регуляции пролиферативной активности клеток сердца. В одном исследовании среди прочего было установлено, что у пациентов с различными ВПС, среди которых большинство пациентов имело тетраду Фалло, активность клеточного цикла кардиомиоцитов была ниже по сравнению с кардиомиоцитами из образцов без сердечной патологии [148]. В-третьих, ТФ является цианотическим пороком сердца, что означает наличие гипоксемии в различной степени выраженности, что может иметь значение для пролиферативной способности кардиомиоцитов.

Ограничениями клинической части данной работы могут служить относительно небольшое количество пациентов, входящих в исследование, ретроспективный характер анализа и распределение пациентов на группы по временным промежуткам в месяцах возраста. К ограничениям экспериментальной части можно отнести ограниченное число наблюдений, отсутствие контрольной группы образцов клеток от здоровых индивидуумов для сравнения пролиферативной активности клеток и широкий спектр неоднородности клинических проявлений у пациентов, от которых использовались клеточные культуры.

Суммируя все выше изложенное, можно говорить о том, что ранняя радикальная коррекция тетрады Фалло в совокупности с методами баллонной и механической дилатации позволяет безопасно выполнить коррекцию порока с высокой частотой сохранения клапана легочной артерии. При наличии гипоплазии ветвей легочной артерии по данным предоперационных визуализирующих методов диагностики, интраоперационное измерение диаметра ветвей ЛА позволяет исключить их

гипоплазию. Ранняя РК не увеличивает риск осложнений и не продляет госпитальный период. Отсутствие взаимосвязи возраста пациентов с клеточной пролиферацией мезенхимных клеток сердца в исследуемой возрастной когорте пациентов, будет требовать будущих исследований. Обнаруженная взаимосвязь уровня активации Notch-сигнального пути с пролиферативной активностью МКС может способствовать в будущем появлению новых точек терапевтического воздействия для лечения различных врожденных пороков сердца, что является перспективным направлением дальнейших исследований.



## ВЫВОДЫ

1. Методики интраоперационной баллонной и механической дилатации фиброзного кольца клапана легочной артерии при выполнении первичной ранней радикальной коррекции тетрады Фалло позволяют выполнить клапан-сохраняющую операцию в 60% случаев.

2. У пациентов с тетрадой Фалло размер легочных артерий, оцениваемый по данным неинвазивных методов обследования, значительно меньше их истинного размера, что показывает необходимость интраоперационного измерения размеров ветвей легочной артерии в случаях их гипоплазии.

3. Ранняя радикальная коррекция тетрады Фалло не увеличивает длительность искусственной вентиляции легких, инотропный индекс через 72 часа и длительность инотропной поддержки в послеоперационном периоде, продолжительность госпитализации и не повышает риск летальности.

4. Уровень экспрессии генов сигнального каскада Notch в мезенхимных клетках сердца значимо отличается от такового у пациентов с тетрадой Фалло по сравнению с пациентами с дефектом межжелудочковой перегородки.

5. Уровень активности Notch сигнального пути коррелирует с пролиферативной способностью мезенхимных клеток сердца у пациентов с ТФ в исследуемой возрастной группе.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. При отсутствии противопоказаний радикальная коррекция тетрады Фалло может быть выполнена в возрасте до 6 месяцев с низкими рисками осложнений и летальности.
2. В ситуациях гипоплазии ветвей легочной артерии у пациентов с тетрадой Фалло по данным предоперационных методов обследования, рекомендовано интраоперационное измерение размеров легочных артерий.
3. Использование методов баллонной и механической дилатации в совокупности с реконструктивными методиками клапана легочной артерии увеличивает вероятность проведения клапан-сохраняющей коррекции.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

ВОПЖ – выносящий отдел правого желудочка

ВПС – врожденный порок сердца

ДМЖП – дефект межжелудочковой перегородки

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИВЛ – искусственная вентиляция легких

ИК – искусственное кровообращение

кДНК – кодирующая ДНК

КЛА – клапана легочной артерии

КПК – клетки-предшественники кардиомиоцитов

ЛЖ – левый желудочек

МКС – мезенхимные клетки сердца

ПА – пролиферативная активность

ПЖ – правый желудочек

ПП – правое предсердие

ППС – приобретенный порок сердца

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТАД – трансатриальный доступ

ТАП – трансаннулярная пластика

ТВД – трансвентрикулярный доступ

ТФ – тетрада Фалло

ФВ – фракция выброса

ФК – фиброзное кольцо

HEY1 (hair/enhancer-of-split related with YRPW motif protein1) – ген-мишень сигнального пути Notch

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Van Arsdell, G. What is the optimal age for repair of tetralogy of Fallot? / G.S. Van Arsdell, G.S. Maharaj, J. Tom, [et al.] // *Circulation*. — 2000. — Vol.102, №19 Suppl 3. — P.Iii123-9.
2. Peer, S. Early primary repair of tetralogy of Fallot does not lead to increased postoperative resource utilization / S.M. Peer, D. Zurakowski, R.A. Jonas, [et al.] // *The Annals of thoracic surgery*. — 2014.— Vol.98, №6. — P.2173-80.
3. Бокерия, Л. 2016 Клинические рекомендации «Тетрада Фалло» / Л.А. Бокерия, С.С. Волков, С. В. Горбачевский, [и др.] // 2016.
4. Tamesberger, M. Early primary repair of tetralogy of fallot in neonates and infants less than four months of age / M. Tamesberger, E. Lechner, R. Mair, [et al.] // *The Annals of thoracic surgery*. —2008. — Vol.86. —P.1928-35.
5. Jonas, R. Early primary repair of tetralogy of Fallot / R.A. Jonas // *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery: Pediatric cardiac surgery annual*. — 2009.— Vol.12, №1. — P.39-47.
6. Apitz, C. Tetralogy of fallot / C. Apitz, G. D. Webb and A. N. Redington // *The Lancet*. — 2009. — Vol.374. — P. 1462-71.
7. Oparil, S. Pathogenesis of ventricular hypertrophy / S. Oparil // *Journal of the American College of Cardiology*. —1985.—Vol.5, №6 Suppl.— P.57b-65b.
8. Klopsch, C. Cardiac mesenchymal stem cells proliferate early in the ischemic heart / C. Klopsch, A. Skorska, M. Ludwig, [et al.] // *European Surgical Research*. — 2017. — Vol. 58. — P. 341-53.
9. Oldershaw, R. Human cardiac-mesenchymal stem cell-like cells, a novel cell population with therapeutic potential / R. Oldershaw,

W. A. Owens, R. Sutherland, [et al.] // Stem cells and development. — 2019. — Vol. 28. — P. 593-607.

10. Simpson, D. A strong regenerative ability of cardiac stem cells derived from neonatal hearts / D.L. Simpson, R. Mishra, S. Sharma, [et al.] // Circulation. — 2012.— Vol.126, №11 Suppl 1.— P.S46-53.

11. Agarwal, U. Age-Dependent Effect of Pediatric Cardiac Progenitor Cells After Juvenile Heart Failure / U. Agarwal, A.W. Smith, K.M. French, [et al.] // Stem cells translational medicine. — 2016.— Vol.5, №7.— P.883-92.

12. Niessen, K. Notch signaling in cardiac development / K. Niessen and A. Karsan // Circulation research. — 2008. — Vol. 102. — P. 1169-81.

13. Bruneau, B. The developmental genetics of congenital heart disease / B. G. Bruneau // Nature. — 2008. — Vol. 451. — P. 943.

14. Luxan, G. Endocardial Notch Signaling in Cardiac Development and Disease / G. Luxan, G. D'Amato, D. MacGrogan, [et al.] // Circulation research. —2016.—Vol.118, №1.— P.e1-e18.

15. Grotek, B. Notch signaling coordinates cellular proliferation with differentiation during zebrafish fin regeneration / B. Grotek, D. Wehner, G. Weidinger // Development (Cambridge, England). —2013.— Vol.140, №7.— P.1412-23.

16. Chau, M. Notch signaling plays a key role in cardiac cell differentiation. M. D. Chau, R. Tuft, K. Fogarty, [et al.] // Mechanisms of development. —2006. —Vol.123. — P.626-40.

17. Collesi, C. Notch1 signaling stimulates proliferation of immature cardiomyocytes / C. Collesi, L. Zentilin, G. Sinagra, [et al.] // The Journal of cell biology. —2008.—Vol.183, №1.— P.117-28.

18. Talner, C. Report of the New England Regional Infant Cardiac Program, by Donald C. Fyler, MD, Pediatrics, 1980;65(suppl):375-461 / C.N. Talner // Pediatrics. —1998.—Vol.102, №1 Pt 2.— P.258-9.

19. Белозеров, Ю. Распространенность врожденных пороков сердца у детей на современном этапе / Ю.М. Белозеров, Л.В. Брегель, В.М. Субботин // Российский вестник перинатологии и педиатрии. —2014.—Vol.59, №6.— с.7-11.
20. Bailliard, F. Tetralogy of Fallot / F. Bailliard, R.H. Anderson // Orphanet J Rare Dis. —2009.—Vol.4, 2. — с.1-10.
21. A. Fallot. Contribution à l'anatomie pathologique de la maladie bleue (cyanose cardiaque), par le Dr. A. Fallot: Barlatier-Feissat; 1888.
22. Tchervenkov, C. Congenital Heart Surgery Nomenclature and Database Project: pulmonary atresia--ventricular septal defect / C.I. Tchervenkov, N. Roy // The Annals of thoracic surgery. —2000.—Vol.69, №4 Suppl.— P.S97-105.
23. Zucker, N. Clinical presentation, natural history, and outcome of patients with the absent pulmonary valve syndrome / N. Zucker, I. Rozin, A. Levitas, [et al.] // Cardiology in the young. —2004.—Vol.14, №4.— P.402-8.
24. Hraska, V. A novel approach to the repair of tetralogy of Fallot with absent pulmonary valve and the reduction of airway compression by the pulmonary artery / V. Hraska, J. Photiadis, E. Schindler, [et al.] // Seminars in thoracic and cardiovascular surgery Pediatric cardiac surgery annual. —2009.—Vol.12, №1. — P.59-62.
25. Jonas, R. Comprehensive Surgical Management of Congenital Heart Disease: CRC Press, 2002. — с.279-300.
26. Суханов, С. Механическая функция правого желудочка у детей первого года жизни с тетрадой Фалло / С.Г. Суханов, Е.Н. Орехова, Ю.С. Синельников, [и др.] // Патология кровообращения и кардиохирургия. —2015.—Vol.19, №3.— с. 19-25.
27. Dadlani, G. Echocardiography in tetralogy of Fallot / G.H. Dadlani, J.B. John, M.S. Cohen // Cardiology in the young. —2008.— Vol.18 Suppl 3, — P.22-8.

28. Need, L. Coronary echocardiography in tetralogy of fallot: diagnostic accuracy, resource utilization and surgical implications over 13 years / L.R. Need, A.J. Powell, P. del Nido, [et al.] // Journal of the American College of Cardiology. —2000.—Vol.36, №4.— P.1371-7.

29. van den Berg, J. Diastolic function in repaired tetralogy of Fallot at rest and during stress: assessment with MR imaging / J. van den Berg, P.A. Wielopolski, F.J. Meijboom, [et al.] // Radiology. —2007.— Vol.243, №1.— P.212-9.

30. Blalock, A. The surgical treatment of malformations of the heart: In which there is pulmonary stenosis or pulmonary atresia / A. Blalock, H.B. Taussig // Jama. —1984.—Vol.251, №16.— P.2123-38.

31. Lillehei, C. The direct-vision intracardiac correction of congenital anomalies by controlled cross circulation; results in thirty-two patients with ventricular septal defects, tetralogy of Fallot, and atrioventricularis communis defects / C.W. Lillehei, M. Cohen, H.E. Warden, [et al.] // Surgery. —1955.—Vol.38, №1.— P.11-29.

32. Kirklin, J. Intracardiac surgery with the aid of a mechanical pump-oxygenator system (gibbon type): report of eight cases / J.W. Kirklin, J.W. Dushane, R.T. Patrick, [et al.] // Proceedings of the staff meetings Mayo Clinic. —1955.—Vol.30, №10.— P.201-6.

33. Shenoy, C. Sixty Years After Tetralogy of Fallot Correction / C. Shenoy, J.H. Moller // The Annals of thoracic surgery. —2019.— Vol.107, №1.— P.e45-e47.

34. Kirklin, J. Routine primary repair vs two-stage repair of tetralogy of Fallot / J.W. Kirklin, E.H. Blackstone, A.D. Pacifico, [et al.] // Circulation. —1979.—Vol.60, №2.— P.373-86.

35. Gustafson, R. Early primary repair of tetralogy of Fallot / R.A. Gustafson, G.F. Murray, H.E. Warden, [et al.] // The Annals of thoracic surgery. —1988.—Vol.45, №3.— P.235-41.

36. Омельченко, А. Оценка анатомических компонентов правого желудочка у пациентов после коррекции тетрады Фалло / А.Ю. Омельченко, Ю.Н. Горбатов, И.А. Соинов, [и др.] // Сибирский медицинский журнал (Томск). —2016.—Vol.31, №3.— P.49-54.

37. Regensburger, D. Reconstruction of the right ventricular outflow tract in tetralogy of Fallot and pulmonary stenosis with a monocusp patch / D. Regensburger, H.H. Sievers, P.E. Lange, [et al.] // The Thoracic and cardiovascular surgeon. —1981.—Vol.29, №6.— P.345-347.

38. Brown, J. Right ventricular outflow tract reconstruction with a polytetrafluoroethylene monocusp valve: a twelve-year experience / J.W. Brown, M. Ruzmetov, P. Vijay, [et al.] // The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. —2007.—Vol.133, №5.— P.1336-43.

39. Sasson, L. Right ventricular outflow tract strategies for repair of tetralogy of Fallot: effect of monocusp valve reconstruction / L. Sasson, S. Houry, A. Raucher Sternfeld, [et al.] // European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery. —2013.—Vol.43, №4.— P.743-51.

40. Jang, W. Surgical Results of Monocusp Implantation with Transannular Patch Angioplasty in Tetralogy of Fallot Repair / W.S. Jang, J.Y. Cho, J.U. Lee, [et al.] // The Korean journal of thoracic and cardiovascular surgery. —2016.—Vol.49, №5.— P.344-9.

41. Park, C. The long-term result of total repair for tetralogy of Fallot / C.S. Park, J.R. Lee, H.G. Lim, [et al.] // European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery. —2010.—Vol.38, №3.— P.311-7.

42. Singh, N. Monocusp valve placement in children with tetralogy of Fallot undergoing repair with transannular patch: A functioning pulmonary valve does not improve immediate postsurgical outcomes / N.M. Singh, R.S. Loomba // —2018.—Vol. — P.935-43.



43. Ильин, А. Результаты после радикальной коррекции тетрады Фалло с позиций хирургической тактики при реконструкции выходного отдела правого желудочка / А.С. Ильин, Ю.Н. Горбатов, Ю.С. Синельников, [и др.] // Патология кровообращения и кардиохирургия. —2010.—Vol.№1.— P.7-12.

44. Kaza, A. Long-term results of right ventricular outflow tract reconstruction in neonatal cardiac surgery: options and outcomes / A.K. Kaza, H.G. Lim, D.J. Dibardino, [et al.] // The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. —2009.—Vol.138, №4.— P.911-6.

45. Омельченко, А. Радикальная коррекция тетрады Фалло. 10-летний опыт / А.Ю. Омельченко, Ю.Н. Горбатов, Ю.Л. Наберухин, [и др.] // Journal of Siberian Medical Sciences. —2012.— Vol.№6.— P.58-64.

46. Gatzoulis, M. Risk factors for arrhythmia and sudden cardiac death late after repair of tetralogy of Fallot: a multicentre study / M.A. Gatzoulis, S. Balaji, S.A. Webber, [et al.] // The Lancet. —2000.— Vol.356, №9234.— P.975-81.

47. Hoffman, J. At what age should tetralogy of Fallot be corrected? / J.I.E. Hoffman // Cardiology in the young. —2017.—Vol.27, №4.— P.625-9.

48. Sadeghi, H. Does early tetralogy of Fallot total correction give better final lung volumes? / H.A. Sadeghi, S.R. Miri, H. Bakhshandeh, [et al.] // Asian cardiovascular & thoracic annals. —2013.—Vol.21, №3.— P.270-4.

49. Cunningham, M. Optimal Timing for Elective Early Primary Repair of Tetralogy of Fallot: Analysis of Intermediate Term Outcomes / M.E. Cunningham, M.T. Donofrio, S.M. Peer, [et al.] // The Annals of thoracic surgery. —2016.—Vol. —P.845-52.

50. Morales D. Tetralogy of fallot repair: The right ventricle infundibulum sparing (rvis) strategy / D. L. Morales, F. Zafar and C. D.

Fraser, [et al.] // *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery: Pediatric Cardiac Surgery Annual*. —2009; —Vol. —12. —P.54-58.

51. Peer, S. Early primary repair of tetralogy of Fallot does not lead to increased postoperative resource utilization / S.M. Peer, D. Zurakowski, R.A. Jonas, [et al.] // *The Annals of thoracic surgery*. —2014.—Vol.98, №6.— P.2173-9; discussion 9-80.

52. Бокерия, Л. Результаты хирургической коррекции тетрады Фалло у детей первого года жизни / Л. Бокерия, А. Ким, О. Махачев, [и др.] // *Детские болезни сердца и сосудов*. —2005.—Vol.№3.— с.52-7.

53. Mercer-Rosa, L. Predictors of Length of Hospital Stay After Complete Repair for Tetralogy of Fallot: A Prospective Cohort Study / L. Mercer-Rosa, O.U. Elci, G. DeCost, [et al.] // *Journal of the American Heart Association*. —2018.—Vol.7, №11(e008719).— P.1-13.

54. Egbe, A. Primary tetralogy of Fallot repair: predictors of intensive care unit morbidity / A.C. Egbe, S.C. Uppu, A.J. Mittnacht, [et al.] // *Asian cardiovascular & thoracic annals*. —2014.—Vol.22, №7.— P.794-9.

55. Kirsch, R. Results of elective repair at 6 months or younger in 277 patients with tetralogy of Fallot: a 14-year experience at a single center / R.E. Kirsch, A.C. Glatz, J.W. Gaynor, [et al.] // *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. —2014.—Vol.147, №2.— P.713-7.

56. Martins, I. When is the Best Time for Corrective Surgery in Patients with Tetralogy of Fallot between 0 and 12 Months of Age? / I.F. Martins, I.C. Doles, N.J.M. Bravo-Valenzuela, [et al.] // *Brazilian journal of cardiovascular surgery*. —2018.—Vol.33, №5.— P.505-10.

57. Bacha, E. Long-term results after early primary repair of tetralogy of Fallot / E.A. Bacha, A.M. Scheule, D. Zurakowski, [et al.] // *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. —2001.—Vol.122, №1.— P.154-61.

58. Maury, P. Ventricular arrhythmias and sudden death in tetralogy of Fallot / P. Maury, F. Sacher, A. Rollin, [et al.] // Archives of cardiovascular diseases. —2017.—Vol.110, №5.— P.354-62.

59. Sfyridis, P. Preservation of right ventricular structure and function following transatrial-transpulmonary repair of tetralogy of Fallot† / P.G. Sfyridis, G.V. Kirvassilis, J.K. Papagiannis, [et al.] // European Journal of Cardio-Thoracic Surgery. —2013.—Vol.43, №2.— P.336-42.

60. Атмашкин, А. Создание адекватного антеградного кровотока у больных со сложными ВПС при помощи транспредсердной инфундибулектомии / А. Атмашкин, А.И. Ким, В. Дидык, [и др.] // Бюллетень НЦССХ им АН Бакулева РАМН Сердечно-сосудистые заболевания. —2016.—Vol.17, №S3.— с.14-16.

61. Stellin, G. Repair of tetralogy of Fallot in the first six months of life: transatrial versus transventricular approach / G. Stellin, O. Milanesi, M. Rubino, [et al.] // The Annals of thoracic surgery. —1995.— Vol.60, №6 Suppl.— P.S588-91.

62. Sun, G. Primary repair of tetralogy of Fallot in infants: transatrial/transpulmonary or transventricular approach / G. Sun, X. Wang, J. Chen, [et al.] // Asian journal of surgery. —2013.—Vol.36, №4.— P.137-43.

63. Alexiou, C. Repair of tetralogy of Fallot in infancy with a transventricular or a transatrial approach / C. Alexiou, Q. Chen, M. Galogavrou, [et al.] // European journal of cardio-thoracic surgery: official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery. — 2002.—Vol.22, №2.— P.174-83.

64. Morales, D. Right ventricular infundibulum sparing (RVIS) tetralogy of fallot repair: a review of over 300 patients / D.L. Morales, F.

Zafar, J.S. Heinle, [et al.] // *Annals of surgery*. —2009.—Vol.250, №4.— P.611-7.

65. Padalino, M. Long-term outcomes following transatrial versus transventricular repair on right ventricular function in tetralogy of Fallot / M.A. Padalino, G. Cavalli, S.B. Albanese, [et al.] // *Journal of cardiac surgery*. —2017.—Vol.32, №11.— P.712-20.

66. Padalino, M. Transatrial-transpulmonary repair of tetralogy of Fallot / M.A. Padalino, V.L. Vida, G. Stellin // *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery Pediatric cardiac surgery annual*. —2009.— Vol.12, №1. —P.48-53.

67. Giannopoulos, N. Early results after transatrial/transpulmonary repair of tetralogy of Fallot / N.M. Giannopoulos, A.K. Chatzis, P. Karros, [et al.] // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. —2002.—Vol.22, №4.— P.582-6.

68. Anagnostopoulos, P. Pulmonary valve cusp augmentation with autologous pericardium may improve early outcome for tetralogy of Fallot / P. Anagnostopoulos, A. Azakie, S. Natarajan, [et al.] // *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. —2007.—Vol.133, №3.— P.640-7.

69. Бокерия, Л. Новый метод создания пути оттока из правого желудочка при тетраде фалло с сохранением фиброзного кольца клапана легочной артерии / Л.А. Бокерия, А.А. Свободов, Д.О. Беришвили, [и др.] // *Грудная и сердечно-сосудистая хирургия*. — 2017.—Vol.59, №4.— с.275-9.

70. Sarris, G. Results of reparative surgery for tetralogy of Fallot: data from the European Association for Cardio-Thoracic Surgery Congenital Database / G.E. Sarris, J.V. Comas, Z. Tobota, [et al.] // *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. —2012.—Vol.42, №5. discussion 74. — P.766-74.

71. Smith, C. Long-term Outcomes of Tetralogy of Fallot: A Study From the Pediatric Cardiac Care Consortium / C.A. Smith, C. McCracken, A.S. Thomas, [et al.] // *JAMA cardiology*. —2019.—Vol.4, №1. —P.34-41.

72. Sen, D. Aiming to Preserve Pulmonary Valve Function in Tetralogy of Fallot Repair: Comparing a New Approach to Traditional Management / D.G. Sen, M. Najjar, B. Yimaz, [et al.] // *Pediatric cardiology*. —2016.—Vol.37, №5.— P.818-25.

73. Y. Hiramatsu. Pulmonary cusp and annular extension technique for reconstruction of right ventricular outflow in tetralogy of Fallot / Y. Hiramatsu // *The Annals of thoracic surgery*. —2014.—Vol.98, №5.— P.1850-2.

74. Bautista-Hernandez, V. Valve-sparing tetralogy of Fallot repair with intraoperative dilation of the pulmonary valve / V. Bautista-Hernandez, I. Cardenas, I. Martinez-Bendayan, [et al.] // *Pediatric cardiology*. —2013.—Vol.34, №4.— P.918-23.

75. Robinson, J. The evolving role of intraoperative balloon pulmonary valvuloplasty in valve-sparing repair of tetralogy of Fallot / J.D. Robinson, R.H. Rathod, D.W. Brown, [et al.] // *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. —2011.—Vol.142, №6.— P.1367-73.

76. Vida, V. Evolving strategies for preserving the pulmonary valve during early repair of tetralogy of Fallot: mid-term results / V.L. Vida, A. Guariento, B. Castaldi, [et al.] // *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. —2014.—Vol.147, №2. discussion 94-6.— P.687-94.

77. Vida, V. Preservation of the Pulmonary Valve During Early Repair of Tetralogy of Fallot: Surgical Techniques / V.L. Vida, A. Guariento, F. Zucchetta, [et al.] // *Seminars in thoracic and cardiovascular*

surgery Pediatric cardiac surgery annual. —2016.—Vol.19, №1.— P.75-81.

78. Vida, V. Pulmonary valve-sparing techniques during repair of tetralogy of Fallot: The delamination plasty / V.L. Vida, F. Zucchetta, G. Stellin // The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. —2016.— Vol.151, №6.— P.1757-8.

79. Hofferberth, S. Valve-sparing repair with intraoperative balloon dilation in tetralogy of Fallot: Midterm results and therapeutic implications / S.C. Hofferberth, M. Nathan, G.R. Marx, [et al.] // The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. —2018.—Vol.155, №3.— P.1163-73.e4.

80. Hofferberth, S. Valve-sparing repair in tetralogy of Fallot: Does valve biology determine long-term outcome? / S.C. Hofferberth, S.M. Emani // The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. — 2018.—Vol.156, №2.— P.782-4.

81. Simon, B. Use of a Dacron Annular Sparing Versus Limited Transannular Patch With Nominal Pulmonary Annular Expansion in Infants With Tetralogy of Fallot / B.V. Simon, M.F. Swartz, M. Egan, [et al.] // The Annals of thoracic surgery. —2017.—Vol.103, №1.— P.186-92.

82. Hickey, E. Annulus-Sparing Tetralogy of Fallot Repair: Low Risk and Benefits to Right Ventricular Geometry / E. Hickey, E. Pham-Hung, F. Halvorsen, [et al.] // The Annals of thoracic surgery. —2017.— Vol.106, №3. —P.822-29.

83. Омельченко, А. Гемодинамическая и функциональная оценка правого желудочка после радикальной коррекции тетрады Фалло / А.Ю. Омельченко, Ю.Н. Горбатов, И.А. Сойнов, [и др.] // Медицинский альманах. —2016.—Vol.№4. №44.— с.93-99.

84. Ross, E. Right ventricular outflow tract growth in infants with palliated tetralogy of fallot / E.T. Ross, J.M. Costello, C.L. Backer, [et al.] // *The Annals of thoracic surgery*. —2015.—Vol.99, №4.— P.1367-72.

85. Омельченко, А. Гипоплазия легочных артерий у пациентов с тетрадой Фалло: радикальная коррекция или шунт? / А. Омельченко, И. Сойнов, Ю. Горбатых, [и др.] // *Верхневолжский медицинский журнал*. —2017.—Vol.№3.— с.16-21.

86. Омельченко, А. Паллиативная коррекция у пациентов с тетрадой Фалло / А.Ю. Омельченко, И.А. Сойнов, Ю.Н. Горбатых, [и др.] // *Медицинский альманах*. —2017.—Vol.3. №48.— с.28-32.

87. Petrucci, O. Risk factors for mortality and morbidity after the neonatal Blalock-Taussig shunt procedure / O. Petrucci, S.M. O'Brien, M.L. Jacobs, [et al.] // *The Annals of thoracic surgery*. —2011.—Vol.92, №2. discussion 51-2.— P.642-51.

88. Kucuk, M. Risk Factors for Thrombosis, Overshunting and Death in Infants after Modified Blalock-Taussig Shunt / M. Kucuk, R. Ozdemir, M. Karacelik, [et al.] // *Acta Cardiologica Sinica*. —2016.— Vol.32, №3.— P.337-42.

89. Барышникова, И. Функциональное состояние миокарда желудочков у детей раннего возраста с тетрадой Фалло до и после радикальной коррекции порока / И. Барышникова, В. Плахова, А. Купряшов, [и др.] // *Бюллетень НЦССХ им АН Бакулева РАМН Сердечно-сосудистые заболевания*. —2010.—Vol.11, №S6.— с.242.

90. Максименко, А. Стентирование открытого артериального протока, как этап палиативного лечения, при врожденных пороках сердца с дуктус-зависимым легочным кровотоком / А. Максименко, Ю. Кузьменко, О. Мотречко, [и др.] // *Современная педиатрия*. — 2014.—Vol.6.— P.74.

91. Tola, H. Ductal stent implantation in tetralogy of fallot with aortic arch abnormality / H.T. Tola, Y. Ergul, M. Saygi, [et al.] // Texas Heart Institute journal. —2015.—Vol.42, №3.— P.281-4.

92. Шишкова, Д. Применение стентов для коррекции врожденных пороков сердца / Д. Шишкова, Е. Овчаренко, В. Ганюков, [и др.] // Сибирский медицинский журнал. —2017.— Vol.32, №3.— с.35 - 42.

93. Bentham, J. Duct Stenting Versus Modified Blalock-Taussig Shunt in Neonates With Duct-Dependent Pulmonary Blood Flow: Associations With Clinical Outcomes in a Multicenter National Study / J.R. Bentham, N.K. Zava, W.J. Harrison, [et al.] // Circulation. —2018.— Vol.137, №6.— P.581-8.

94. Remadevi, K. Balloon pulmonary valvotomy as interim palliation for symptomatic young infants with tetralogy of Fallot / K.S. Remadevi, B. Vaidyanathan, E. Francis, [et al.] // Annals of pediatric cardiology. —2008.—Vol.1, №1.— P.2-7.

95. Barron, D. Tetralogy of Fallot: controversies in early management / D.J. Barron // World journal for pediatric & congenital heart surgery. —2013.—Vol.4, №2.— P.186-91.

96. Dohlen, G. Stenting of the right ventricular outflow tract in the symptomatic infant with tetralogy of Fallot / G. Dohlen, R.R. Chaturvedi, L.N. Benson, [et al.] // Heart (British Cardiac Society). —2009.—Vol.95, №2.— P.142-7.

97. Нохрин, А. Стентирование выводного тракта правого желудочка у маловесных детей, как этап при подготовке к радикальной коррекции тетрады фалло / А. Нохрин, Р. Тарасов, И. Сизова, [и др.] // Евразийский кардиологический журнал. —2016.— Vol.3.— с.168-9.

98. Черноглаз, П. Стентирование выходного отдела правого желудочка как этапное паллиативное вмешательство перед



проведением радикальной коррекции тетрады фалло у детей / П. Черноглаз, Ю. Линник, А. Башкевич, [и др.] // Неотложная кардиология и кардиоваскулярные риски. —2018.—Vol.2, №1.-с.230-6.

99. Барсумян, А. Сравнение результатов радикальной хирургической коррекции тетрады фалло у детей в зависимости от вида предшествовавшего паллиативного этапа / А. Барсумян, Ю. Линник, О. Жук, [и др.] // Научные стремления. —2017.— Vol.№22.— с.55-6.

100. Lee, C. Primary repair of symptomatic neonates with tetralogy of Fallot with or without pulmonary atresia / C.H. Lee, J.G. Kwak, C. Lee // Korean journal of pediatrics. —2014.—Vol.57, №1.— P.19-25.

101. Wilder, T. Young infants with severe tetralogy of Fallot: Early primary surgery versus transcatheter palliation / T.J. Wilder, G.S. Van Arsdell, L. Benson, [et al.] // The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. —2017.—Vol.154, №5.— P.1692-700.e2.

102. Shimazaki, Y. The dimensions of the right ventricular outflow tract and pulmonary arteries in tetralogy of Fallot and pulmonary stenosis / Y. Shimazaki, E.H. Blackstone, J.W. Kirklin, [et al.] // The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. —1992.—Vol.103, №4.— P.692-705.

103. Nakata, S. A new method for the quantitative standardization of cross-sectional areas of the pulmonary arteries in congenital heart diseases with decreased pulmonary blood flow / S. Nakata, Y. Imai, Y. Takanashi, [et al.] // The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. —1984.—Vol.88, №4.— P.610-9.

104. Wilder, T. Aggressive Patch Augmentation May Reduce Growth Potential of Hypoplastic Branch Pulmonary Arteries After Tetralogy of Fallot Repair / T.J. Wilder, G.S. Van Arsdell, E. Pham-Hung,

[et al.] // The Annals of thoracic surgery. —2016.—Vol.101, №3.— P.996-1004.

105. Dexter, J. The analysis of a case of continuous variation in *Drosophila* by a study of its linkage relations / J.S. Dexter // The American Naturalist. —1914.—Vol.48, №576.— P.712-58.

106. Artavanis-Tsakonas, S. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development / S. Artavanis-Tsakonas, M.D. Rand, R.J. Lake // Science (New York, NY). —1999.—Vol.284, №5415.— P.770-6.

107. Hori, K. Notch signaling at a glance. The Company of Biologists Ltd; 2013. -Vol.126. —P.2135-40.

108. Татаринова, Т. Роль мутаций гена notch в развитии пороков сердца и сосудов / Т.Н. Татаринова, О.А. Фрейлихман, А.А. Костарева, [и др.] // Трансляционная медицина. —2015.—Vol.№2-3.— с.84-9.

109. Balistreri, C. Deregulation of Notch1 pathway and circulating endothelial progenitor cell (EPC) number in patients with bicuspid aortic valve with and without ascending aorta aneurysm / C.R. Balistreri, F. Crapanzano, L. Schirone, [et al.] // Scientific reports. —2018.—Vol.8, №1(13834).— P.1-10.

110. Kostina, A. Notch, BMP and WNT/ $\beta$ -catenin network is impaired in endothelial cells of the patients with thoracic aortic aneurysm / A. Kostina, H. Bjork, E. Ignatieva, [et al.] // Atherosclerosis Supplements. —2018.—Vol.35, e6-e13.

111. Kostina, A. Different Notch signaling in cells from calcified bicuspid and tricuspid aortic valves / A. Kostina, A. Shishkova, E. Ignatieva, [et al.] // Journal of molecular and cellular cardiology. — 2018.—Vol.114, P.211-9.

112. Garg, V. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease / V. Garg, A.N. Muth, J.F. Ransom, [et al.] // *Nature*. —2005.—Vol.437, №7056.— P.270-4.

113. Page, D. Whole exome sequencing reveals the major genetic contributors to nonsyndromic tetralogy of Fallot / D.J. Page, M.J. Miossec, S.G. Williams, [et al.] // *Circulation research*. —2019.— Vol.124, №4.— P.553-63.

114. Michielon, G. Genetic syndromes and outcome after surgical correction of tetralogy of Fallot / G. Michielon, B. Marino, R. Formigari, [et al.] // *The Annals of thoracic surgery*. —2006.—Vol.81, №3.— P.968-75.

115. Kamath, B. NOTCH2 mutations in Alagille syndrome / B.M. Kamath, R.C. Bauer, K.M. Loomes, [et al.] // *Journal of medical genetics*. —2012.—Vol.49, №2.— P.138-44.

116. Töpf, A. Functionally significant, rare transcription factor variants in tetralogy of Fallot / A. Töpf, H.R. Griffin, E. Glen, [et al.] // *PLoS One*. —2014.—Vol.9, №8(e95453).— P.1-8.

117. McDaniell, R. NOTCH2 mutations cause Alagille syndrome, a heterogeneous disorder of the notch signaling pathway / R. McDaniell, D.M. Warthen, P.A. Sanchez-Lara, [et al.] // *American journal of human genetics*. —2006.—Vol.79, №1.— P.169-73.

118. Page, D. Deleterious genetic variants in NOTCH1 are a major contributor to the incidence of non-syndromic Tetralogy of Fallot / D.J. Page, M.J. Miossec, S.G. Williams, [et al.] // *bioRxiv*. —2018.— Vol.300905. —P.1-31.

119. de la Pompa, J. Coordinating tissue interactions: Notch signaling in cardiac development and disease / J.L. de la Pompa, J.A. Epstein // *Developmental cell*. —2012.—Vol.22, №2.— P.244-54.

120. Greenway, S. De novo copy number variants identify new genes and loci in isolated sporadic tetralogy of Fallot / S.C. Greenway,

A.C. Pereira, J.C. Lin, [et al.] // *Nature genetics*. —2009.—Vol.41, №8.— P.931-35.

121. Bauer, R. Jagged1 (JAG1) mutations in patients with tetralogy of Fallot or pulmonic stenosis / R.C. Bauer, A.O. Laney, R. Smith, [et al.] // *Human mutation*. —2010.—Vol.31, №5.— P.594-601.

122. Andersson, E. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function / E.R. Andersson, R. Sandberg, U. Lendahl // *Development (Cambridge, England)*. —2011.—Vol.138, №17.— P.3593-612.

123. Felician, G. Epigenetic modification at Notch responsive promoters blunts efficacy of inducing notch pathway reactivation after myocardial infarction / G. Felician, C. Collesi, M. Lusic, [et al.] // *Circulation research*. —2014.—Vol.115, №7.— P.636-49.

124. Li, Y. Notch1 in bone marrow-derived cells mediates cardiac repair after myocardial infarction / Y. Li, Y. Hiroi, S. Ngoy, [et al.] // *Circulation*. —2011.—Vol.123, №8.— P.866-76.

125. Ignatieva, E. Mechanisms of Smooth Muscle Cell Differentiation Are Distinctly Altered in Thoracic Aortic Aneurysms Associated with Bicuspid or Tricuspid Aortic Valves / E. Ignatieva, D. Kostina, O. Irtyuga, [et al.] // *Frontiers in physiology*. —2017.—Vol.8, №536.— P.1-12.

126. Kostina, A. Notch-dependent EMT is attenuated in patients with aortic aneurysm and bicuspid aortic valve / A.S. Kostina, C. Uspensky Vcapital Ie, O.B. Irtyuga, [et al.] // *Biochimica et biophysica acta*. —2016.—Vol.1862, №4.— P.733-40.

127. Tzahor, E. Cardiac regeneration strategies: Staying young at heart / E. Tzahor, K.D. Poss // *Science (New York, NY)*. —2017.— Vol.356, №6342.— P.1035-9.

128. Bergmann, O. Dynamics of cell generation and turnover in the human heart / O. Bergmann, S. Zdunek, A. Felker, [et al.] // *Cell*. —2015.—Vol.161, №7.— P.1566-75.

129. Ptaszek, L. Towards regenerative therapy for cardiac disease / L.M. Ptaszek, M. Mansour, J.N. Ruskin, [et al.] // *The Lancet*. —2012.— Vol.379, №9819.— P.933-42.

130. Wehman, B. Mesenchymal stem cells preserve neonatal right ventricular function in a porcine model of pressure overload / B. Wehman, S. Sharma, N. Pietris, [et al.] // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. —2016.—Vol.310, №11.— P.H1816-H26.

131. Peral, S. Safety and Feasibility for Pediatric Cardiac Regeneration Using Epicardial Delivery of Autologous Umbilical Cord Blood-Derived Mononuclear Cells Established in a Porcine Model System / S.C. Peral, H.M. Burkhart, S. Oommen, [et al.] // *Stem cells translational medicine*. —2015.—Vol.4, №2.— P.195-206.

132. Rupp, S. Intracoronary bone marrow cell application for terminal heart failure in children / S. Rupp, C. Jux, H. Böning, [et al.] // *Cardiology in the young*. —2012.—Vol.22, №5.— P.558-63.

133. Rupp, S. A regenerative strategy for heart failure in hypoplastic left heart syndrome: intracoronary administration of autologous bone marrow-derived progenitor cells / S. Rupp, A.M. Zeiher, S. Dimmeler, [et al.] // *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. — 2010.—Vol.29, №5.— P.574-7.

134. Tarui, S. Stem cell therapies in patients with single ventricle physiology / S. Tarui, S. Sano, H. Oh // *Methodist DeBakey cardiovascular journal*. —2014.—Vol.10, №2.— P.77-81.

135. Leong, Y. Cardiac Stem Cells for Myocardial Regeneration: They Are Not Alone / Y.Y. Leong, W.H. Ng, G.M. Ellison-Hughes, [et al.] // *Frontiers in cardiovascular medicine*. —2017.—Vol.4, №47. —P.1-13.

136. Le, T. Cardiac progenitor cells for heart repair / T.Y.L. Le, J.J.H. Chong // *Cell Death Discovery*. —2016.—Vol.2, №16052. —P.1-4.

137. Beltrami A. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. A. P. Beltrami, L. Barlucchi, D. Torella, [et al.] // *Cell*. —2003. —Vol.114, —P.763-76.

138. Liu, Q. Genetic lineage tracing identifies in situ Kit-expressing cardiomyocytes / Q. Liu, R. Yang, X. Huang, [et al.] // *Cell research*. — 2016.—Vol.26, №1.— P.119-30.

139. Sultana, N. Resident c-kit<sup>+</sup> cells in the heart are not cardiac stem cells / N. Sultana, L. Zhang, J. Yan, [et al.] // *Nature communications*. —2015.—Vol.6, №8701. —P.1-10.

140. Van Berlo, J. C-kit<sup>+</sup> cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart / J.H. Van Berlo, O. Kanisicak, M. Maillet, [et al.] // *Nature*. —2014.—Vol.509, №7500.— P.337-41.

141. Малашичева, А. Сравнительная характеристика стволовых клеток сердца, полученных из миокарда детей и взрослых / А. Малашичева, А. Сабирова, И. Козырев, [и др.] // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. —2015.—Vol.14, №3.— с.52-8.

142. White, A. Intrinsic cardiac origin of human cardiosphere-derived cells / A.J. White, R.R. Smith, S. Matsushita, [et al.] // *European heart journal*. —2011.—Vol.34, №1.— P.68-75.

143. Li, T. Direct comparison of different stem cell types and subpopulations reveals superior paracrine potency and myocardial repair efficacy with cardiosphere-derived cells / T.-S. Li, K. Cheng, K. Malliaras, [et al.] // *Journal of the American College of Cardiology*. — 2012.—Vol.59, №10.— P.942-53.

144. Chakravarty, T. TCT-820 multivessel intracoronary infusion of allogeneic cardiosphere derived cells in dilated cardiomyopathy: long term outcomes of the Dilated Cardiomyopathy Intervention with Allogeneic Myocardially-Regenerative Cells (DYNAMIC Trial) / T. Chakravarty, R. Makkar, T. Henry, [et al.] // *Journal of the American College of Cardiology*. —2016.—Vol.68, №18 Supplement.— P.8332.

145. Oh, H. Cell therapy trials in congenital heart disease / H. Oh // *Circulation research*. —2017.—Vol.120, №8.— P.1353-66.

146. Докшин, П. Активация стволовых клеток сердца при инфаркте миокарда / П. Докшин, А. Карпов, Ш. Эйвазова, [и др.] // *Цитология*. —2018.—Vol.60, №2.— с.81-88.

147. Yester, J. Mechanisms of Cardiomyocyte Proliferation and Differentiation in Development and Regeneration / J.W. Yester, B. Kühn // *Current cardiology reports*. —2017.—Vol.19, №2.— P.13.

148. Polizzotti, B. Neuregulin stimulation of cardiomyocyte regeneration in mice and human myocardium reveals a therapeutic window / B.D. Polizzotti, B. Ganapathy, S. Walsh, [et al.] // *Science translational medicine*. —2015.—Vol.7, №281 (281ra45).— P.1-13.

149. Porrello, E. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart / E.R. Porrello, A.I. Mahmoud, E. Simpson, [et al.] // *Science (New York, NY)*. —2011.—Vol.331, №6020.— P.1078-80.

150. Notari, M. The local microenvironment limits the regenerative potential of the mouse neonatal heart / M. Notari, A. Ventura-Rubio, S.J. Bedford-Guaus, [et al.] // *Science Advances*. —2018.—Vol.4, №5 (eaao5553).— P.1-13.

151. Mishra, R. Characterization and functionality of cardiac progenitor cells in congenital heart patients / R. Mishra, K. Vijayan, E.J. Colletti, [et al.] // *Circulation*. —2011.—Vol.123, №4.— P.364-73.

152. Haubner, B. Functional recovery of a human neonatal heart after severe myocardial infarction / B.J. Haubner, J. Schneider, U. Schweigmann, [et al.] // *Circulation research*. —2016.—Vol.118, №2.— P.216-21.

153. Ye, L. Cardiomyocytes in Young Infants With Congenital Heart Disease: a Three-Month Window of Proliferation / L. Ye, L. Qiu, H. Zhang, [et al.] // *Scientific reports*. —2016.—Vol.6, №23188.—P.1-8.

154. Худяков, А. Сравнение эффективности методов получения функционально активных кардиомиоцитов человека / А. Худяков, Д. Курапеев, А. Костарева, [и др.] // Гены и клетки. — 2013.—Vol.8, №2.— с.47-55.

155. Нарциссова, Г. Оценка легочной регургитации методом доплер-эхокардиографии у пациентов после радикальной коррекции тетрады Фалло / Г.П. Нарциссова, Д.С. Прохорова, Н.В. Матвеева, [и др.] // Патология кровообращения и кардиохирургия. — 2012.—Vol.№2.— с.15-19.

156. E. Bacha. Valve-Sparing or Valve Reconstruction Options in Tetralogy of Fallot Surgery / E. Bacha // Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery: Pediatric Cardiac Surgery Annual. —2017.— Vol.20, —P.79-83.

157. Piazza, L. Timing of pulmonary valve replacement after tetralogy of Fallot repair / L. Piazza, M. Chessa, A. Giamberti, [et al.] // Expert review of cardiovascular therapy. —2012.—Vol.10, №7.— P.917-23.

158. Е. Пшеничная. Внезапная сердечная смерть у детей. Часть 1 / Е. Пшеничная // Здоровье ребенка. —2013.—Vol.1, №44.— с.135-39.

159. Mouws, E. Tetralogy of Fallot in the Current Era / E. Mouws, N.M.S. de Groot, P.C. van de Woestijne, [et al.] // Seminars in thoracic and cardiovascular surgery. —2018.—Vol. 31, №3. —P.496-501.

160. Бокерия, Л. Тетрада Фалло у младенцев: возможно ли уменьшить процент трансаннулярной пластики при ранней радикальной коррекции / Л. Бокерия, А. Ким, О. Махачев, [и др.] // Бюллетень НЦССХ им АН Бакулева РАМН Сердечно-сосудистые заболевания. —2004.—Vol.5, №5.— с.25-28.

161. Kim, D. Optimal Pulmonary Valve Annulus Diameter for Annulus Preservation in Tetralogy of Fallot May Be Far Smaller Than



Normal Annulus Size / D.H. Kim, J.H. Lee, E.S. Choi, [et al.] // *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery*. —2018.—Vol.31, №2. —P.253-63.

162. Singh, S. Pulmonary valve preservation in Tetralogy of Fallot with a mildly hypoplastic annulus-should we do it? / S. Singh, H. Pratap, S. Agarwal, [et al.] // *Indian Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. —2011.—Vol.27, №2.— P.76-81.

163. Liu, M. Risk-adjusted prolonged length of stay as an alternative outcome measure for pediatric congenital cardiac surgery / M. Liu, C.M. Druschel, E.L. Hannan // *The Annals of thoracic surgery*. —2014.—Vol.97, №6.— P.2154-9.

164. Limperopoulos, C. Predictors of developmental disabilities after open heart surgery in young children with congenital heart defects / C. Limperopoulos, A. Majnemer, M.I. Shevell, [et al.] // *The Journal of pediatrics*. —2002.—Vol.141, №1.— P.51-8.

165. Newburger, J. Length of stay after infant heart surgery is related to cognitive outcome at age 8 years / J.W. Newburger, D. Wypij, D.C. Bellinger, [et al.] // *The Journal of pediatrics*. —2003.—Vol.143, №1.— P.67-73.

166. Emani, S. Cell-Based Therapy With Cardiosphere-Derived Cardiocytes: A New Hope for Pediatric Patients With Single Ventricle Congenital Heart Disease? / S.M. Emani, P.J. Del Nido // *Circulation research*. —2018.—Vol.122, №7.— P.916-7.

167. Sano, T. Impact of Cardiac Progenitor Cells on Heart Failure and Survival in Single Ventricle Congenital Heart Disease / T. Sano, D. Ousaka, T. Goto, [et al.] // *Circulation research*. —2018.—Vol.122, №7.— P.994-1005.

168. Ishigami, S. Intracoronary autologous cardiac progenitor cell transfer in patients with hypoplastic left heart syndrome: the TICAP

prospective phase 1 controlled trial / S. Ishigami, S. Ohtsuki, S. Tarui, [et al.] // *Circulation research*. —2015.—Vol.116, №4.— P.653-64.

169. Tarui, S. Transcoronary infusion of cardiac progenitor cells in hypoplastic left heart syndrome: Three-year follow-up of the Transcoronary Infusion of Cardiac Progenitor Cells in Patients With Single-Ventricle Physiology (TICAP) trial / S. Tarui, S. Ishigami, D. Ousaka, [et al.] // *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. —2015.—Vol.150, №5.— P.1198-208.

170. Ishigami, S. Intracoronary cardiac progenitor cells in single ventricle physiology: the PERSEUS (Cardiac Progenitor Cell Infusion to Treat Univentricular Heart Disease) randomized phase 2 trial / S. Ishigami, S. Ohtsuki, T. Eitoku, [et al.] // *Circulation research*. —2017.—Vol.120, №7.— P.1162-73.

171. Kaushal, S. Study design and rationale for elpis: A phase i/iib randomized pilot study of allogeneic human mesenchymal stem cell injection in patients with hypoplastic left heart syndrome. S. Kaushal, B. Wehman, N. Pietris, [et al.] // *American heart journal*. —2017. —Vol.192, —P.48-56.

172. Ozlek, B. Rationale, design, and methodology of the apollon trial: A comprehensive, observational registry of heart failure with midrange and preserved ejection fraction. B. Ozlek, E. Ozlek, O. Celik, [et al.] // *Anatolian journal of cardiology*. —2018. —Vol.19. —P.311-18.

173. Boni, A. Notch1 regulates the fate of cardiac progenitor cells / A. Boni, K. Urbanek, A. Nascimbene, [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. —2008.—Vol.105, №40.— P.15529-34.

174. Secco, I. Notch pathway activation enhances cardiosphere in vitro expansion / I. Secco, L. Barile, C. Torrini, [et al.] // *Journal of cellular and molecular medicine*. —2018.—Vol.22, №11.— P.5583-95.

175. Chen, L. The role of notch 1 activation in cardiosphere derived cell differentiation / L. Chen, M. Ashraf, Y. Wang, [et al.] // *Stem cells and development*. —2012.—Vol.21, №12.— P.2122-9.

176. Urbanek, K. Inhibition of Notch1-Dependent Cardiomyogenesis Leads to a Dilated Myopathy in the Neonatal Heart Novelty and Significance / K. Urbanek, M.C. Cabral-da-Silva, N. Ide-Iwata, [et al.] // *Circulation research*. —2010.—Vol.107, №3.— P.429-41.

177. Ye, L. Decreased Yes-Associated Protein-1 (YAP1) Expression in Pediatric Hearts with Ventricular Septal Defects / L. Ye, M. Yin, Y. Xia, [et al.] // *PLoS One*. —2015.—Vol.10, №10 (e0139712).— P.1-11.

178. D'Uva, G. ERBB2 triggers mammalian heart regeneration by promoting cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation / G. D'Uva, A. Aharonov, M. Lauriola, [et al.] // *Nature cell biology*. —2015.— Vol.17, №5.— P.627-38.

179. Flurkey, K. Pitfalls of animal model systems in ageing research / K. Flurkey, J.M. Curren // *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. —2004.—Vol.18, №3.— P.407-21.

180. Postma, A. Genetics of congenital heart disease: the contribution of the noncoding regulatory genome / A.V. Postma, C.R. Bezzina, V.M. Christoffels // *Journal of human genetics*. —2016.— Vol.61, №1.— P.13-9.