

**Федеральное государственное бюджетное учреждение «Северо-Западный
федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

Татаринова Татьяна Николаевна

**РОЛЬ МУТАЦИЙ ГЕНА NOTCH1 В РАЗВИТИИ КОАРКТАЦИИ
АОРТЫ**

14.01.05 – кардиология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель – д.м.н. О.М. Моисеева

Санкт-Петербург – 2016

Содержание

Содержание	2
Список сокращений	4
Введение.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Частота встречаемости врожденных пороков сердца и коарктации аорты	12
1.2 Актуальность проблемы и трудности внутриутробной диагностики	13
1.3 Факторы риска развития врожденных пороков сердца.....	16
1.4 Анатомические особенности коарктации аорты	17
1.5 Патофизиология коарктации аорты	19
1.6 Эмбриология сердца и сосудов	21
1.6.1 Формирование дуги аорты.....	23
1.6.2 Эмбриональное развитие коарктации аорты	24
1.7 Этиология коарктации аорты.....	25
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	32
2.1 Результаты клинических исследований пациентов с коарктацией аорты	32
2.2 Семейный анамнез пациентов с коарктацией аорты и детей контрольной группы	32
2.3 Инструментальные методы исследования	33
2.3.1 Эхокардиографическое исследование	34
2.4 Молекулярно-генетические методы исследования	36
2.5 Методы статистической обработки результатов.....	38
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	40
3.1 Клиническая характеристика групп пациентов с коарктацией аорты....	40
3.2 Клиническая характеристика родителей пациентов	40
3.3 Клиническая характеристика детской и взрослой контрольных групп .	42
3.4 Факторы риска развития коарктации аорты.....	45

3.5 Результаты секвенирования гена	
<i>NOTCH1</i> у больных с коарктацией аорты	47
3.6 Результаты секвенирования гена <i>NOTCH1</i> у пациентов	
с сочетанием коарктации аорты и двустворчатого клапана аорты	62
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	66
Выводы	80
Практические рекомендации.....	81
Список литературы	82

Список сокращений

БАК – двустворчатый или бicuspidальный клапан аорты

ВОЛЖ – выходной отдел левого желудочка

ВПС – врожденные пороки сердца

ГЛОС – гипоплазия левых отделов сердца

ДМЖП – дефект межжелудочковой перегородки

ДМПП – дефект межпредсердной перегородки

КоА – коарктация аорты

МСКТ – мультиспиральная компьютерная томография

ОАП – открытый артериальный проток

ТМА – транспозиция магистральных артерий сердца

ЭМП – эндотелиально-мезенхимальный переход

ЭФР – эпидермальный фактор роста

Введение

В России ежегодно рождается от 40 до 45 тысяч детей с врожденными пороками сердца (ВПС) [2]. Согласно данным статистики российской федерации ВПС составляют не менее 30% всех врожденных пороков развития и их удельный вес возрастает с течением времени [1, 3]. Постоянно увеличивается и абсолютное число детей с этой патологией, например, в 2001г оно увеличилось по сравнению с 2000г на 5%. Если учесть, что ВПС — причина 11% младенческих смертей и до 50% всех смертей, связанных с пороками развития, очевидной становится актуальность изучаемой проблемы [1, 4].

Коарктация аорты (КоА), как правило, называют стеноз проксимального отдела грудной части аорты. Несмотря на кажущуюся простоту данного порока, КоА значительно варьируется в анатомии, физиологии, клинической картине, методах лечения и результатах [23].

New England Regional Infant Cardiac Program определила КоА как четвертый наиболее часто встречающийся порок, требующий катетеризации сердца или хирургического лечения в течение первого года жизни [23, 68]. Это связано с ранним развитием гемодинамических проблем при данном пороке.

КоА, манифестирующая симптомами сердечной недостаточности в периоде новорожденности, требует незамедлительного хирургического лечения [80]. Незрелый миокард новорожденного не способен к эффективному использованию компенсаторных механизмов: активации симпатической нервной системы, приводящей к увеличению частоты сердечных сокращений и гипертрофии миокарда, мобилизации механизма Франка-Старлинга, обеспечивающего увеличение конечно-диастолического объема левого желудочка и поддержание ударного объема [23, 91]. При ранней диагностике, стабилизации состояния ребенка и своевременном направлении для коррекции порока в специализированные центры,

летальность вследствие хирургического лечения изолированной КоА достаточно низкая [81-87]. Операционная смертность младенцев со сложной КоА колеблется от 2% до 10% и является наиболее высокой среди детей со сложными пороками сердца [81-86]. У детей старшего возраста КоА, как правило, протекает бессимптомно, однако хирургическое лечение не должно затягиваться позднее двух-трехлетнего возраста ребенка из-за высокого риска резидуальной артериальной гипертензии и раннего атеросклероза [88 – 90]. Поэтому особенно важно диагностировать заболевание в максимально короткие сроки.

Однако, несмотря на совершенствование методов пренатальной диагностики, фетальная эхокардиография позволяет правильно идентифицировать КоА лишь в 30% случаев [6, 76, 92, 93]. Благодаря особенностям внутриутробного кровообращения плода, визуализировать зону перешейка аорты крайне затруднительно, как правило, наличие КоА можно только предположить на основании таких косвенных признаков, как асимметрия размеров магистральных сосудов или желудочков и сужение дуги аорты [6, 72, 93].

Причина возникновения КоА до сих пор не установлена. Как и большинство аномалий выходного отдела левого желудочка (ВОЛЖ), КоА чаще встречается у мужчин, чем у женщин, с частотой от 1,27 до 1,74 [23, 68, 77]. Генетический компонент КоА уже давно признан в синдроме Шершевского-Тернера (кариотип X0), среди пациентов которого данный порок встречается с частотой около 35% [23]. Исследования последних лет свидетельствуют, что генетическое вклад в развитие аномалий ВОЛЖ, в том числе и КоА, более важен, чем считалось ранее [23, 26, 61, 78]. Также были замечены сезонные колебания КоА, с обострением рождения детей с данной патологией в конце осени и зимой [23, 79].

Однако до сих пор не найдены конкретные гены, участвующие в развитии КоА, а также нет данных о факторах риска, способствующих развитию заболевания. В этом аспекте чрезвычайно интересным

представляется исследование гена *NOTCH1*, участвующего на раннем этапе в эмбриогенезе сердца и сосудов [62 – 65].

Подводя итог вышеизложенному, следует заключить что, несмотря на многочисленные исследования, посвященные изучению причин и механизмов, приводящих к формированию коарктации аорты, генез развития данного порока до сих пор не установлен, что делает тему актуальной с научной и практической точек зрения. Путем обследования семей пациентов с КоА и поиска у них мутаций гена *NOTCH1*, мы попытаемся приблизиться к пониманию механизмов развития КоА. С другой стороны, выявление факторов риска и расширение возможностей ранней диагностики заболевания позволят не только снизить летальность при данной патологии, но и предупредить развитие отдаленных послеоперационных осложнений, тем самым увеличивая продолжительность жизни пациентов с прооперированной КоА.

Цель исследования

На основании анализа семейных форм заболевания и поиска мутаций в гене *NOTCH1* оценить вклад генетической составляющей в развитии коарктации аорты.

Задачи исследования

1. Охарактеризовать морфофункциональные особенности коарктации аорты в изолированном ее варианте и в сочетании с двустворчатым клапаном аорты и другими врожденными пороками сердца.
2. Определить частоту семейных случаев коарктации аорты и других врожденных аномалий выходного тракта левого желудочка.

3. Провести генетическое обследование пациентов с коарктацией аорты на предмет наличия мутаций и редких полиморфных вариантов гена *NOTCH1*.

4. Установить связь между существованием замен/мутаций в гене *NOTCH1* и клиническими особенностями коарктации аорты.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Наследственность играет важную роль в развитии коарктации аорты. У родителей с аномалиями выходного отдела левого желудочка, в том числе и с двустворчатым аортальным клапаном, риск рождения ребенка с коарктацией аорты выше. Дети, имеющие отягощенную наследственность по врожденным порокам сердца, и в частности аномалиям выходного отдела левого желудочка, значительно чаще имеют сочетанную врожденную патологию сердца.

2. Для гена *NOTCH1* характерна высокая изменчивость. Пациенты с редкими полиморфными вариантами гена *NOTCH1* чаще имеют сочетанную патологию аорты. Замены в гене *NOTCH1* могут быть ассоциированы с развитием коарктацией аорты. Для доказательной базы патогенеза заболевания особенно важно идентифицировать ген вариант/мутация, исследуя достаточное количество человек в контрольной группе, прошедших функциональное обследование.

Научная новизна

Выявлены дополнительные факторы риска, влияющие на течение беременности и формирование коарктации аорты у плода. В результате исследования установлено, что отягощенная наследственность по ВПС в сочетании с профессиональными вредностями родителей увеличивают риск развития коарктации аорты почти в 2 раза, тогда как отягощенный акушерский анамнез не влияет на формирование заболевания. Наличие

отягощенной беременности и экстрагенитальной патологии у матери ведут к увеличению частоты возникновения врожденных аномалий выходного отдела левого желудочка у ребенка.

Установлено, что у пациентов с коарктацией аорты, родители которых имели врожденные пороки сердца (в том числе двустворчатый клапан аорты), частота развития сочетанной врожденной патологии выходного тракта левого желудочка выше.

В проведенном исследовании впервые представлены данные, полученные путем прямого секвенирования 10 экзонов гена *NOTCH1* от 200 человек контрольной группы, прошедших функциональное обследование сердца и не имеющих внутрисердечных аномалий. В работе выявлено несколько новых, а также ранее опубликованных вариантов гена *NOTCH1* как у пациентов с коарктацией аорты, так и в контрольной группе.

Впервые продемонстрированы разные варианты замен гена *NOTCH1* у пациентов с сочетанием коарктации аорты и двустворчатого клапана аорты в зависимости от нарушения функции аортального клапана.

Благодаря выявлению редких генетических вариантов, встречающихся с частотой ниже 1%, проведенное нами исследование подтверждает высокую изменчивость гена *NOTCH1*. Установлена связь варианта R1279H гена *NOTCH1* с развитием коарктации аорты.

Показано, что замена R1279H в гене *NOTCH1* может представлять собой ассоциированный с болезнью аллель и при наличии неблагоприятных факторов способствовать развитию коарктации аорты. Также нами предложена математическая модель прогнозирования развития КоА на основании исследования мутаций/замен гена *NOTCH1*. Проведенное исследование служит дополнительным подтверждением существования наследственной предрасположенности к развитию коарктации аорты, а также объясняет частую ассоциированность данного порока с другими врожденными пороками сердца.

Практическая значимость

Выявление факторов риска, способствующих развитию коарктации аорты, позволило выделить группу лиц, имеющих высокий риск рождения ребенка с данной патологией, и обосновать необходимость медико-генетического консультирования и эхокардиографического обследования будущих родителей, в том числе отца ребенка.

В комплексе скринингового обследования новорожденных, родители которых имеют аномалии выходного отдела левого желудочка, и в частности двустворчатый клапан аорты, рекомендовано проведение эхокардиографического исследования, вне зависимости от отсутствия у них патологии по данным внутриутробной диагностики сердца плода.

При проведении медико-генетического консультирования пациентов с двустворчатым клапаном аорты необходимо детальное уточнение анатомии и функции клапана.

Внедрение результатов исследования.

Результаты исследования внедрены в практику обучения слушателей, интернов, клинических ординаторов и аспирантов на кафедре педиатрии имени профессора И.М. Воронцова факультета послевузовского и дополнительного профессионального образования ГБОУ ВПО СПбГПМУ Минздрава России, а также в работу Института перинатологии и педиатрии ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова».

Апробация работы

Материалы исследования представлены в виде докладов и обсуждены на Российском национальном конгрессе кардиологов в Казани в 2014 г., на XVIII конгрессе педиатров в России в 2015 г. в Москве и на Европейских

конgressах кардиологов в 2011 г. (Париж, Франция) и в 2015 г. (Лондон, Великобритания).

По материалам диссертации опубликовано 6 научных работ, из них 3 статьи в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, характеристики обследованных пациентов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 5 отечественных и 153 зарубежных источников.

Диссертация изложена на 97 страницах машинописного текста, содержит 10 таблиц и 8 рисунков.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Частота встречаемости врожденных пороков сердца и коарктации аорты

Среди заболеваний сердечнососудистой системы у детей грудного возраста ВПС занимают главенствующее место и с удивительным постоянством встречаются с одинаковой частотой среди новорожденных всех стран, независимо от географического положения последних, уровня социальной защиты населения и качества медицинской помощи. По данным проведенных ранее исследований частота ВПС варьирует в широких пределах: от 2,4 до 14,15 случаев на 1 000 новорожденных [1, 3, 68, 69, 70, 94]. Наиболее распространенными являются пороки так называемой "большой шестерки": ДМЖП, ОАП, ТМА, ДМПП, тетрада Фалло и КоА. Вместе они составляют более 66% всех ВПС [1].

КоА впервые была описана Морганьи в 1760 г., и представляет собой врожденное сегментарное сужение, которое может локализоваться на любом участке аорты [6, 7]. Такие морфологические изменения описаны для восходящего отдела, нисходящей грудной или брюшной аорты, а также отмечены случаи множественной локализации [1, 6, 74, 75, 76]. Однако в подавляющем большинстве случаев (89 – 98%) коарктация располагается на участке от левой подключичной артерии до ОАП (так называемый «перешеек аорты») или сразу ниже ОАП. Сужение может выявляться на разном протяжении, может быть дискретным (вследствие мембраны) или тубулярным, и достигать значительной степени, вплоть до атрезии или перерыва дуги аорты, которые имеются у 1,5% больных [1, 6].

КоА встречается в 0,23 – 0,33 случаях на 1000 новорожденных, а среди пациентов с ВПС составляет около 6% и до 10% среди критических пороков [1, 6, 69, 71, 72, 73]. По данным патологоанатомического исследования КоА

была обнаружена у 6% плодов, 43% из которых имели хромосомные аномалии, в частности моносомию по X хромосоме [6, 8].

1.2 Актуальность проблемы и трудности внутриутробной диагностики

В последние годы отмечается тенденция к неуклонному росту ВПС. Отчасти это связано с появлением внутриутробной диагностики и высоким уровнем развития сердечнососудистой хирургии, что позволяет осуществлять раннюю диагностику и своевременное оперативное лечение, тем самым повышая выживаемость пациентов с этой патологией. Вместе с тем, нельзя не отметить ухудшение экологической обстановки в мире и состояния здоровья населения в целом, а также появление все более поздних браков, что приводит к росту частоты ВПС. Так по данным мета-анализа D.van der Lide с соавторами за последние 15 лет в мире ежегодно появляется 1,35 миллионов новорожденных с пороками сердца и сосудов [9].

В период новорожденности КоА уступает по частоте только ДМЖП и ТМА. Это объясняется ранним возникновением гемодинамических проблем при данном пороке.

Изолированная КоА приводит к смерти 41 – 46% детей в течение первого года жизни, при ее сочетании с другими ВПС умирают 70 – 90% младенцев [2, 10]. Основные причины смерти – сердечная и почечная недостаточность. По данным зарубежных исследований, средний возраст умерших пациентов с неоперированной КоА составил 31 год [11]. Смерть наступила в 26% от сердечной недостаточности, в 21% от разрыва аорты, в 18% от инфекционного эндокардита, и 18% пациентов умерли от внутримозговых кровоизлияний [11].

В целом, чем раньше проявляется заболевание, тем тяжелее оно протекает и неблагоприятнее его последствия. Поэтому особенно важно выявление заболевания в максимально короткие сроки. Ребенку, рожденному

с КоА, показано оперативное лечение. В настоящее время это единственный эффективный способ лечения данного порока.

Благодаря совершенствованию методов диагностики и развитию сердечнососудистой хирургии, большинство детей с ВПС в настоящее время удается прооперировать, хотя летальность при этих заболеваниях по-прежнему остается высокой. По данным статистики с конца 70-х годов прошлого века в Великобритании с пороками сердца ежегодно рождается около 4 600 детей, один на 145 живорожденных. С учетом ежегодного выполнения около 3 100 операций и 725 катетеризаций полостей сердца детям с ВПС летальность при этой патологии даже в такой развитой стране как Великобритания превышает 50% [12].

Несмотря на большой опыт и хорошие результаты хирургического лечения КоА как полостными, так и эндоваскулярными методами, частота отдаленных послеоперационных осложнений и смертность остаются значительными. По данным клиники Mayo (США) за период наблюдения с 1964 г. по 1981 г. прооперирован 571 пациент с КоА [13]. Средний возраст наблюдения этих пациентов составил 20 лет. Из них 11% пациентов потребовалось последующее хирургическое лечение (3% по поводу рекоарктации аорты), у 25% развилась артериальная гипертензия, 15% впоследствии умерли от сердечной недостаточности. Анализ выживаемости показал, что 91% пациентов пережили первые 10 лет после хирургической коррекции, после 30 лет данный показатель снизился до 72%. Смерть наступала в среднем в возрасте около 38 лет и была напрямую связана с поздним оперативным лечением (старше 9 лет жизни), а также с сохранением послеоперационной артериальной гипертензии. Сорок четыре процента всех летальных исходов были вторичными и возникали вследствие ишемической болезни сердца или нарушений мозгового кровообращения, указывая на наличие ускоренных сосудистых проблем у данной группы пациентов [13]. Аналогичные результаты были получены О.Н.Торо-Salazar с соавторами, наблюдавшими 274 пациента с КоА в течение более 50 лет [14].

Риск смертельного исхода после хирургического лечения по поводу КоА оценивается как 3,8 на 1 000 пациентов в год [15]. Важным фактором риска остается резидуальная артериальная гипертензия, что связано как с поздним оперативным лечением, так и с сохранением остаточной обструкции аорты [13, 16]. Повышенное артериальное давление наблюдалось у 7 - 28% пациентов, оперированных в младенчестве, и у 38% лиц, получавших лечение после четырех лет [14, 17, 18]. Заболеваемость инфекционным эндокардитом после хирургической коррекции КоА составила 1,2 на 1 000 пациентов в год, поэтому особенно важно соблюдать пожизненный режим антибактериальной профилактики.

С учетом особенностей кровообращения плода, в результате которых через аортальный истмус проходит только 10 – 15% от общего желудочкового потока крови, и даже атрезия аорты не мешает нормальному развитию ребенка. Поэтому визуализировать участок коарктации удастся только в единичных случаях [5, 19, 20]. Так, согласно результатам скринингового ультразвукового обследования 20 248 плодов на 19 – 22 неделе беременности в Германии (1990 – 1994 гг.), из 7 случаев КоА пренатальный диагноз не был установлен ни в одном [5, 19]. Аналогичные данные получены и в Норвегии [20]. Пренатальная диагностика повышает выживаемость и общий исход периоперационного периода. По данным сравнительных исследований, в группе детей с КоА, диагностированной в послеродовом периоде, процент летальности и периоперационных осложнений был значительно выше [5, 21].

Высокая частота критических состояний в постнатальном периоде и сложность внутриутробной диагностики КоА диктует необходимость поиска альтернативных методов, что позволит выявить группу лиц, имеющих высокий риск рождения ребенка с данной патологией, с целью ранней диагностики и своевременного оперативного лечения.

1.3 Факторы риска развития врожденных пороков сердца

Известно, что период закладки и формирования структур сердца (со 2-й по 7-ю неделю беременности) является наиболее уязвимым для целого ряда неблагоприятных воздействий. К ним относят врожденные и приобретенные заболевания матери (отца), а также тератогенные факторы внешней среды. Естественно, эти воздействия могут комбинироваться. Наиболее важными являются наследственные заболевания (хромосомные аномалии и делеции, свежие мутации), инфекционные заболевания (в первую очередь - вирусные), хронические нарушения обмена веществ, гормональные нарушения, алкоголизм и прием наркотиков.

В ранее опубликованных работах уже анализировалось влияние на течение беременности таких факторов риска, как возраст и вес матери, употребление алкоголя, кофейных напитков, оральных контрацептивов и табакокурение во время беременности [22]. Частота ВПС у детей в этой группе значительно превышала среднепопуляционные показатели и составила 9%. О негативном влиянии возраста свидетельствует увеличение числа ВПС у детей, рожденных от матерей младше 16 лет и старше 41 года, в два и три раза, соответственно. Курящие и регулярно употребляющие алкоголь матери имеют риск рождения ребенка с ВПС в три раза выше. Уменьшение или отказ от курения и употребления алкоголя во время беременности снижает риск врожденных аномалий сердца. Вместе с тем, дети женщин, принимающих оральные контрацептивы до беременности, имели более низкие риски развития ВПС. Достоверных корреляций между частотой возникновения ВПС у детей и индексом массы тела матери, а также употреблением ею кофейных напитков не получено.

В настоящее время отсутствуют работы, анализирующие семьи пациентов с КоА. Нет исследований о влиянии неблагоприятных факторов во время беременности и значении наследственности в развитии данного

порока. Отсутствуют сведения о наличии и частоте структурных аномалий сердца у родителей и близких родственников пациентов с КоА.

1.4 Анатомические особенности коарктации аорты

У плода и новорожденного в возрасте 5 – 10 недель область перешейка аорты в норме бывает сужена, так как в период внутриутробного развития пропускает в нисходящую аорту не более трети всего кровотока, а две трети попадают туда через ОАП из легочной артерии.

Так как в норме ОАП закрывается вскоре после рождения, весь поток крови в нисходящую аорту начинает поступать через перешеек, и он постепенно расширяется до нормального диаметра. При формировании коарктации в данной области сохраняется сужение различной протяженности и формы, наиболее часто – в виде локальной перетяжки, выше и ниже которой аорта имеет нормальный диаметр. Внутри аорты в таких случаях находят диафрагму с небольшим отверстием или серповидную связку. Иногда просвет аорты полностью облитерирован. Другим анатомическим вариантом является тубулярное сужение перешейка аорты (менее 50% от диаметра нисходящей аорты), протяженностью 1,5 – 2,5 см. Артериальный проток в таких случаях, как правило, сохраняет свою проходимость. Ранее локальный и протяженный типы коарктации называли «взрослым» и «инфантильным», соответственно. Однако в результате накопления большого клинического и патологоанатомического материала эти термины перестали использовать, так как выяснилось, что «взрослый» тип встречается у умерших новорожденных, а «инфантильный» тип нередко обнаруживается у взрослых. Кроме того, возможна комбинация тубулярной гипоплазии перешейка с выраженным локальным сужением аорты.

Характерной особенностью КоА является значительная частота сопутствующих ВПС. Чем меньше возраст, тем выше вероятность дополнительных пороков сердца. У взрослых подобное сочетание

встречается в 18% случаев, тогда как у детей — в 70%. Чаще всего выявляют ОАП в 68% случаев, ДМЖП в 53%, пороки митрального клапана — 8%. [1, 23, 24, 25]. Однако наиболее часто (85%) КоА сочетается с БАК [23, 26]. Некоторые больные имеют многоуровневые обструкции ВОЛЖ, так называемый синдром Шона: комплекс врожденных сердечнососудистых аномалий в виде митрального стеноза за счет парашютообразного митрального клапана (когда хорды обеих створок соединяются в один тяж, который прикрепляется только к одной папиллярной мышце), субаортального стеноза (мембранозное или фиброзно-мышечное образование, ведущее к подклапанному сужению ВОЛЖ), стеноза клапана аорты (чаще всего на фоне БАК) и КоА. При сочетании двух или трех компонентов комплекса речь идет о неполной форме синдрома Шона. Обструкция левых отделов на нескольких уровнях является крайне редкой патологией и, вероятно, носит наследственный характер. По данным N.Zucker и соавторов комплекс Шона встречался в четырех случаях на 12500 эхокардиографических исследований [27]. Сопутствующую гипоплазию дуги аорты (между брахиоцефальным стволом и левой подключичной артерией) большей или меньшей степени находят примерно у 65% пациентов, подвергающихся хирургическому лечению. Цианотические пороки сочетаются с коарктацией значительно реже, чем пороки бледного типа. Описаны комбинации КоА с атриовентрикулярным каналом, d-ТМА (с наличием или отсутствием атрезии трикуспидального клапана), двойным отхождением магистральных артерий от правого желудочка по типу аномалии Тауссиг-Бинга (подлегочное расположение ДМЖП), корригированной ТМА. КоА также является важным компонентом ГЛОС. Частота сочетания с экстракардиальной патологией составляет 26%. Наиболее часто наблюдается: аневризма сосудов головного мозга, трахеопищеводная фистула, почечные кисты, подковообразные почки, порок входит в синдром Тернера.

1.5 Патология коарктации аорты

Гемодинамические сдвиги при КоА определяются препятствием кровотоку в аорте. Основным следствием этого является высокое давление в левом желудочке и верхней половине туловища. В последующем артериальная гипертензия поддерживается с помощью измененной реактивности стенки сосудов, расположенных проксимальней коарктации, а также гуморальными механизмами (активацией системы ренин-ангиотензин-альдостерона и др.) [1, 28]. В нижней половине тела перфузионное давление резко снижено, и кровоснабжение зависит либо от проходимости ОАП, через который поступает кровь из легочной артерии (дуктус зависимое кровообращение), либо от наличия коллатералей. К главным сосудам, участвующим в развитии коллатеральной сети, относятся подключичные артерии с их ветвями, внутренние грудные артерии, межреберные артерии, сосуды лопатки, позвоночные артерии. При коарктации, расположенной преддуктально, кровоток в нисходящую аорту может долгое время осуществляться через ОАП, и стимулы для развития коллатералей отсутствуют [1].

При аномальном отхождении левой и правой подключичных артерий ниже места резкой коарктации возможно развитие в них ретроградного кровотока из бассейна мозговых сосудов в нисходящую аорту с клиническими проявлениями церебральной недостаточности (синдром обкрадывания).

В период внутриутробного развития основную нагрузку несет правый желудочек, в значительной мере осуществляющий системное кровообращение и КоА не оказывает влияния на развитие плода. Даже при полном перерыве аорты, кровоснабжение нижней половины туловища успешно осуществляется через ОАП.

После рождения ребенка основная нагрузка кровотоком полностью переходит к левому желудочку, который при наличии КоА должен быстро

гипертрофироваться. Если нарастание массы миокарда не сопровождается достаточным увеличением его кровоснабжения, это ведет к кислородному голоданию мышцы сердца, развитию зон ишемии, мелкоочаговых некрозов, фиброэластоза. Фракция выброса левого желудочка снижается как вследствие механического препятствия, так и последующей дистрофии миокарда, что приводит к снижению сердечного выброса [1, 23, 91].

Закрытие ОАП у таких пациентов приводит к стремительному ухудшению течения порока и сопровождается высокой летальностью.

Изменения легочного кровотока обычно связаны с наличием ОАП и других ВПС. Кровоток через ОАП может быть направлен как в сторону нисходящей аорты (у новорожденных с предуктальной коарктацией), так и в сторону легочной артерии (у старших детей). В первом случае он поддерживает кровообращение в бассейне нисходящей аорты, во втором приводит к гиперволемии малого круга кровообращения. Сопутствующий ДМЖП сопровождается быстрым развитием высокой легочной гипертензии. Так как через него на легочные сосуды передается высокое давление из левого желудочка [1, 23].

При изолированной КоА в связи с повышением давления в левом предсердии возможен застой в малом круге кровообращения и шунтирование крови в правое предсердие через открытое овальное окно. Сброс слева направо через сопутствующий ДМЖП в течение некоторого времени «разгружает» левый желудочек, позволяя адаптироваться к нагрузке давлением, но быстро приводит к дополнительной объемной нагрузке. При пороках со сбросом крови справа налево обращают на себя внимание симптомы артериальной гипоксемии [1, 23, 80].

Кроме того, при естественном течении заболевания могут развиваться вторичный фиброэластоз левого желудочка, морфологические изменения коронарных артерий, расстройства мозгового кровообращения или кровоизлияния в мозг, аневризма аорты, что также утяжеляет прогноз и ухудшает результаты отложенного хирургического лечения [1, 23].

1.6 Эмбриология сердца и сосудов

В норме развитие сердца в эмбриональном периоде складывается из следующих стадий. Закладка сердца происходит на ранних этапах эмбриогенеза из двух билатеральных листков мезодермы, вскоре после гастрюляции [29]. Далее эти два поля первичных сердечных клеток сходятся по средней линии, образуя полумесяц (сердечный гребень), а затем вытягиваются в сердечную трубку, состоящую из эндотелия, окруженного одним слоем клеток миокарда. На двадцатый день развития эмбриона впервые бьется сердце. Постепенно трубка удлиняется, образуя правостороннюю петлю, получая дополнительную порцию клеток-предшественников, имеющих глоточное происхождение, так называемых клеток вторичного сердечного поля (second heart field, SHF). Далее следует серия сложных этапов, посредством которых происходит реконструкция сердца из сердечной трубки в четырехкамерную структуру [29] (Рисунок 1-А). Формируется атриовентрикулярный канал, который разделяет сердечную трубку на предполагаемые предсердия и желудочки сердца. Затем в области выносящего тракта и атриовентрикулярного соединения образуются эндокардиальные подушки. До начала формирования подушек, клетки эндокарда и миокарда лежат рядом друг с другом, разделенные толстым слоем внеклеточного матрикса, известным под названием «сердечный гель» [29] (Рисунок 1–Б).

Под воздействием различных сигналов смежного миокарда, эндокард подвергается эндотелиально-мезенхимальному переходу (ЭМП). Впоследствии эндокардиальные клетки способны отделиться от их эпителиального слоя и внедриться в сердечный гель, приобретая мезенхимный фенотип и теряя эндотелиальный. Эти события являются решающими в формировании предшественников четырех основных клапанов сердца (аортального, пульмонального, митрального и трикуспидального) [123]. Далее следует стадия образования трабекул внутри

стенки правого и левого желудочков сердца, формируются межпредсердная и межжелудочковая перегородки, происходит реконструкция отводящего тракта с образованием аорты и легочной артерии.

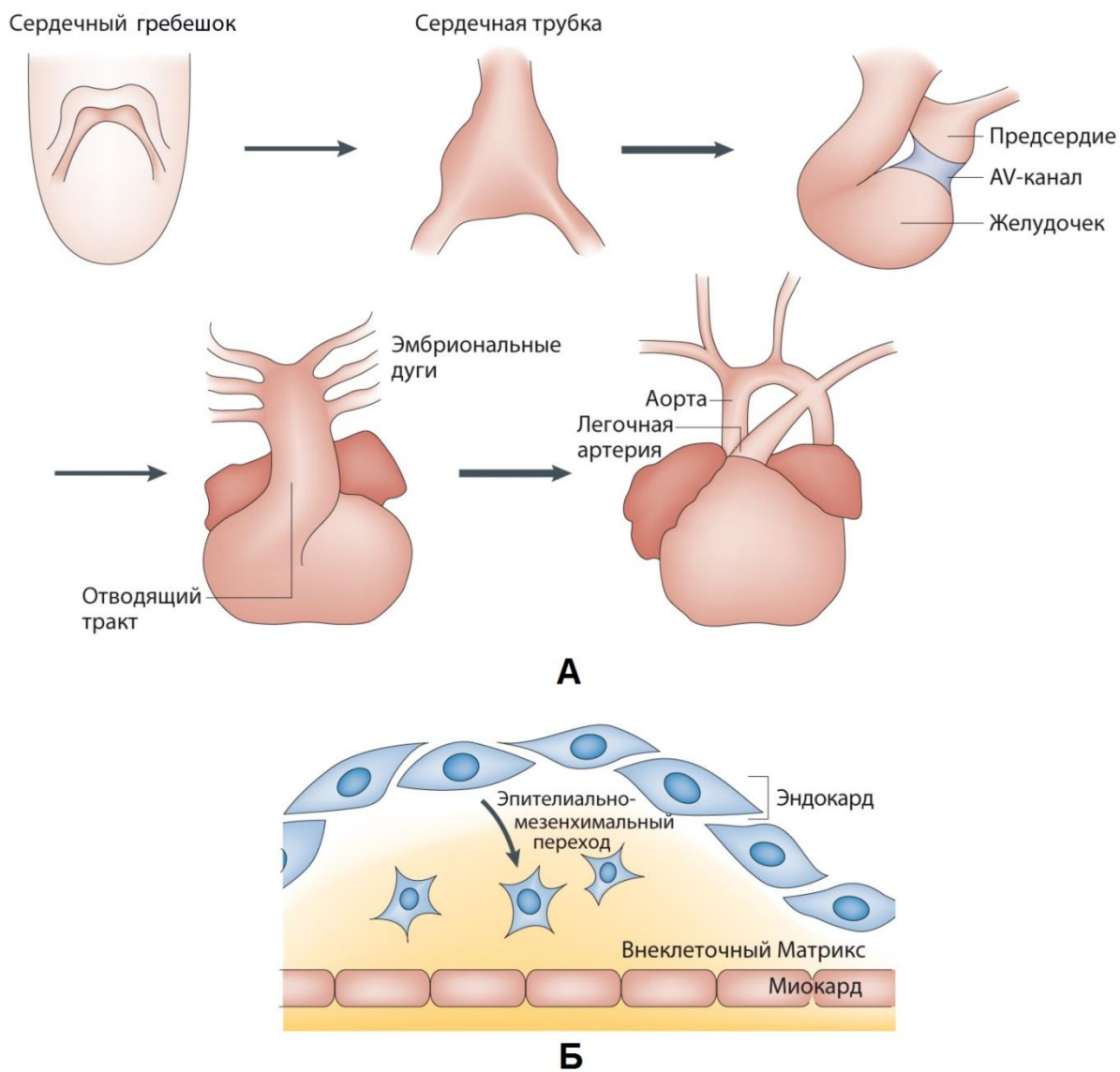


Рисунок 1 – Эмбриология сердца и сосудов: А - этапы развития сердца; Б - эндотелиально-мезенхимальный переход.

Клетки первичного сердечного поля участвуют в формировании левого желудочка, тогда как клетки вторичного сердечного поля дают начало правому желудочку, отводящему тракту, венозному синусу и предсердиям [29, 30].

1.6.1 Формирование дуги аорты

Процесс развития дуги аорты можно описать как последовательное появление с сохранением или распадом 6 пар сосудов, соединяющих трункоаортальный мешок эмбриональной сердечной трубки с парной дорсальной аортой, которые, сливаясь, окончательно формируют нисходящую аорту. Каждой дуге соответствует жаберная сумка, производная от эмбриональной первичной кишки. Хотя механизм, определяющий постоянство или распад компонентов дуги аорты до конца не ясен, миграция клеток неврального гребня в глоточные дуги может играть значительную роль [23, 31]. Кроме того, описан ряд ассоциаций различных аномалий дуги аорты, таких как праволежащая дуга аорты, аберрантная и изолированная подключичная артерия, сосудистое кольцо, с микроделециями хромосомы 22q11, что может являться одной из причин в развитии данной патологии [32]. Тот факт, что клетки нервного гребня также участвуют в формировании конотрункуса и что конотрункальные аномалии имеют место у пациентов с делецией хромосомы 22q11, подразумевают наличие связи генетического компонента и с другими аномалиями аорты. Нормальное формирование дуги аорты, согласно теории E.D. Congdon, происходит из аортальной части эмбрионального общего артериального ствола, левой ветви трункоаортального мешка, левой четвертой артериальной дуги, участком левой дорсальной аорты между четвертой и шестой эмбриональными дугами, и левой дорсальной аортой, расположенной дистальнее шестой эмбриональной дуги [23, 33].

Согласно E.D. Congdon, появление и атрофия сосудов дуги или фрагментов брахиоцефальной системы, процесс последовательный, тогда как концепция J.E. Edwards предполагает существование двойной дуги аорты, которая, по сути, определяет ее окончательное формирование [23, 33, 34]. Диаграмма, предложенная J.E. Edwards, не только демонстрирует развитие всех структур дуги аорты на эмбриональном этапе, но и может помочь

диагностировать возникновение вероятных аномалий аорты в зависимости от этапов эмбриогенеза [23] (Рисунок2).

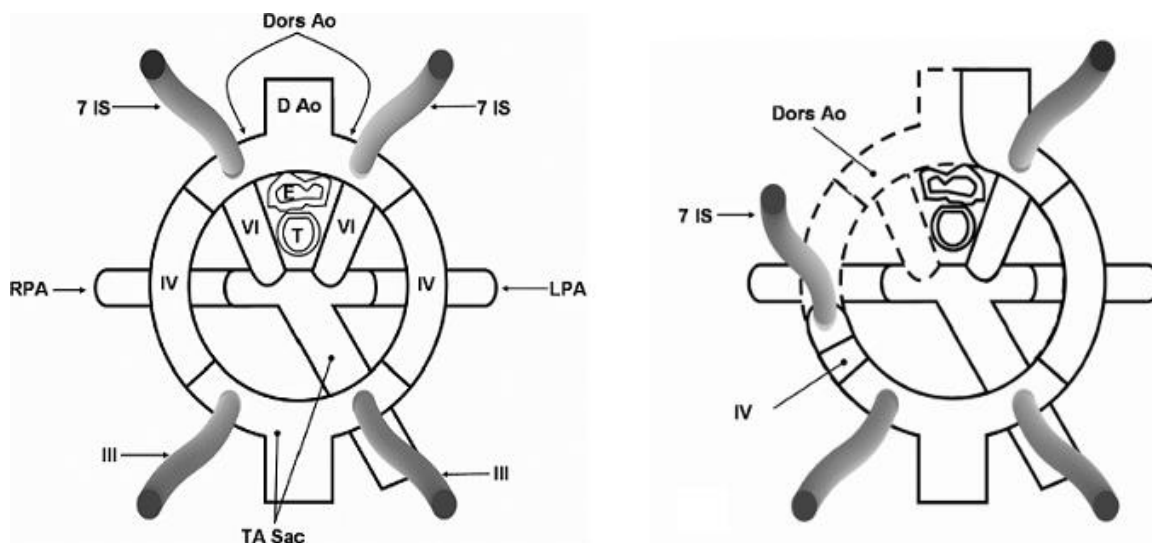


Рисунок 2 – Схема формирования дуги аорты. (D Ao – нисходящая аорта, Dors Ao – дорсальная аорта, E – пищевод, LPA – левая ветвь легочной артерии, RPA – правая ветвь легочной артерии, T – трахея, TA Sac – аортостоловой мешок, III, IV, VI – третья, четвертая и шестая эмбриональные дуги, 7 IS – седьмая межсегментарная артерия).

1.6.2 Эмбриональное развитие коарктации аорты

Дуга аорты и ее ветви формируются с 6 по 8 неделю беременности. Общие сонные артерии являются производными третьих эмбриональных дуг аорты, грудная аорта и истмус берут начало от левой четвертой аортальной дуги, правая четвертая дуга в норме редуцируется. Легочные артерии формируются из проксимальных участков шестых эмбриональных дуг, тогда как их левый дистальный конец становится артериальным протоком. КоА (грудного отдела), таким образом, является следствием дефекта развития левых четвертой и шестой эмбриональных дуг [23, 35]. Однако, что способствует возникновению этих нарушений в эмбриогенезе аорты до сих пор не установлено.

1.7 Этиология коарктации аорты

Возвращаясь к истории, следует отметить, что до последнего времени существовало несколько основных теорий возникновения коарктации аорты [23]. Наиболее востребованной была дуктальная теория КоА, предложенная J.Skoda (1855) [23, 36]. Данная теория построена на том, что наиболее частой локализацией КоА служит место отхождения артериального протока. Предполагалось, что коарктация возникает в результате миграции гладкомышечных клеток в перидуктальную аорту с последующей ее констрикцией, а затем и морфологическим сужением. Эта концепция подтверждается клиническими наблюдениями, так как КоА часто манифестирует после закрытия артериального протока [23, 36]. Однако дуктальная теория не объясняет атипичного расположение КоА: на уровне дуги или абдоминального отдела, а также сочетание коарктации и ОАП.

Второй, в историческом плане, была гемодинамическая теория, согласно которой причиной возникновения коарктации является уменьшение объема кровотока через аорту плода. Авторство этой теории принадлежит А. Rudolf [23, 37, 38]. Кровообращение плода таково, что только 10-15% крови проходит через дугу аорты. Наличие внутрисердечных аномалий уменьшает объем выброса левого желудочка, тем самым еще больше снижая количество крови, проходящее через аортальный истмус. Данная теория объясняет частое сочетание КоА с ДМЖП, обструкцией ВОЛЖ и тубулярной гипоплазией дуги аорты. Но оставляет неясным механизм возникновения вышеперечисленных аномалий без развития КоА, а также атипичного расположения КоА.

Третья теория, впервые предложенная в 1828 году и более подробно изложенная Н.Rosenberg (1974) [39], основана на идее первичного нарушения развития дуги аорты. Авторы этой теории считают, что данная патология связана с общим недоразвитием всего зачатка аорты в раннем эмбриональном возрасте.

Вместе с тем ни одна из ранее опубликованных теорий не объясняет данные о существовании наследственной предрасположенности к формированию КоА. О влиянии генетической компоненты на развитие КоА говорят результаты ранее опубликованных работ, посвященных анализу семейных случаев заболевания и обследования пациентов с ВПС, ассоциированными с хромосомными аномалиями [30].

Роль генетики в развитии ВПС, и в частности аномалий ВОЛЖ, изучалась с помощью экспериментальных моделей на животных — трансгенных/нокаутных мышах. Однако до сих пор не найдены конкретные гены, отвечающие за развитие данной патологии, чтобы объяснить связь существования различных типов аномалий ВОЛЖ среди членов одной семьи. Риск повторения в потомстве больных с аномалиями ВОЛЖ составляет 7-13%, что значительно выше, чем при других видах ВПС [40].

По данным Н.Л. Levy с соавторами у женщин, страдающих фенилкетонурией, вероятность родить ребенка с ВПС возрастала в 14 раз по сравнению с контрольной группой [41]. В структуре имеющихся ВПС аномалии ВОЛЖ занимали главенствующую роль (20% приходилось на КоА, 11% на ГЛОС, у 12% и 6% детей выявили аномалии митрального и аортального клапанов, соответственно). Это дало возможность предположить, что полученные исследования — результат мутации гена фенилаланингидроксилазы [41].

Пациенты с синдромом Шершевского-Тернера еще одно свидетельство влияния генетической компоненты на развитие ВПС. По данным зарубежных авторов, ВПС наблюдались у 71% лиц с данным заболеванием, основную группу также составили аномалии ВОЛЖ, в том числе КоА (14%), БАК (12%) и ГЛОС (1,2%) [42, 43, 44]. Другие исследователи, в частности Е.В. Clark с соавторами, дают еще более высокий процент (до 35%) частоты встречаемости КоА у пациентов с синдромом Шершевского-Тернера [45]. Ассоциировано ли это влияние на развитие сердечнососудистой системы с гаплоидным набором X-хромосомы, или является следствием

лимфатического отека тканей (крыловидная шея) – до сих пор не ясно [43, 46, 47]. Исследования С.А. Boucher с соавторами свидетельствуют, что лимфедема плодов с синдромом Тернера действительно может быть связана с критической зоной гена, расположенного на Xp11.4 [48]. Наконец, G. Andelfinger в соавторстве описали семейные случаи ассоциаций стигм дизэмбриогенеза почечных аномалий с БАК и КоА [49]. Детальный анализ показал наличие у таких пациентов мутаций в гене KCNJ2, кодирующем калиевые каналы Kir2.1 [49].

На основании выше изложенных данных можно предположить наличие связи КоА с генетическими аномалиями и, в частности, с X-хромосомой. В пользу этого представления говорят и данные о гендерных особенностях развития КоА, которая встречается почти в два раза чаще у мальчиков, чем у девочек.

Генетический механизм формирования ВПС крайне сложен. Недавние исследования показали, что помимо хорошо известных хромосомных аномалий, единичные генные мутации также могут внести свой вклад в возникновение ВПС [50]. К данному списку относят не только гены, кодирующие факторы транскрипции, рецепторы и лиганды, участвующие в кардиогенезе, а также гены, кодирующие структурные белки [51-54]. В настоящее время описаны мутации более 30 генов, приводящих к возникновению изолированных ВПС, однако эти знания не получили широкого практического применения и не используются для диагностики заболеваний [55].

Влияние генетических факторов на формирование ВПС, в том числе аномалий ВОЛЖ, подтверждается высокой частотой встречаемости среди родственников, что может быть расценено как аутосомно-доминантный тип наследования [56 – 59]. Было показано, что в семьях, дети которых имеют аномалию ВОЛЖ, повышается риск рождения ребенка с данной патологией, что свидетельствует о существенном вкладе генетического компонента в развитие ВПС [60, 61]. Однако низкая пенетрантность и фенотипическая

вариабельность значительно затрудняют изучение данной группы заболеваний с помощью классического Менделевского подхода. Согласно недавно полученным исследованиям, семейные и спорадические случаи развития БАК могут возникнуть в результате мутации гена *NOTCH 1* [62, 63]. Далее были описаны мутации данного гена у пациентов, имеющих аневризму аорты в сочетании с аномалиями ВОЛЖ, такими как ГЛОС и КоА [64, 65].

Notch был впервые описан в лаборатории Томаса Ханта Моргана в 1913 году. Мутация в генетическом локусе, получившем такое название, приводила к возникновению выемки на крыле *Drosophila* (Notch – «выемка» в переводе с английского языка). В 1970 г. Ted Wright опубликовал обзор, который начинался со слов: «Если бы кто-нибудь попросил выбрать единственный, наиболее важный генетический компонент в эмбриональном развитии дрозофилы — ответ был бы локус NOTCH». Следующее упоминание о генетической системе NOTCH появилось 18 лет спустя (Artavanis-Tsakonas, 1988). Связь Notch и эмбриогенеза была описана в 30-е годы 20-го века. Благодаря секвенированию самого гена *NOTCH1* и его партнеров в 80-е годы, с дальнейшей расшифровкой механизма действия соответствующих белков стало понятно, что ген *NOTCH1* является одним из компонентов большого семейства генов и одним из участников ключевого, для развития и функционирования организма, сигнального каскада, который в настоящее время носит названия сигнального пути Notch.

Было показано, что мутации в генах-компонентах этого сигнального пути способны вызывать заболевания печени, почек, глаз, скелетной мускулатуры, сердечнососудистой системы и некоторых других органов. В настоящее время не только доказана важная роль *NOTCH1* в развитии сердца и сосудов, но и выявлена связь мутаций в этом гене с формированием ВПС [65, 66, 105, 111 – 115]. Кроме того, сигнальный путь Notch играет роль в процессах регенерации миокарда, защите кардиомиоцитов от ишемии, в процессах ангиогенеза, и трансформации фибробластов в миофибробласты [106-109, 119, 120]. В настоящее время появились также доказательства того,

что дефекты гена *NOTCH1* играют роль в развитии аритмий сердца, в том числе синдрома преждевременного возбуждения желудочков [116-118].

Семейство *Notch* представляет собой группу эволюционно консервативных белков-рецепторов и лигандов, имеющих схожее строение: они состоят из внеклеточного, трансмембранного и внутриклеточного доменов. У млекопитающих имеется 4 рецептора Notch [121]. С мутациями кодирующих их генов ассоциирован ряд патологий. С мутациями гена *NOTCH2* связывают развитие синдрома Алажиля и спондилококостального дизостоза аутосомно-рецессивного типа. В рамках недавно проведенных исследований было также показано, что мутации гена *NOTCH2* могут приводить также к формированию синдрома Хайду-Чейни — аутосомно-доминантного заболевания, вызывающего фокусное разрушение костной ткани, остеопороз, челюстно-лицевую мальформацию и почечные кисты. Мутации гена *NOTCH3* приводят к развитию синдрома: аутосомно-доминантной церебральной артериопатии с субкортикальными инфарктами и лейкоэнцефалопатией (CADASIL — *cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy*). Мутации гена *NOTCH4* связывают с возникновением псевдобульбарного паралича и шизофрении [105].

Для развития ряда заболеваний сердца и сосудов наибольшее значение имеют изменения функции рецептора Notch1. Внеклеточный домен содержит 29-36 повторов, подобных эпидермальному фактору роста и 3 *NOTCH/lin* повтора. Внутриклеточный домен содержит 7 анкириновых последовательностей (ANK), домен RBP-Як-ассоциированной молекулы (RAM), домен трансактивации (TAD) и Pest domain (Рисунок 3) [66].

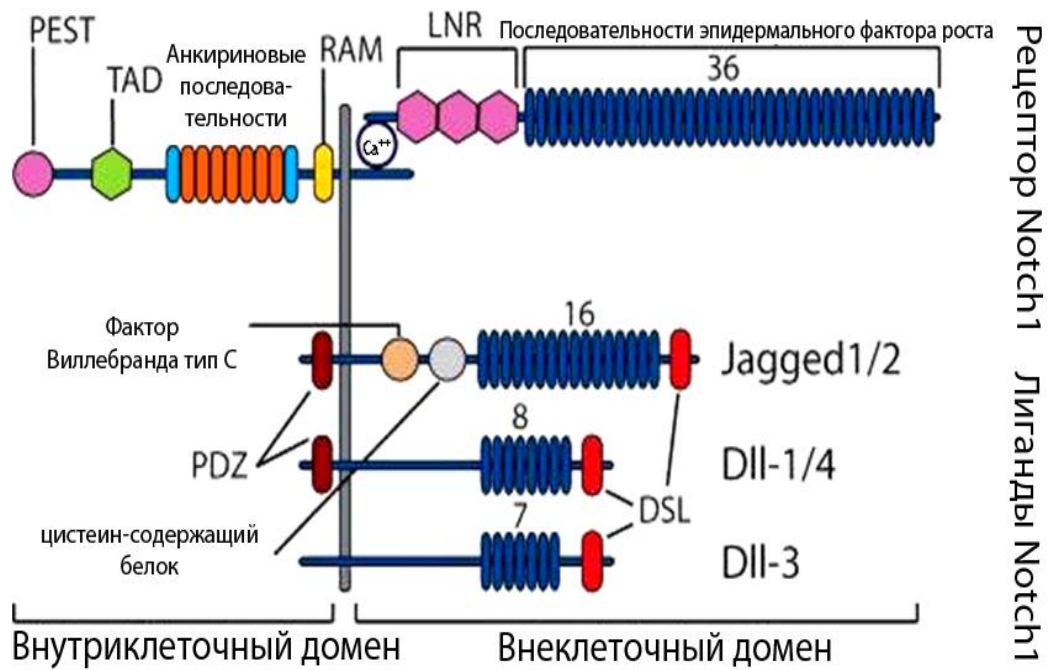


Рисунок 3 – Строение гена *NOTCH1*.

Рецептор NOTCH1 активируется взаимодействием внеклеточного домена, расположенного на поверхности клетки, с лигандами, находящимися на соседних клетках. Описано 5 типов лигандов: Jagged (*JAG1* и *JAG2*) и Delta-like (*DLL1*, *DLL2* и *DLL4*). При взаимодействии внеклеточного домена с лигандами происходит три расщепления белка Notch1, в результате которых, в частности, освобождается внутриклеточный домен, который транслоцируется к ядру, где через каскад реакций и белковых взаимодействий активирует транскрипцию (Рисунок 4) [66, 67, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 122].

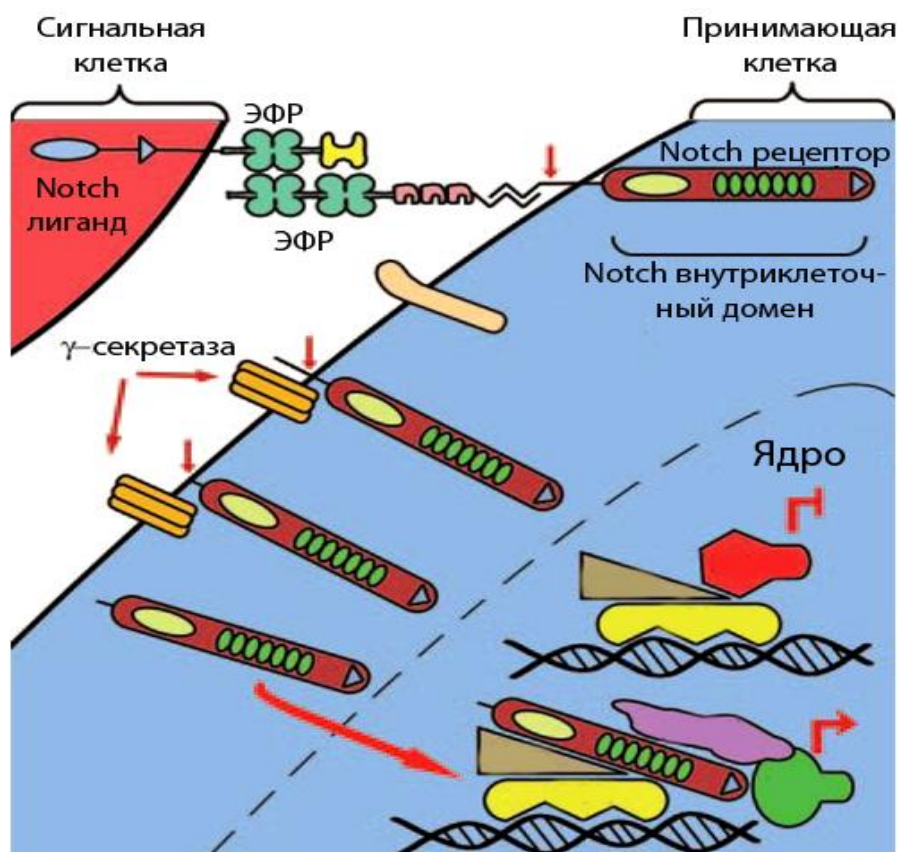


Рисунок 4 – Notch1 сигнальный путь.

Рецепторы NOTCH указанных типов в совокупности с лигандами являются одними из ключевых компонентов сигнального пути Notch. Этот сигнальный путь играет одну из ведущих ролей в регуляции пролиферации и апоптоза клеток, формировании границ тканей, а применительно к эмбриональному развитию сердца и сосудов — играет ключевую роль в протекании ряда процессов кардио- и васкулогенеза. Несмотря на многочисленные исследования последних лет, роль Notch сигналинга в развитии сердца до конца не ясна [66, 67].

В результате последних исследований выявлено, что мутации в сигнальной системе *NOTCH1* являются причиной ВПС, в частности БАК [105, 111 – 115]. Однако в настоящее время отсутствуют работы, доказывающие влияние данного гена на развитие КоА.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Результаты клинических исследований пациентов с коарктацией аорты

Протокол исследования был одобрен этическим комитетом ФГБУ «Северо-западный Федеральный медицинский исследовательский центр», и письменное информированное согласие, в том числе и отдельно на генетическое обследование, было получено от детей старше двенадцати лет и от всех родителей пациентов. В исследование включено 68 пациентов с КоА различной локализации, степени сужения и протяженности, перенесших хирургическое лечение в СЗФМИЦ в период с 2008 по 2011 годы, а также в других российских кардиохирургических клиниках в более ранние сроки.

Все обследованные были разделены на 2 группы: пациенты с изолированной КоА и пациенты, имеющие сочетание КоА с БАК. Клинико-демографическая характеристика групп приведена в таблице 1.

2.2 Семейный анамнез пациентов с коарктацией аорты и детей контрольной группы

В контрольную группу вошли 60 практически здоровых детей без пороков сердца, что подтверждено данными эхокардиографического исследования.

Были собраны подробные данные анамнеза об особенностях течения беременности и родов, наличия отягощенной наследственности, экстрагенитальной патологии матери, профессиональных вредностей родителей у пациентов с коарктацией аорты, а также у детей контрольной группы.

Таблица 1 – Клинико-демографическая характеристика пациентов с коарктацией аорты

	КоА n=68		Подгруппы			
			Изолиро- ванная КоА n ₁ =30		КоА с БАК n ₂ =38	
Возраст на момент обследования, лет	11,2±1,2		9,1±1,6		12,9±1,8	
Пол (м:ж)	47:21		17:13		30:8*	
	n	%	n	%	n	%
Локализация КоА						
Типичная	65	95,6	27	90	38	100
Атипичная	3	4,4	3	10	0	0
Гипоплазия дуги аорты	22	32,4	12	40	10	26,3
Гипоплазия нисходящей аорты	9	13,2	4	13,3	5	13,2
Гипоплазия левой подключичной артерии	8	11,8	2	6,7	6	15,8**
Перерыв дуги аорты	2	2,9	0	0	2	5,3

Примечание — Результаты представлены М±m.

Достоверность различий: * - p=0,05; ** - p<0,05

2.3 Инструментальные методы исследования

Всем пациентам выполнялось стандартное эхокардиографическое исследование, непрямая манометрия (измерения артериального давления на руках и ногах) с помощью механических тонометров. Большинству пациентов выполнялась прямая манометрия в рамках диагностической или лечебной аортографии, мультиспиральная компьютерная аортография, а также интраоперационная ревизия зоны коарктации.

С помощью стандартного эхокардиографического исследования обследованы все доступные родители пациентов с КоА и все родители детской контрольной группы на предмет наличия у них ВПС.

2.3.1 Эхокардиографическое исследование

Эхокардиографическое исследование пациентам и их родителям выполнялось на аппарате Philips iE33 (США). С помощью двухмерного эхокардиографического исследования был установлен основной диагноз КоА, а также уровень обструкции аорты и наличие сопутствующих ВПС (Рис.5-А).

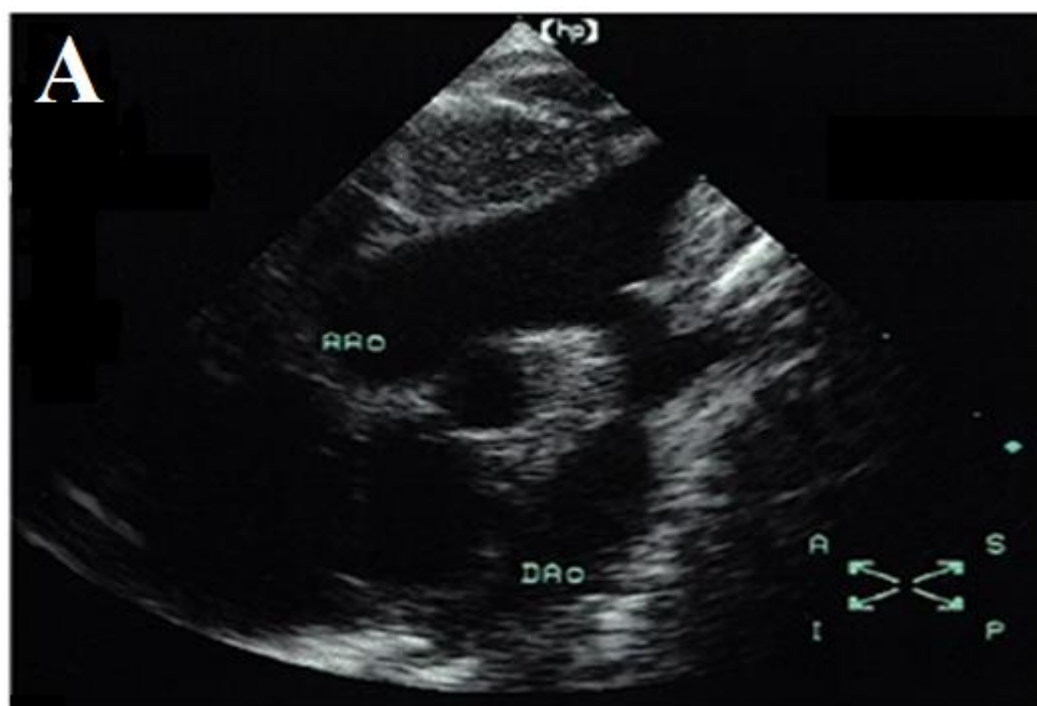
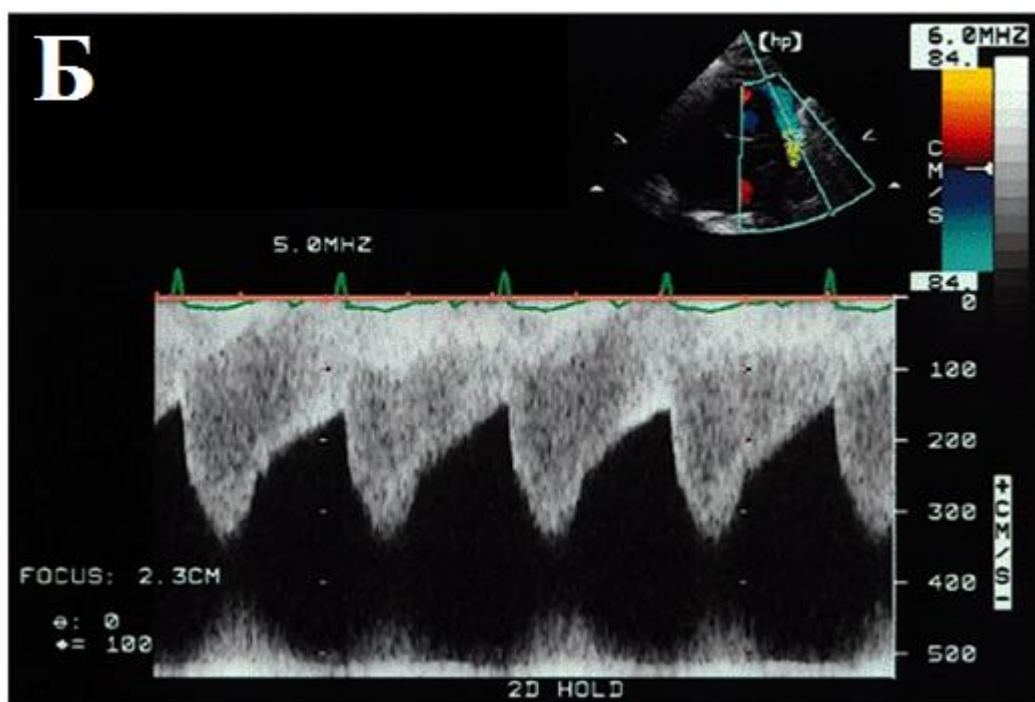


Рисунок 5-А – Эхокардиограмма из супрастернального доступа по длинной оси при коарктации аорты. Выявлено резкое сужение перешейка аорты. ААо – восходящая аорта, ДАо – нисходящая аорта.

С помощью доплеровского исследования выполнялось измерение максимальных скоростей и градиентов давления на нисходящей и восходящей аорте, расчет пикового градиента давления на КоА производились с помощью модифицированной формулы Бернулли (Рисунок 5-Б). Размеры и функция левого желудочка оценивались в М-режиме.



$\Delta P=4(V_1^2-V_2^2)$ Модифицированная формула Бернулли

Рисунок 5-Б – Дуплексное сканирование нисходящей аорты.
 (ΔP – пиковый градиент давления на КоА; V_1, V_2 – максимальная скорость кровотока на нисходящей и восходящей аорте соответственно).

2.3.2 Мультиспиральная компьютерная томография коарктации аорты

МСКТ выполнялось на аппарате SIEMENS SOMATOM Definition с применением внутривенного контрастирования (препарат «Омнипак»). Данная методика применялась у пациентов с плохой эхокардиографической визуализацией для получения точной локализации и степени сужения аорты, визуализации анатомии дуги аорты и наличия коллатералей (Рисунок 6), а также при трудностях в выборе тактики оперативного вмешательства (транскатетерное или хирургическое лечение КоА).



Рисунок 6 – Трехмерная реконструкция компьютерной ангиографии в левой боковой проекции пациента с коарктацией аорты.

2.4 Молекулярно-генетические методы исследования

Молекулярно-генетическое исследование выполнено у 51 пациента с КоА. Пациенты, имеющие хромосомные аномалии, ассоциированные с ВПС, не вошли в данное исследование. Отсутствие анеуплоидии было подтверждено стандартным кариотипированием. На основании фенотипического обследования и отсутствия стигм дизэмбриогенеза были исключены такие хромосомные болезни, как синдром Ди Джоржи.

В контрольную группу для генетического исследования вошли 200 человек, участвующих в клиническом исследовании NICA метаболического синдрома, не имеющих структурных внутрисердечных аномалий по данным эхокардиографического исследования.

Мы применили стратегию целевого скрининга мутаций, обследовав 10 из 34 экзонов гена *NOTCH1*, ранее замешанных в развитии ВПС и магистральных сосудов. Геномная ДНК была выделена из периферической крови с использованием набора реагентов FlexiGene DNA purification Kit

(Qiagen, GmbH, Hilden, Germany). Амплификация экзонов 10, 11, 12, 13, 20, 23, 24, 29, 30 и 34, проводилась с использованием праймеров (таблица 2), которые были выбраны на основе ранее опубликованных отчетов о причастности гена *NOTCH1* в развитии ВПС, в том числе БАК, аневризмы аорты и пороков ВОЛЖ.

Таблица 2 – Список праймеров исследуемых экзонов гена *NOTCH1*

Экзон	Размер ПЦР продукта	Последовательность праймеров	Экзон	Размер ПЦР продукта	Последовательность праймеров
Ex 10	347 п.о.	F - AGA GCT GGA GCT GGC TGA G R - AGA CCA AGG TGT CCA TGA CC	Ex 23	351 п.о.	F – GTC CTG ACT GTG GCG TCA T R – TAG CAA CTG GCA CAA ACA GC
Ex 11	680 п.о.	F - CCG CCA GTC CTA AGT CTT CC R - CTC TGA CCG GAG ACA AGA GG	Ex 24	643 п.о.	F – CGG TGT CAT GTG AAG TGT TG R – AGA CTC CCG GTG AGG ATG
Ex 12	442 п.о.	F - GAC AGG GAA ATC GAG GTT GA R - TCT GAC TGA GGA CCC AGA GG	Ex 29	693 п.о.	F - ATG GCT ACC TGT CAG ACG TG R - GCT CTC CAC TCA GGA AGC TC
Ex 13	508 п.о.	F – GAG CTG GAG ACA CAG GAT CG R – CAC CAC TTT ACC CTC CAG TCA	Ex 30/30-1	360 п.о.	F - ACA TCC AGC AGC AGC AAA G R - ACC ACT GGT CAG GGG ACT C
Ex 20	700 п.о.	F - CCT TGA CAC CTG CCT CTC C R - AGG GTG AGG AGG AGG ATG A	Ex 30-1/30	428 п.о.	F - CAC AGC TAC TCC TCG CCT GT R - CTG GGG CCA GAT AAA ACA GT
Ex 20 (2)	239 п.о.	F - TGG CAG ATG TGC GTT CTG AG R - AGC AGG TTA CCT TGT CGC TG	Ex 34	700 п.о.	F – TGC CAT GTG TTT TAG ATG GTT T R – CAC TGG CAT GAC ACA CAA CA

Примечание — Ex – экзон, п.о. – пар оснований, F (от англ. forward) – прямой синтез, R (от англ. reverse) – обратный синтез

Скрининг мутаций в исследуемой и контрольной группах был проведен путем прямого секвенирования амплифицированных фрагментов на капиллярном секвенаторе ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) с использованием BigDye Terminator v3.1 mix (Applied Biosystems). Полученные последовательности были проанализированы и приведены в соответствие с помощью программного обеспечения BioEdit и Geneious. Для сравнительного анализа ДНК использовали эталонные последовательности *NOTCH1* из соответствующей базы данных секвенированных геномов (GeneBank Accession Количество NM_017617.3 из NCBI).

Молекулярно-генетическое исследование проводилось в лаборатории Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова».

2.5 Методы статистической обработки результатов

Статистическая обработка данных, полученных в ходе клинических и экспериментальных исследований, проведена с использованием прикладных статистических программ Statistica for Windows ver 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Результаты представлены в виде среднего арифметического значения (M), ошибки среднего арифметического (m) и количества признаков в группе (n). Для анализа номинальных данных использовались различные варианты критерия хи-квадрат и критерий Фишера.

Для проверки гипотез относительного различия двух независимых выборок порядковых переменных использовались критерий Стьюдента, критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U Test) и метод ANOVA с последующими post hoc тестами. Критерий значимости статистических методов устанавливался на уровне $p=0,05$ (5%).

Различия генотипов пациентов и контрольной группы были проанализированы путем вычисления критерия Фишера, значение $p<0,05$ считалось значимым.

Сравнительный комбинаторный анализ контрольных и референтной групп проводился с помощью программы статистического пакета R. В ходе обработки данных были использованы следующие статистические методы: критерий независимости качественных признаков хи-квадрат, коэффициенты неопределенности, расширение пространства бинарных признаков при помощи логических операций сложения, умножения, и введения линейных комбинаций над конечным полем характеристики, дискриминантный анализ.

Клинико-математический анализ выполнялся совместно с ведущим научным сотрудником НИЛ математического моделирования ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Н. П. Алексеевой.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Клиническая характеристика групп пациентов с коарктацией аорты

Среди пациентов с КоА лица мужского пола встречались в 2 раза чаще: 2,2:1. В 55,9% случаев КоА сочеталась с БАК. Такая сочетанная врожденная патология также чаще встречалась у пациентов мужского пола ($p=0,05$). В 95,6% случаев наблюдалась типичная КоА (зона перешейка, ниже отхождения левой подключичной артерии). Сочетание КоА с гипоплазией дуги встречалось в 32,4% случаев, с гипоплазией нисходящей аорты в 13,2% случаев и с гипоплазией левой подключичной артерии в 11,8% случаев. 2,9% пациентов имели крайнюю степень коарктации — перерыв дуги аорты. Средний пиковый градиент давления между зонами до и после сужения аорты составил 46 мм рт.ст. Достоверных различий степени сужения аорты в подгруппах с изолированной КоА и сочетанием КоА с БАК не выявлено. Доля пациентов с рекоарктацией аорты в исследуемых подгруппах также была одинаковой. Число пациентов, имеющих аномалию митрального клапана, было выше в подгруппе лиц, имеющих КоА с БАК ($\chi^2=5,27$ $p=0,022$), тогда как доля других ВПС (ОАП, ДМПП и ДМЖП) в обеих подгруппах оказалась примерно одинаковой. Клиническая характеристика групп приведена в таблице 3.

3.2 Клиническая характеристика родителей пациентов

С учетом высокого процента иногородних пациентов, обращающихся за хирургической помощью в Федеральный центр, эхокардиографическое обследование удалось провести у 77 родителей пациентов с КоА, среди которых матерей было 56 (82,4%). Несмотря на то, что доля обследованных отцов составила всего 30,9% в общей группе, 23,8% из них имели БАК.

Таблица 3 – Клиническая характеристика пациентов с коарктацией аорты

	КоА n=68		Подгруппы			
			Изолированная КоА n ₁ =30		КоА с БАК n ₂ =38	
Средний пиковый градиент давления на КоА	68	45,7±2,6	30	46,4±4,2	38	45,1±3,4
	n	%	N	%	n	%
Пациенты с рекоарктацией аорты	14	20,6	7	23,3	7	18,4
Пациенты с повторной рекоарктацией аорты	2	2,9	2	6,7	0	0
Пациенты с двустворчатым клапаном аорты	38	55,9	0	0	38	100
1) с аортальным стенозом	15	22,1	0	0	15	39,5
2) с аортальной недостаточностью	17	25,0	0	0	17	44,7
I степень	11	64,7	0	0	11	28,9
II степень	2	11,8	0	0	2	5,3
III степень	4	23,5	0	0	4	10,5
Пациенты с субаортальным стенозом	2	2,9	0	0	2	5,26
Пациенты с неполным комплексом Шона	2	2,9	0	0	2	5,26
Пациенты с аномалией митрального клапана	9	13,2	1	3	8	21,05
1) митральный стеноз	2	2,9	0	0	2	5,3
2) митральная недостаточность	8	11,8	2	6,7	6	15,8
Пациенты с полным комплексом Шона	1	1,5	0	0	1	2,63
Пациенты с другими ВПС	18	26,5	7	23,3	11	28,9
1) ОАП	12	17,6	6	20	6	15,79
2) ДМЖП	9	13,2	4	13,3	5	13,16
3) ДМПП	6	8,8	2	6,67	4	10,53
4) ТМС	1	1,5	1	3,33	0	0

Двоим, из обследованных родителей, ранее выполнялось протезирование аортального клапана. Следует отметить, что БАК у отцов выявлен только в подгруппе мальчиков, имеющих как сочетание КоА с БАК (в основном), так и изолированную КоА. Из обследованных матерей только 3,6% имели БАК, что незначительно выше, чем данные общепопуляционной статистики, в соответствии с которой БАК встречается с частотой 1-2%. При этом частота выявления БАК у матерей в двух исследуемых подгруппах не различалась. Процент всех ВПС у обследованных родителей составил 19,1%. В эту группу вошли БАК, ДМЖП, ДМПП, легочный стеноз и единственный левый желудочек. Интересен тот факт, что сочетанная врожденная патология у родителей детей из группы КоА с БАК встречалась в 1,5 раза чаще. Возможность обследования других родственников пациентов с КоА оказалась крайне незначительной: всего 11 человек, среди которых были бабушки, дедушки, дяди, тети, родные сестры и братья. Однако ни у кого из них врожденной патологии сердца при обследовании не выявлено.

В целом у пациентов с КоА, родители которых имели ВПС (в том числе БАК), частота развития сочетанной врожденной патологии выходного тракта левого желудочка была значительно выше ($\chi^2=21,6$ $p<0,001$).

3.3 Клиническая характеристика детской и взрослой контрольных групп

В детскую контрольную группу вошли 60 человек от 3 месяцев до 17 лет (средний возраст $7,0\pm 4,9$ года), соотношение мальчиков и девочек составило как 39:21, соответственно. В исследование вошли практически здоровые дети по данным анамнеза и амбулаторной карты ребенка. Всем детям выполнялось стандартное эхокардиографическое исследование для исключения ВПС.

На основании полученных данных отягощенная наследственность по ВПС составила 8,3%. В 41,7% случаев наблюдался отягощенный акушерский

анамнез. Аномальное течение беременности и наличие экстрагенитальной патологии матери выявлено в 51,7% и 36,7%, соответственно. Профессиональные вредности встречались только у отцов в 6,7% случаев. Общее количество ВПС у родителей составило 3,3%, в эту группу вошли ДМЖП, ДМПП малого диаметра, коронаро-пульмональная фистула и БАК. Следует отметить, что двое родителей знали о наличии у них ВПС. В остальных случаях пороки сердца были гемодинамически незначимыми и выявлены впервые при эхокардиографическом обследовании контрольной группы. БАК наблюдался у одного родителя (отца), его частота составила 0,8% от общего количества обследованных родителей и 1,7% от обследованных отцов, что соответствует данным общепопуляционной статистики. Подробная характеристика контрольной группы детей и их родителей представлена в таблице 5.

По этическим соображениям забор крови детям не проводился. В контрольную группу для генетического исследования вошли 200 человек старше 18 лет, средний возраст составил $46,7 \pm 8,8$ года. Лица мужского пола встречались несколько чаще, чем женского, и их соотношение составило 102:98 соответственно. Клинико-демографическая характеристика взрослой контрольной группы представлена в таблице 6.

Таблица 5 – Акушерский, гинекологический, семейный анамнез и клиническая характеристика контрольной группы детей и их родителей

	Детская контрольная группа					
	Общее количество n=60		Мальчики n ₁ =39		Девочки n ₂ =21	
Возраст на момент обследования, лет	7,0±4,9		6,9±4,9		7,1±5,2	
	n	%*	n	%**	n	%**
Эхокардиографическое обследование у детей, %	60	100	39	100	21	100
БАК у детей	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Всего ВПС у детей	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Отягощённая наследственность по ВПС	5	8,3	2	5,1	3	14,4
1) по линии матери	3	5,0	0	0,0	3	14,4
2) по линии отца	2	3,3	2	5,1	0	0,0
3) по линии обоих родителей	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Отягощённый акушерский анамнез	25	41,7	15	38,5	10	47,6
Отягощённая беременность	31	51,7	21	53,8	10	47,6
Экстрагенитальная патология матери	22	36,7	13	33,3	9	42,9
Профессиональные вредности						
Матери	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Отцы	4	6,7	3	7,7	1	4,8
Обследованные родители						
Матери	60	100	39	100	21	100
Отцы	60	100	39	100	21	100
БАК						
Матери	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Отцы	1	0,8***	1	1,7****	0	0,0
Всего ВПС у родителей	4	3,3***	2	1,7***	2	1,7***
Матери	1	1,7****	0	0,0	1	4,8****
Отцы	3	5,0****	2	5,1****	1	4,8****

Примечания: * Процент указан от общего числа детей, n = 60. ** Процент указан от общего числа мальчиков, n₁=39, и девочек, n₂=21. *** Процент указан от общего количества всех обследованных родителей n = 120. **** Процент указан от количества обследованных родителей n_{матерей} = 60 и n_{отцов} = 60 соответственно.

Таблица 6 – Клинико-демографическая характеристика контрольной группы для генетического исследования

	Контрольная группа		
	Общее количество n=200	Мужчины n ₁ =98	Женщины n ₂ =102
Возраст на момент обследования, лет	46,7±8,8	44,6±9,7	48,8±7,2
Рост, см	170,8±9,6	178,1±6,8	163,8±5,9
Вес, кг	84,8±14,7	90,0±14,1	79,8±13,6
Эхокардиографическое обследование, %	100	100	100
КДРлж, мм	47,6±3,9	48,8±4,0	46,4±3,5
КСРлж, мм	29,4±2,9	30,0±2,9	28,8±2,9
МЖП, мм	10,9±1,5	11,2±1,5	10,5±1,4
ЗСлж, мм	10,4±1,4	10,8±1,4	10,0±1,2
ФВ, %	68,1±5,3	68,3±5,7	68,0±4,8
Аортальный клапан			
Трехстворчатый, %	100	100	100
ΔP_{\max} , мм рт. ст.	6,9±2,4	6,0±1,5	7,7±2,8
Регургитация (от 0 до 1 ст.), %	100	100	100
ВПС, %	0	0	0

Примечания: КДРлж – конечно-диастолический размер левого желудочка, КСРлж – конечно-систолический размер левого желудочка, МЖП – толщина межжелудочковой перегородки, ЗСлж – толщина задней стенки левого желудочка, ФВ – фракция выброса левого желудочка, ΔP_{\max} – максимальный градиент давления на аортальном клапане.

3.4 Факторы риска развития коарктации аорты

На основании собранного анамнеза отягощенная наследственность по ВПС в общей группе наблюдалась в 33,8% случаев, данный показатель был в 1,5 раза выше в группе, имеющей сочетание КоА с БАК. Высокий процент осложнений во время беременности зарегистрирован в общей группе пациентов с КоА (57,4%), тогда как существенной разницы этого показателя

между двумя подгруппами выявлено не было. Материалы исследования представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Акушерский, гинекологический, семейный анамнез и клиническая характеристика родителей пациентов с коарктацией аорты

	КоА n=68		Подгруппы			
			Изолиро- ванная КоА n ₁ =30		КоА с БАК n ₂ =38	
Пол, м:ж	47:21		17:13		30:8	
	n	%*	n	%**	n	%**
Отягощённая наследственность по ВПС	23	33,8	9	30	14	36,8
1) по линии матери	12	17,6	4	13,3	8	21,1
2) по линии отца	9	13,2	3	10	6	15,8
3) по линии обоих родителей	2	2,9	2	6,7	0	0
Отягощённый акушерский анамнез	7	10,3	5	16,7	2	5,3
Отягощённая беременность	39	57,4	18	60	21	55,3
Экстрагенитальная патология матери	12	17,6	5	16,7	7	18,4
Профессиональные вредности						
Матери	1	1,5	1	3,3	0	0
Отцы	13	19,1	5	16,7	8	21,1
Обследованные родители						
Матери	56	82,4	25	83,3	31	81,6
Отцы	21	30,9	6	20	15	39,5
БАК						
Матери	2	3,6***	1	3,3	1	2,6
Отцы	5	23,8***	1	3,3	4	10,5
Всего ВПС у родителей	13	19,1	5	16,7	8	21,1

Примечания: * Процент указан от общего числа пациентов с КоА, n = 68.

** Процент указан от числа пациентов с изолированной КоА, n₁=30, и от КоА с БАК, n₂=38. *** Процент указан от количества обследованных родителей соответственно n_{матерей} = 56 и n_{отцов} = 21.

С профессиональными вредностями на производстве (химическими и физическими факторами производственной среды, а также вредными

факторами трудового процесса) в основном, сталкивались отцы (19,1% в общей группе). При этом достоверных различий между двумя подгруппами не получено. Выявлена тенденция к увеличению частоты экстрагенитальной патологии у матери в подгруппе пациентов, имеющих сочетание коарктации с БАК (18,4%), по сравнению с подгруппой детей с изолированной КоА (16,7%). Наличие отягощенной беременности и экстрагенитальной патологии у матери было тесно связано с увеличением сочетанных врожденных аномалий ВОЛЖ ($\chi^2=6,95$ $p<0,01$).

По данным сравнительного статистического анализа пациентов с КоА и детской контрольной группы выяснилось, что отягощенная наследственность по ВПС (в том числе БАК) увеличивала риск рождения ребенка с КоА в 1,57 раза [относительный риск $RR=1,9$, $CI=(1,44, 2,5)$], наличие профессиональных вредностей у родителей — в 1,46 раза [относительный риск $RR=1,58$, $CI=(1,16, 2,16)$]. Отягощенный акушерский анамнез не влиял на развитие данного заболевания [относительный риск $RR=0,34$, $CI=(0,16, 0,69)$]. Сочетание отягощенной наследственности с вредностями на производстве у родителей увеличивало риск рождения ребенка с КоА в 1,88 раза [относительный риск $RR=1,95$, $CI=(1,64, 2,31)$].

3.5 Результаты секвенирования гена *NOTCH1* у больных с коарктацией аорты

Десять из 34 экзонов гена *NOTCH1* и прилегающих к нему интронов были секвенированы у 51 пациента с КоА и у 200 человек контрольной группы. Была использована стратегия скрининга целевых мутаций в экзонах, ранее выявленных у пациентов с ВПС и аневризмой аорты. Большинство секвенированных экзонов соответствуют последовательностям ЭФР внеклеточной части белка *NOTCH1* и кодируют миссенс-варианты, ранее ассоциированные с аномалиями ВОЛЖ. Экзоны 29, 30 и 34, соответствующие

внутриклеточному домену белка, были выбраны на основе ранее опубликованных отчетов об их причастности к развитию КоА и БАК [63, 65].

В общей сложности было выявлено 29 вариантов среди пациентов исследуемой и контрольной группы, из них 13 находилось в кодирующих областях, таблица 7.

Девять из 29 вариантов были описаны впервые (нет сведений ни в базах данных, ни в литературе), из них 5 расположены в экзонах. Семь вариантов, в том числе 6 экзонных, были найдены только в контрольной группе, 3 из них не были описаны ранее. Вариант P2377L был обнаружен только один раз и только в контрольной группе.

Из 29 выявленных вариантов 3 приводят к замене аминокислот, однако только вариант R1279H был обнаружен и в исследуемой и в контрольной группах. Тем не менее, данный вариант встречался значительно чаще у пациентов с КоА по сравнению с контрольной группой лиц без структурных внутрисердечных аномалий (7 из 51 и 4 из 200 соответственно, $p < 0,05$). Данная ассоциация сохранялась после многократного тестирования, поэтому данный вариант можно рассматривать как восприимчивый к болезни аллель. Клинические данные пациентов с КоА в зависимости от наличия или отсутствия у них замены R1279H приведены в таблице 8.

Таблица 7 – Генетические варианты замен *NOTCH1* у пациентов с коарктацией аорты и в контрольной группе

Позиция в гене <i>NOTCH1</i> NG_007458.1	Расположение в гене <i>NOTCH1</i>	Позиция в белке NP_06008 7.3	Пациенты с КоА	Контрольная группа	Источник
g.29650 C/T	Интрон 9-42		6/51	20/200	rs4880099
g.29772 C/T	Экзон 10	D545D	0/51	3/200	rs11574889
g.29802 G/A	Экзон 10	T555T	0/51	2/200	rs148331061
g.29815 T/C	Интрон 10+9		3/51	11/200	rs3125006
g.30311 G/A	Интрон 11+6		1/51	0/200	Новая
g.30445 C/T	Экзон 12	T 654T	1/51	0/200	rs61751554
g.30469 C/T	Экзон 12	Y662Y	1/51	0/200	Новая
g.30591 C/T	Интрон 12+94		8/51	140/200	rs62579232
g.30667 C/T	Интрон 12+170		10/51	2/200	rs12001048
g.31347 G/A	Интрон 13+70		10/51	112/200	rs3812609
g.31367 A/T	Интрон 13+89		2/51	7/200	Новая
g.38712 G/C	Интрон 22-101		1/51	0/200	rs117232001
g.38735 C/T	Интрон 22-78		13/51	8/200	rs3124596
g.38765 G/T	Интрон 22-48		2/51	0/200	Новая
g.38800 A/G	Интрон 22-13		1/51	0/200	Новая
g.38810 G/A	Интрон 22-4		0/51	1/200	rs79782048
g.38945 T/A	Экзон 23	F1259I	0/51	8/200	Новая
g.39006 G/A	Экзон 23	R1279H	7/51	4/200	rs61751543
g.39016 G/A	Экзон 23	Q1282Q	0/51	3/200	Новая
g.39335 G/A	Интрон 24+75		10/51	5/200	rs4880098
g.43831T/C	Интрон 29+44		11/51	151/200	rs3124594
g.44126 T/A	Интрон 30+86		2/51	14/200	rs11574906
g.48602 A/G	Экзон 34	D2185D	42/51	148/200	Moham. и др., 2006
g.48696 G/A	Экзон34	P2216P	1/51	0/200	rs201987555
g.48901 G/A	Экзон 34	P2320P	2/51	4/200	rs61751489
g.48918 C/T	Экзон 34	S2325S	0/51	1/200	rs61751488
g.48930 G/A	Экзон 34	L2294L	1/51	0/200	Новая
g.49178 C/T	Экзон 34	P2377L	0/51	1/200	Новая
g.49842 G/A	Экзон 34+ (3' UTR)		42/51	171/200	rs3124591

Примечание — g. (от англ. genome) – фрагмент последовательности ДНК; rs. (от англ. reference sequence) – референсная последовательность нуклеотидов в базе Генбанка; UTR – не транслируемый регион. Аминокислоты: D - аспарагиновая кислота, T – треонин, Y – тирозин, F – фенилаланин, I - изолейцин, R – аргинин, H – гистидин, Q – глутамин, P – пролин, S - серин, L – лейцин.

Таблица 8 – Характеристика пациентов с коарктацией аорты с наличием или отсутствием у них варианта R1279H в гене *NOTCH1*

	Пациенты без замены R1279H, n=44			Пациенты с заменой R1279H, n=7		
	n=44	м (n=29)	ж (n=14)	n=7	м (n=5)	ж (n=2)
БАК	29 (66,0)	21 (72,0)	8 (57,0)	5 (71,0)	5 (100,0)	0 (0,0)
Гипоплазия дуги аорты	10 (23,0)	6 (20,7)	4 (28,6)	3 (42,9)	2 (40,0)	1 (50,0)
Гипоплазия нисходящей аорты	6 (13,6)	4 (13,8)	2 (14,3)	2 (28,6)	1 (20,0)	1 (50,0)
Гипоплазия дуги и нисходящей аорты	2 (4,5)	1 (3,4)	1 (7,1)	2 ^{**} (28,6)	1 (20,0)	1 (50,0)
Гипоплазия левой подключичной артерии	5 (11,4)	4 (13,8)	1 (7,1)	1 (14,3)	1 (20,0)	0 (0,0)
Перерыв дуги аорты	2 (4,5)	1 (3,4)	1 (7,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Аномалия митрального клапана	7 (16,0)	2 (6,9)	5 (35,7)	1 (14,3)	1 (20,0)	0 (0,0)
Субаортальный стеноз	2 (4,5)	1 (3,4)	1 (7,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Другие ВПС	11 (25,0)	6 (20,7)	5 (35,7)	2 (28,6)	1 (20,0)	1 (50,0)
1) ОАП	7 (16,0)	6 (20,7)	1 (7,1)	1 (14,3)	0 (0,0)	1 (50,0)
2) ДМЖП	5 (11,4)	3 (10,3)	2 (14,3)	1 (14,3)	1 (20,0)	0 (0,0)
3) ДМПП	2 (4,5)	1 (3,4)	1 (7,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Отягощённая наследственность по ВПС	15 (34,0)	11 (37,9)	4 (28,6)	3 (42,9)	2 (40,0)	1 (50,0)
1) по линии матери	9 (20,5)	6 (20,7)	2 (14,3)	2 (28,6)	1 (20,0)	1 (50,0)
2) по линии отца	4 (9,1)	4 (13,8)	0 (0,0)	1 (14,3)	1 (20,0)	0 (0,0)
3) по линии обоих родителей	2 (4,5)	1 (3,4)	1 (7,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Отягощённый акушерский анамнез	6 (13,6)	3 (10,3)	3 (21,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Отягощённая беременность	25 (56,8)	18 (62,0)	7 (50,0)	4 (57,1)	2 (40,0)	2 (100,0)
Профессиональные вредности						
Мамы	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (14,3)	0 (0,0)	1 (50,0)
Папы	11 (25,0)	11 (37,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Обследованные родители						
Мамы	36 (81,8)	26 (89,6)	10 (71,4)	4 (57,1)	3 (60,0)	1 (50,0)
Папы	16 (36,4)	10 (34,5)	6 (42,9)	1 (14,3)	0 (0,0)	1 (50,0)
БАК у родителей						
Мамы	2	0	2	0	0	0
Папы	2	2	0	1	1	0
Другие ВПС у родителей	9	6	3	1	1	0

Примечание — Достоверность различий: ** - $p < 0,05$

Схематическое изображение варианта R1279H в гене NOTCH1 представлено на рисунке 7.

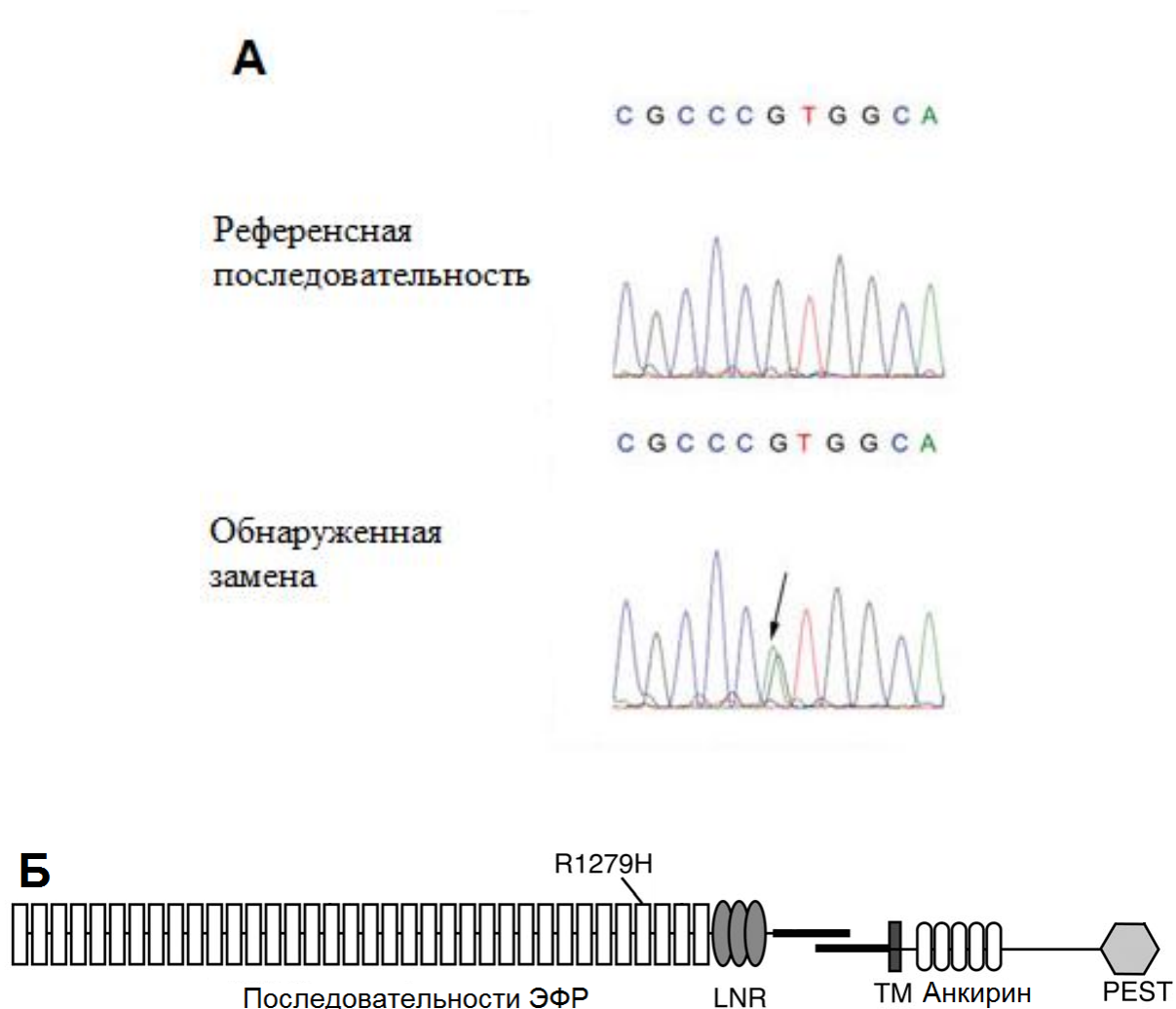


Рисунок 7 – Вариант R1279H замены гена *NOTCH1*. А. Анализ последовательности ДНК гена *NOTCH1* в норме и при варианте R1279H. Б. Схематическое изображение белка NOTCH1 с указанием локализации варианта R1279H. LNR = Lin12/Notch повторы. TM = трансмембранный домен.

Пациенты с КоА, носители варианта R1279H, значительно чаще имели сочетанную гипоплазию дуги и нисходящей аорты по сравнению с пациентами без данной замены в геноме. В проводимом нами исследовании

не получено значительной разницы по другим клиническим характеристикам между пациентами этих двух групп.

Другие два варианта, кодирующие аминокислотные замены, были идентифицированы только в контрольной группе. Вариант F1259I наблюдался у 8 человек контрольной группы и поэтому может быть расценен, как полиморфизм. Замена R2377L является недавно открытой, и ее значение пока не известно.

Среди интронных вариантов три значительно чаще выявлялись в группе пациентов с КоА по сравнению с контрольной группой.

В полученном нами исследовании генетический вариант в интроне 12 (g.30667C/T) встречался у больных с КоА с частотой 10/51 по сравнению с частотой 2/200 в контрольной группе соответственно, что с учетом данных S.A. Mohamed и соавторов составляет 11/99 по сравнению с 2/200 (Точный тест Фишера $p < 0,005$) [63]. Другие два варианта в интронах 22 (g.38735C/T) и 24 (g.39335G/A) ранее не были описаны у пациентов с аномалиями ВОЛЖ и наблюдались также значительно чаще в исследуемой группе (13/51 против 8/200, $p < 0,05$ и 10/51 по сравнению с 5/200, $p < 0,05$). Хроматограммы последовательностей ДНК в норме и при некоторых заменах гена NOTCH1, выявленных в настоящем исследовании, представлены на рисунке 8.

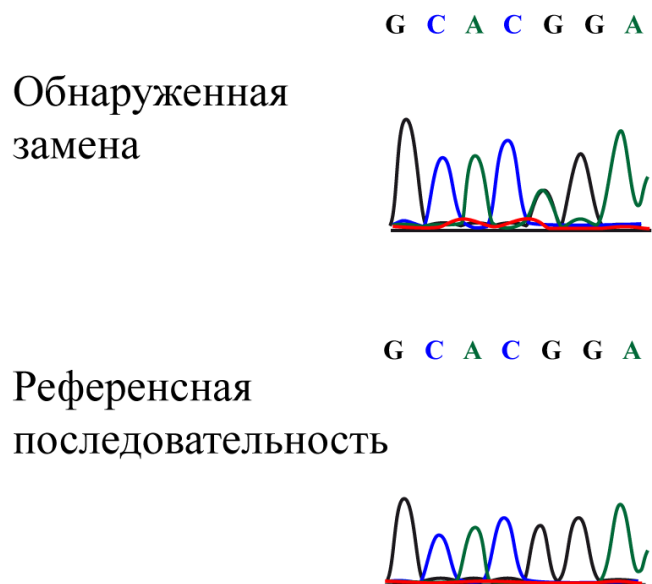


Рисунок 8-1 – Геномная замена *NOTCH1* в позиции g.29802 G/A (Экзон 10), синонимичная замена T555T.

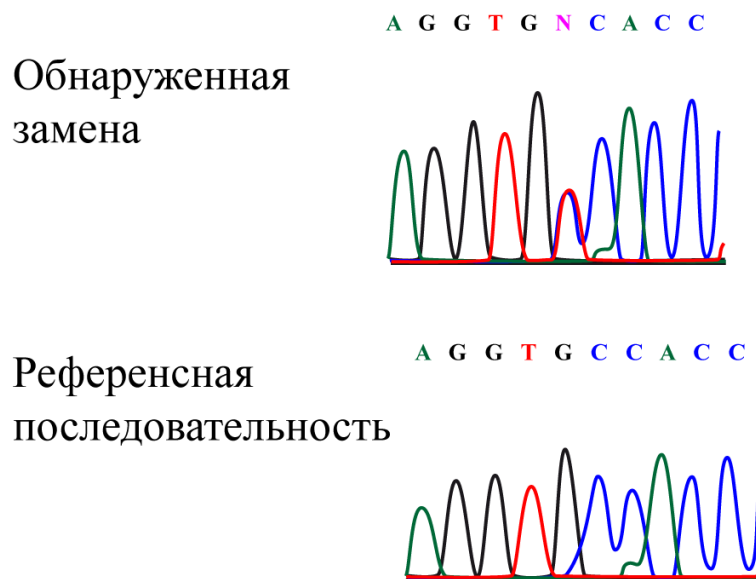


Рисунок 8-2 – Геномная замена *NOTCH1* в позиции g.31347 T/C (Инtron 13+70, обратный сиквенс).

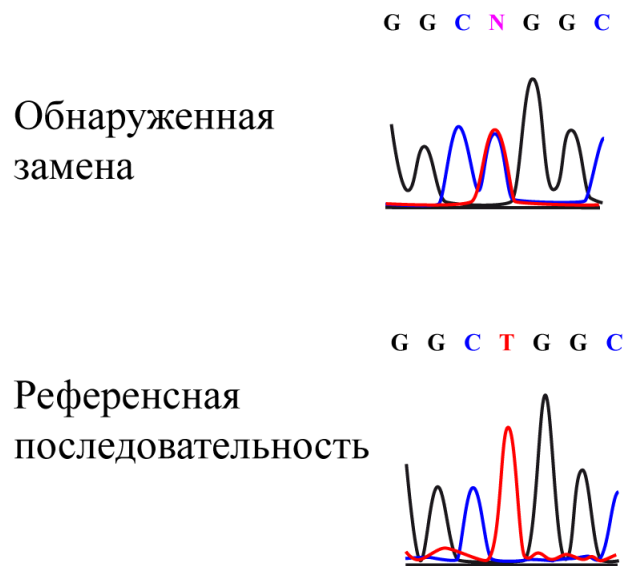


Рисунок 8-3 – Геномная замена *NOTCH1* в позиции g.29815 T/C (Инtron 10+9).

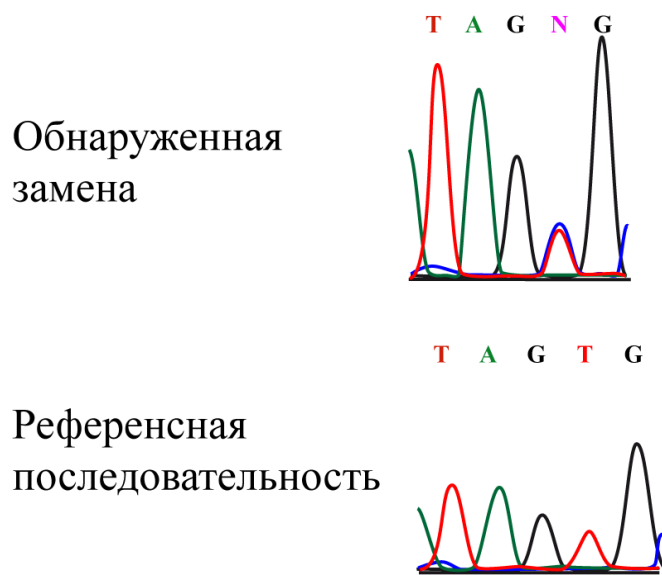


Рисунок 8-4 – Геномная замена *NOTCH1* в позиции g.29650 C/T (Инtron 9 - 42).

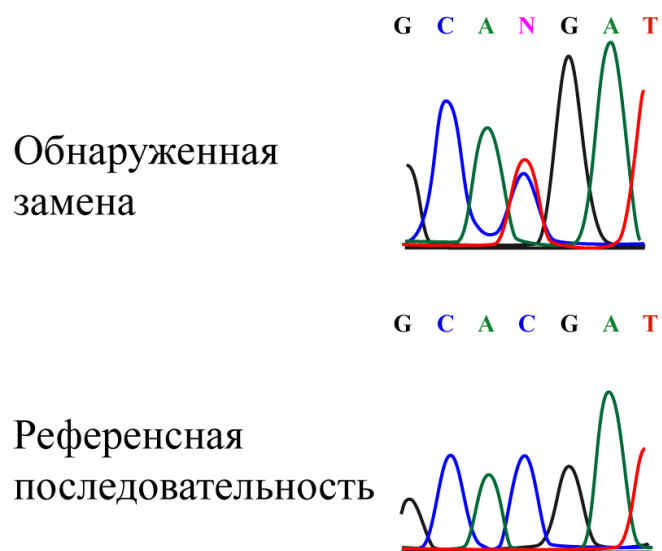


Рисунок 8-5 – Геномная замена *NOTCH1* в позиции g.30667 С/Т (Инtron 12+170).

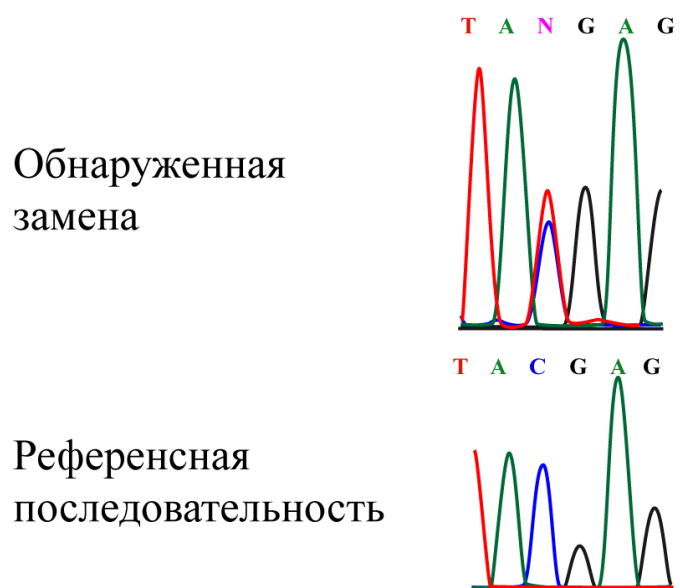


Рисунок 8-6 – Геномная замена *NOTCH1* в позиции g.30469 С/Т (Экзон 12), синонимичная замена Y662Y.

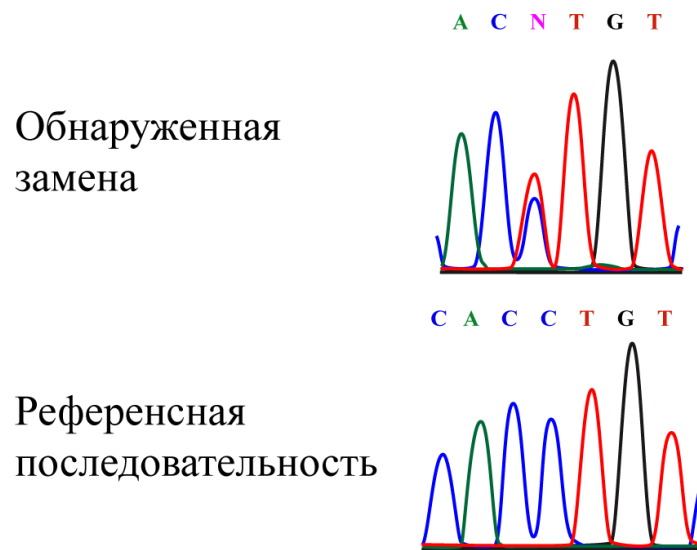


Рисунок 8-7 – Геномная замена *NOTCH1* в позиции g.30445 C/T (Экзон 12), синонимичная замена T 654T.

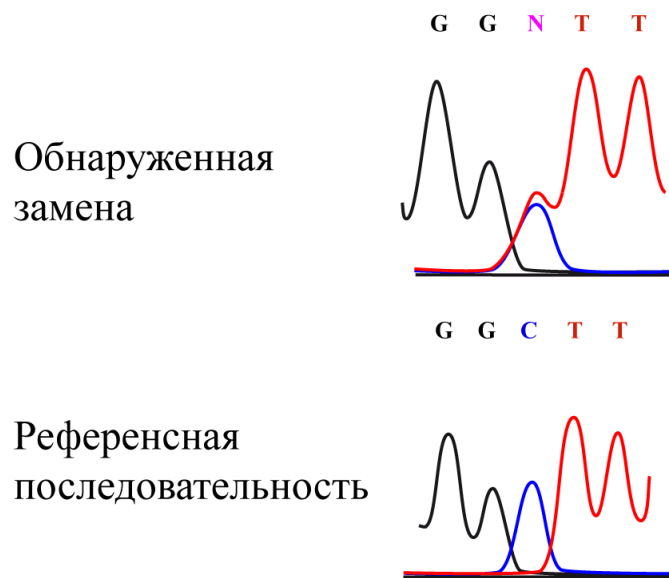


Рисунок 8-8 – Геномная замена *NOTCH1* в позиции g.30591 C/T (Инtron 12+94).

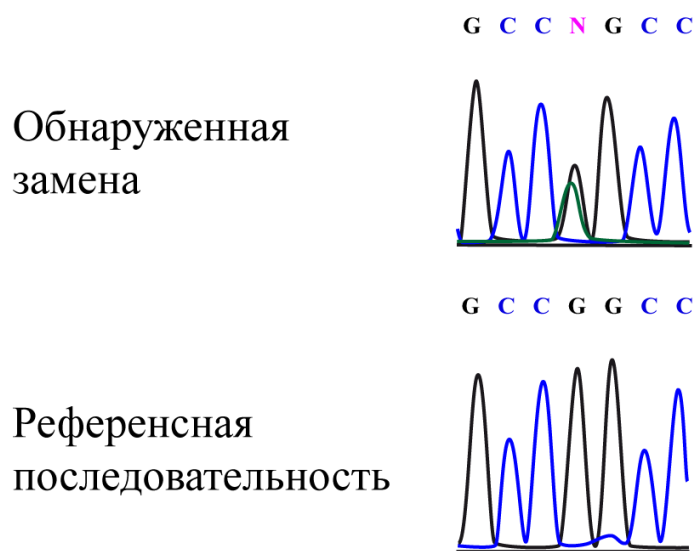


Рисунок 8-9 – Геномная замена *NOTCH1* в позиции g.30311 G/A (Инtron 11+6).

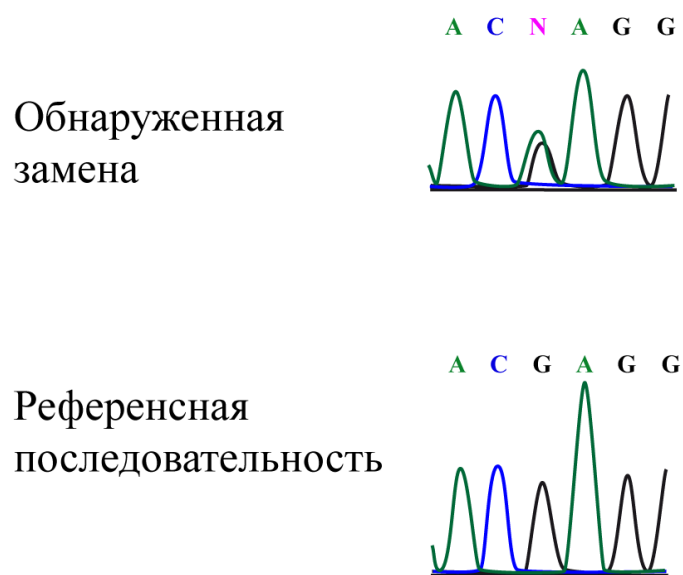


Рисунок 8-10 – Геномная замена *NOTCH1* в позиции g.49842 G/A (Экзон 34, не кодирующая последовательность).

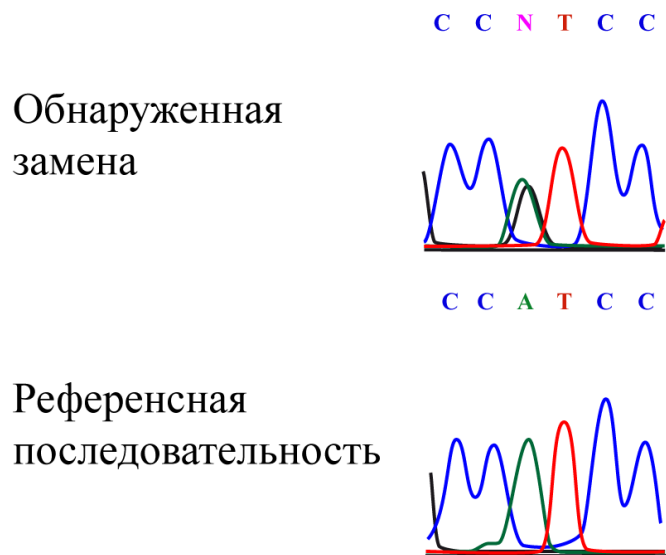


Рисунок 8-11 – Геномная замена *NOTCH1* в позиции g.48602 A/G (Экзон 34), синонимичная замена D2185D.

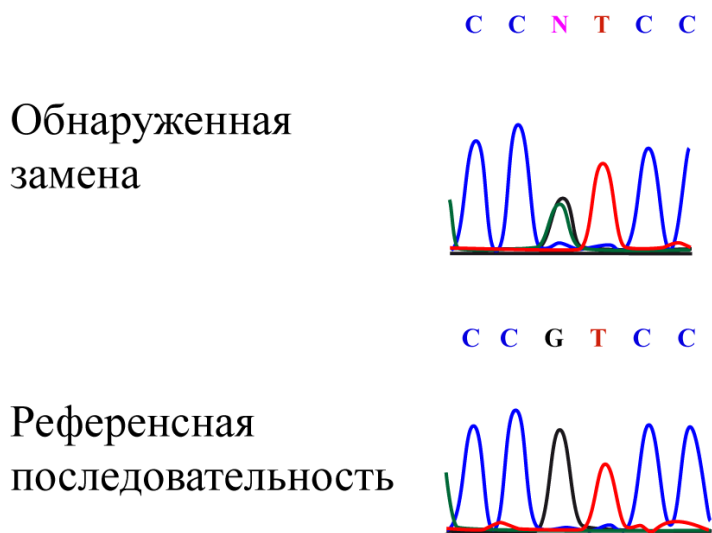
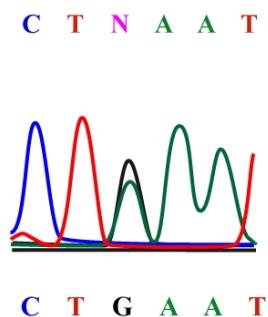


Рисунок 8-12 – Геномная замена *NOTCH1* в позиции g.48901 G/A (Экзон 34), синонимичная замена P2320P.

Обнаруженная
замена



Референсная
последовательность

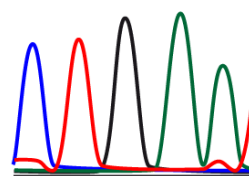


Рисунок 8-13 – Геномная замена *NOTCH1* в позиции g.48930 G/A (Экзон 34), синонимичная замена L2294L.

В контрольной группе лиц старше 18 лет, биологический материал которых использовался при проведении секвенирования гена *NOTCH1*, распределение по полу выглядело следующим образом: 49% мужчин и 51% женщин, по сравнению с 67% и 33%, соответственно, в группе пациентов с КоА ($p=0,02$).

Среди экзонных замен гена *NOTCH1*, частоты которых значительно отличались в исследуемой и контрольной группах, можно выделить вариант R1279H, частота которого составила 2% в контрольной группе и 13,7% среди пациентов с КоА ($p=0,00026$).

Некоторые интронные замены, напротив, были более характерны для здоровых лиц без структурных внутрисердечных аномалий: частота варианта интрона 29 (g.43831T/C) в контрольной и исследуемой группах наблюдалась у 75,5% и 21,6%, соответственно ($p=6\times 10^{-13}$), замена интрона 12 (g.30591 C/T) – у 70,0% и 15,7% ($p=1\times 10^{-12}$). При расчете коэффициента неопределенности около 20% информации о наличии КоА можно объяснить по отдельности выше указанными вариантами. При объединении этих замен информативность для прогнозирования КоА возрастает до 30%: в

контрольной группе в 91% случаев (по сравнению с 31,3% в группе с КоА) имеются или вариант интрона 29 (g.43831 T/C), или замена интрона 12 (g.30591C/T).

Среди других интронных вариантов, которые встречались не так часто, как вышеперечисленные, выделены наиболее статистически информативные (с максимально высокой энтропией), но преобладающие в группе пациентов с КоА в отличие от контрольной группы. Например, частота замены интрона 12 (g.30667C/T) встречалась у 12 человек из 251 (4,8%); 10 из 12 относились к группе пациентов с КоА, то есть шанс возникновения врожденного порока при наличии данного варианта повышается до 83%. В контрольной группе встречаемость варианта интрона 12 (g.30667C/T) составила всего 1%, в то время как в группе пациентов с КоА - 19,6% ($p=2 \times 10^{-8}$). Замена интрона 24 (g.39335G/A) наблюдалась у 2,5% и 19,6% лиц в контрольной и референтной группах, соответственно ($p=4 \times 10^{-6}$).

При исследовании сочетания вариантов в экзонах: 12 (g.30469 C/T, g.30445C/T), 23 (g.39006G/A) и 34 (g.48696G/A, g. 48901G/A, g. 48930G/A), наличие замещения хотя бы в одном из указанных участков гена *NOTCH1* наблюдалось у 25,5% пациентов с КоА и у 4,0% среди контрольной группы лиц без ВПС; с другой стороны, при выявлении одной и более из вышеперечисленных замен КоА имела место в 61,9% случаев, а при полном их отсутствии - наблюдалась только у 16,5% больных. Статистическая значимость отличия частот была $p=7 \times 10^{-7}$. Добавление в этот набор других геномных замен снижало выше описанную зависимость. Использование конечно-линейных комбинаций указывало на аналогичную ситуацию.

Логические произведения признаков были мало информативны из-за редкой встречаемости. Например, при одновременном сочетании вариантов экзонов 23 (g.39006 G/A) и 34 (g.49842G/A) риск развития КоА равен 77,8%; в случае, когда этих замен нет, либо они встречаются по отдельности – 18,1%. В референтной группе сочетание вышеописанных вариантов наблюдалось у 7

пациентов из 51, т. е. в 13,7% случаев, тогда как в контрольной группе только у 2 из 200, т. е. 1% ($p=1\times 10^{-5}$).

Одновременное сочетание интронных замен: 12 (g.30591 C/T) и 29 (g.43831T/C) редко встречалось у пациентов с КоА – 5,9%, однако наблюдалось у более половины (52,5%) здоровых лиц без ВПС ($p=1\times 10^{-9}$). Логическая сумма также выделяет эти варианты как встречающиеся в контрольной группе в 93% случаев, а среди пациентов с КоА только у одной трети больных - 31% ($p<1\times 10^{-10}$). А вот логическая сумма замен интронов 12 (g.30667 C/T) и 24 (g.39335 G/A), наоборот, в большей степени характерна для лиц с КоА – 39,2%, тогда как частота в контрольной группе составила только 3,5% ($p=2\times 10^{-13}$).

При наличии хотя бы одного из вариантов интронов 12 (g.30667 C/T), 11 (g.30311G/A), 22 (g.38735C/T), 24 (g.39335G/A) риск возникновения КоА составил 67,4%, а при полном их отсутствии - всего 9,75% ($p<1\times 10^{-10}$).

При помощи комбинаторного анализа всевозможных сочетаний были выявлены наиболее значимые неблагоприятные варианты экзонов: 23 (g.39006G/A), 12 (g.30469 C/T, g.30445 C/T), 34 (g.48696G/A, g.48901G/A, g.48930G/A) и интронов: 12 (g.30667C/T), 11 (g.30311G/A), 22 (g.38735 C/T, g.38712G/C), 24 (g.39335 G/A) и, так называемый, благоприятный интронный ряд: интроны 13 (g.31367A/T), 12 (g.30591C/T), 29 (g.43831T/C) исследуемого гена. Все экзонные замены, вошедшие в неблагоприятное сочетание, расположены в кодирующих областях гена *NOTCH1*.

При отсутствии неблагоприятных экзонных и интронных вариантов и наличии одной и более замены из благоприятного интронного ряда, риск возникновения КоА составил 1,2%. Присутствие хотя бы одной из выше перечисленных экзонных замен повышает вероятность возникновения КоА до 62%; если при этом не наблюдается ни одного благоприятного интронного варианта — риск достигает 100%, а при наличии таковых — снижается до 46%. При имеющейся одной и более замены из неблагоприятного экзонного и благоприятного интронного рядов, но отсутствии при этом неблагоприятных

интронных вариантов, риск возникновения КоА составил 33%. В группе лиц, с наличием хотя бы одной экзонной замены, но при этом благоприятных интронных вариантов нет или они имеются в сочетании с неблагоприятными — риск возникновения порока достигает 83%.

В результате расчета априорных вероятностей и коэффициентов дискриминантной функции контрольной и референтной групп на основании полученных замен экзонной и двух интронных комбинаций было показано, что из 200 человек без ВПС, 35 имели генетический набор, характерный для исследуемого заболевания. Тогда как из 51 пациента с КоА, 49 классифицируются как лица, склонные к развитию порока. Таким образом, при отсутствии КоА, взвешенная комбинация замен гена *NOTCH1* отнесёт такое наблюдение как благополучное в 82,5% случаев, а при наличии порока, у 96% пациентов будет указывать на наличие риска развития данного заболевания. Однако стоит отметить, что полученные расчёты не носят окончательный характер из-за относительно небольшого объёма выборки пациентов с КоА, что не позволяет применить процедуру кросс-валидации вместе с более эффективными современными методами статистического прогнозирования.

3.6 Результаты секвенирования гена *NOTCH1* у пациентов с сочетанием коарктации аорты и двустворчатого клапана аорты

При статистической обработке данных, полученных в результате генетического исследования пациентов с КоА, сочетающихся с БАК, удалось обнаружить разные варианты замен гена *NOTCH1* у пациентов с аортальной недостаточностью и с нормальной функцией двустворчатого клапана. При помощи комбинаторного анализа всевозможных комбинаций были выявлены наиболее значимые сочетания вариантов в экзонах и интронах исследуемого гена.

Например, у 4 из 12 (33.3%) пациентов с аортальной недостаточностью имелись замены в 34 экзоне (g.48930G/A, L2294L) или одновременно в 23 (g.39006G/A, R1279H) и 34 экзонах (g.48602A/G, D2185D), в то время как у пациентов с нормальной функцией БАК вариант в 34 экзоне (g.48930G/A, L2294L) не наблюдался ни у одного из 22 человек, а одновременные замены в 23 (g.39006 G/A, R1279H) и 34 экзонах (g.48602 A/G, D2185D) были выявлены только у одного пациента из 22 (4.5%), статистическая значимость $p=0,023$. С другой стороны интронные варианты были характерны в большей степени для лиц с нормальной функцией БАК. Например, замены хотя бы в одном из интронов: 13 (g.31347G/A), 22 (g.38800A/G) или 29 (g.43831T/C) встречались у 60% больных (13 из 22) с нормальной функцией БАК; в то время как только у 1 из 12 пациентов (8.3%) с аортальной недостаточностью одновременно наблюдались варианты в 13 (g.31347G/A) и 29 (g.43831T/C) интронах, статистическая значимость $p=0,004$. Генетическая характеристика групп представлена в таблице 9.

При статистическом сравнении больных с изолированной КоА, пациентов с сочетанием КоА и БАК, имеющих или аортальную недостаточность или нормальную функцию клапана, а также индивидуумов контрольной группы оказалось, что интронные замены были более характерны для здоровых лиц без ВПС (88,5%). Пациенты с изолированной КоА и КоА с нормальной функцией БАК также имели высокий процент среди интронных вариантов (35,5% и 59,0%, соответственно). Однако подобные замены редко встречались в группе у пациентов с БАК и аортальной недостаточностью (8,3%), тогда как экзонные варианты, напротив, для них были более характерны (33,3%). В контрольной группе подобная экзонная комбинация практически не встречалась (1%), а в группах пациентов с изолированной КоА и нормальной функцией БАК наблюдалась в крайне низком проценте случаев (5,9% и 4,5%, соответственно). Подробная характеристика замен гена NOTCH1 в вышеописанных группах представлена в таблице 10.

Таблица 9 – Генетические варианты замен *NOTCH1* у пациентов с коарктацией аорты и двустворчатым клапаном аорты в сочетании с наличием или отсутствием у них аортальной недостаточности

Варианты замен гена NOTCH1	Пациенты с КоА и нормальной функцией БАК	Пациенты с КоА и недостаточностью БАК	Риск возникновения аортальной недостаточности у пациентов с БАК
Нет комбинаций замен в экзонах* и интронах**	9	7	43%
Наличие комбинации интронных** вариантов при отсутствии экзонных*	12	1	7,7%
Наличие комбинации экзонных* замен при отсутствии интронных**	0	4	100%
Наличие комбинаций вариантов в экзонах* и интронах**	1	0	0%

Примечания: * Комбинация экзонных замен: замена в 34 экзоне (g.48930 G/A, L2294L) или сочетание замен в экзонах 23 (g.39006G/A, R1279H) и 34 (g.48602A/G, D2185D). ** Комбинация интронных вариантов: замена в интроне 13 (g.31347G/A), или 22 (g.38800A/G), или 29 (g.43831T/C).

Таблица 10 – Сравнительная характеристика замен гена *NOTCH1* в контрольной группе, а также в группах пациентов с изолированной коарктацией аорты и ее сочетанием с двустворчатым клапаном в зависимости от нарушения функции аортального клапана

	Вариант интронов 13 (g.31347 G/A) или 22 (g.38800 A/G) или 29 (g.43831 T/C)			Вариант экзонов 34 (g.48930 G/A) или сочетания 23(g.39006G/A) и 34 (g.48602A/G)		
	нет	есть	%*	нет	есть	%*
Контрольная группа	23	177	88,5%	198	2	1%
Изолированная КоА	11	6	35,3%	16	1	5,9%
КоА и БАК без нарушения функции клапана	9	13	59,0%	21	1	4,5%
КоА и БАК с аортальной недостаточностью	11	1	8,3%	8	4	33,3%

Примечание: * – процент указан от наличия интронных и экзонных замен, соответственно.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ.

Высокая частота критических состояний после рождения, значительный уровень осложнений и смертности, в том числе и в отдаленные сроки после хирургического лечения, сложности внутриутробной диагностики, несмотря на усовершенствование технических средств при ее проведении, делают проблему коарктации аорты по-прежнему актуальной. В настоящее время операция является единственным эффективным способом лечения КоА. Методы и сроки могут обсуждаться, но в целом тактика ясна, поскольку 50% пациентов без операции умирают в течение первых 10 лет жизни [71]. Однако предвидеть, предотвратить или как-то воздействовать на развитие порока в настоящее время не представляется возможным. Исследования последних десятилетий, связанные с изучением роли генетических факторов в формировании ВПС, а также эмбриогенеза сердца и крупных сосудов расширяют наши представления о патогенезе КоА и, следовательно, позволяют в дальнейшем совершенствовать методы профилактики.

Вместе с тем ни одна из ранее опубликованных теорий не объясняет полученные в настоящей работе данные о существовании наследственной предрасположенности к формированию КоА. Хотя в пользу генетической теории свидетельствовали описанные ранее гендерные различия пациентов и высокий процент КоА у лиц с гаплоидным набором X-хромосомы; данная концепция могла бы также объяснить атипичное расположение КоА и частую ассоциацию данного порока с другими ВПС, однако до сих пор не найдены конкретные гены, отвечающие за развитие данной патологии. В последние годы опубликованы результаты исследований, в которых продемонстрирована роль наследственной предрасположенности в развитии целого ряда аномалий ВОЛЖ, в том числе и КоА [26, 60, 65, 68]. Принимая во внимание тот факт, что КоА в 80% случаев может сочетаться с БАК [26], можно предположить

наличие общих механизмов развития данных заболеваний, обусловленных особенностями эмбриогенеза выходного тракта левого желудочка.

Открытие клеток вторичного сердечного поля (second heart field, SHF) существенным образом изменило представление об эмбриогенезе сердца позвоночных. Дело в том, что SHF содержит мультипотентные прогениторные клетки, которые обладают высоким пролиферативным потенциалом и способны отсрочено, в отличие от клеток первичного сердечного поля, дифференцироваться в кардиомиоциты, эндотелиальные и гладкомышечные клетки [69]. Благодаря этому феномену, клетки SHF дают начало выходному отделу левого и правого желудочков, а также большей части предсердий, тогда как клетки первичного сердечного поля принимают участие в формировании приносящего тракта левого и правого желудочков. Удлинение сердечной трубки регулируется с помощью сигнальных путей FGF (фактора роста фибробластов), BMP2 (костного морфогенного белка), канонического и неканонического Wnt- и Notch-сигнального пути, которые обеспечивают высокий пролиферативный потенциал клеток SHF и длительное поддержание их в недифференцированном состоянии [70, 157, 158]. Снижение миграционной способности или ранняя дифференцировка клеток SHF может приводить к возникновению дефектов выходного отдела желудочков.

Другими причинами нарушения морфогенеза отводящего тракта или процесса межжелудочковой/межпредсердной септации могут быть мутации генов, кодирующих транскрипционные факторы, участвующие в формировании сердца в эмбриогенезе [30]. В частности, мутации в генах *NKX2-5*, *THRAP2* приводят к развитию ТМА или двойному отхождению магистральных сосудов от правого желудочка. Мутации генов *NKX2-5*, *NOTCH1*, *TBX1*, *JAG1* ассоциированы с развитием тетрады Фалло. Некоторые типы ВПС включают в себя клапанные аномалии, развитие которых связано с нарушением эндотелиально-мезенхимального перехода (ЭМП), вследствие которого из клеток первичного эндокарда формируются гладкомышечные

клетки и фибробласты под влиянием различных транскрипционных факторов. Наглядным примером является Notch сигнальный путь. Notch1 экспрессируется в эндокарде магистральных артерий сердца и служит важным регулятором ЭМП [29, 104]. Мутации *NOTCH1* - одна из причин формирования БАК. Кроме того, пациенты с *NOTCH1* мутациями могут иметь широкий спектр других врожденных аномалий, таких как аортальный стеноз, ДМЖП, тетрада Фалло, атрезия митрального клапана, двойное отхождение магистральных сосудов от правого желудочка и ГЛОС.

В пользу влияния сигнального пути Notch на развитие КоА, говорит не только его частая ассоциация с БАК и другими аномалиями ВОЛЖ, а также высокий процент летальных исходов вследствие ускоренных сосудистых проблем как у пациентов с прооперированной КоА, так и у лиц, не подвергшихся хирургической коррекции порока.

В 2008 году опубликованы результаты исследования, в котором анализируется 91 пациент с аномалиями ВОЛЖ, в том числе 35 пациентов с КоА и 5 с БАК на предмет наличия мутаций в гене *NOTCH1* [65]. Дополнительно в этой работе было обследовано 8 родителей детей с ВПС, у которых выявлена мутация в гене *NOTCH1*, но эхокардиографических данных в пользу врожденных мальформаций сердца получено не было.

Несмотря на небольшую выборку, преимуществом настоящего исследования в том, что все пациенты имели узкоспециализированную патологию, и все доступные родители были обследованы. В соответствии с полученными нами данными, встречаемость БАК среди обследованных матерей детей с КоА была несколько выше (3,6%), чем в общей популяции населения (1%) [26]. При этом почти у четверти обследованных отцов при эхокардиографическом обследовании выявлен БАК (23,8%), особенно в группе детей, имеющих сочетание коарктации с аномалией клапана аорты (19,0%). В целом среди обследованных родителей был выявлен высокий процент ВПС (19,1%), значительно превышающий среднестатистические общепопуляционные данные.

Кроме того, в результате статистического сравнения пациентов с КоА и детской контрольной группы нами выявлены дополнительные факторы риска развития исследуемого заболевания. Анализ показал, что отягощенная наследственность по ВПС (в том числе БАК) и наличие профессиональных вредностей у родителей, по отдельности, увеличивают риск рождения ребенка с КоА примерно в полтора раза. Отягощенный акушерский анамнез не влияет на развитие данного заболевания. Сочетание отягощенной наследственности с вредностями на производстве у родителей увеличивают риск рождения ребенка с исследуемым ВПС почти в 2 раза.

Тогда как наличие отягощенной беременности и экстрагенитальной патологии у матери в группе пациентов с КоА в целом ведет к увеличению частоты возникновения врожденных аномалий ВОЛЖ у ребенка.

Несмотря на немногочисленную детскую контрольную группу, преимуществом данной выборки является то, что все дети и все родители были обследованы. Тем самым мы исключили возможность случайного фактора – наличия гемодинамически незначимого порока сердца, не выявленного ранее. В нашем случае погрешность составила бы 1,7%, так как из четырех родителей в двух случаях ВПС был выявлен впервые, включая БАК. Тем самым особенно хочется подчеркнуть необходимость максимально полного обследования контрольной группы в результате проводимых исследований.

Ранее в работе K.L. McBride с соавторами были выявлены мутации гена *NOTCH1* у двух пациентов, имеющих сочетание КоА с БАК, с частотой около 20%, но не у пациентов с изолированной КоА. Целью нашего исследования был поиск мутаций у пациентов с КоА вне зависимости от наличия или отсутствия у них БАК или других ВПС. При этом мы сравнивали частоту выявленных вариантов гена между группой пациентов и контрольной группой лиц без структурных аномалий сердца. Поэтому в отличие от работы K.L. McBride нами впервые представлены данные, полученные путем прямого секвенирования 10 экзонов гена *NOTCH1* от 200 человек

контрольной группы, не имеющих внутрисердечных аномалий. Благодаря подобному дизайну исследования нами выявлено несколько новых, а также ранее опубликованных вариантов гена *NOTCH1* как у пациентов с КоА, так и в контрольной группе. По аналогии с данными других авторов, наше исследование также подтверждает высокую изменчивость гена *NOTCH1*, обнаружив несколько редких генетических вариантов с частотой ниже 1%. Например, замещение P2377L было найдено однократно, и наблюдалось только в контрольной группе. Эта замена является наиболее консервативной из 6 других вариантов и расположена в функциональной области PEST domain. Принимая во внимания данные К.Л. McBride с соавторами [65], общая частота полученного замещения составляет 1/416 и вряд ли является редким полиморфизмом. Однако вызывает эта мутация заболевание или нет не ясно, так как была обнаружена и у здоровых лиц, не имеющих внутрисердечных дефектов. Все представленные нами данные подчеркивают, что для доказательной базы патогенеза особенно важно идентифицировать ген вариант/мутация, исследуя достаточное количество человек в контрольной группе, прошедших функциональное обследование.

Наиболее важным результатом настоящего исследования является выявление связи варианта гена R1279H с развитием КоА. Ранее эта генная замена была описана в работе К.Л. McBride [65] у пациентов с врожденной патологией ВОЛЖ (3/91) и в контрольной группе (4/207). Частота варианта R1279H в контрольной группе без структурных аномалий сердца в нашем исследовании аналогична данным К.Л. McBride (4/200, 4/207) [65]. Эта замена находится в функционально важном ЭФР-подобном домене и является чрезвычайно консервативной среди видов. Наличие этой замены приводит к снижению активации индуцированной лигандом Notch1 активности в клетках NIH3T3 (клеточная линия эмбриональных фибробластов мыши, в настоящее время признана стандартом линии фибробластов), хотя и не является статистически значимым, как в случае с известными заболеваниями, вызванными мутациями [65].

Сигнальный путь Notch играет важную роль в регулировании ЭМП, что является одним из первых критических событий в формировании ВОЛЖ и сосудов [101 – 103].

ЭМП включает в себя активацию факторов транскрипции семейства Snail, которые ответственны за подавление клеточной адгезии сосудистого эндотелиального кадгерина (VE-кадгерина, также известного как кадгерин-5) [29]. Впоследствии эндокардиальные клетки способны оторваться от их эпителиального слоя и вторгнуться в сердечный гель. Notch1-рецепторы и некоторые Notch лиганды экспрессируются в эндокарде в момент формирования эндокардиальных подушек. В исследованиях на мышах было показано, что мутантные по генам *NOTCH1* и *RBPJ* (фактор транскрипции гена Notch1) эмбрионы погибали, имея признаки гипоцеллюлярности эндокардиальных подушек с отсутствием в данных клетках ультраструктурных признаков ЭМП [101]. Такая потеря способности клеток к ЭМП связана с уменьшением экспрессии Snail и Slug, а также с неспособностью подавлять VE-кадгерин. Эти результаты были подтверждены с помощью моделей культур клеток из эксплантов сердца, выращенных в пробирке на матрице-геле коллагена. В этих условиях клетки эндокарда подвергаются ЭМП и мигрируют из эксплантов в окружающий коллаген. Трансгенные/накаутные с отсутствием *NOTCH1* и *Rbpj* экспланты, а также экспланты дикого типа, обработанные ингибиторами γ -секретазы, блокирующими Notch-сигнальный путь, продемонстрировали подавление ЭМП [101]. Результаты исследований в пробирке с использованием культивируемых эндотелиальных клеток млекопитающих сопоставимы с этими результатами [29]. Повышенная экспрессия внутриклеточного домена NOTCH1 в эндотелиальных клетках приводит к индукции Snail и к потере экспрессии VE-кадгерина, способствуя возникновению морфологических изменений, соответствующих ЭМП, т.е. утрате артериальной спецификации [101]. По данным независимого исследования повышенной экспрессии NOTCH1 внутриклеточного домена или стимуляции Notch лигандов в

эндотелиальных клетках было достаточно для индукции морфологических изменений, подавляющих эндотелиальные маркеры, включая молекулярную адгезию и активирующих экспрессию мезенхимальных маркеров, таких как гладкомышечный α -актин [102]. На основании этих данных, можно предположить что активации NOTCH в эндотелиальных клетках необходимо и достаточно для того, чтобы вызвать изменение артериовенозной спецификации и спровоцировать структурные изменения сосудистой стенки.

Таким образом, небольшое нарушение функции белка на ранних этапах эмбриогенеза сердца и сосудов может лежать в основе формирования аномалий ВОЛЖ и, позже, приводить к дисфункции аорты у взрослого человека. До сих пор отсутствуют нормативные сайты или сиквенсы, кодирующие или связывающие мРНК, которая как сообщалось ранее, покрывает этот регион, однако необходима дальнейшая работа, чтобы раскрыть функциональные последствия этого варианта ДНК.

Полученные в настоящем исследовании данные о наличии частого сочетания КоА с гипоплазией дуги и нисходящей аорты у носителей варианта R1279H по сравнению с пациентами без данной замены в геноме, также могут свидетельствовать в пользу влияния NOTCH1 на развитие данной патологии. Однако, в связи с небольшой выборкой пациентов вошедших в исследование, данная ассоциация требует дальнейшего изучения и уточнения.

При статистической обработке данных, полученных в результате генетического исследования пациентов с КоА, имеющих БАК, удалось обнаружить разные варианты замен гена *NOTCH1* у пациентов с аортальной недостаточностью и с нормальной функцией двустворчатого клапана.

Анатомия аортального клапана такова, что в норме при закрытии он не имеет регургитации в отличие от других трехстворчатых клапанов сердца (трикуспидального клапана и клапана легочной артерии). Такие гемодинамические характеристики обусловлены высокой нагрузкой на левую половину сердца. Аортальный клапан здорового человека имеет три

полулунные створки и окружен фиброзной тканью, формирующей клапанное кольцо, которое, присоединяясь к волокнистой мускулатуре сердца, образует поддерживающий каркас [124, 125]. В центре свободного края каждой створки расположен маленький фиброзный выступ, так называемый узелок Аранци [126, 127]. Обод створок несколько толще их тела и известен как lunula. Полулунные утолщения смежных створок слегка перекрывают друг друга в момент закрытия, и служат дополнительным усилением поддержки клапана [126, 127]. Такие анатомические особенности обеспечивают клапанную герметичность.

БАК имеет только две створки, которые могут занимать, как правило, правое или переднезаднее положения. В первом случае образование двустворчатого клапана произошло при слиянии правой и некоронарной створок (Right-Left, R-Non), такой клапан имеет два коронарных синуса, от которых отходят коронарные артерии, частота встречаемости такого типа БАК в среднем 17%; во втором – в результате объединения правой и левой створок аортального клапана (Anterior-Posterior, R-L), обе коронарные артерии отходят от одного синуса так называемой передней аортальной створки, подобная анатомия БАК является наиболее частой и составляет более 80%; и, наконец, крайне редкий вариант двустворчатого клапана формируется при слиянии некоронарной и левой аортальной створок, частота не превышает 2 % [26, 128, 129]. БАК часто ассоциирован с наличием аортальной недостаточности и/или стеноза. Однако существуют двустворчатые клапаны аорты без нарушения функции. Регургитация на аортальном клапане появляется при неполотном смыкании створок. Наличие БАК с клапанной недостаточностью значительно увеличивает риски необходимости последующего оперативного лечения и возникновения инфекционного эндокардита. Поэтому при развитии БАК особенно важно понимать не только причину слияния створок, но и факторы, способствующие их недоразвитию.

Формирование полулунных клапанов сердца начинается в течение четвертой недели беременности. В это время, противоположные правоверхняя и левонижняя эндокардиальные подушки появляются в цефальной части общего артериального ствола, также одновременно происходит формирование двух дополнительных вставочных эндокардиальных подушек, каждая из которых расположена под углом 90° от вышеупомянутых структур. В свою очередь, правоверхняя и левонижняя эндокардиальные подушки образуют стволовую (труккальную) перегородку, которая, претерпевая сложный процесс клеточной дифференцировки, и, в конечном счете, формирует правую и левую створки аортального клапана. Из правой вставочной эндокардиальной подушки впоследствии развивается задняя (некоронарная) аортальная створка. Неправильное слияние или неполная дифференцировка ранее упомянутых эндокардиальных подушек, как полагают, несет ответственность за формирование аномального клапана аорты [130, 131, 132]. В настоящее время доказано, что двустворчатый клапан аорты является наследуемым состоянием по аутосомно-доминантному типу со сниженной пенетрантностью и варьирующей экспрессивностью, продемонстрирована также четкая ассоциация его возникновения с мутациями в гене *NOTCH1*. По данным зарубежных авторов наследуемость БАК может достигать более 89% [26, 133].

В то время как наследственная предрасположенность и роль генетических факторов в возникновении БАК в настоящее время установлена, гены, связанные с развитием данного заболевания остаются не известными. Анализ семейных случаев БАК с помощью микросателлитных маркеров показал связь БАК с тремя локусами на хромосомах 18Q, 5q и 13q, однако гены в пределах этих областей не были определены [134]. В результате последних исследований описано большое количество транскрипционных факторов и сигнальных путей, участвующих в ЭМП и формировании эндокардиальных подушек, таких как семейство TGF- β , VEGF, ErbB, NFATc1, NOTCH, Wnt / β -катенин, Twist-1, Sox9, Tbx20, и Gata4

[135]. Однако на сегодняшний день, была продемонстрирована только связь мутаций в гене *NOTCH1*, который расположен на 9q34-35, с БАК у небольшого количества семей [63, 64, 136, 137].

Проведенные ранее исследования также показали, что нарушения в экспрессии компонентов внеклеточного матрикса (эластина, коллагена и протеогликанов) могут привести к развитию ВПС. Например, мутации в *FBN1* (внеклеточный гликопротеин экстрацеллюлярного матрикса, который сохраняет и поддерживает эластичность тканей створок клапанов и стенки аорты, связывая гладкомышечные клетки с прилегающими к ним эластиновыми фибриллами) наблюдались у пациентов с синдромом Марфана, пролапсом митрального клапана, БАК, и/или аортальной диссекцией и аневризмой [138 – 140]. Кроме того, пониженная экспрессия *FBN1* в аорте пациентов с БАК, также была ранее описана другими зарубежными авторами [141]. Следует отметить, что целевое удаление *FBN1* у мышей фенотипически копирует дефекты, наблюдаемые при синдроме Марфана, свидетельствуя о причинно-следственной связи между мутациями *FBN1* и мальформациями створок клапанов [142, 143].

Слабость (несостоятельность) тканей створок и фиброзного кольца аортального клапана вследствие развития БАК при участии нарушения экспрессии компонентов внеклеточного матрикса, могли бы объяснить наличие сочетания двустворчатого клапана с врожденной аортальной недостаточностью у новорожденных.

По данным исследований, полученных с использованием *Nos3* нокаутных мышей и инбредных линий сирийских хомяков, селективно демонстрирующих разные типы БАК, доказано их разное эмбриональное происхождение [26, 134, 144]. Анализ показал, что R-Non тип БАК является следствием дефекта формирования подушек отводящего тракта, что происходит перед его септацией, и, вероятно, зависит от ЭМП; тогда как R-L тип — это результат аномального развития перегородки проксимальной части трункуса и, скорее всего, вызван нарушением работы клеток неврального

гребня [145, 146]. Кроме того, было установлено, что R-L слияние связано с увеличением диаметра корня аорты, а также с развитием аортальной недостаточности в дальнейшей жизни [147].

Полученные в настоящем исследовании данные о наличии разных вариантов замен гена *NOTCH1* у пациентов с аортальной недостаточностью и с нормальной функцией двустворчатого клапана описаны впервые и также могут свидетельствовать в пользу существования разных источников происхождения БАК. В ходе проведенного статистического анализа было выявлено, что для больных с аортальной недостаточностью более характерны сочетания экзонных замен, тогда как у лиц без ВПС и с нормальной функцией БАК чаще встречались замены среди интронов.

Таким образом, установлен специфический паттерн *NOTCH1* мутаций, ассоциированных с БАК и характерных либо для развития аортальной недостаточности, либо для формирования в дальнейшем аортального стеноза. Поэтому, при проведении медико-генетического консультирования в настоящее время не достаточно знать только о факте наличия БАК, необходимо детальное эхокардиографическое обследование с указанием подробной анатомии клапана, а также наличия и степени нарушения его функции. Полученные в настоящей работе данные могут послужить основанием для проведения дальнейших исследований и поисков дополнительных факторов риска и генетических особенностей в развитии пороков сердца, ассоциированных с БАК.

Вместе с тем, основной целью настоящего исследования было выявление факторов риска и поиска мутаций гена *NOTCH1* у пациентов с КоА.

ВПС являются самыми распространенными из врожденных дефектов человека и патология Notch сигнального пути - одна из основных причин развития данной группы заболеваний [47, 113]. По данным зарубежных исследований развитие пренатальной диагностики путем обнаружения дефектов гена *NOTCH1* позволит увеличить вероятность выявления ВПС у

плода, тем самым способствуя своевременному оказанию квалифицированной медицинской помощи и увеличению выживаемости таких пациентов [47]. Поэтому в качестве исследуемого объекта нами был выбран один из самых частых критических ВПС, и единственный порок, имеющий трудности диагностики на этапе внутриутробного ультразвукового исследования плода.

В настоящем исследовании были секвенированы не только экзоны гена *NOTCH1*, замеченные ранее в развитии аномалий ВОЛЖ, но и прилежащие к ним интроны.

Поток генетической информации традиционно рассматривается как процесс транскрипции ДНК в РНК с последующей трансляцией белка. Однако продолжают открываться дополнительные уровни регулирования протеинового синтеза, что значительно расширяет эту упрощенную структуру, раскрывая сложную сеть, управляемую экспрессией генов [148]. По оценкам экспертов более 50% заболеваний вызванных мутациями возникают при нарушении сплайсинга (процесс вырезания интронов при синтезе информационной РНК) [149 – 151].

Воздействия на сплайсинг могут быть как прямыми причинами развития болезней, так и вносить определенный вклад в формирование восприимчивости к заболеваниям или быть модуляторами их тяжести. Девяносто четыре процента человеческих генов содержат интроны и экзоны, которые соединяются между собой пост- или ко-транскрипционно [148]. Молекулярным структурам, обеспечивающим удаление интронов и соединение экзонов необходимо выполнить трудную задачу. Сплайсинг требует чрезвычайной точности, так как даже отсутствие или наличие одного дополнительного нуклеотида в месте присоединения экзона сместит рамку считывания с неблагоприятными последствиями для кодирования белка. Для достижения такой точности, молекулярные «машины» (сплайсосомы) должны эффективно распознавать границы интрон-экзон в пре-мРНК [152]. Экзоны составляют только одну десятую часть типичной пре-мРНК и,

следовательно, должны быть определены в море интронов. Мутации, расположенные на стыке интрон-экзонных соединений вызывают примерно 10% генетических заболеваний [153]. Вопреки существовавшему ранее мнению, что только экзонные мутации способны вызывать заболевания, исследования последних лет показали существование ряда болезней, таких как семейная дизавтономия (синдром Райли-Дея, семейная вегетативная дисфункция), нейрофиброматоз 1 типа (болезнь фон Реклингхаузена), синдром Фрейзера (синдром Мейер-Швикерата, синдром Фрейзера-Франсуа) и атипичный муковисцидоз, возникающих в результате интронных нарушений [154 – 156]. Эти исследования продемонстрировали, как одиночные интронные замены могут драматически повлиять на включение экзонов в РНК, в результате нарушения распознавания границы интрон-экзон в период сплайсинга.

В ходе статистического анализа настоящего исследования, интронные замены у лиц контрольной группы без ВПС встречались значительно чаще, чем у пациентов с КоА. Однако при статистическом прогнозировании на основании совокупности экзонных и интронных вариантов *NOTCH1* у 96% пациентов было указано на наличие исследуемого врожденного порока. А при отсутствии КоА, взвешенная комбинация замен того же гена отнесла такое наблюдение как благополучное в 82,5% случаев. Что может указывать на необходимость исследования как экзонов, так и интронов при проведении генетического исследования для оценки рисков развития КоА.

По данным ультразвукового исследования сердца у родителей пациентов с КоА в настоящей работе, выявлен высокий процент БАК, особенно в группе отцов (23,5%), что значительно превышает общепопуляционные данные по двустворчатому аортальному клапану (1 - 2%).

Учитывая вариабельность гена *NOTCH1*, трудоемкость и дороговизну генетического исследования по сравнению с эхокардиографией, перспектива внедрения этого исследования в алгоритм пренатальной диагностики

сомнительна. Наряду с этим, эхокардиография является повсеместно доступным и рутинным методом обследования, не требующим высококласных лабораторий, дорогого оборудования и реактивов. На основании собранного анамнеза и наличия ВПС у родителей, главным образом БАК, можно предположить наличие риска рождения ребенка с КоА, с последующими рекомендациями к выполнению эхокардиографического исследования новорожденному вскоре после рождения вне зависимости от результатов ультразвукового обследования плода.

Подводя итог выше изложенному следует отметить, что проведенное нами исследование служит дополнительным подтверждением существования наследственной предрасположенности к развитию КоА, а также объясняет частую ассоциированность данного порока с другими врожденными аномалиями сердца, в том числе БАК.

Выводы

1. Сочетание коарктации с двустворчатым клапаном аорты наиболее часто наблюдается у лиц мужского пола по сравнению с изолированной коарктацией аорты. У пациентов с коарктацией и двустворчатым клапаном аорты чаще встречается аномалия митрального клапана. Достоверных различий в локализации, степени сужения, наличия рекоарктации аорты, сочетания с гипоплазией аорты и другими врожденными пороками сердца (субаортальный стеноз, ДМПП, ДМЖП, ОАП) у пациентов с коарктацией аорты в изолированном ее варианте и в сочетании с двустворчатым клапаном аорты не получено.
2. Воздействия на родителей вредных факторов производственной среды и отягощенная наследственность по врожденным порокам сердца повышают риск развития коарктации аорты у ребенка. Отягощенный акушерский анамнез не влияет на возникновение данного заболевания.
3. Вариант R1279H в гене *NOTCH1* ассоциирован с развитием коарктации аорты.
4. Паттерн полиморфных вариантов/замен в гене *NOTCH1* ассоциирован с развитием недостаточности двустворчатого клапана аорты.
5. Исследование полиморфных вариантов/замен гена *NOTCH1* может быть использовано для оценки рисков развития коарктации аорты.

Практические рекомендации

При планировании беременности для выявления вероятности развития коарктации аорты у ребенка, показано уточнение наличия патологии аортального клапана у родителей, включая будущего отца ребенка.

Детям, которые имеют отягощенную наследственность по аномалиям выходного отдела левого желудочка, и в частности двустворчатый клапан аорты, а также наличие профессиональных вредностей у родителей по данным анамнеза, рекомендовано выполнять эхокардиографическое исследование в ранние сроки после рождения, вне зависимости от отсутствия у них патологии по данным внутриутробной диагностики сердца плода.

При проведении медико-генетического консультирования пациентов с двустворчатым клапаном аорты в настоящее время не достаточно знать только о факте наличия аномалии аортального клапана, необходимо детальное эхокардиографическое обследование с указанием подробной анатомии клапана, а также наличия и степени нарушения его функции.

Список литературы

1. Шарыкин А.С. Врожденные пороки сердца. М., 2005. – 380 с.
2. Шабалов Н.П. Детские болезни. СПб, 2003. – 731 с.
3. Бокерия Л.А., Гудкова Р.Г. Сердечно-сосудистая хирургия – 2001. Болезни и врожденные аномалии системы кровообращения. – М.: ИД НЦССХ им. А.Н.Бакулева РАМН, 2002.
4. Осокина Г.Г., Абдулатипова И.В., Корсунский А.А. Структура заболеваемости и смертности у детей первого года жизни // Физиология и патология сердечно-сосудистой системы у детей первого года жизни / Под ред. Школьниковой М.А, Кравцовой Л.А. – М.: ИД «Медпрактика-М», 2002.- С.146-160.
5. Медведев М.В. Эхокардиография плода. – М.: ИД «Реальное время», 2000.- С.107-109.
6. Mohamed A Hamdan. Coarctation of the Aorta: A Comprehensive Review. J. Arab Neonatal Forum 2006; 3:5-13.
7. Sinha SN, Kardatzke ML, Cole RB, et al. Coarctation of the aorta in infancy. Circulation 1969; 40: 385-398.
8. Tennstedt C, Chaoui R, Korner H., et al. Spectrum of congenital heart defects and extracardiac malformations associated with chromosomal abnormalities: results of a seven year necropsy study. Heart 1999; 82: 34-39.
9. Denise van der Linde, Elisabeth E.M. Konings, Maarten A. Slager., et al. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide. JACC 2011; 58:2241-2247.
10. Hessleini P.S., Gutgesell H.P., McNamara D.G. Prognosis of symptomatic coarctation of the aorta in infancy // Am. J. Cardiol. 1983. Vol. 51. P. 299-303.

11. Jenkins NP, Ward C. Coarctation of the aorta: natural history and outcome after surgical treatment. *QJM* 1999; 92:365-371.
12. Petersen S., Peto V., Rayner M. British Heart Foundation Health Promotion Research Group Department of Public Health, University of Oxford. 2003
13. Cohen M, Fuster V, Steele PM, Driscoll D, McGoon DC. Coarctation of the aorta. Longterm follow-up and prediction of outcome after surgical correction. *Circulation* 1989; 80: 840-845.
14. Toro-Salazar OH, Steinberger J, Thomas W., et al. Longterm follow-up of patients after coarctation of the aorta repair. *Am J Cardiol* 2002; 89:541- 547.
15. Silka MJ, Hardy BG, Menashe VD, et al.. A population-based prospective evaluation of risk of sudden cardiac death after operation for common congenital heart defects. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 245-251.
16. Vriend JW, Zwinderman AH, de Groot E, et al. Predictive value of mild, residual descending aortic narrowing for blood pressure and vascular damage in patients after repair of aortic coarctation. *Eur Heart J* 2005; 26: 84-90.
17. Hamdan MA, Maheshwari S, Fahey JT, et al. Endovascular stents for coarctation of the aorta: initial results and intermediate-term follow-up. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38:1518-1523.
18. O'Sullivan JJ, Derrick G, Darnell R. Prevalence of hypertension in children after early repair of coarctation of the aorta: a cohort study using casual and 24 hour blood pressure measurement. *Heart* 2002; 88:163-166.
19. Achiron R., Tadmor O. Screening for fetal anomalies during the first trimester of pregnancy: transvaginal sonographic diagnosis of fetal anomalies // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 1990. Vol. 163. P. 466-476.
20. Bronshtein M., Siegler E., Eshcoli Z., et al. Transvaginal ultrasound measurements of the fetal heart at 11 to 17 weeks of gestation // *Amer. J. Perinat.* 1992. Vol. 9. P. 38-42.

21. Franklin O, Burch M, Manning N, et al. Prenatal diagnosis of coarctation of the aorta improves survival and reduces morbidity. *Heart* 2002; 87:67-69.
22. Pejtsik B, Pintér J, Horváth M, et al. Relationship between congenital heart disease and various factors affecting pregnancy *Orv Hetil.* 1992 Jan 19; 133 (3):155-8.
23. Moss, Adams. Heart disease in infants, children, and adolescents: including the fetus and young adults. 2008; Vol.2, 988-1005.
24. Anderson RH, Lenox CC, Zuberbuhler JR. Morphology of ventricular septal defect associated with coarctation of aorta. *Br Heart J* 1983; 50:176
25. Rosenquist GC. Congenital mitral valve disease associated with coarctation of the aorta. *Circulation* 1974; 49:985
26. Cripe L, Andelfinger G, Martin LJ, et al. Bicuspid aortic valve is heritable. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44(1): 138-143.
27. N. Zucker, A. Levitas, E. Zalstein. Prenatal diagnosis of Shone's syndrome: parental counseling and clinical outcome. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 2004, Vol. 24, No.6, p. 629–632.
28. Celermajer D.S., Greaves K. Survivors of coarctation repair: fixed but not cured // *Heart.*-2002. -Vol.88.- P. 113-114.
29. High FA, Epstein JA. The multifaceted role of Notch in cardiac development and disease. *Nat Rev Genet.* 2008; 9:49–61.
30. Benoit G, Bruneau. The developmental genetics of congenital heart disease // *Nature* 2008; 451(7181): 943-948.
31. Kuratani S, Kirby ML. Initial migration and distribution of the cardiac neural crest in the avian embryo: An introduction to the concept of the circumpharyngeal crest. *Am J Anat* 1991;191:215.
32. Momma K, Matsuoka R, Takao A. Aortic arch anomalies associated with chromosome 22q11 deletion (CATCH 22). *Pediatr Cardiol* 1999;20:97.

33. Congdon ED. Transformation of the aortic-arch system during the development of the human embryo. *Contrib Embryol* 1922;14:47.
34. Edwards JE. Anomalies of the derivatives of the aortic arch system. *Med Clin North Am* 1948;32:925.
35. Barry A. The aortic arch derivatives in the human adult. *Anat Rec* 1951;111:221.
36. Ho SY, Anderson RH. Coarctation, tubular hypoplasia and the ductus arteriosus // *Br Heart J* 1979; 41:268-274.
37. Rudolph AM, Heymann MA, Spitznas U. Hemodynamic considerations in the development of narrowing of the aorta // *Am J Cardiol* 1972; 30:514-525.
38. Rudolph AM. *Congenital Diseases of the Heart* . Chicago, Year Book Medical Publishers Inc, 1974; pp 329-349.
39. Rosenberg H. Coarctation of the aorta: Morphology and pathogenesis considerations. In: Rosenberg HS, Bolande RP (eds): *Perspectives in Pediatric Pathology*, vol. 1. Chicago, Year Book, 1973.
40. Nora JJ. Causes of congenital heart diseases: old and new modes, mechanisms, and models. *Am Heart J* 1993; 125: 1409-1419.
41. Levy HL, Guldberg P, Guttler F, et al. Congenital heart disease in maternal phenylketonuria: report from the Maternal PKU Collaborative Study. *Pediatr Res* 2001; 49: 636-642.
42. Sybert VP. Cardiovascular malformations and complications in Turner syndrome. *Pediatrics* 1998; 101: E11.
43. Ho VB, Bakalov VK, Cooley M, et al. Major vascular anomalies in Turner syndrome: prevalence and magnetic resonance angiographic features. *Circulation* 2004; 110: 1694-1700.
44. Stratakis CA, Rennert OM. Turner Syndrome An Update. *The Endocrinologist* 2005; 15: 27-36.

45. Clark EB. Neck web and congenital heart defects: A pathogenic association in 45 X-O Turner syndrome? // *Teratology* 1984; 29:355-361.
46. Loscalzo ML, Van PL, Ho VB, et al. Association between fetal lymphedema and congenital cardiovascular defects in Turner syndrome. *Pediatrics* 2005; 115:732-735.
47. X.L. Zhou and J.C. Liu. Role of Notch signaling in the mammalian heart. *Braz J Med Biol Res* 2014; 47(1):1-10.
48. Boucher CA, Sargent CA, Ogata T, Affara NA. Breakpoint analysis of Turner patients with partial Xp deletions: implications for the lymphoedema gene location. *J Med Genet* 2001; 38: 591-598.
49. Andelfinger G, Tapper AR, Welch RC, et al. KCNJ2 mutation results in Andersen syndrome with sex-specific cardiac and skeletal muscle phenotypes. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 663-668.
50. Andelfinger G. Genetic factors in congenital heart malformation. *Clin Genet.* 2008; 73:516–527.
51. Ching YH, Ghosh TK, Cross SJ, et al. Mutation in myosin heavy chain 6 causes atrial septal defect. *Nat Genet.* 2005; 37: 423–428.
52. Garg V, Kathiriya IS, Barnes R, et al. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature.* 2003; 424:443–447.
53. Reamon-Buettner SM, Borlak J. TBX5 mutations in non-Holt–Oram syndrome (HOS) malformed hearts. *Hum Mutat.* 2004; 24:104.
54. Wessels MW, Willems PJ. Mutations in sarcomeric protein genes not only lead to cardiomyopathy but also to congenital cardiovascular malformations. *Clin Genet.* 2008;74: 16–19.
55. Fahed AC, Gelb BD, Seidman JG, Seidman CE. Genetics of congenital heart disease: the glass half empty. *Circ Res.* 2013; 112:707–720.

56. Clementi M, Notari L, Borghi A, et al. Familial congenital bicuspid aortic valve: a disorder of uncertain inheritance. *Am J Med Genet.* 1996; 62:336–338.
57. Huntington KA, Hunter G, Chan KL. A prospective study to assess the frequency of familial clustering of congenital bicuspid aortic valve. *J Am Coll Cardiol.* 1997;30: 1809–1812.
58. Pradat P, Francannet C, Harris J, et al. The epidemiology of cardiovascular defects, part I: a study based on data from three large registries of congenital malformations. *Pediatr Cardiol.* 2003; 24:195–221.
59. Roberts WC. The congenitally bicuspid aortic valve: a study of 85 autopsy cases. *Am J Cardiol.* 1970; 26:72–83.
60. Lewin MB, McBride KL, Pignatelli R, et al. Echocardiographic evaluation of asymptomatic parental and sibling cardiovascular anomalies associated with congenital left ventricular outflow tract lesions. *Pediatrics.* 2004;114: 691–696.
61. McBride KL, Pignatelli R, Lewin M, et al. Inheritance analysis of congenital left ventricular outflow tract obstruction malformations: segregation, multiplex relative risk, and heritability. *Am J Med Genet.* 2005; 134A:180–186.
62. Garg V, Muth AN, Ransom JF, et al. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature.* 2005; 437:270–274.
63. Mohamed SA, Aherrahrou Z, Liptau H, et al. Novel missense mutations (p.T596M and p.P1797H) in NOTCH1 in patients with bicuspid aortic valve. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 345: 1460–1465.
64. McKellar SH, Tester DJ, Yagubyan M, et al. Novel NOTCH1 mutations in patients with bicuspid aortic valve disease and thoracic aortic aneurysms. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007; 134:290–296.

65. McBride K.L., Riley M.F., Zender G.A., et al. NOTCH1 mutations in individuals with left ventricular outflow tract malformations reduce ligand-induced signaling. *Human Molecular Genetics*, 2008, Vol. 17, No. 18.
66. Niessen K., Karsan A. Notch signaling in the developing cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 293: C1-C11.
67. Niessen K., Karsan A. Notch signaling in cardiac development. *Circ Res*. 2008; 102:1169-1181.
68. Fyler D.C. Report of New England Regional Infant Cardiac Program. *Pediatrics*.-1980.-Vol.65, №2 (pt 2). - Suppl.
69. Samanek M., Voriskova M. Infants with critical heart disease in a territory with centralized care. *Int. J. Cardiol*.-1986.-Vol. 11.-P. 63-74.
70. Botto L., Correa A., Erickson D. Racial and temporal variations in the prevalence of heart defects. *Pediatrics*. - 2001. Vol. 107. - P. 32-48.
71. Mitchell SC, Korones SB, Berendes HW. Congenital heart disease in 56,109 births. Incidence and natural history. *Circulation* 1971; 43: 323-332.
72. Rosenthal E. Coarctation of the aorta from fetus to adult: curable condition or life long disease process? *Heart* 2005; 91: 1495-1502.
73. Kuehl KS, Loffredo CA, Ferencz C. Failure to diagnose congenital heart disease in infancy. *Pediatrics* 1999; 103: 743-747.
74. Kiraly L, Kornyei L, Mogyorossy G, Szatmari A. Hypoplastic aortic arch in newborns rapidly adapts to post-coarctectomy circulatory conditions. *Heart* 2005; 91: 233-234.
75. Beekman RH. Coarctation of the aorta. In: Allen HG, Gutgesell HP, Clark EB, Driscoll DJ, editors. *Moss and Adams' Heart Disease in Infants, Children, and Adolescents Including the Fetus and Young Adults*. 6th edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001 p 988-1010.

76. Paladini D, Volpe P, Russo MG, et al. Aortic coarctation: prognostic indicators of survival in the fetus. *Heart* 2004; 90: 1348-1349.
77. Campbell M, Polani PE. The aetiology of coarctation of the aorta. *Lancet* 1961;1:463-468.
78. Loffredo CA, Chokkalingam A, Sill AM, et al. Prevalence of congenital cardiovascular malformations among relatives of infants with hypoplastic left heart, coarctation of the aorta, and d-transposition of the great arteries. *Am J Med Genet A* 2004;124: 225-230.
79. Miettinen OS, Reiner ML, Nadas AS. Seasonal incidence of coarctation of the aorta. *Br Heart J* 1970; 32:103-107.
80. Kilman JW, Williams TE Jr, Breza TS, et al. Reversal of infant mortality by early surgical correction of coarctation of the aorta. *Arch Surg* 1972;105:865-868.
81. Van Son JA, Daniels O, Vincent JG, et al. Appraisal of resection and end-to-end anastomosis for repair of coarctation of the aorta in infancy: Preference for resection. *Ann Thorac Surg* 1989;48:496-502.
82. Rubay JE, Sluysmans T, Alexandrescu V, et al. Surgical repair of coarctation of the aorta in infants under one year of age: Long-term results in 146 patients comparing subclavian flap angioplasty and modified end-to-end anastomosis. *J Cardiovasc Surg.* 1992; 33:216-222.
83. Merrill WH, Hoff SJ, Stewart JR, et al. Operative risk factors and durability of repair of coarctation of the aorta in the neonate. *Ann Thorac Surg* 1994;58: 399-402.
84. Quaegebeur JM, Jonas RA, Weinberg AD, et al. Outcomes in seriously ill neonates with coarctation of the aorta: A multiinstitutional study. *J Thorac Cardiovas Surg* 1994;108: 841-851.

85. Zehr KJ, Gillinov AM, Redmond JM, et al. Repair of coarctation of the aorta in neonates and infants: A thirty-year experience. *Ann Thorac Surg* 1995;59: 33-41.
86. Wood AE, Javadpour H, Duff D, et al. Is extended arch aortoplasty the operation of choice for infant aortic coarctation? Results of 15 years' experience in 181 patients. *Ann Thorac Surg* 2004;77: 1353-1357.
87. Wright GE, Nowak CA, Goldberg CS, et al. Extended resection and end-to-end anastomosis for aortic coarctation in infants: Results of a tailored surgical approach. *Ann Thorac Surg* 2005;80: 1453-1459.
88. Maron BJ, Humphries JO, Rowe RD, et al. Prognosis of surgically corrected coarctation of the aorta: A 20-year post-operative appraisal. *Circulation* 1973;47:119-126.
89. Brouwer RMHJ, Erasmus ME, Ebels T, et al. Influence of age on survival, late hypertension, and recoarctation in elective aortic coarctation repair. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 108:525-531.
90. Liberthson RR, Pennington DG, Jacobs ML, et al. Coarctation of the aorta: Review of 234 patients and clarification of management problems. *Am J Cardiol* 1979;43: 835-840.
91. Friedman WF. The intrinsic physiologic properties of the developing heart. In: Friedman WF, Lesch M, Sonnenblick EH, eds. *Neonatal Heart Disease*. New York: Grune & Stratton, 1973:21-49.
92. Head CE, Jowett VC, Sharland GK, Simpson JM. Timing of presentation and postnatal outcome of infants suspected of having coarctation of the aorta during fetal life. *Heart* 2005; 91:1070-1004.
93. Khoshnood B, De Vigan C, Vodovar V, et al. Trends in prenatal diagnosis, pregnancy termination, and perinatal mortality of newborns with congenital heart disease in France, 1983- 2000: a population-based evaluation. *Pediatrics* 2005; 115: 95-101.

94. Hoffman J.I.E. The Incidence of Congenital Heart Disease: II. Prenatal Incidence. *Pediatr. Cardiol.* – 1995. - Vol. 16. - P.155-165.
95. Brou C, Logeat F, Gupta N., et al. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* 5: 207–216, 2000.
96. De Strooper B, Annaert W, Cupers P, et al. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398: 518 –522, 1999.
97. Francis R, McGrath G, Zhang J, et al. aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell* 3:85–97, 2002.
98. Hu Y, Ye Y, Fortini ME. Nicastrin is required for gamma-secretase cleavage of the Drosophila Notch receptor. *Dev Cell* 2: 69 –78, 2002.
99. Okochi M, Steiner H, Fukumori A, et al. Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1. *EMBO J* 21: 5408 – 5416, 2002.
100. Struhl G, Greenwald I. Presenilin-mediated transmembrane cleavage is required for Notch signal transduction in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 229 –234, 2001.
101. Timmerman LA, Grego-Bessa J, Raya A, et al. Notch promotes epithelial–mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev.* 2004; 18:99–115.
102. Nosedá M, McLean G, Niessen K, et al. Notch activation results in phenotypic and functional changes consistent with endothelial–mesenchymal transformation. *Circ Res.* 2004; 94: 910–917.
103. Riley MF, McBride KL, Cole S. NOTCH1 missense alleles associated with left ventricular outflow tract defects exhibit impaired receptor processing and defective EMT. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1812:121–129.

104. Schwanbeck R, Martini S, Bernoth K, Just U. The Notch signaling pathway: Molecular basis of cell context dependency. *Eur J Cell Biol* 2011; 90: 572-581, doi: 10.1016/j.ejcb.2010.10.004.
105. Penton AL, Leonard LD, Spinner NB. Notch signaling in human development and disease. *Semin Cell Dev Biol* 2012; 23: 450-457, doi: 10.1016/j.semcdb.2012.01.010.
106. Boni A, Urbanek K, Nascimbene A, et al. Notch1 regulates the fate of cardiac progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 15529-15534.
107. Gude N, Sussman M. Notch signaling and cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol* 2012; 52: 1226-1232.
108. Fan YH, Dong H, Pan Q, et al. Notch signaling may negatively regulate neonatal rat cardiac fibroblast-myofibroblast transformation. *Physiol Res* 2011; 60: 739-748.
109. Kume T. Ligand-dependent Notch signaling in vascular formation. *Adv Exp Med Biol* 2012; 727: 210-222.
110. Kopan R. Notch: a membrane-bound transcription factor. *J Cell Sci.* 2002; 115:1095–1097.
111. MacGrogan D, Nus M, de la Pompa JL. Notch signaling in cardiac development and disease. *Curr Top Dev Biol.* 2010; 92:333–65.
112. MacGrogan D, Luna-Zurita L, de la Pompa JL. Notch signaling in cardiac valve development and disease. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2011; 91(6):449–59.
113. Epstein JA, de la Pompa JL. Coordinating tissue interactions: Notch signaling in cardiac development and disease. *Dev Cell.* 2012; 22(2): 244–254.
114. Francis C, Prapa S, Abdulkareem N, et al. Identification of likely pathogenic variants in patients with bicuspid aortic valve: correlation of complex

genotype with a more severe aortic phenotype. *Heart* 2014 Jun;100 Suppl 3:A55-6.

115. Foffa et al. Sequencing of NOTCH1, GATA5, TGFBR1 and TGFBR2 genes in familial cases of bicuspid aortic valve. *BMC Medical Genetics* 2013, 14:44.
116. Aanhaanen WT, Moorman AF, Christoffels VM. Origin and development of the atrioventricular myocardial lineage: insight into the development of accessory pathways. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2011; 91:565–577.
117. Akazawa H, Komuro I. Navigational error in the heart leads to premature ventricular excitation. *J Clin Invest.* 2011; 121:513–516.
118. Rentschler S, Harris BS, Kuznekoff L, et al. Notch signaling regulates murine atrioventricular conduction and the formation of accessory pathways. *J Clin Invest.* 2011; 121:525–533.
119. Grieskamp T, Rudat C, Ludtke TH, et al. Notch signaling regulates smooth muscle differentiation of epicardium-derived cells. *Circ Res.* 2011; 108:813–823.
120. Del Monte G, Casanova JC, Guadix JA, et al. Differential Notch Signaling in the Epicardium Is Required for Cardiac Inflow Development and Coronary Vessel Morphogenesis. *Circ Res.* 2011; 108:824–836.
121. Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell.* 2009; 137:216–233.
122. Logeat F, Bessia C, Brou C, et al. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95:8108–8112.
123. Hinton RB, Yutzey KE. Heart valve structure and function in development and disease. *Annu Rev Physiol.* 2011; 73:29–46.
124. Anderson RH. Clinical anatomy of the aortic root. *Heart.* 2000; 84(6): 670-3.

125. Kim H, Bergman R, Matyal R, et al. Three-dimensional echocardiography and en face views of the aortic valve: technical communication. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2013; 27(2): 376-80.
126. Malouf JF, Edwards WD, Tajik AJ, et al. Functional anatomy of the heart. In: Fuster V, O'Rourke RA, Walsh RA, Poole-Wilson P, eds. *Hurst's The Heart.* 12th ed. New York, NY: McGraw-Hill Companies, Inc; 2008.
127. Misfeld M, Sievers HH. Heart valve macro- and microstructure. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2007; 362(1484):1421-36.
128. Mahadevia R, Barker AJ, Schnell S, et al. Bicuspid aortic cusp fusion morphology alters aortic three-dimensional outflow patterns, wall shear stress, and expression of aortopathy. *Circulation* 2014. 129 (6): 673–82.
129. Bissell MM, Hess AT, Biasiolli L, et al. Aortic dilation in bicuspid aortic valve disease: flow pattern is a major contributor and differs with valve fusion type. *Circulation. Cardiovascular Imaging.* 2013; 6 (4): 499–507.
130. Anderson RH, Webb S, Brown NA, Lamers W, Moorman A. Development of the heart: (3) formation of the ventricular outflow tracts, arterial valves, and intrapericardial arterial trunks. *Heart.* 2003; 89(9):1110-8.
131. Hurwitz LE, Roberts WC. Quadricuspid semilunar valve. *Am J Cardiol.* 1973; 31(5): 623-6.
132. Restivo A, Piacentini G, Placidi S, et al. Cardiac outflow tract: a review of some embryogenetic aspects of the conotruncal region of the heart. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2006; 288(9): 936-43.
133. Garg V, Muth AN, Ransom JF, et al. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature* 2005. 437 (7056): 270–274.
134. Martin LJ, Ramachandran V, Cripe L, et al. Evidence in favor of linkage to human chromosomal regions 18q, 5q and 13q for bicuspid aortic valve and associated cardiovascular malformations. *Human Genetics.* 2007; vol. 121, no. 2, pp. 275–284.

135. Sans-Coma V, Fernandez B, Duran A, et al. Fusion of valve cushions as a key factor in the formation of congenital bicuspid aortic valves in Syrian hamsters. *Anatomical Record*. 1996; vol. 244, no. 4, pp. 490–498.
136. Laforest B, Nemer M. Genetic Insights into Bicuspid Aortic Valve Formation. *Cardiol Res Pract*. 2012; 2012:180297.
137. Chakraborty S, Combs M, Yutzey K. Transcriptional regulation of heart valve progenitor cells. *Pediatric Cardiology*. 2010; vol. 31, no. 3, pp. 414–421.
138. Dietz H, Cutting G, Pyeritz R, et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature*. 1991; vol. 352, no. 6333, pp. 337–339.
139. Dietz H, Pyeritz R. Mutations in the human gene for fibrillin-1 (FBN1) in the Marfan syndrome and related disorders. *Human Molecular Genetics*. 1995; vol. 4, pp. 1799–1809.
140. Robinson P, Booms P, Katzke S, et al. Mutations of FBN1 and genotype-phenotype correlations in Marfan syndrome and related fibrillinopathies. *Human Mutation*. 2002; vol. 20, no. 3, pp. 153–161.
141. Fedak PWM, De Sa MPL, Verma S, et al. Vascular matrix remodeling in patients with bicuspid aortic valve malformations: implications for aortic dilatation. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2003; vol. 126, no. 3, pp. 797–806.
142. Pereira L, Andrikopoulos K, Tian J, et al. Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome. *Nature Genetics*. 1997; vol. 17, no. 2, pp. 218–222.
143. Pereira L, Lee SY, Gayraud B, et al. Pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999; vol. 96, no. 7, pp. 3819–3823.

144. Fedak PWM, Verma S, David TE, et al. Clinical and pathophysiological implications of a bicuspid aortic valve. *Circulation*. 2002; 106:900–4.
145. Fernandez B, Duran A, Fernandez-Gallego T, et al. Bicuspid aortic valves with different spatial orientations of the leaflets are distinct etiological entities. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009; vol. 54, no. 24, pp. 2312–2318.
146. Fernandes S, Khairy P, Sanders S, et al. Bicuspid aortic valve morphology and interventions in the young. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007; vol. 49, no. 22, pp. 2211–2214.
147. Hope M, Hope T, Crook S, et al. 4D flow CMR in assessment of valve-related ascending aortic disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011; vol. 4, no. 7, pp. 781–787.
148. Ward J, Cooper TA. The Pathobiology of Splicing. *J Pathol*. 2010; 220(2): 152–163.
149. Lopez-Bigas N, Audit B, Ouzounis C, et al. Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease? *FEBS Lett*. 2005; 579:1900–1903.
150. Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet*. 2008; 40:1413–1415.
151. Wang ET, Sandberg R, Luo S, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*. 2008; 456:470–476.
152. Wahl MC, Will CL, Luhrmann R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*. 2009;136:701–718.
153. Krawczak M, Thomas NS, Hundrieser B, et al. Single base-pair substitutions in exon-intron junctions of human genes: nature, distribution, and consequences for mRNA splicing. *Hum Mutat*. 2007;28:150–158.

154. Faustino NA, Cooper TA. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.* 2003; 17:419–437.
155. Tazi J, Bakkour N, Stamm S. Alternative splicing and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1792:14–26.
156. Wang GS, Cooper TA. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat Rev Genet.* 2007; 8:749–761.
157. Kelly RG. The second heart field. *Curr Top Dev Biol.* 2012;100:33-65.
158. Neeb ZI, Lajiness JD, Bolanis E, Conway SJ Cardiac outflow tract anomalies. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2013 Jul;2(4):499-530.