

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

На правах рукописи

КОНДОРИ ЛЕАНДРО ЭБЕР ИВАН

Электрофизиологический подход к эндоваскулярной катетерной денервации  
легочной артерии

3.1.20 – Кардиология

3.1.15 – Сердечно-сосудистая хирургия

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:

Доктор медицинских наук, профессор, Академик РАН

Шляхто Евгений Владимирович

Доктор медицинских наук, доцент

Михайлов Евгений Николаевич

Санкт-Петербург – 2022

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

Введение.....	3
Глава 1 Обзор литературы.....	11
Глава 2 Материалы и методы.....	27
2.1 Дизайн исследования.....	27
2.2 Описание исследования.....	28
2.3 Статистический анализ полученных данных.....	37
Глава 3 Результаты исследований.....	38
3.1 Стимуляционное картирование легочной артерии.....	38
3.2 Пилотное клиническое исследование денервации легочной артерии с применением стимуляционного картирования.....	51
3.3 Радиочастотная денервация легочной артерии у нормотензивных животных.....	58
3.4 Лазерная катетерная денервация легочной артерии.....	63
Глава 4 Обсуждение полученных результатов.....	71
Заключение.....	83
Выводы.....	84
Практические рекомендации.....	85
Перспективы дальнейшей разработки темы исследования.....	86
Список сокращений.....	87
Список литературы.....	88

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования и степень ее разработанности**

Легочная гипертензия (ЛГ) — это тяжелое хроническое заболевание, характеризующееся средним давлением в легочной артерии (ЛА) выше 20 мм рт. ст., измеренным при катетеризации правых отделов сердца, с высокой морбидностью и смертностью [1, 2].

В 2015 году сообщалось о распространенности 97 случаев на миллион населения при соотношении женщин и мужчин 1,8 в Соединенном Королевстве. Приведенный к возрасту уровень смертности в Соединенных Штатах колеблется от 4,5 до 12,3 на 100 000 населения [3].

По данным регистра Giessen, 3- и 5-летняя выживаемость пациентов с ЛГ составляет 66,7% и 53,6%, соответственно. Однако, данные варьируют в зависимости от этиологии и гемодинамического варианта ЛГ. Так, у пациентов с легочной артериальной гипертензией (ЛАГ) (I группа клинической классификации) 3-летняя выживаемость составляет 72,2%, а 5-летняя – 59,4%, тогда как для пациентов с хронической тромбоэмболической ЛГ (ХТЭЛГ) 3- и 5-летняя выживаемость составляет 77,4% и 66,7%, соответственно, и ассоциирована с возможностью выполнения тромбэндартерэктомии из ЛА [4]. Для пациентов с патологией левых камер сердца наличие ЛГ ассоциировано с неблагоприятным прогнозом и значимым снижением выживаемости: 3- и 5-летняя выживаемость равняется 68,6% и 55,6%, соответственно. Несмотря на то, что четкий путь патогенеза ЛАГ еще не до конца выяснен, эндотелиальная дисфункция с неадекватной вазоконстрикцией, ремоделирование легочных сосудов и тромбоз ЛА описаны в качестве основных механизмов развития ЛГ, однако нейрогормональная дисрегуляция и повышение симпатической нервной активности также предполагаются в качестве ключевых факторов патогенеза.

Последние два десятилетия ознаменовались значительным прогрессом в медикаментозном лечении ЛАГ в отношении как качества жизни пациентов, так и снижения смертности; однако нередко терапия ограничена из-за побочных эффектов, отсутствия явных преимуществ монотерапии в клинических

исследованиях, недостаточной приверженности и социально-экономических факторов. При этом прогноз пациентов остается неблагоприятным, что стимулирует поиск новых методов лечения [5].

В 1999 году Rudner и соавторы изучили распределение симпатических нервных волокон в периваскулярной ткани ЛА и предположили, что эти нервы могут быть потенциальной мишенью для коррекции автономной регуляции легочного кровообращения. Теоретически, снижение симпатической нервной импульсации легочной артерии может привести к снижению легочного сосудистого сопротивления и давления в ЛА. В качестве нового малоинвазивного подхода коррекции ЛГ была предложена транскатетерная денервация ЛА, результаты которой изучались в экспериментальных и клинических условиях [6].

Денервация ЛА направлена на снижение количества функционирующих симпатических нервов в стенке ЛА и периваскулярной клетчатке, что, как предполагается, через рефлекторную цепь снижает эфферентную симпатическую активность и приводит к снижению сосудистого сопротивления и давления в ЛА. На сегодняшний день наиболее часто используют радиочастотную энергию для катетерной денервации. У человека наибольшее количество периваскулярных нервов ЛА находится в стволе легочной артерии и проксимальных отделах левой и правой легочной артерии, поэтому абляция выполняется в этих областях.

Принято считать, что доклинические исследования являются крайне важным этапом изучения новых методик лечения и позволяют оценить целесообразность и безопасность фармакологических субстанций, протезов, катетеров и устройств. Выбор экспериментальных животных для таких исследований имеет ключевое значение, поскольку анатомия и физиология существенно различаются между видами и от таковых у человека [7]. В настоящее время для экспериментов используются как мелкие, так и крупные млекопитающие. Для изучения интервенционных методик в кардиологии соответствие параметров гемодинамики, регуляции кровообращения, размеры сосудов и камер сердца таковым у человека является решающим. Так, неадекватно выбранная модель и результаты исследований у мелких животных могут представлять технические ограничения из-за размера, особенностей

анатомии (в том числе характере распределения нервов) могут привести к неверным выводам применения методики и невозможности сравнения результатов на моделях у крупных животных. Среди крупных млекопитающих, используемых в кардиологических исследованиях, наиболее широко используются свиньи и овцы, также используются модели собак [8].

Распределение нервов ЛА имеет свои особенности и различия у крыс, свиней, овец и человека. Так, отличаются расстояние периваскулярных нервов от интимы, у овец распределение нервов может зависеть от возраста животного; нервы могут обнаруживаться в адвентиции и меди у овец, в то время как у свиней и человека нервы, в основном, расположены в адвентиции и периваскулярной ткани [9]. Таким образом, к экстраполяции результатов, полученных у разных видов, следует относиться с осторожностью, поскольку любая из имеющихся моделей не может полностью соответствовать ни анатомическим/гистологическим характеристикам человека, ни патофизиологии заболевания. Таким образом, использование наиболее подходящих видов животных для разных экспериментальных фаз исследования является мотивированным и необходимым.

Было предложено несколько методик денервации ЛА и к настоящему времени не существует стандартизированного подхода. Метод транссосудистой аблации бифуркации ЛА по ее окружности был впервые выполнен Chen и соавт. в 2013 году с использованием прототипа декаполярного циркулярного катетера в экспериментальной модели ЛГ, индуцированной с помощью окклюзионного баллона в ЛА [10]. Rothman и соавт. выполняли денервацию ЛА с использованием прототипа спирального катетера на модели острой легочной гипертензии, индуцированной инфузией синтетического аналога тромбоксана A<sub>2</sub> [11]. При этом, в последней работе аппликации наносились на стенку ЛА дискретно, со значительным расстоянием между абляциями. Изучение клинического применения денервации ЛА начато с 2013 года, получены обнадеживающие результаты.

Сплошная циркулярная аблация стенки ЛА, по-видимому, эффективна в деструкции наибольшего количества адвентициальных и периваскулярных

нервов, однако может быть ассоциирована с риском околососудистого повреждения из-за массивности и неселективности воздействия [12]. Более того, известно, что радиочастотная абляция (РЧА) характеризуется неомогенностью повреждения и малой воспроизводимостью объема деструкции нервной ткани.

Различные источники энергии и методы абляции периваскулярных нервов интенсивно изучаются в качестве альтернативных методов для терапии различных заболеваний. Так, значительный прогресс получен в применении фокусированного ультразвука, брахитерапии, химической абляции [13,14]. Технологические достижения в последнее время позволили изготавливать оптические волокна для лазерных устройств достаточной мощности, интегрируемые в тонкие катетеры различных модификаций, что дало толчок развитию малоинвазивных лазерных медицинских вмешательств [15, 16, 17]. Однако лазерная абляция ранее не изучалась применительно к денервации ЛА.

Таким образом, актуальным является разработка подходов к селективной и безопасной денервации ЛА, что может быть реализовано интегрированием электрофизиологических методов диагностики в процедуру денервации ЛА, а также изучение эффектов абляции ЛА с помощью альтернативных источников энергии (лазера) для оптимизации транссосудистой абляции периваскулярных нервов.

### **Цель исследования**

Разработать методику электрофизиологического картирования при транскатетерной абляции периваскулярных нервов легочной артерии, изучить эффекты радиочастотной и лазерной денервации в условиях нормотензии.

### **Задачи исследования**

1. Определить типы реакций ритма сердца при низкочастотной и высокочастотной транссосудистой стимуляции периваскулярных нервов легочной артерии в эксперименте на крупных животных, сформировать карты расположения стволов крупных нервов в зоне бифуркации легочной артерии (диафрагмальные нервы, возвратные ларингеальные нервы) на основе захвата нервов при стимуляции артерии.

2. Изучить воспроизводимость и безопасность применения методики катетерной денервации легочной артерии на основе стимуляционного картирования у пациентов с легочной артериальной гипертензией в пилотном клиническом исследовании.

3. Изучить макроскопические и микроскопические повреждения при транссосудистой радиочастотной абляции периваскулярных нервов легочной артерии у крупных нормотензивных животных.

4. На экспериментальной модели у крупных животных изучить возможность повреждающего лазерного воздействия на периваскулярные нервы легочной артерии с помощью транссосудистого фиброоптического катетера.

### **Научная новизна**

1. Определены реакции ритма сердца на стимуляцию зоны бифуркации легочной артерии и распределение зон нейро-опосредованного ответа ритма сердца на стимуляцию.

2. Показано, что денервация участка легочной артерии сопровождается потерей реакции частоты ритма на повторную стимуляцию.

3. Изучены эффекты катетерной денервации легочной артерии в условиях нормотензии: в остром периоде после радиочастотной абляции зоны бифуркации легочной артерии не отмечается статистически значимых изменений системной и легочной гемодинамики.

4. Изучены эффекты катетерной фиброоптической лазерной абляции стенки легочной артерии и периваскулярных нервов: лазерная абляция с длиной волны 1064 нм характеризуется меньшим риском повреждения эндотелия и тромбообразования, однако отмечается значительное повреждение периваскулярной жировой ткани, содержащей нервы.

### **Теоретическая и практическая значимость**

В результате настоящего трансляционного исследования выполнена разработка модифицированной методики транскатетерной денервации легочной артерии, заключающейся в электрофизиологическом картировании легочной артерии и использования лазерной катетерной абляции. Отдельными аспектами практической значимости являются следующие:

1. Предложен метод безопасной таргетной абляции периваскулярных нервов легочной артерии на основе результатов низкочастотного и высокочастотного стимуляционного картирования.

2. В пилотном клиническом исследовании показана воспроизводимость и безопасность разработанного электрофизиологического подхода к денервации легочной артерии.

3. Предложена и отработана экспериментальная модель лазерной денервации легочной артерии: предложены параметры эффективной и безопасной абляции, разработана шкала повреждения стенки легочной артерии, которая может применяться для стандартизации оценки методов денервации.

### **Методология и методы исследования**

В результате сочетания экспериментальных и клинических данных проведено трансляционное исследование, результаты которого имеют высокую готовность к применению в клинических условиях. В экспериментальных фазах работы проведено испытание электрофизиологического картирования легочной артерии. Показана локальная и гемодинамическая безопасность разработанного метода денервации. В то же время, изучены и систематизированы недостатки радиочастотной абляции для денервации легочной артерии в экспериментальных и клинических условиях. Сформулировано и экспериментально обосновано сочетание электрофизиологического картирования и использования лазерной энергии для модифицированной методики денервации легочной артерии.

Набор использованных методов исследования соответствует современному уровню экспериментальных и клинических исследований. Методы статистической обработки данных являются современными и отвечают поставленной цели и задачам исследования.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Высокочастотная стимуляция зоны бифуркации легочной артерии способна выявить зоны высокой плотности иннервации стенки сосуда, а также определить адекватность чрессосудистой абляции нервов, что подтверждается отсутствием реакции на повторную стимуляцию после абляции.

2. Стимуляционное картирование легочной артерии позволяет определить



расположение крупных околососудистых структур, таких как диафрагмальные нервы, возвратные ларингеальные нервы, задняя стенка левого предсердия, где следует соблюдать осторожность при чрессосудистой аблации, снижая мощность воздействия или не нанося воздействий.

3. Несмотря на исчезновение функциональных реакций на чрессосудистую стимуляцию нервов после радиочастотной аблации стенки легочной артерии, физическая деструкция нервов недостаточна. Так, только в 50% случаев видны повреждения на легочной артерии при макроскопическом исследовании, а экспрессия нейромаркеров сохраняется в большинстве выявленных аппликациях.

4. Фиброоптическая лазерная аблация может быть безопасно использована для чрессосудистой денервации легочной артерии: в большинстве аппликаций нет существенного повреждения эндотелиального слоя, также не обнаруживается повреждения легких и стенки предсердия при ограничении мощности воздействия до 20 Вт.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Объём экспериментального и клинического материала позволяет сделать основные выводы. Материалы диссертации были представлены в виде докладов на научных конференциях: «Российский национальный конгресс кардиологов 2020» (Казань) (3 место конкурса работ молодых ученых – «Новый подход при денервации легочной артерии – стимуляционное картирование периваскулярных нервов»); «IX Всероссийский съезд аритмологов», Санкт-Петербург, 2021 г (2 место конкурса работ молодых ученых – «Лазерная аблация для аблации миокарда и периваскулярных нервов»); Конгресс Европейского Кардиологического Общества 2020 года (ESC Congress 2020), Конгресс Европейского Кардиологического Общества 2021 года (ESC Congress 2021).

По результатам диссертации опубликовано 13 научных работ, из них 10 статей в журналах, входящих в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора и кандидата наук» и индексированных в международных базах цитирования Web of Science и/или Scopus.

### **Внедрение в практику**

Результаты исследования внедрены в экспериментальную работу Центра доклинических и трансляционных исследований ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, клиническую практику отделения рентген-хирургического лечения сложных нарушений ритма и электрокардиостимуляции ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России (Санкт-Петербург), образовательную деятельность Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России (Санкт-Петербург).

Работа выполнена в рамках реализации плана фундаментальных научных исследований гранта Минобрнауки «Разработка новых технологий профилактики и лечения сердечной недостаточности на основе нейромодуляции» (соглашение №075-15-2020-800).

### **Личное участие автора**

Автор принимал непосредственное участие в разработке концепции исследования, а также самостоятельно проводил экспериментальные процедуры по денервации легочной артерии, участвовал в анализе макро- и микроскопических препаратов, участвовал в выполнении процедур денервации у пациентов. Также автор выполнил научный и статистический анализ полученных данных.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 100 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Работа содержит 12 таблиц и 23 рисунков. Указатель литературы включает 96 источников, из них 7 отечественных и 89 иностранных.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Легочная артериальная гипертензия (ЛАГ) — это патофизиологическое и гемодинамическое состояние, которое характеризуется повышением среднего давления в легочной артерии  $\geq 20$  мм рт ст по данным катетеризации правых камер сердца и легочным сосудистым сопротивлением  $\geq 3$  ед Вуд; может встречаться как самостоятельная нозология или осложнять течение широкого спектра заболеваний, негативно влияя на выживаемость больных [2].

При ЛАГ происходит ремоделирование мелких интра- и преацинарных артерий, тогда как ремоделирование проксимальных участков легочной артерии, ее дилатация, снижение растяжимости и увеличение жёсткости, формируется по мере прогрессирования заболевания, что ассоциировано с ухудшением течения ЛАГ и снижением выживаемости [18, 19].

Современная терапия ЛАГ создана исходя из представления о роли эндотелиальной дисфункции в ремоделировании легочной артерии (ЛА), и реализует свое действие путем блокады рецепторов к вазоконстрикторным субстанциям и стимуляции основных путей, опосредованных мощными вазодилататорами, такими как оксид азота и простаглицлин. Несмотря на широкое внедрение таргетной терапии ЛАГ, ежегодная летальность в среднем составляет около 10% [20], а 5 летняя выживаемость больных с ЛАГ остается крайне низкой (59,4%) [21], что определяет высокую научно-практическую значимость изучения новых путей патогенеза ЛАГ и поиска новых методов лечения.

Наряду с ауто/паракринными факторами, в регуляции сосудистого тонуса артерий и вен малого круга кровообращения активное участие принимает автономная нервная система [22, 23].

### **Иннервация легочной артерии**

Сосуды легких иннервируются ветками блуждающего нерва, звездчатого ганглия и цервико-торакальными симпатическими нервными волокнами, включающими адренергические, холинергические и сенсорные волокна. Из нервного сплетения ворот легких волокна распространяются и образуют периваскулярную нервную сеть в адвентиции ЛА с максимальной плотностью иннервации в ее проксимальных отделах и постепенным уменьшением по

направлению к периферии сосудистого русла [24].

У человека и свиней аксоны адренергических нервных волокон обнаруживаются в артериях диаметром до 50 мкм [6]. В иннервации сосудов легких преобладают симпатические нервные волокна. Активация  $\alpha$ 1-адренорецепторов норадреналином приводит к вазоспазму, повышению легочного сосудистого сопротивления (ЛСС) и снижению комплаентности ЛА [25], тогда как преимущественно через активацию  $\beta$ 2-адренорецепторов реализуется эффект вазодилатации [26].

В условиях ЛАГ количество адренергических аксонов увеличено в адвентициальной оболочке самых мелких интраацинарных артериях. Высказывается предположение о взаимосвязи ремоделирования мелких легочных артерий, гипертрофии гладкомышечного слоя и роста нервных окончаний [18]. Однако у пациентов с ЛГ и без нее не было выявлено различий в количестве и глубине залегания нервных волокон в стволе и проксимальных отделах легочных артерий [26].

Тем не менее, особенности иннервации мелких легочных артерий и венул у пациентов с идиопатической ЛАГ остаются не изученными. Значение симпатической нервной системы в регуляции тонуса сосудов малого круга кровообращения было впервые продемонстрировано в эксперименте на крупных животных в 1977 году.

Так, у собак удаление адвентициальной оболочки, окружавшей главный ствол ЛА и зону бифуркации, прилежащей к аорте, приводило к невозможности повышения давления в легочной артерии при растяжении баллоном ствола ЛА.

Подобный эффект был получен и при инфильтрации лидокаином мышечной стенки ЛА и адвентиции в той же зоне. Двусторонняя перерезка блуждающих нервов не препятствовала повышению давления в ЛА. Введение блокаторов альфа- и бета-адренорецепторов (фентоламин и пропранолол) не блокировало вазоконстрицию, тогда как использование 6-гидроксидопамина, вызывающего селективную деструкцию адренергических нервных окончаний и высвобождение норэпинефрина, полностью предотвращало повышение давления в легочной артерии [27].

Данный эксперимент позволил сделать два главных вывода: во-первых, опосредованная вагусом афферентная и эфферентная иннервация ЛА не играет большого эффекта в вазоконстрикторных реакциях, а во-вторых, механическое или химическое воздействие в проксимальных участках ЛА позволяет блокировать вазоконстрикторные реакции.

Данный эксперимент послужил основой для проведения дальнейших исследований. Спустя практически 40 лет Zhou L. с соавторами (2015) [28] и A. Rothman с соавторами (2015) в эксперименте на собаках и свиньях с моделированием ЛАГ выполнили чрескожную катетерную радиочастотную абляцию ЛА в зоне бифуркации и циркулярно в устьях ее главных ветвей, продемонстрировав снижение давления ЛА, а также гибель нервных волокон в зоне воздействия радиочастотной или ультразвуковой энергии, подтвержденную при аутопсийном исследовании животных [11].

### **Клиническое применение денервации легочной артерии**

Успешные эксперименты на животных способствовали быстрому внедрению катетерной денервации ЛА в клиническую практику и уже в 2013 году были опубликованы результаты первого применения метода чрескожной радиочастотной абляции с целью денервации у больных с ЛАГ.

В результате, у пациентов с ЛАГ после чрескожной катетерной денервации проксимальных отделов ЛА с использованием радиочастотной энергии было продемонстрировано снижение среднего давления в ЛА (ср.ДЛА) и ЛСС, увеличение сердечного индекса и, соответственно, физической работоспособности по данным теста 6-минутной ходьбы, и улучшение эхокардиографических показателей [29 – 33].

К сожалению, исследований с классическим рандомизированным делением пациентов с ЛАГ на две группы до сих пор нет. H. Zang с соавт. (2019) пытались провести рандомизированное исследование с выполнением ложной радиочастотной абляции ЛА, однако в этой группе контроля в «послеоперационном» периоде был назначен ЛАГ-специфический препарат силденафил, что, безусловно, нарушает чистоту исследования и интерпретацию результатов [32].

В других исследованиях у пациентов с ЛАГ группа сравнения отсутствовала, либо контрольная группа была представлена пациентами, которые отказались от РЧА ЛА [34]. А в исследовании S.-L. Chen и соавт. (2013) в послеоперационном периоде у части пациентов с ЛАГ была отменена ЛАГ-специфическая терапия, что вызвало много этических вопросов при отсутствии достоверных данных о пользе и долгосрочном клиническом эффекте денервации ЛА.

В 2020 году Романов и соавт. провели рандомизированное исследование по использованию радиочастотной денервации ЛА у пациентов с резидуальной хронической тромбоэмболической ЛГ, получающих ЛАГ-специфическую терапию в виде риоцигуата, и показали достоверное снижение ср.ДЛА более 10 мм от исходного у 72% пациентов непосредственно после процедуры [35]. Денервация выполнялась в условиях седации и, в целом, хорошо переносилась пациентами.

Наиболее частыми нежелательными эффектами была боль в грудной клетке, кашель и в 32% случаев брадикардия и транзиторная асистолия, потребовавшая временной электрокардиостимуляции через аблационный катетер. Спустя 12 месяцев у пациентов в группе денервации ЛА регистрировалось статистически достоверное снижение ЛСС по сравнению с группой ложной аблации (контроль), получавших терапию риоцигуатом, преимущественно за счет снижения ср.ДЛА. Однако не было отмечено достоверных различий в минутном объеме кровообращения, хотя именно этот гемодинамический показатель имеет наибольшую прогностическую значимость в отношении выживаемости пациентов с ЛАГ [2].

Таким образом, группы пациентов, которым выполнялась денервация ЛА, крайне полиморфна по этиологии ЛГ и гемодинамическим вариантам. Остается неясным при какой нозологии ЛГ и гемодинамическом варианте ЛГ процедура денервации ЛА будет иметь наилучшие результаты.

В экспериментах на животных и пилотных клинических исследованиях, проведенных у людей, положительный эффект на гемодинамику малого круга

кровообращения был зарегистрирован как при легочной артериальной, так и при легочной венозной гипертензии [29 – 33].

В исследовании Zhang и др. (2019) у пациентов с комбинированной пре- и посткапиллярной ЛГ на фоне патологии левых камер сердца наряду со снижением среднего давления ЛА регистрировалось значимое снижение давления заклинивания в ЛА (ДЗЛА) через 6 месяцев после РЧА ЛА, сочетавшееся с уменьшением размера левого предсердия и левого желудочка. Для пациентов с прекапиллярной ЛГ уменьшение в объеме левых камер сердца является нежелательным событием, тогда как у пациентов с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) на фоне патологии левых камер сердца этот эффект будет крайне ценным, в особенности в сочетании со снижением ДЗЛА или конечного-диастолического давления в левом желудочке.

Существенным вопросом остается и определение оптимальных сроков проведения денервации. Так Митрофанова и соавт (2019) при исследовании аутопсийного материала ствола ЛА обнаружили достоверное уменьшение плотности нервных волокон у пациентов III-IV функционального класса (ФК) ХСН по сравнению с больными II ФК ХСН [26].

При длительном течении ЛАГ с формированием высокого ФК и неблагоприятного профиля гемодинамики происходит тяжелое ремоделирование ЛА с формированием дилатации и фиброза ствол ЛА, появлении атеросклеротических бляшек. Закономерно возникает вопрос о точке приложения денервации ЛА, учитывая возможное уменьшение плотности нервных волокон у пациентов с тяжелой ЛАГ, а также необратимость ремоделирования ЛА.

В большинстве случаев денервация ЛА проводилась циркулярно в стволе и устьях правой и левой ЛА без учета возможности повреждения окружающих структур и характера распределения адренергических и холинергических волокон ЛА. До сих пор остается неясным как во время процедуры выбрать правильные точки для нанесения РЧА, оставив неповрежденными парасимпатические нервные ганглии.

В настоящее время количество пациентов с различной этиологией ЛГ в опубликованных исследованиях составляет чуть более 200 во всем мире. Остается

много вопросов относительно эффективности и безопасности радиочастотной денервации ЛА, точности топки воздействия на нервные элементы и вклада в целом денервации в процессы обратного ремоделирования сосудов легких и миокарда.

Методика представляет большой интерес с учетом отсутствия широкой возможности выполнения трансплантации легких у пациентов, уже получающих максимальную ЛАГ- специфическую терапию, а также отсутствия альтернативных методов лечения в настоящее время.

Инвазивность процедуры, значимое ремоделирование как дистальных, так и проксимальных участков ЛА, хрупкость гемодинамики пациентов с ЛАГ требует создания максимально безопасного метода лечения, обладающего устойчивой эффективностью. Теоретически, расширенная циркулярная денервация ЛА может приводить к большому объему повреждения стенки ЛА, её дальнейшему фиброзу, потере растяжимости, что в свою очередь, ассоциировано с неблагоприятным прогнозом при ЛАГ и летальностью [19].

Список клинических исследований по денервации легочной артерии с использованием различных подходов и технологий приведен в таблице 1 и на рисунках 1-5. [36-39].

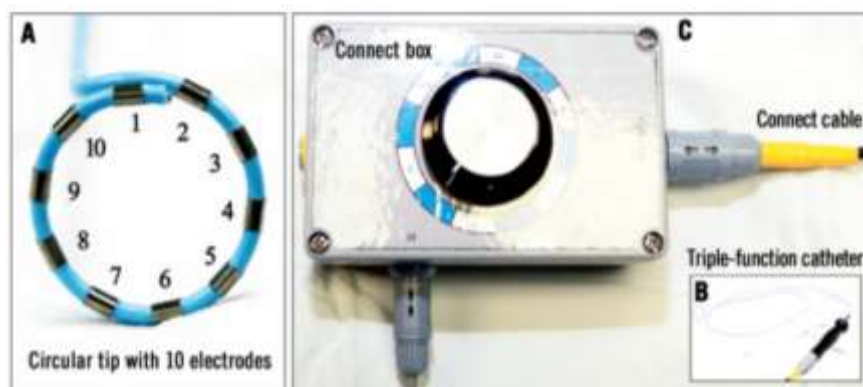


Рисунок 1 - Радиочастотная система чрескожной денервации легочной артерии  
 Примечание: Специальный катетер с тройной функцией 7,5 F имел конический (до 5 Fr) круглый наконечник с предварительно установленными 10 электродами (каждый имеет ширину электрода 0,75 мм и разделен 2 мм). Круглый наконечник состоит из внутреннего кольца и внешнего кольца, на которых электроды соединены с генератором [10]



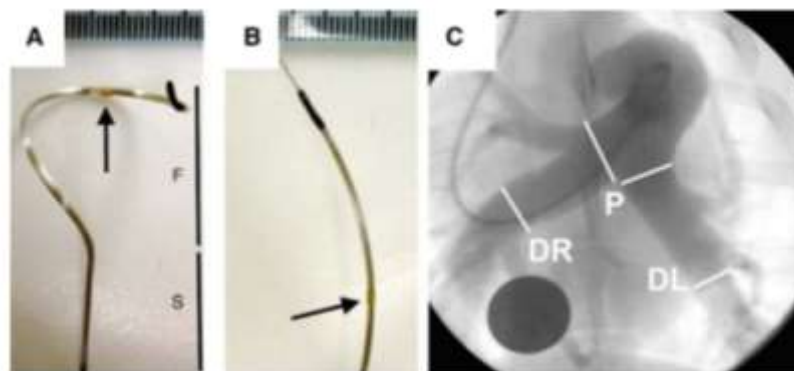


Рисунок 2 - Прототип радиочастотного катетера (Medtronic Inc) с направляющей проволокой 0,014 дюйма

Примечание: (F обозначает нитинол Спирал; S - стержень катетера; стрелка - радиочастотный электрод; шаг шкалы 1 мм) Ангиограмма легочной артерии.

Белые линии представляют собой проксимальную и дистальную границы.

Проксимальный (P) указывает на бифуркацию легочной артерии; левый дистальный (DL), устье задней артерии; и правый дистальный (DR), задняя нисходящая артерия [11]

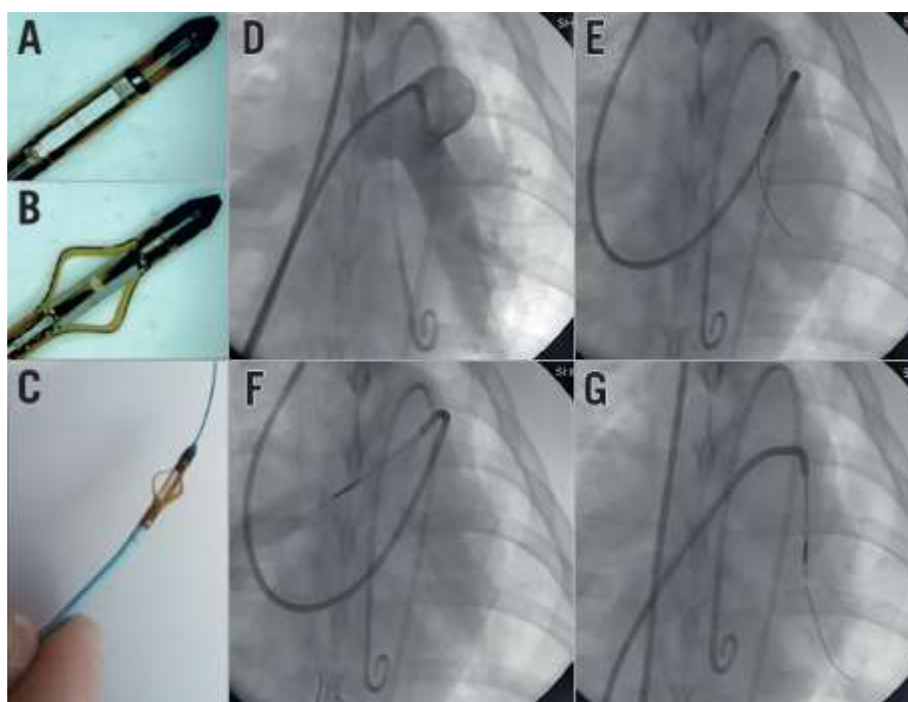


Рисунок 3 - Катетер TIVUS

Примечание: Катетер с дистанционным устройством, закрытым и открытым, на проводе 0,014 дюйма. Рентгеноскопические изображения катетера TIVUS в правой, основной и левой легочных артериях [39, 48]

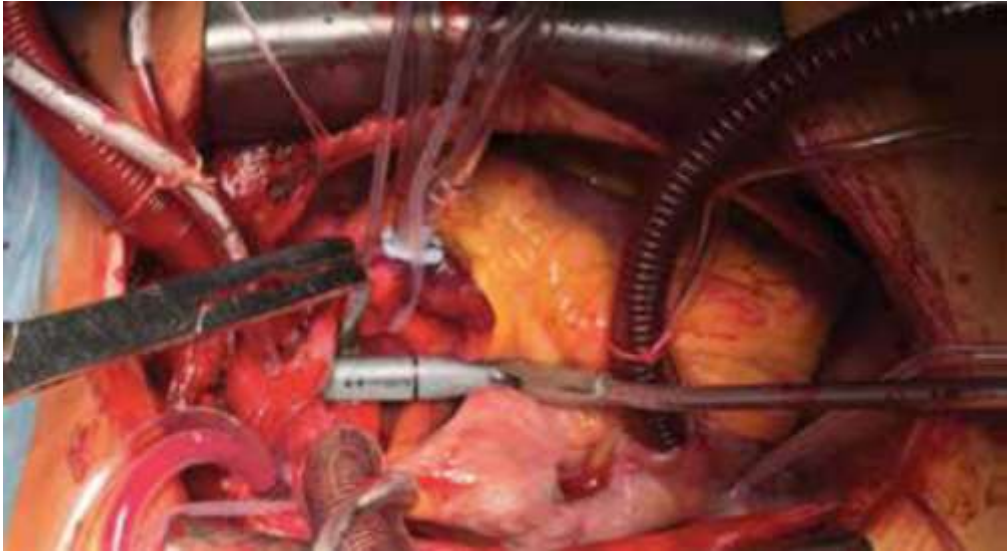


Рисунок 4 – Система Atricure

Примечание: Железнев и соавт. в открытом грудной клетке выполнили радиочастотную абляцию ЛА в проксимальных левой и правой ЛА и в области бифуркации с помощью искусственного кровообращения [36], ЛА – легочная артерия

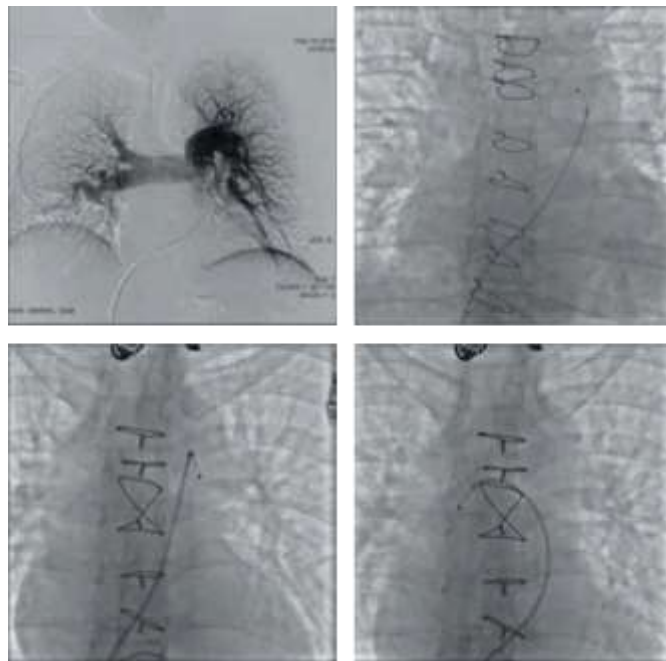


Рисунок 5 – Система Symplicity

Примечание: Руденко и др. на первом этапе денервации легочной артерии выполняли ангиографию для характеристики анатомии легочной артерии. Радиочастотные аппликации применялись в устьях правой и левой легочной артерии [37]

Таблица 1 – Клинические исследования денервации легочной артерии

Исследование	Популяция исследования	Критерии включения	Период наблюдения	Первичные конечные точки	Вторичные конечные точки	Техника ДнЛА	Ключевые результаты
Chen и соавторы (2013)	21 (13/8) иЛАГ=21	Пациенты с иЛАГ, не отвечающие на оптимальную медикаментозную терапию*	3 мес.	Т6МХ, ср.ДЛА	Неблагоприятные клинические события**	Транскатетерная, циркулярная РЧА Т >50°С Энергия=10В, время = 60 с Абляция в стволе и устьях основных ЛА	ср.ДЛА -16 мм.рт.ст. ТШХ +167м отсутствие серьезных осложнений процедуры**

## Продолжение таблицы 1

Chen и соавторы (2015)	66 (66/0) ЛАГ=39 ЛГ II=18 ЛГ IV=9	Пациенты с ЛГ, ср.ДЛА>25 мм.рт.ст., для пациентов с ЛГ II группы дополнительным критерием было ЛСС > 3 ед.Вуда	12 мес.	Гемодинамическое (ДЛА, ЛСС), функциональные (ТШХ), характеристики пациента за период наблюдения	Неблагоприятные клинические события**	Транскатетерная, циркулярная РЧА Т >45°С, Энергия<20В, время = 120 с Абляция в стволе и устьях основных ЛА	ср.ДЛА - 8.5 мм.рт.ст. ЛСС -7.9 ед Вуда ТШХ +94±73 м отсутствие серьезных осложнений процедуры**
------------------------	--	--	---------	---	---------------------------------------	--	---

## Продолжение таблицы 1

Zhang и соавторы (2019)	98 (48/50) ЛГ II=98	Пациенты с ЛГ II группы  ср.ДЛА>25 мм.рт.ст,  ДЗЛА >15 мм.рт.ст., ЛСС>3 ед.Вуда	6 мес.	Изменения ТШХ за период наблюдения	Изменение ЛСС за период наблюдения	Транскатетерная, циркулярная РЧА Т >45°С  Энергия<20В, время = 120 с  Абляция в стволе и устьях основных ЛА	ТШХ +83м  ЛСС с 6.38±3.19 до 4.2±1.5 Ед.Вуда
-------------------------	------------------------	---	--------	------------------------------------	------------------------------------	--	--

## Продолжение таблицы 1

Железнев и соавторы (2016)	30 (15/15) ЛГ II=30	Порок МК, МН, требующий коррекции; ср.ДЛА > 40 мм.рт.ст. периоперационно	Ранний послеоперационный период 24-48 часов	ср.ДЛА	Послеоперационная летальность, послеоперационные осложнения, ТШХ	Интраоперационно, на открытом сердце, с использованием биполярного радиочастотного зажима AtriCure Линейные аппликации в области ствола и основных ЛА	ср.ДЛА снизилось с 48,1±10,2 до 29.8±4.4 мм рт.ст. ТШХ +12м отсутствие серьезных осложнений процедуры
----------------------------	------------------------	--	--	--------	--	--	---

## Продолжение таблицы 1

Руденко и соавторы (2018)	12 (12/0) ЛГ IV=12	ЛГ (ср.АД в ЛА по данным ЭХО-КГ $\geq 25$ мм.рт.ст) после тромбэндартректомии по поводу ХТЭЛГ	12 мес.	ТШХ, ср.ДЛА, ЛСС	Неблагоприятные клинические события (перфорация ЛА, кровотечения, тромботические осложнения)	Транскатетерная, «точка за точкой» РЧА (система Symplicity)	ср.ДЛА снизилось с $48 \pm 10$ до $31 \pm 6$ мм.рт.ст., ЛСС снизилось с $8,6 \pm 2,1$ до $3,2 \pm 1,4$ Ед.Вуда ТШХ прирост с $251 \pm 81$ до $387 \pm 51$ отсутствие серьезных осложнений процедуры
---------------------------	-----------------------	---	---------	------------------	--	---	---

## Продолжение таблицы 1

Фещенко и соавторы (2019)	20 (20/0) ЛГ II=20	ЛГ (систолическое АД в ЛА по данным ЭХО-КГ >35 мм.рт.ст), ХСН (NYHA ≥2)	12 мес.	ТШХ, ср.ДЛА, ЛСС	Неблагоприятные клинические события (перфорация ЛА, кровотечения, тромботические осложнения)	Транскатетерная, «точка за точкой» криоабляция Т >-80°С, время = 120 с Абляция в устьях основных ЛА	ср.ДЛА снизилось с 40 до 31 мм.рт.ст. ЛСС снизилось с 5,6 до 3,9 ед.Вуда ТШХ + 33 м  отсутствие серьезных осложнений процедуры
---------------------------	-----------------------	---	---------	------------------	--	--	--



## Продолжение таблицы 1

Rothman и соавторы (2020)	23 (23/0)	Пациенты с ЛАГ с отрицательным вазореактивным тестом, получающие комбинированную ЛАГ-специфическую терапию	1 мес. для первичных конечных точек, 4 или 6 месяцев для оценки параметров гемодинамики и ТШХ, 12 мес для оценки течения ЛАГ	Неблагоприятные клинические события (перфорация ЛА, кровотечения, тромботические осложнения, стеноз ЛА, аневризма ЛА)	Параметры гемодинамики (ЛСС, ср.ДЛА, давление в ПП), ТШХ, клиническое течение ЛАГ	Транскатетерная «точка за точкой» ультразвуковая абляция (TIVUS system)	Неблагоприятные клинические события отсутствовали и  ср.ДЛА - 5.1±7.4 мм.рт.ст.  ТШХ +671±1,555м
---------------------------	-----------	--	--	---	---	---	--

## Продолжение таблицы 1

Романов и соавторы (2020)	50(25/25) иЛАГ=50	Пациенты с ХТЭЛГ и средним ДЛА > 25 мм.рт.ст или ЛСС > 400 дин*с*см <sup>-5</sup> , прошедшие процедуру тромбэндартэктомии	12 мес.	Среднее ЛСС	ЭХО-КГ параметры функционирования ПЖ, систолическое ДЛА, среднее ДЛА, ТШХ, неблагоприятные клинические события	Транскатетерная, «точка за точкой» РЧА Энергия = 25 В, время = 60 с	ср.ДЛА снизилось с 35 ± 9 до 26 ± 7 мм.рт.ст. ЛСС снизилось с 600 ± 151 до 342 ± 149 дин*с*см <sup>-5</sup> отсутствие серьезных осложнений процедуры
---------------------------	----------------------	--	---------	-------------	--	--	---

Примечание: \* Снижение среднего ДЛА < 5 мм.рт.ст и/или прирост ТШХ < 50м на оптимальной терапии \*\*Перфорация, диссекция ЛА, острый тромбоз, смертность от всех причин, регоспитализации, связанные с ЛАГ, трансплантация легких. ЛГ — легочная гипертензия, иЛАГ — идиопатическая легочная артериальная гипертензия, ДнЛА — денервация легочной артерии, ДЛА — давление в легочной артерии, сДЛА — систолическое давление в легочной артерии, срДЛА — среднее давление в легочной артерии, ДЗЛА — давление заклинивания легочной артерии, ЛСС — легочное сосудистое сопротивление, ФП — фибрилляция предсердий, ТШК — тест шестиминутной ходьбы, ПЖ — правый желудочек, МК — митральный клапан, МН — митральная недостаточность, ХТЭЛГ — хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия, РЧА — радиочастотная абляция, мес – месяцев, ЛА – легочная артерия

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Дизайн исследования

Исследование было разделено на четыре блока. В экспериментальную работу было включено 35 животных: 25 свиней породы Ландрас и 10 овец породы Катумская, возрастом около 3 месяцев. В пилотное клиническое исследование у пациентов было включено 3 больных с ЛАГ.

Первый блок работы включал разработку метода стимуляционного картирования легочной артерии с помощью высокочастотной и низкочастотной стимуляции на животных (17 свиней) и гистологической оценки стенки артерии и периваскулярных нервов в местах реакции частоты ритма на стимуляцию.

Второй блок состоял из пилотного применения стимуляционного картирования у пациентов с ЛАГ в проспективном наблюдательном исследовании.

Третий блок состоял из радиочастотной денервации легочной артерии у нормотензивных крупных животных (8 свиней) для изучения острых эффектов радиочастотной аблации периваскулярных нервов легочной артерии о оценки ограничений РЧ аблации, потенциально ассоциированных с субоптимальной денервацией.

Четвертый блок включал изучение возможности лазерной денервации легочной артерии в качестве нового подхода для процедур денервации (10 овец).

Все этапы исследования в блоках 1, 3 и 4 были одобрены комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных (ИАКУК). Второй блок исследования был одобрен этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России и проводился в рамках клинической апробации нового метода лечения, утвержденной Минздравом России.

Работа выполнена в рамках гранта Министерства науки и высшего образования №075-15-2020-800 «Разработка новых технологий профилактики и лечения сердечной недостаточности на основе нейромодуляции».

## 2.2 Описание исследования

### **Блок I – Разработка метода стимуляционного картирования легочной артерии**

Этот этап был запланирован для оценки возможности определения расположения нервов в адвентиции легочной артерии и периваскулярных нервов путем внутрисосудистой стимуляции. В местах реакции частоты ритма сердца и/или артериального давления на стимуляцию на эндотелиальную поверхность легочной артерии наносились метки радиочастотным током. Эти воздействия радиочастотным током наносились не с целью повреждения нервов, а создавались для дискретного поверхностного повреждения легочной артерии – создания меток точек стимуляции для идентификации на аутопсии. Эксперименты проводились на свиньях весом 35-45кг породы Ландрас. Методика проведения эксперимента включала следующие этапы:

Доступ к правой яремной вене и доступ к правой наружной сонной артерии были выполнены под общей анестезией в положении лежа на спине. Интродьюсер 7F (AVANTI® +, Кордис, Флорида, США) был введен в правую внутреннюю яремную вену. Ангиография легочной артерии была выполнена с использованием многоцелевого ангиографического катетера под рентгеноскопическим контролем (Multipurpose, Cordis, США), а инвазивная манометрия проводилась с использованием баллонного катетера (Corodyn™ P2, BRAUN, Мельзунген, Германия).

После ангиографии легочной артерии выполнялось стимуляционное картирование с помощью управляемого аблационного катетера с открытым контуром орошения (Celsius THERMOCOOL, Biosense Webster, Калифорния, США) и программируемого электрофизиологического стимулятора ЭЛКАРТ (Электропульс, Томск, Россия).

Стимуляция с помощью электрофизиологического аблационного катетера выполнялась в зоне бифуркации ствола легочной артерии, а также в правой и левой основных ветвях артерии на расстоянии 2-5 см от бифуркации. Стимуляции проводились в точках на удалении  $\geq 5$  мм друг от друга. В каждой точке

выполнялась низкочастотная стимуляция (НЧС) с длительностью цикла 333 мс (180 ударов в минуту) при 10 В и 1 мс для оценки возможного захвата стимуляцией предсердного миокарда или миокарда выходного тракта правого желудочка, что свидетельствовало о непосредственной близости этих структур к точке расположения аблационного электрода.

При отсутствии захвата стимуляцией миокарда выполнялась высокочастотная стимуляция (ВЧС) 33 Гц (10В, 1мс) в течение 10 секунд. Если отмечался захват миокарда НЧС, то в этой точке не проводилась ВЧС из-за риска индукции фибрилляции предсердий или желудочков, соответственно.

Стимуляционное картирование выполнялось в непосредственной близости от выходного тракта правого желудочка на стволе легочной артерии, бифуркации и проксимальных частях ветвей легочной артерии с расстоянием между точками 5 мм. В каждом случае точки с вызванными реакциями были отмечены на трехмерной модели легочной артерии. Реакции сердечного ритма оценивались как изменение длины цикла (интервала RR)  $\geq 20$  мс во время или сразу после ВЧС. Чтобы подтвердить воспроизводимость реакций, высокочастотная стимуляция была выполнена не менее двух раз в каждой точке.

Трехмерные модели легочной артерии, полученные от всех животных, были объединены в одну для окончательного анализа. Участки с вызванными реакциями были отмечены на стенке легочной артерии с помощью дискретной радиочастотной аблации (РЧА) 40 Вт;  $\leq 30$  с; орошение 30 мл / мин (АТАКР® II RF Power generator, Medtronic, MN, США). Стабильность положения катетера оценивалась с помощью рентгеноскопии и ручного усилия при установке кончика катетера. На участках аблации выполнялась повторная ВЧС для оценки воспроизводимости реакции частоты ритма после аблации.

Гемодинамический мониторинг был начат после введения сосудистого интродьюсера и продолжен на протяжении всей процедуры. Были выполнены измерения на исходном уровне и через 10 минут после РЧА: частота сердечных сокращений (ЧСС), инвазивное системное артериальное давление (ИСАД), центральное венозное давление (ЦВД) и среднее давление в ЛА (ср.ДЛА). Во

время ВЧС проводился гемодинамический мониторинг для изучения возможных изменений параметров в результате электростимуляции.

После аблации с созданием маркеров на эндотелии ЛА были выполнены гемодинамические измерения для оценки вероятного влияния дискретных аппликаций на изменения параметров.

После экспериментальной процедуры проводилась эвтаназия путем внутрисердечной инъекции хлорида калия. Выполнялась срединная стернотомия, сердце с легочными артериями и легкими извлекалось. ЛА вскрывалась вдоль по ее ходу, начиная от выходного тракта правого желудочка, через ствол легочной артерии, ее основные ветви и до субсегментарных ветвей. Макроскопическое исследование ствола легочной артерии, левой и правой легочных артерий выявляло участки аблации.

Для гистологического и иммуногистохимического исследования образцы ЛА с маркерами РЧА были взяты из ствола ЛА, бифуркации и обеих легочных артерий. Образцы фиксировались в 10% забуференном формалине стандартным методом; микропрепараты были окрашены гематоксилином и эозином.

Иммуногистохимическое «окрашивание» проводилось с использованием следующих антител: для обнаружения нервных волокон и ганглиев - белок анти-S100 (DakoCytomation, Дания); для маркера симпатических нервов – анти-тирозингидроксилаза (ТН, Abcam, США); для парасимпатических нервных волокон – анти-ацетилхолиновый рецептор M1 (Abnova, Германия); и для идентификации дофаминового рецептора - анти-D5 (Santa Cruz Biotechnology, США). Морфометрический анализ проводился с использованием анализатора изображений Leica Application Suite V 4.5.0 и Leica Scope (Leica, Германия). Иммуногистохимическое окрашивание оценивалось полуколичественно по следующим критериям: «окрашивание» > 75% клеток - 3 балла; от 25 до 75% ячеек - 2 балла; от 5 до 24% ячеек - 1 балл; <5% – 0 баллов. Выражения маркеров в нервных волокнах были показаны как среднее  $\pm$  стандартное отклонение.

## **Блок II – Пилотное клиническое исследование денервации легочной артерии с применением стимуляционного картирования**

На основании полученных данных на первых двух этапах экспериментальной работы проведено пилотное клиническое исследование денервации ЛА с использованием чрессосудистого стимуляционного картирования. Целью данного раздела явилась оценка воспроизводимости реакций частоты ритма и артериального давления на стимуляцию ЛА, а также безопасности данного подхода.

Проведено вмешательство у трех пациенток с идиопатической ЛАГ. Информированное согласие на участие в исследовании было подписано пациентами перед процедурой. Протокол исследования был одобрен этическим комитетом Национального исследовательского центра имени В.А. Алмазова.

Критериями включения явились следующие:

- Идиопатическая ЛАГ в стабильном состоянии в течение не менее 3 месяцев.
- Стабильная ЛАГ-специфическая терапия в течение не менее 3 месяцев до включения.
- Подписанное информированное согласие на исследование.

Критериями невключения в исследование были следующие:

- IV функциональный класс ЛГ;
- Нестабильная гемодинамика (систолическое АД <100 мм рт ст);
- Отсутствие лаг-специфической терапии;
- Устойчивая предсердная тахикардия (трепетание/фибрилляция предсердий);
- Острые воспалительные заболевания;
- Клинически значимые сопутствующие заболевания;
- Психические расстройства;
- Беременность/кормление грудью.

Стимуляционное картирование ЛА и абляция. Картирование и процедура абляции проводились в рентген-операционной натошак. Правый бедренный доступ был выполнен под местной анестезией. В ЛА был введен многоцелевой

неуправляемый интродьюсер 8 F (Preface Multipurpose, Cordis, США), а затем введен орошаемый аблационный катетер с наконечником 3,5 мм (NaviStar ThermoCool, Biosense Webster, США) с магнитным датчиком.

Процедура была выполнена под электроанатомическим контролем (CARTO 3, Biosense Webster, США) с трехмерной реконструкцией ствола ЛА, его бифуркации и проксимальных отделов правой и левой легочных артерий.

Стимуляция проводилась в области 15 мм проксимальнее бифуркации и 15 мм дистальнее бифуркации, с расстоянием 5-6 мм между каждой точкой стимуляции. Каждая точка стимуляции была отмечена на электроанатомической карте. Стимуляция была проведена с помощью аблационного катетера, подключенного к программируемому электрофизиологическому стимулятору EPS320B (Micropace, Австралия). Параметры тока составили 33 Гц, 15 мА и длительность импульса 1 мс; серии стимуляции были от 7 до 10 с. Перед каждой серией высокочастотной стимуляции сначала применяли стимуляцию с длиной цикла 500 мс, чтобы исключить возможный захват миокарда предсердий или желудочков и предотвратить индукцию тахикардии путем прямой стимуляции миокарда.

Радиочастотная абляция была выполнена с использованием радиочастотного генератора Stockert (Biosense Webster, США) со следующими параметрами: 30 Вт, орошение 17 мл / мин, аппликации 15–30 с. После стимуляции и перед первой абляцией был введен фентанил внутривенно (болюс 0,1 мг с дополнительными введениями при необходимости).

После абляции ЛА интродьюсеры были удалены; все пациенты находились под наблюдением до следующего утра в реанимации. Антикоагуляция прямым пероральным антикоагулянтом (апиксабан 5 мг дважды в день) была начата после достижения гемостаза и продолжалась минимум 2 месяца для профилактики тромбообразования в местах абляций ЛА.

Гемодинамические измерения выполнялись через правый подключичный доступ с использованием катетера 7F Swan Ganz (Corodyn TD, B. Braun Medical Ltd., Германия). Катетер ArterioFix (B. Braun Medical Ltd., Германия) был помещен в левую лучевую артерию. Образцы крови для оценки насыщения



кислородом были взяты из ЛА и лучевой артерии.

Инвазивная гемодинамика и оксиметрия измерялись перед аблацией ЛА, сразу после аблации, через 6 и 12 месяцев. Сердечный выброс был определен с помощью уравнения Фика. Легочное сосудистое сопротивление рассчитывался по следующей формуле:  $LCC = [80 \times (\text{среднее давление ЛА} - \text{ДЗЛК})/СВ]$ , ДЗЛК: давления заклинивания легочных капилляров; СВ: сердечный выброс.

Контрольные визиты были назначены через 6 месяцев после аблации, а плановая госпитализация с катетеризацией сердца была выполнена через 12 месяцев. Во время визитов проводилось стандартное физикальное обследование, тест NT-proBNP (Elecsys, Roche Diagnostic GmbH, Германия), трансторакальная эхокардиография (Система VIVID 7, GE, США), тест с шестиминутной ходьбой и кардиореспираторное тестирование (Oxycon Pro, CARDINAL HEALTH, Германия).

### **Блок III – Радиочастотная денервация легочной артерии у нормотензивных животных**

В связи с тем, что результаты денервации ЛА в отношении снижения ДЛА в блоке II у 2 из 3 пациентов оказались субоптимальными, необходимо было удостовериться в достаточности/эффективности транссосудистой радиочастотной аблации для деструкции нервов адвентиции ЛА. Данный этап проводился для оценки микроскопического повреждения периваскулярных нервов при денервации ЛА у нормотензивных животных, а также для оценки возможных негативных гемодинамических реакций денервации в условиях исходной нормотензии. Методика проведения эксперимента включала следующие этапы:

- подготовительные этапы индукции наркоза, анестезии,
- катетеризации и гемодинамического мониторинга описаны в первом разделе «Разработка метода стимуляционного картирования легочной артерии»,
- электрофизиологическое стимуляционное картирование ЛА,
- катетерная РЧА легочной артерии на основании результатов картирования (не наносились воздействия в зонах навязывания стимуляции на диафрагмальные и

- возвратные гортанные нервы, миокард желудочков и предсердий),
- повторное измерение параметров гемодинамики (через 20 минут после последней радиочастотной аппликации),
  - эвтаназия,
  - макроскопическое, гистологическое и иммуногистохимическое исследование образцов ЛА.

В данном блоке денервация ЛА выполнена у 8 свиней породы Ландрас весом 35-45 кг. Денервация ЛА (40 Вт; 40 с; орошение 30 мл / мин – АТАКР®II RF, Power generator, Medtronic, MN, США) была выполнена в стволе ЛА и в проксимальных частях левой и правой основных ветвей, где были зарегистрированы реакции на высокочастотную стимуляцию. Отличительной характеристикой этого блока исследования явилось направленное глубокое повреждение ЛА с целью ее денервации, тогда как в первом блоке аппликации наносились для создания поверхностного повреждения эндотелия и маркировки зон для последующего гистологического исследования сохранных глубоких слоев стенки ЛА.

После экспериментальной процедуры все свиньи были умерщвлены внутрисердечной инъекцией хлорида калия, протокол гистологического и иммуногистохимического исследования представлен в разделе 1.

#### **Блок IV – Лазерная катетерная денервация легочной артерии у нормотензивных животных**

Данный этап исследования был запланирован в связи с тем, что нами предположен недостаточный эффект радиочастотной денервации ЛА на основании анализа результатов, полученных в блоке III (оценка повреждения стенки ЛА в эксперименте), а также в блоке II (клиническая оценка радиочастотной денервации ЛА). Значительное повреждением эндотелиального слоя и медики стенки ЛА при РЧА и, при этом, недостаточное повреждение адвентиции и периваскулярной ткани с нервами могут свидетельствовать о недостатках радиочастотного тока в достижении задачи денервации сосуда. Более

глубокое проникновение повреждающего воздействия, при этом с более щадящим воздействием на слои стенки ЛА требуется для безопасной и эффективной денервации.

Для оценки возможности применения фиброоптической лазерной абляции с целью денервации ЛА выполнялись эксперименты на овцах. Овечья модель для экспериментов была выбрана на основании данных, свидетельствующих о большей схожести диаметра и глубины расположения нервов овцы с таковыми у человека в зоне бифуркации легочной артерии; в то время как у свиней сходного веса различия более выражены. При лазерной абляции светопоглощение ткани определяет характеристику повреждения на необходимой глубине, следовательно, для лазерной чрессосудистой денервации *in vivo* ЛА овец является более подходящей [Alexander VV и соавт. 2014].

Эксперименты проводились на 10 овцах породы Катумская весом 35-45кг. Методика проведения эксперимента включала несколько этапов. Предоперационное подкожное введение 5000 ЕД гепарина для снижения риска тромбообразования. Чрескожный сосудистый доступ был выполнен под общей анестезией (внутримышечно тилетаминотом и золазепамом, 4-7 мг / кг для индукции; и изофлураном 100%, 1,5-2%, с O<sub>2</sub> через эндотрахеальную трубку со скоростью 7 мл / мин). Интродьюсер 7F (AVANTI® +, Кордис, Флорида, США) был помещен в правую бедренную артерию для мониторинга системного артериального давления, а управляемый интродьюсер (Agilis™ NxT, St.Jude Medical, Миннесота, США) был введен в правую бедренную вену для катетеризации легочной артерии.

Ангиография легочной артерии выполнялась с использованием многоцелевого ангиографического катетера (Multipurpose, Cordis, США). Все манипуляции проводились под рентгеноскопическим контролем (BV Endura C-Arm, Philips, Veerpluis, Нидерланды), и желудочный зонд был помещен для предотвращения аспирации.

Образцы крови брали для контроля активированного частичного тромбопластинового времени вначале, а затем каждые 30 минут. Дозирование

гепарина выполнялось с достижением целевого времени  $\geq 300$  секунд. Мониторинг электрокардиограммы выполнялся на протяжении всей процедуры, а желудочная аспирация – каждые 20 минут.

Для разработки протокола денервации легочной артерии использовался лазерный источник MediLas D1064 Cardiovascular Laser Application (LasCor GmbH, Тауфкирхен, Германия) и прототип неуправляемого лазерного катетера (Рисунок 6-7) с открытым контуром орошения (изготовлен «ИнЛазтехМед», Москва, Россия). Лазерные аппликации наносились в стволе ЛА и проксимальных областях правой и левой ЛА с расстоянием 5 мм между точками с использованием различных диапазонов энергии и времени аппликации (Рисунок 8), чтобы определить оптимальные настройки параметров для процедуры лазерной денервации ЛА.

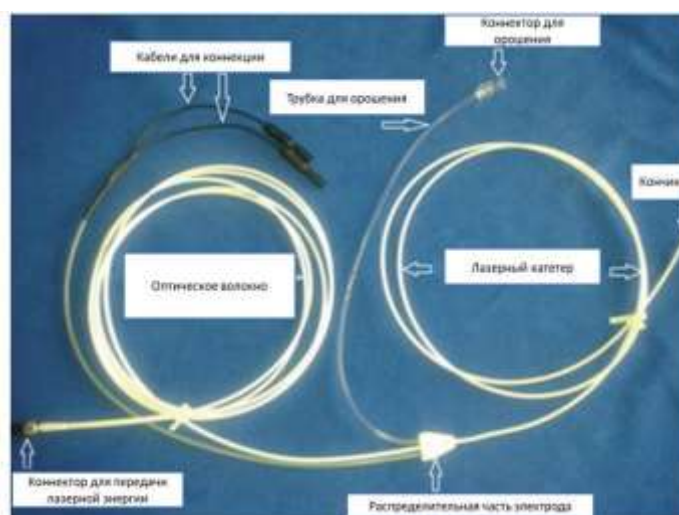


Рисунок 6 – Прототип фиброоптического катетера для лазерной абляции

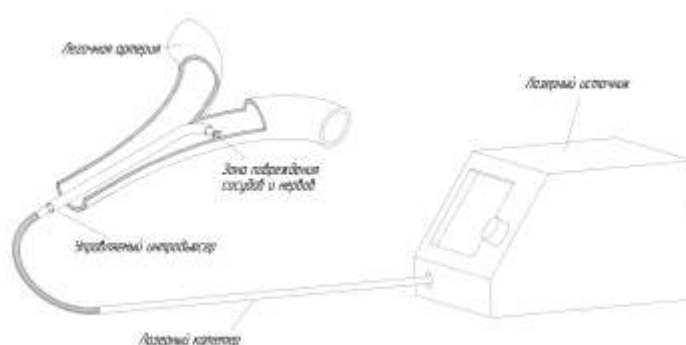


Рисунок 7 – Схематическое изображение процедуры лазерной денервации легочной артерии с помощью прототипа фиброоптического катетера

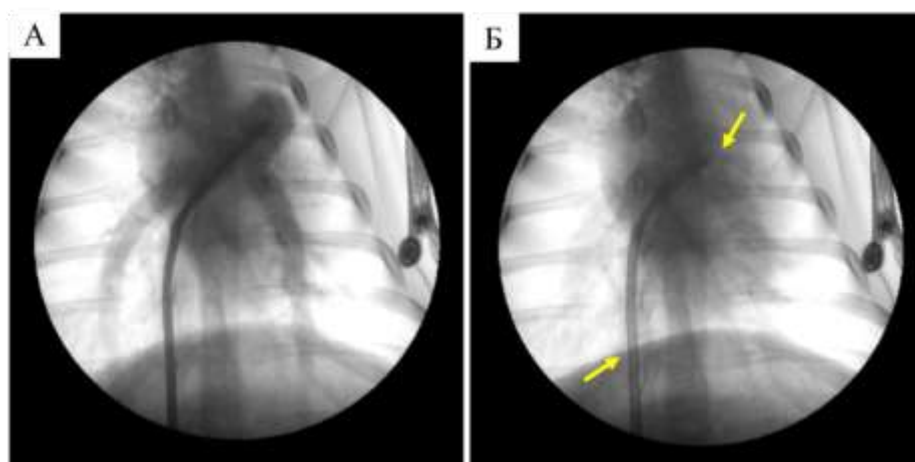


Рисунок 8 – Внутриоперационное флюороскопическое изображение лазерной абляции легочной артерии у овцы

После экспериментальной процедуры все овцы были умерщвлены внутрисердечной инъекцией хлорида калия. Была выполнена срединная стернотомия, извлечено сердце с легочными артериями и легкими. ЛА рассекалась по ее ходу, начиная от выходного тракта правого желудочка, через ствол ЛА, ее основные ветви и до субсегментарных ветвей. Макроскопическое исследование ствола ЛА, левой и правой легочных артерий выявило очаги абляции. Протокол гистологического и иммуногистохимического исследования упоминается разделе 1.2.

### 2.3 Статистический анализ полученных данных

База данных была создана в программе MS Excel. Статистический анализ выполнялся с использованием статистического пакета IBM SPSS Statistics (version 19.0.0, NY, USA). Гемодинамические параметры анализировались с определением изменений после выполнение радиочастотной и лазерной ДЛА. Результаты представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение, либо медиана и 1ый и 3ий квартили, а также в виде абсолютных чисел и процентов. Средние значения сравнивались с использованием парного критерия Стьюдента для нормально распределенных переменных и с использованием критерия Хи-квадрат и Вилкоксона для переменных с непараметрическим распределением. Статистически значимыми считались различия при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1 Стимуляционное картирование легочной артерии

Схема проведения экспериментов и количество животных, участвующих в этапах, представлены на рисунке 9.

#### **Вызванные реакции на фоне стимуляционного картирования легочной артерии в эксперименте**

НЧС идентифицировала области захвата желудочков над выходным трактом правого желудочка, и вероятность захвата миокарда была тем выше, чем ближе место стимуляции к миокарду правого желудочка (Рисунок 10). Поскольку ВЧС в этих областях могла вызвать фибрилляцию желудочков, ВЧС не применялась. Передние стенки левой и правой основных ветвей ЛА были местами захвата предсердий даже при слабом токе (с уменьшением напряжения до 3–4 В, ширина импульса 1 мс).

Таким образом, захват предсердного миокарда подтверждал тесное взаимное расположение передних отделов ЛА и задней стенкой предсердий. ВЧС в этих точках ассоциировалась с высоким риском индукции фибрилляции предсердий, что не позволяло интерпретировать изменения частоты сердечных сокращений, вызванные стимуляцией. Применение ВЧС избегалось на передних стенках ЛА, где был очевиден захват предсердий. Это не позволяло оценить вызванные вегетативные нервные реакции в этих областях (Рисунок 11а).

Во время ВЧС были зарегистрированы следующие вызванные реакции (Таблица 2): увеличение частоты ритма предсердий (Рисунок. 11б, верхняя панель), замедление синусового ритма (Рисунок 10а), захват левого или правого диафрагмального нерва, определяемый видимым и ощутимым пальпаторно сокращением диафрагмы, и захват возвратного нерва гортани определяется видимым сокращением внутренних мышц гортани.

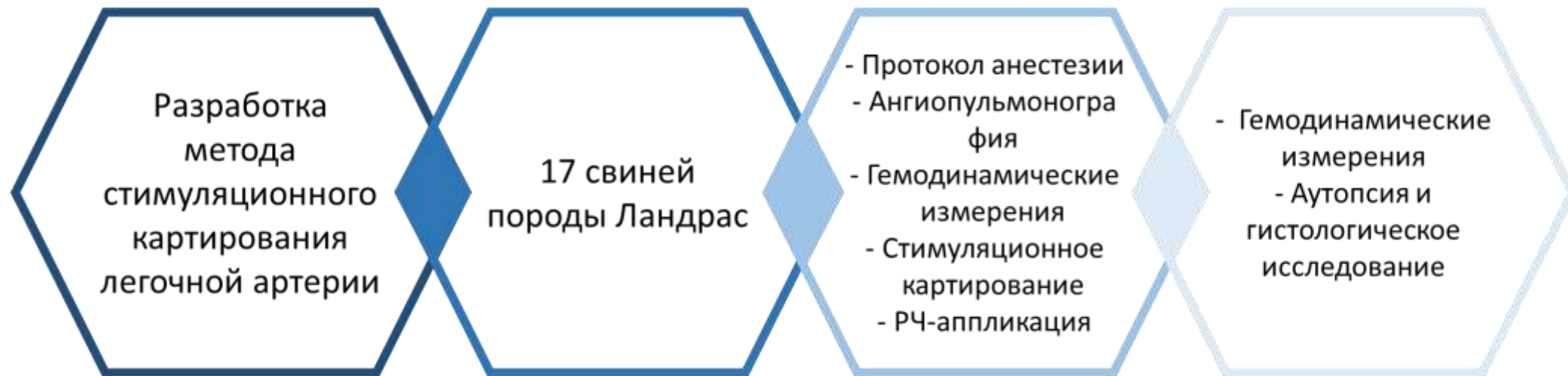


Рисунок 9 – Схема выполнения исследования в блоке I

Во время ВЧС происходил захват левого и правого диафрагмального нервов у всех животных на передней стенке ствола ЛА и проксимальной части левой и правой ЛА, и ход нервов был отмечен на трехмерной модели. Захват возвратного нерва гортани обнаружен у 4 (23%) животных в непосредственной близости от передней стенки в бифуркации основной ЛА.

Вызванное замедление синусового ритма и увеличение частоты ритма предсердий были обнаружены в проксимальной части правой и левой ЛА во время ВЧС в 10 (59%) случаях. После РЧА вызванные реакции на одних и тех же участках ВЧС не воспроизводились во всех случаях (Рисунок 11с и Рисунок 12b).

Гемодинамического ответа системного давления (АД, ср.ДЛА) во время ВЧС не было.

Таблица 2 – Вызванные реакции во время стимуляционного картирования

Параметр	Количество точек с определенной реакцией			
	Замедление синусового ритма	Увеличение частота ритма предсердий	Захват диафрагмального нерва	Захват гортанного возвратного нерва
свинья 1	1	4	1	1
свинья 2	0	5	2	0
свинья 3	0	2	3	1
свинья 4	2	0	4	0
свинья 5	1	0	2	0
свинья 6	0	1	2	0
свинья 7	0	2	2	0
свинья 8	1	1	1	0



## Продолжение таблицы 2

свинья 9	1	3	3	4
свинья 10	1	1	2	0
свинья 11	1	0	3	0
свинья 12	2	0	2	0
свинья 13	1	2	2	0
свинья 14	0	0	4	0
свинья 15	0	0	1	0
свинья 16	0	0	2	1
свинья 17	1	1	1	0

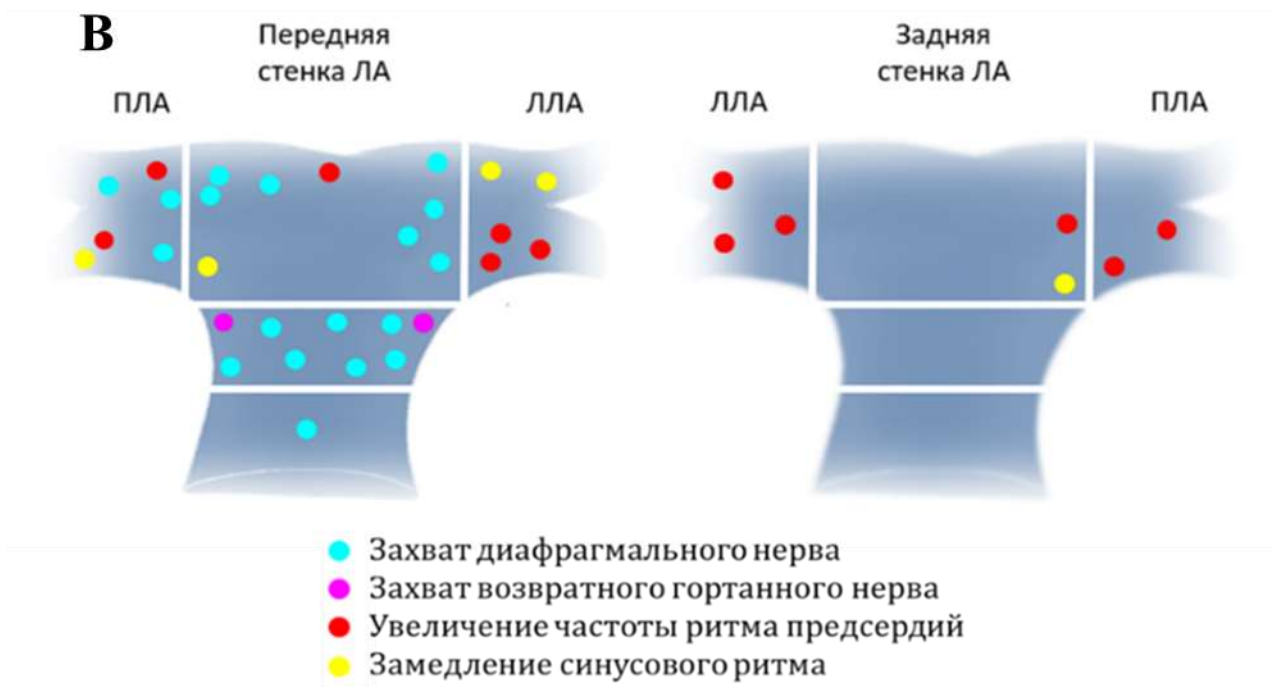
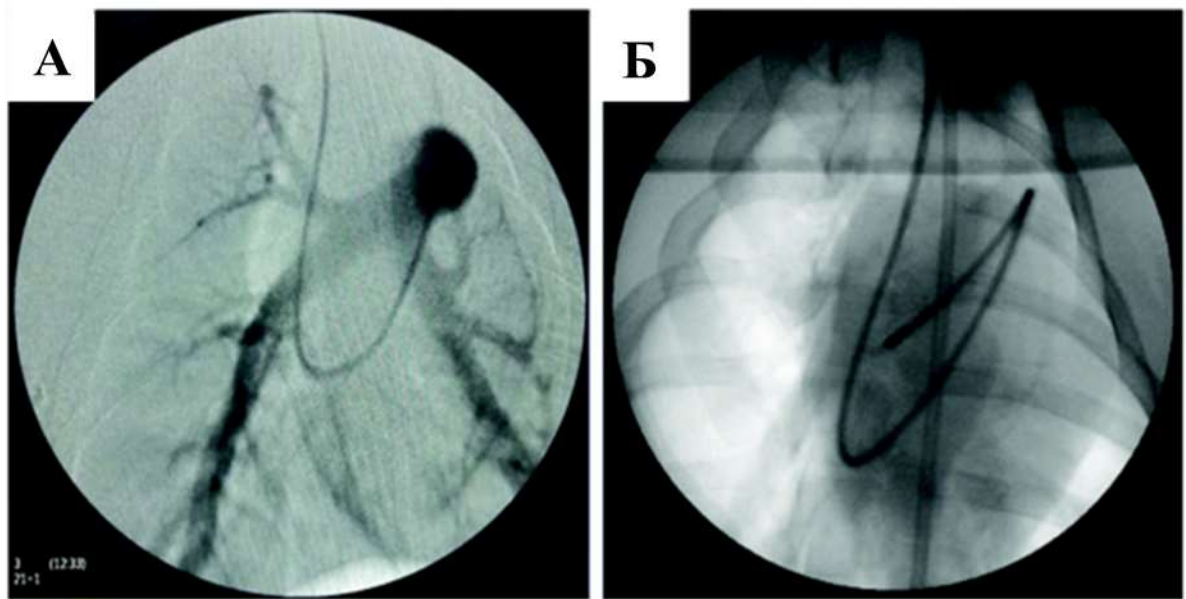


Рисунок 10 – Схематическое изображение легочной артерии

Примечание: А. Ангиография легочной артерии. Б Аблационный катетер помещается в дистальную часть правой легочной артерии. В. Схематическое изображение легочной артерии с точками вызванных реакций. ЛА - легочная артерия, ПЛА - правая легочная артерия, ЛЛА - левая легочная артерия

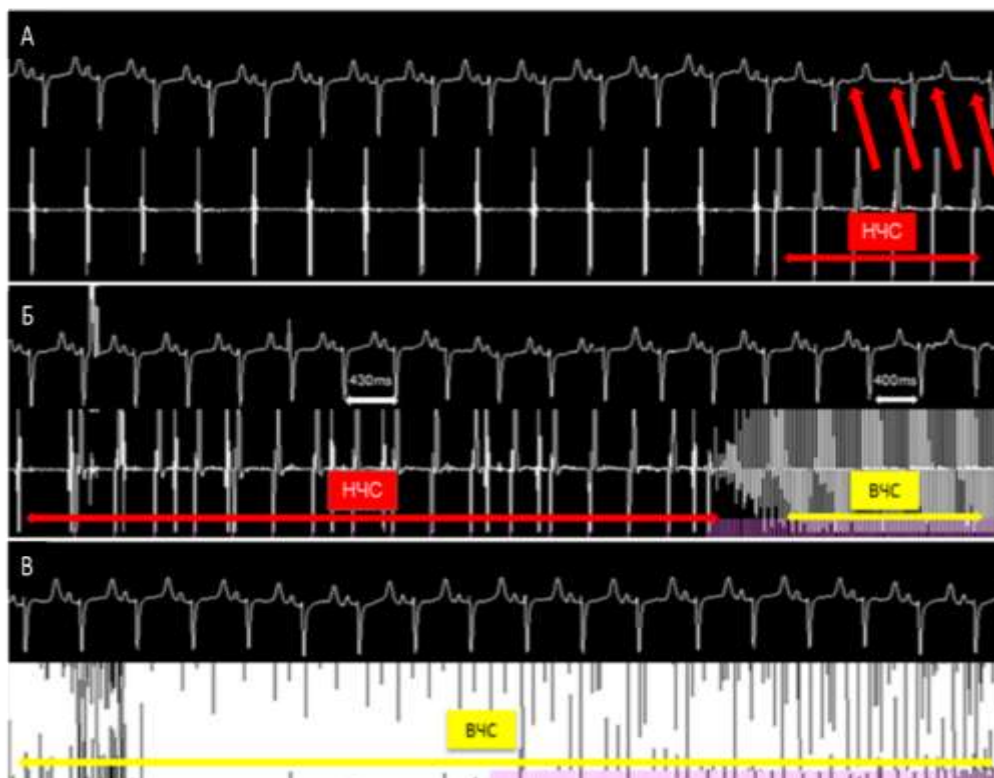


Рисунок 11 – Учащение предсердного ритма при стимуляционном картировании легочной артерии, свинья №17

Примечание: А. НЧС в правой ЛА с захватом предсердного миокарда; верхняя кривая – ЭКГ, нижняя кривая – канал стимулируемого электрода (абляционно-картирующего); исходно регистрируется синусовый ритм и каждому предсердному зубцу Р соответствует отдаленный предсердный потенциал на картирующем электроде; период включения НЧС обозначен на рисунке горизонтальной стрелкой; во время НЧС происходит захват предсердного миокарда и навязанные предсердные зубцы Р указаны косыми красными стрелками. Б. Отсутствует захват предсердий во время НЧС в правой ЛА. Стимуляция переводится в режим ВЧС и на той же кривой, в той же самой точке, ВЧС провоцирует учащение предсердного ритма – сокращение длины предсердного цикла с 430 до 400 мс. В: Абляционный катетер устанавливается в той же зоне, что и на панели Б. После нанесения радиочастотной аппликации повторная ВЧС не приводит к изменению длины предсердного цикла, демонстрируя инактивацию нервов стенки легочной артерии. НЧС - низкочастотная стимуляция, ВЧС - высокочастотная стимуляция

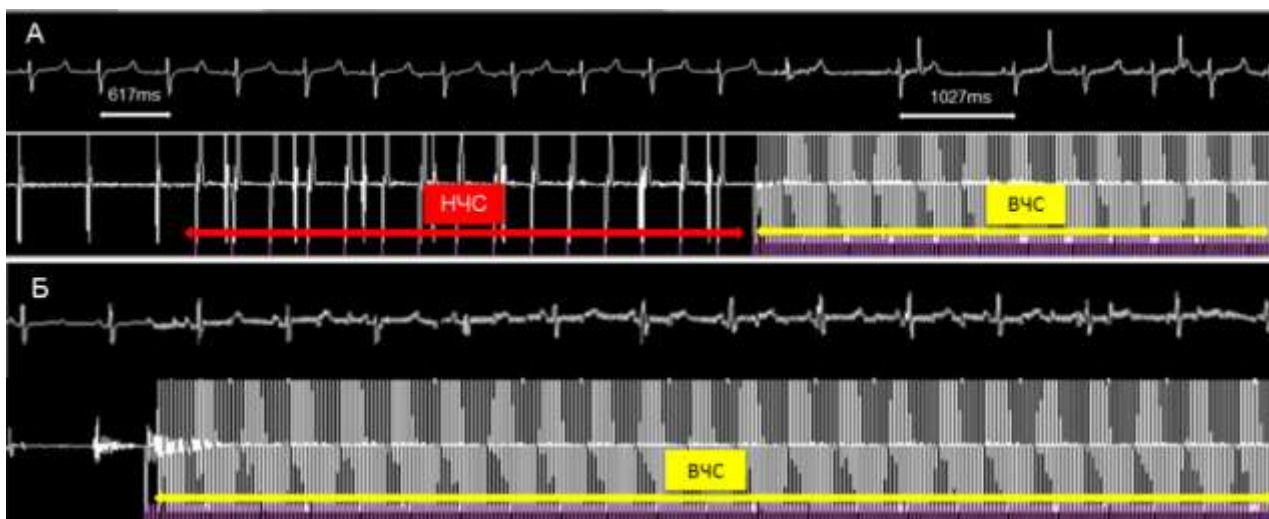


Рисунок 12 – Замедление синусового ритма при стимуляционном картировании легочной артерии, свинья №12

Примечание: А. Отсутствует захват миокарда предсердий или желудочков во время НЧС (обозначена горизонтальной стрелкой красного цвета) в точке правой легочной артерии. ВЧС (обозначена горизонтальной стрелкой желтого цвета) приводит к значительному замедлению предсердного ритма (удлинение цикла с 617 до 1027 мс). Б. Абляционный катетер располагается в той же точке, что и на панели А. После нанесения радиочастотной аппликации повторная ВЧС не приводит к изменению предсердного цикла. НЧС - низкочастотная стимуляция, ВЧС - высокочастотная стимуляция

### **Гемодинамические параметры до и после нанесения радиочастотных меток**

Статистической разницы в гемодинамических параметрах (таблица 3), измеренных до и после нанесения радиочастотных меток на ЛА, не было выявлено. Динамика значений следующих параметров была вычислена после РЧА (разница значения после РЧА минус исходное значение): средняя разница в частоте сердечных сокращений составила -3,00 (IQR – 10,50; 6,50) ударов в минуту; медиана разницы в АД составила 0 (IQR – 9,00; 11,50) мм рт. Средняя разница ЦВД составила 0 (IQR – 2,50; 1,50) мм рт. Средняя разница в срдЛА составила 0 (IQR – 2,50; 2,00) мм рт. Ст.

Таблица 3 – Гемодинамические параметры исходно и после нанесения радиочастотных меток

Параметр	Исходно	После нанесения радиочастотных меток на ЛА	P-значение
ЧСС, уд/мин	101,7±12,5	105±17,5	0,21
ИСАД, мм рт. ст.	72,8±12,4	71,2±10,1	0,62
ЦВД, мм рт. ст.	3,24±3,1	3,53±2,7	0,45
ср.ДЛА, мм рт. ст.	14,06±5,5	14,06±4,5	0,84

Примечание: ЧСС - частота сердечных сокращений, ИСАД - инвазивное системное артериальное давление, ЦВД - центральное венозное давление, ср.ДЛА - среднее давление в легочной артерии, ЛА – легочная артерия

#### **Аутопсия, гистологическое и иммуногистохимическое исследования**

На эндотелиальной поверхности препаратов ЛА было идентифицировано 30 дискретных радиочастотных меток (Рисунок 13). Образцы ЛА, содержащие РЧА метки, были иссечены в пределах нормальной поверхности и направлены на гистологическое и иммуногистохимическое исследования. В образцах были выявлены следующие изменения: париетальные тромбы, очаговый субинтимальный отек меди с расслоением мышечных волокон, диссекции на разную глубину стенки ЛА, кровоизлияния между мышечно-эластическими слоями меди, адвентицией и окружающей жировой тканью (Рисунок 14 А, Б). Выраженность этих изменений варьировала в широком диапазоне. В 4 случаях наблюдался коагуляционный некроз адвентиции, в одном из них – неполное разрушение нервных волокон; во всех случаях нервные волокна и ганглии были обнаружены в адвентиции и жировой ткани. Несмотря на намеренно ограниченное по мощности и длительности радиочастотное воздействие на стенку ЛА отмечались существенные ее повреждения, однако нервные элементы (нервные волокна и ганглии) были внешне сохранены во всех случаях.

Плотность нервных волокон в периваскулярной жировой ткани ЛА составила  $61,6 \pm 11,7$  / см<sup>2</sup>, плотность нервных ганглиев –  $11,6 \pm 5,3$  / см<sup>2</sup>. Средний диаметр нервных волокон составлял  $46,7 \pm 9,4$  мкм, а средний размер нервных ганглиев –  $616,0 \pm 177,6$  мкм. Среднее расстояние от интимы ЛА до нервных волокон составляло  $1530,3 \pm 172,13$  мкм, а до ганглиев –  $3196,2 \pm 1053,6$  мкм. Не было разницы в плотности нервов между периваскулярной тканью боковых стенок ЛА и периваскулярной тканью передней стенки ЛА ( $60,8 \pm 11,8$  / см<sup>2</sup>;  $P > 0,05$ ), где ВЧС не проводилась.

Иммуногистохимическое исследование препаратов ЛА с метками выявило очаговое исчезновение экспрессии M1, TH и D5 в гладкомышечных клетках. Потеря экспрессии нейромаркеров во внешне неизменном нервном волокне может объяснять исчезновение вегетативных реакций на стимуляцию после нанесения радиочастотных меток.

Зоны минимальных и отсутствующих гистологических изменений имели сходные иммуногистохимические характеристики (Рисунок 15). Чаще наблюдалось полное исчезновение экспрессии M1, тогда как экспрессия D5 в стенке ЛА частично сохранялась с мозаичным рисунком.

Маркер S100 был экспрессирован в образцах от 16 из 17 свиней, что свидетельствует о сохранении нервов после коротких РЧА. В целом, экспрессия M1 была наиболее чувствительным маркером повреждения (таблица 4).

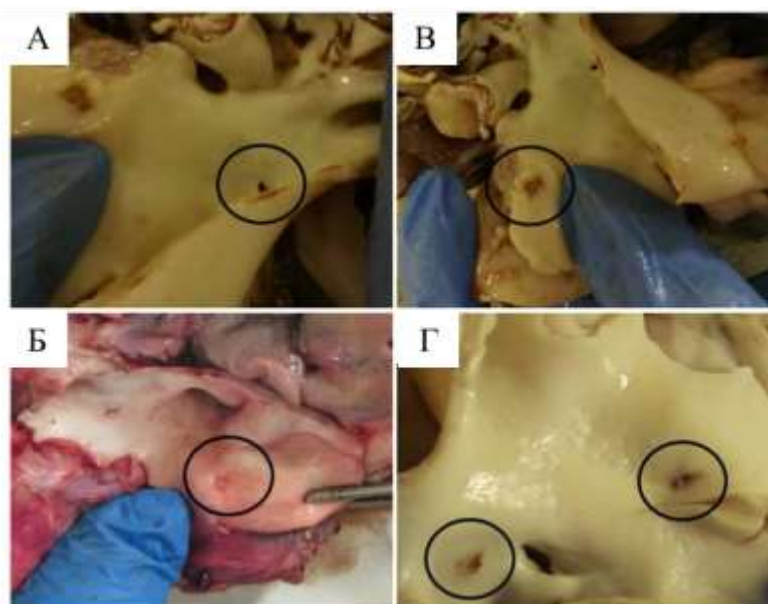


Рисунок 13 – Макроскопическое исследование легочной артерии

Примечание: А. Радиочастотная метка в стволе легочной артерии, свинья №3. Б. Радиочастотная метка, обнаруженная в проксимальной части левой легочной артерии, свинья №9. В Радиочастотная метка в проксимальном отделе левой легочной артерии, свинья №11. Г Две радиочастотные метки, расположенные в проксимальной части левой и правой легочной артерии, соответственно, свинья №

12

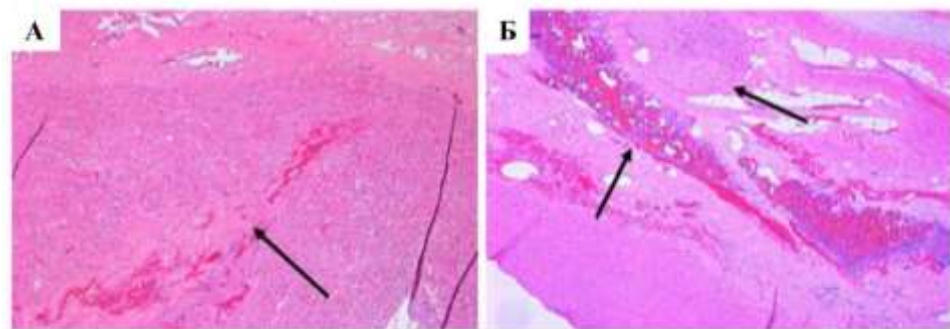


Рисунок 14 – Гистологические срезы легочной артерии, окрашенные гематоксилином и эозином

Примечание: А. Образец легочной артерии с расслоением и кровоизлиянием в среднюю область, достигающим 85% толщины стенки (указано стрелкой);  $\times 100$ .

Свинья №5. Б. Очаговое кровоизлияние в легочную артерию в адвентиции и периваскулярной жировой ткани (30% площади образца). Сохранившееся нервное волокно указано стрелками;  $\times 50$ . Окрашивание гематоксилином и эозином.

свинья №7

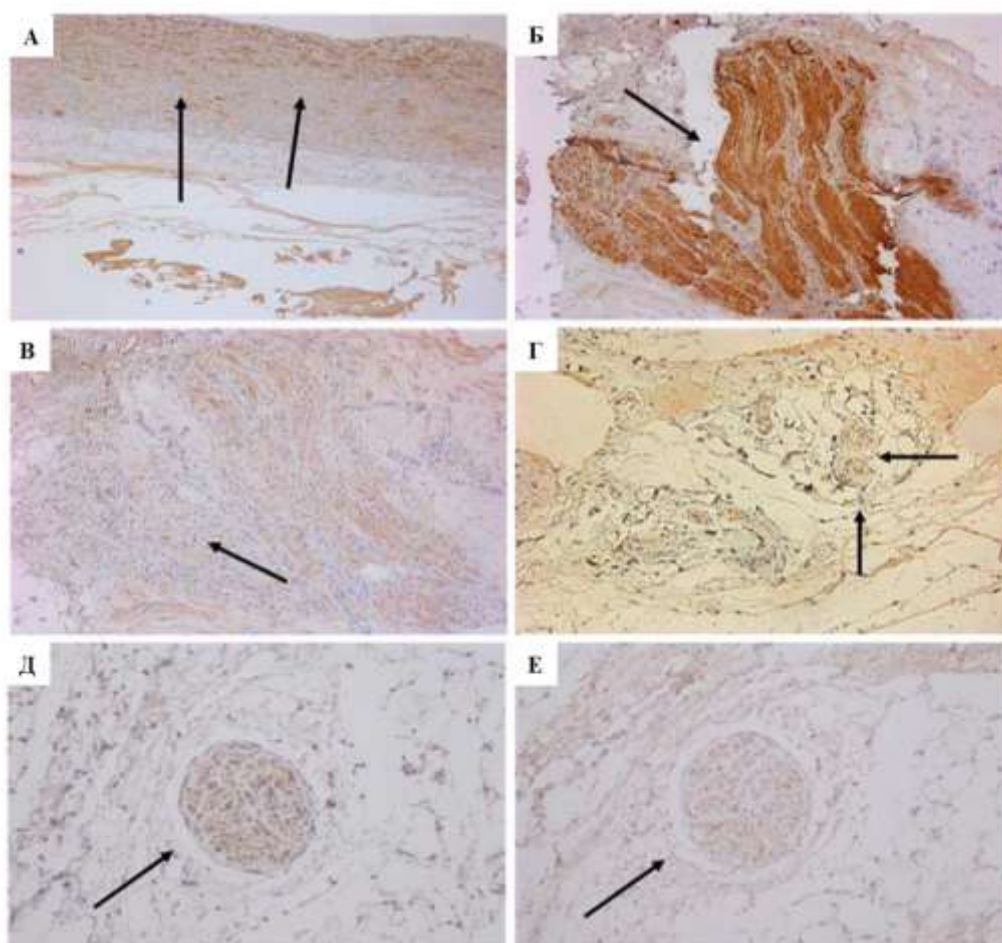


Рисунок 15 – Иммуногистохимическая оценка образца легочной артерии после нанесения радиочастотных меток

Примечание: А. Потеря экспрессии рецептора D5 в 75% гладкомышечных клеток меди (указано стрелками); x50, свинья № 1. Б. Нервные волокна в периваскулярной жировой ткани со 100% экспрессией S100 (коричневый цвет, обозначенный стрелкой) под зоной аблации; x100, свинья №7. В. Нервные волокна в периваскулярной жировой ткани, зоны с потерей экспрессии M1 в 90% клеток (зона потери экспрессии указана стрелкой); x100, свинья № 7. Г. Нервные волокна (обозначены стрелками) в периваскулярной жировой ткани из зоны аблации с потерей экспрессии TH (коричневый цвет) в 85% клеток; x100, свинья №4. Д. Нервное волокно, обнаруженное в периваскулярном жире ЛА, с иммунной меткой M1 (коричневый цвет) x200, свинья №11. Е. Тот же образец, что и на панели Д: нервное волокно с иммунной меткой TH (коричневый цвет); x200, свинья №11



Таблица 4 – Гистологический и иммуногистохимический анализ образцов легочной артерии

№ живот-ного	Радиочастотные-индуцированные поражения ЛА	Экспрессия М1		Экспрессия ТН		Экспрессия D5
		Медия	% нервных волокон	Медия	% нервных волокон	
1	Кровоизлияния, отеки.	1 балл	62.25 ± 9.83%	1 балл	43.8 ± 0.3%.	2-3 балла
2	Кровоизлияния, отеки, расслоения.	2-3 балла	29.21 ± 5.88%	1 балл	5.83 ± 4.58%	2-3 балла
3	Кровоизлияния, отеки, расслоения.	2-3 балла	91.9 ± 11.46%	1 балл	58.9 ± 24.1%	1-2 балла
4	Кровоизлияния, коагуляция.	2 балла	56.17 ± 5%	0 балл	61.35 ± 39.67%	1-2 балла
5	Кровоизлияния, расслоения.	2-3 балла	94.23%	0 балл	73%	2 балла
6	Расслоения, коагуляция.	2-3 балла	81.25%	0 балл	37.5%	1-2 балла
7	Кровоизлияния, коагуляция.	2 балла	100%	1 балл	66.6%	1 балл

Продолжение таблицы 4

8	Кровоизлияния, отеки, расслоения.	2-3 балла	65.35 ± 24.54%	0-1 балла	34.54 ± 0.08%	1-2 балла
9	Кровоизлияния, отеки, расслоения, некрозы.	1-2 балла	45.5 ± 2.12%	0 балл	23.5 ± 24.75%	1 балл
10	Кровоизлияния, расслоения.	1 балл	0%	0 балл	0%	1 балл
11	Кровоизлияния, отеки, расслоения.	1-2 балла	43.9 ± 13.03%	0 балл	27.53 ± 11.5%	1 балл
12	Кровоизлияния, отеки, расслоения, некрозы.	1-2 балла	27.66 ± 9.36%	0 балл	16.91 ± 16.48%	1 балл
13	Кровоизлияния, коагуляция, расслоения.	1-2 балла	60%	0 балл	51.1%	1-2 балла
14	Коагуляция,	1 балл	62.92%	0 балл	38.15%	2-3 балла
15	Коагуляция, расслоения.	1 балл	32.57 ± 22.02%	0 балл	23.21 ± 19.54%	3-4 балла
16	Некроз, коагуляция.	1 балл	42.27 ± 15.6%	1 балл	70.63 ± 15.03%	2 балла
17	Некроз, коагуляция.	0-1 балл	21.4%	0 балл	33.3%	1-2 балла

Примечание: 0 баллов: экспрессия > 75% клеток; 2 балла: от 25 до 75% клеток; 1 балл: от 5 до 24% клеток; 0 баллов: <5%. М1 – мускариновые рецепторы 1 типа, ТН -тирозингидроксилаза, D5 - рецепторы к дофамину 5 типа, ЛА – легочная артерия

### **3.2 Пилотное клиническое исследование денервации легочной артерии с применением стимуляционного картирования**

Схема проведения экспериментов и количество пациентов, участвовавших в данном этапе, представлены на рисунке 16.

Результаты стимуляционного картирования ЛА и данные РЧА представлены в таблице 5 и на рисунке 17. Исходные гемодинамические параметры, сразу после аблации, через 6 месяцев и 12 месяцев наблюдения, представлены в таблице 6.

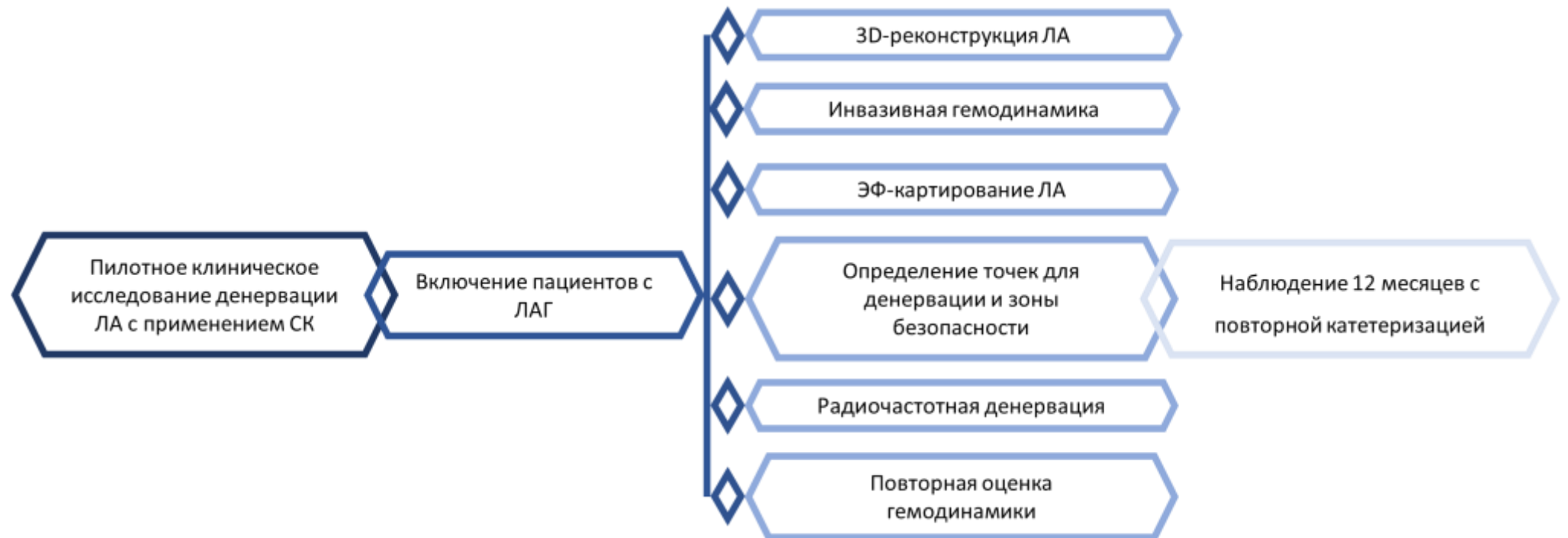


Рисунок 16 – Схема выполнения исследования в блоке III

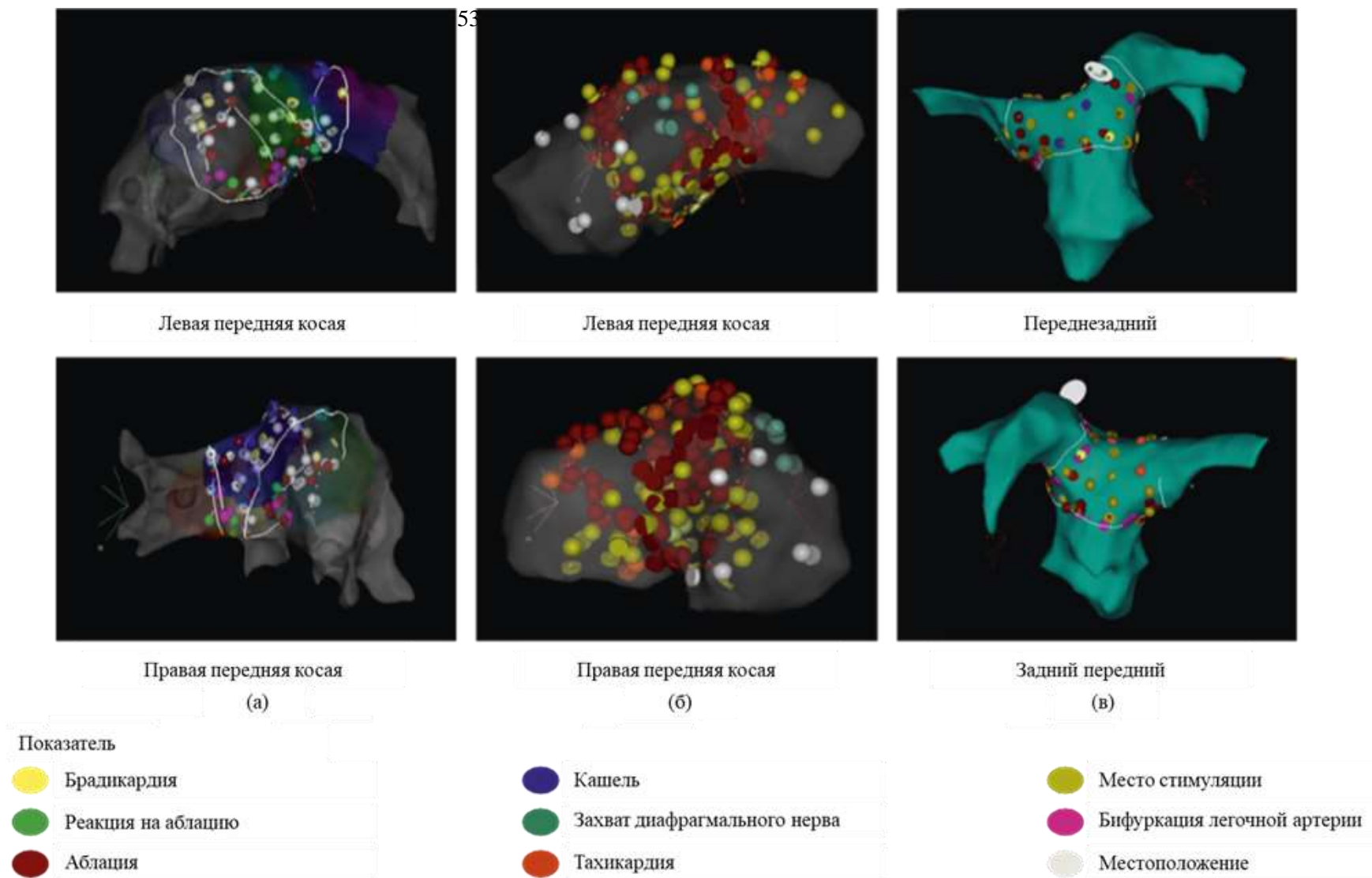


Рисунок 17 – Трехмерная реконструкция легочной артерии (система электроанатомической навигации CARTO 3) с точками стимуляции и аблации

Таблица 5 - Измерения гемодинамики до и после абляции легочной артерии и описание реакций на стимуляцию.

Показатель		Пациент 1			Пациент 2			Пациент 3		
		Исходно	После абляции	12 месяцев	Исходно	После абляции	12 месяцев	Исходно	После абляции	12 месяцев
Гемодинамические параметры	срДЛА, мм рт. ст	30	36	18	48	39	48	28	39	40
	ДЗЛА, мм рт. ст	7	9	2	8	3	8	1	3	8
	ЛСС, дины с см <sup>-5</sup>	328	344	194	1103	1112	1103	424	291	597
	ССС, дины с см <sup>-5</sup>	1387	1924	964	1328	659	1711	1639	1607	2040
	СИ, Л/мин м <sup>2</sup>	2.99	3.2	3.05	1.96	1.72	1.46	2.66	4.19	2.28
Реакции стимуляции и ЛА	Брадикардия	4			2			3		
	Тахикардия	0			12			3		
	Кашель	4			0			2		
	Захват диафрагмального нерва	3			4			0		

Продолжение таблицы 5

РЧА	Точки аблации, #	13	73	23
	Общее время аблации, с	374.75	928.35	663.02

Примечание: ЛА - легочная артерия, СрДЛА - среднее давление в легочной артерии, ДЗЛА - давление заклинивания легочной артерии, ЛСС - легочное сосудистое сопротивление, ССС - системное сосудистое сопротивление, СИ - сердечный индекс, РЧА - радиочастотная аблация

Таблица 6 - Функциональные исследования, эхокардиография и лабораторные данные до и после аблации.

Показатель		Пациент 1			Пациент 2			Пациент 3		
		Исходно	6 месяцев	12 месяцев	Исходно	6 месяцев	12 месяцев	Исходно	6 месяцев	12 месяцев
Функциональные способности	Функциональный класс (ВОЗ)	II	II	I	III	III	IV	II	II	II
	ТШХ	510	546	575	420	300	243	521	510	470
	ППК, мл/мин/кг	16.9	16.2	15.6	13.8	9.9	11.4	14	13.9	9.7
Эхокардиография	КСПП, см <sup>2</sup>	19	18.3	16.3	28	28.5	29	18.3	18.9	20.8

## Продолжение таблицы 6

	ПЖ: ЛЖ соотноше ние	0.79	0.8	0.7	1.38	1.8	1.65	0.96	0.8	0.85
	ССТК, см/с	14	14	18	7	7	5	11	12	8
Лаборатор ные данные	NT- proBNP, пг/мл	118. 7	85.4	95	529	1241	1133	56.5	21	94

Примечание: ТШХ - тест с шестиминутной ходьбой, ППК - пиковое потребление кислорода при кардиореспираторном тестировании, КСПП - конечная систолическая площадь правого предсердия, ПЖ:ЛЖ - отношение диаметра правого желудочка к диаметру левого желудочка, ССТК - систолическая скорость в трикуспидальной кольцевой плоскости, NT-proBNP - N-терминальный фрагмент мозгового натрийуретического пептида.

### **Острые гемодинамические изменения после абляции**

После денервации ЛА острые гемодинамические изменения у пациентов были разнонаправленными (таблица 5). Однако клинически значимых изменений в легочном или системном кровообращении не наблюдалось.

### **Наблюдение 6 месяцев**

В течение первых 6 месяцев после денервации ЛА госпитализаций не было. Пациентка № 1: наблюдалось улучшение дистанции прохождения теста шестиминутной ходьбы, уровень NT-proBNP был снижен, а площадь правого предсердия и размеры правого желудочка уменьшились (таблица 6). Пациентка № 2: отмечалось однократное синкопе при физической нагрузке через 1 месяц после денервации ЛА. Внеплановое V/Q сканирование легких исключило тромбоэмболию легочной артерии. Во время теста шестиминутной ходьбы наблюдалось значительное сокращение дистанции прохождения, увеличение уровня NT-proBNP и увеличение соотношения диаметров правого и левого



желудочков (таблица 6). Пациентка № 3: Во время кардиореспираторного тестирования наблюдалось увеличение пикового потребления O<sub>2</sub>, снижение уровня NT-proBNP и уменьшение соотношения правого и левого желудочков (таблица 6). Однако пациентка сообщила о легком ухудшении одышки; V/Q сканирование исключило тромбоэмболию легочной артерии, а анализ функции легких не показал изменений. В связи с наличием жалоб была выполнена внеплановая катетеризация правых камер сердца с вазореактивным тестированием – отмечалось улучшение показателей, поэтому терапия блокаторами кальциевых каналов была продолжена.

### **Наблюдение 12 месяцев**

Пациентка № 1 оставалась физически активной с высокой толерантностью к физической нагрузке (таблица 6); по данным эхокардиографии отмечалось обратное ремоделирование правых камер сердца и улучшение сократительной способности правого желудочка. Наблюдалось дальнейшее снижение уровня NT-proBNP (таблица 6). Повторная катетеризация показала нормализацию среднего давления ЛА и ЛСС (таблица 5). У пациентки № 2 наблюдалось дальнейшее усугубление ЛАГ с уменьшением дистанции прохождения теста шестиминутной ходьбы, появление асцита, гепатомегалии, увеличение правого предсердия и правого желудочка со снижением систолической функции правого желудочка и наличием перикардального выпота, ухудшение сердечного выброса и гипоксемия. Изменений давления в ЛА и ЛСС отмечено не было. Пациентка № 3 оставалась во II ФК (ВОЗ) без признаков сердечной недостаточности или синкопе. Однако пациентка жаловалась на снижение толерантности к физической нагрузке, подтвержденное тестом шестиминутной ходьбы и кардиореспираторным тестированием (таблица 6). Эхокардиография показала увеличение правого предсердия и снижение систолической функции правого желудочка (таблица 6). Катетеризация показала увеличение среднего давления ЛА и отрицательный вазореактивный тест. Поэтому дилтиазем был отменен и была начата ЛАГ-специфическая терапия (силденафил) с дальнейшим существенным улучшением толерантности к физической нагрузке.

### 3.3 Радиочастотная денервация легочной артерии у нормотензивных животных

Схема проведения экспериментов и количество животных, участвующих в этапах, представлены на рисунке 18.



Рисунок 18 – Схема выполнения исследования в блоке II

Всего было нанесено 93 радиочастотных аппликации в зоне бифуркации ЛА.

Не было выявлено статистически значимых изменений гемодинамических параметров непосредственно после аблации (в течение 20 минут после последней аппликации). Результаты измерений центральной и легочной гемодинамики представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Гемодинамические параметры до и после радиочастотной денервации легочной артерии

Параметр	Исходно	После денервации легочной артерии	P-значение
ЧСС, уд/мин	90,25±17,61	95,00±13,68	0,37
ср.АД, мм рт. ст.	64,25±6,39	56,00±4,34	0,11
ср.ДЛА, мм рт. ст.	11,75±2,50	16,00±8,12	0,39

Примечание: ЧСС - частота сердечных сокращений, ср.АД - среднее артериальное давление, ср.ДЛА - среднее давление в легочной артерии

У четырех животных (50%) точки аблации не были видны на эндотелиальной поверхности при макроскопическом исследовании и у четырех животных (50%) повреждения при аблации варьировались от коричневых пятен до линейных дефектов, наблюдаемых в интима легочной артерии (Рисунок 19).

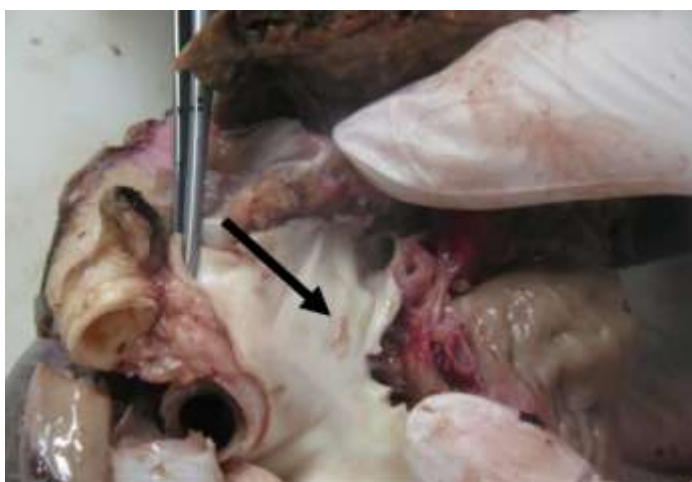


Рисунок 19 - Дефект в интима бифуркации легочной артерии, свинья №2

При макроскопическом исследовании не было выявлено повреждений крупных нервов, легочной ткани и эпикардиальной поверхности предсердий в зонах вокруг ствола и бифуркации ЛА.

Для гистологического и иммуногистохимического исследования было иссечено 18 образцов ЛА, подготовлены по такому же протоколу, как в первой фазе исследования. Гистологические изменения представлены в таблице 8.

Таблица 8 - Гистологические изменения после радиочастотной аблации легочной артерии

Параметр	Микроскопические изменения
свинья №1	1 кровоизлияние в адвентицию. 1 сквозная диссекция всей стенки.
свинья № 2	Ствол: 1 кровоизлияние, 1 диссекция. Правая легочная артерия: продольное расслоение и кровоизлияние в адвентицию с сохранением нервных элементов, 1 очаг отёка субинтимальной меди. Левая легочная артерия: 1 диссекция под интимой
свинья № 3	Ствол: 1 пристеночный тромб. Бифуркация легочной артерии: 1 кровоизлияние во всю толщины стенки, 1 очаговое кровоизлияние, 1 кровоизлияние в нервное волокно, 1 Т-образная диссекция, очаговое кровоизлияние с некрозом адвентиции, 1 кровоизлияние на всю толщу стенки, 1 очаговое кровоизлияние в стенку, 1 очаг коагуляции трети меди с адвентицией и жировой клетчаткой, 1 очаг коагуляции с некрозом всей стенки.
свинья № 4	Ствол: 1 поперечная диссекция, 1 кровоизлияние под интимой. Бифуркация: 1 коагуляция адвентиции, 1 очаговое кровоизлияние в медию.

## Продолжение таблицы 8

свинья № 5	<p>Ствол: 2 участка коагуляции жировой клетчатки без некроза стенки, 1 очаг коагуляции адвентиции и соседней меди.</p> <p>Бифуркация: 2 участка коагуляции жировой клетчатки, адвентиции и дистальной трети меди.</p>
свинья № 6	<p>Ствол: без изменений.</p> <p>Бифуркация: 1 зона коагуляция адвентиции и 1 зона коагуляции с диссекцией в середине меди.</p>
свинья № 7	<p>Ствол: множественные очаговые некрозы меди, 2 очаговых некроза меди с коагуляцией адвентиции.</p> <p>Бифуркация: 1 зона коагуляции адвентиции с кровоизлиянием и неполным разрушением нервных волокон.</p>
свинья № 8	<p>Ствол: без изменений.</p> <p>Бифуркация: 1 некроз в средней и дистальной трети меди, 1 обширная зона коагуляции адвентиции.</p>

При иммуногистохимическом исследовании в стенке легочной артерии наблюдается исчезновение экспрессии M1 и D5 на гладкомышечных клетках в зонах расслоений и зонах минимальных изменений (Рисунок 20). Также были отмечены очаги потери экспрессии рецепторов в участках сосудистой стенки, не измененных при гистологическом окрашивании. Чаще наблюдалось полное исчезновение экспрессии M1, в то время как экспрессия D5 в стенке легочной артерии частично сохранялась, нося мозаичный характер.

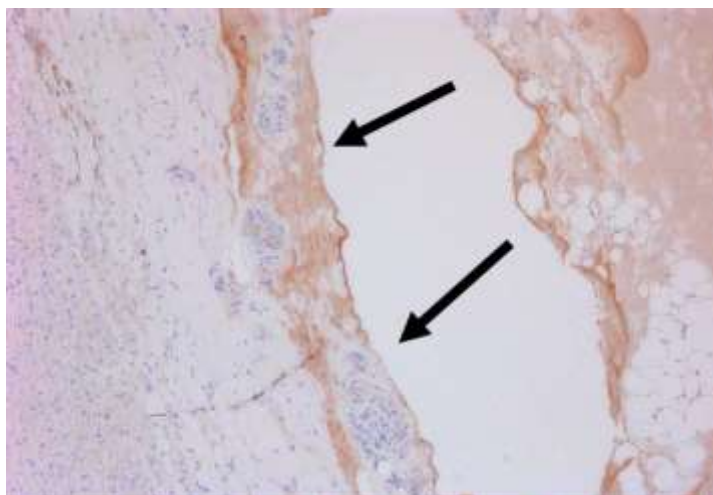


Рисунок 20 - Потеря экспрессии M1 в участке аблации легочной артерии (обозначены стрелками); x100

Таким образом, при радиочастотной денервации ЛА в 90% точек аппликаций не имели видимых изменений стенки ЛА, процедура характеризовалась достаточно мозаичным повреждением микроструктур стенки ЛА и невысоким процентом повреждения периваскулярных нервов. При условии применения стимуляционного картирования ЛА перед аблацией и отсутствия аблацией в зонах близкого расположения диафрагмальных нервов, возвратных гортанных нервов не было выявлено повреждения коллатеральных структур (легких, крупных нервов, стенки предсердий).

### 3.4 Лазерная катетерная денервация легочной артерии

Схема проведения экспериментов и количество животных, участвующих в этапах, представлены на рисунке 21.

Всего было нанесено 42 лазерных аппликации: в стволе ЛА по окружности ( $n = 12$ ), в бифуркации ЛА ( $n = 7$ ), в проксимальных отделах левой ( $n = 11$ ) и правой ( $n = 12$ ) ЛА. Подробные характеристики аблации приведены в таблице 9.

Таблица 9 - Характеристика лазерных аппликаций

Параметр	Ствол ЛА		Бифуркация ЛА		Левая ЛА		Правая ЛА	
	Ватт, с	Количество точек аблации	Ватт, с	Количество точек аблации	Ватт, с	Количество точек аблации	Ватт, с	Количество точек аблации
овца №1	20 Вт, 20 с	6	20Вт, 20 с	2	10 Вт, 30 с	4	15 Вт, 20 с	5
овца №2	20 Вт, 25 с	3	20 Вт, 25 с	3	30 Вт, 20 с	2	30 Вт, 20 с	3
овца №3	20 Вт, 35 с	3	20 Вт, 35 с	2	20 Вт, 35 с	5	20 Вт, 35 с	4

Примечание: ЛА - легочная артерия



Рисунок 21 – Схема выполнения исследования в блоке IV



### Морфометрический анализ иннервации зоны бифуркации легочной артерии у овец

Вне зон аблации ЛА был проведен морфометрический анализ распределения нервов и нервных ганглиев в стенке и периваскулярной клетчатки ЛА у овец. Ранее подобный анализ не проводился и данные об особенностях иннервации овечьей стенки ЛА отсутствуют (Таблица 10).

Таблица 10 - Сравнительный морфометрический анализ нервных волокон легочной артерии и их распределение у свиней, овец и человека

Зона	Параметр	Результаты
Ствол ЛА	Иннервация слоя	Периваскулярная жировая ткань, адвентиция
	Диаметр нерва	$45.43 \pm 6.28$
	Плотность распределения нервов, Ед / см <sup>2</sup>	$52.15 \pm 11.54$
	Средняя глубина нервов от интимы	$1785.84 \pm 104.3$
Бифуркация ЛА	Иннервация слоя	Периваскулярная жировая ткань, адвентиция, медиа
	Диаметр нерва	$45.33 \pm 8.15$
	Плотность распределения нервов, Ед / см <sup>2</sup>	$58.57 \pm 8.41$
	Средняя глубина нервов от интимы	$1515.32 \pm 131.69$

Продолжение таблицы 10

Правая ЛА	Иннервация слоя	Периваскулярная жировая ткань, адвентиция, медиа
	Диаметр нерва	$39.4 \pm 6.66$
	Плотность распределения нервов, Ед / см <sup>2</sup>	$64.55 \pm 7.05$
	Средняя глубина нервов от интимы	$780.5 \pm 140.51$
Левая ЛА	Иннервация слоя	Периваскулярная жировая ткань, адвентиция, медиа
	Диаметр нерва	$43.17 \pm 5.59$
	Плотность распределения нервов, Ед / см <sup>2</sup>	$57.47 \pm 7.65$
	Средняя глубина нервов от интимы	$916.24 \pm 121.93$

Примечание: ЛА – легочная артерия

Результаты морфометрии позволяют высказать предположение, что глубина расположения нервов не имеет значимых отличий от таковых у свиней и человека, находясь в пределах глубины повреждающего действия радиочастотного тока и лазерного излучения.

#### **Макроскопические и микроскопические результаты лазерной денервации**

Пятнадцать повреждений были визуально идентифицированы во время макроскопической оценки ЛА. Поражения, наблюдаемые в ЛА, были неоднородными. У овцы № 1 в стволе ЛА наблюдались явные повреждения в виде нерегулярных пятен коричневого цвета - кровоизлияния (Рисунок 22А); у овцы № 2 во время макроскопической оценки до фиксации препарата ЛА в формалине

повреждений не наблюдалось (Рисунок 22Б); а у овцы № 3 были видны грубые дефекты и сопутствующие поражения легких (Рисунок 22 В, Г).

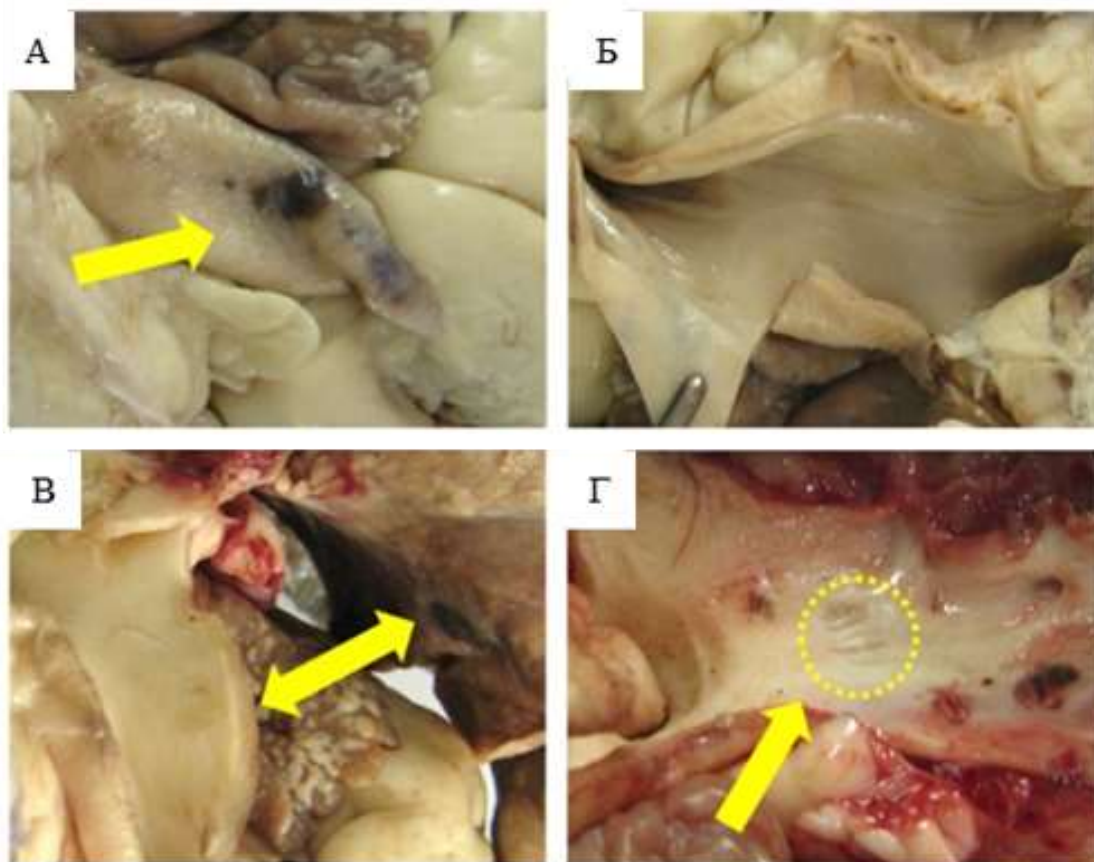


Рисунок 22. Легочная артерия после лазерной денервации

В результате лазерной абляции ЛА выявлен очаговый некроз интимы и нижележащего мышечного слоя, очаговые кровоизлияния в средней оболочке (медии), адвентиции и периваскулярной жировой ткани. У двух из трех овец были обнаружены диссекции стенок в стволе и правой ЛА (Рисунок 23А–В). В зонах диссекции нервные волокна не были идентифицированы в слоях стенки ЛА, а при использовании маркера S100 не наблюдалось специфического окрашивания (Рисунок 23Б). В идентифицированных нервных волокнах вблизи мест диссекций прямого повреждения не наблюдалось, в этих нервах сохранялась экспрессия маркера S100 (Рисунок 23Г).

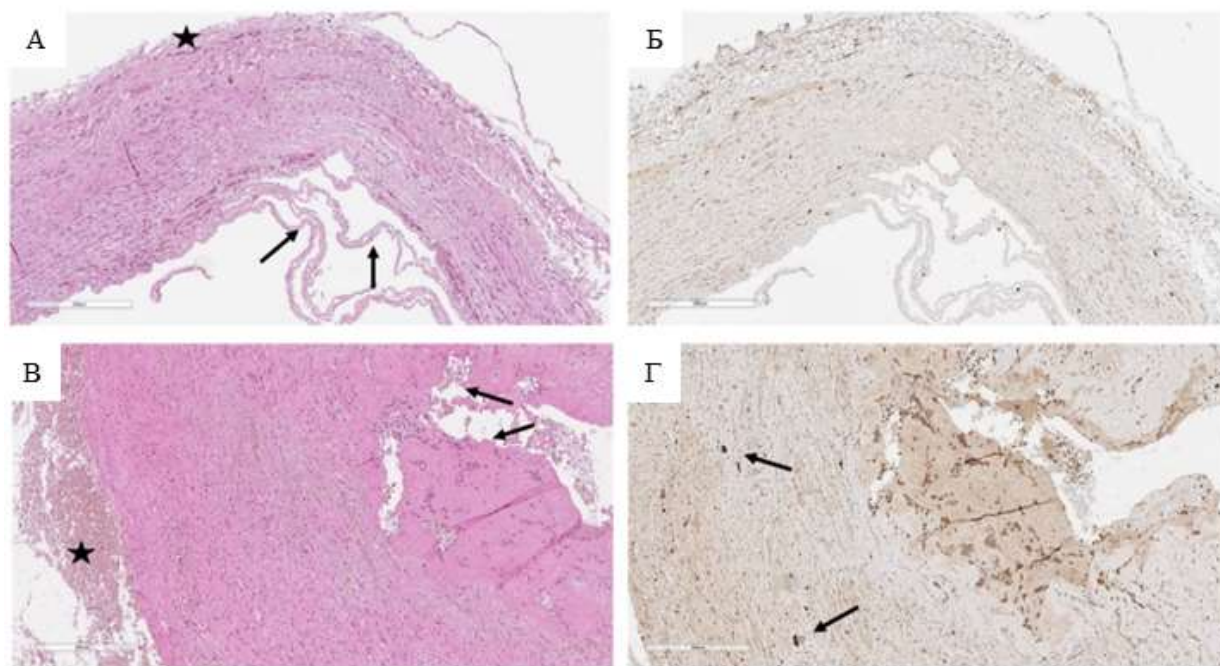


Рисунок 23 - Гистологические и иммуногистохимические препараты легочной артерии после лазерной абляции

На основании результатов макро- и микроскопического анализа повреждений ЛА была предложена градация безопасности лазерной абляции ЛА в зависимости от прилагаемой мощности воздействия (Таблица 11).

Таблица 11 - Полуколичественная оценка безопасности абляции

Показатель	Результаты гистологического анализа	Лазерная настройка
Безопасно	Нет признаков коллатерального повреждения. Диссекция стенки ЛА видно только микроскопически, если таковое имеется.	$\leq 20$ Вт
Небезопасный	Явные признаки внесосудистого повреждения: кровоизлияния в легкие, предсердия миокарда желудочков. Макроскопически тяжелое расслоение стенки ЛА.	20 Вт и 30 Вт

Примечание: Вт - ватт, ЛА – легочная артерия

С целью стандартизации оценки повреждений сосудов и периваскулярной ткани были предложены градации повреждений, кластеризирующие каждую идентифицированную аппликацию на стенке ЛА (таблица 12). Данная градация повреждений может быть использована в будущих исследованиях для сравнения повреждающего воздействия различных источников энергии, применения различных катетеров и мощности воздействия с целью денервации ЛА.

Таблица 12 - Полуколичественная характеристика абляционных повреждений при лазерной денервации легочной артерии

Тип	Гистологические находки	Комментарий
Тип I	Фокальный отек внутренней трети меди и распространение его на глубину до 10% толщины стенки легочной артерии.  Мелкофокусные геморрагии на любую глубину меди и адвентиции (до 200 мкм диаметре).	Повреждение стенки легочной артерии без признаков повреждения нервных волокон.
Тип II	Фокальные геморрагии на любую глубину меди, в адвентиции или периваскулярной жировой ткани (с диаметром 200-800 мкм).  Фокальный некроз интимы и внутренней трети меди (глубина до 10% толщины меди).  Диссекция стенки артерии глубиной до 50% толщины меди.	Нетрансмуральные повреждения, которые вовлекают частично нервные элементы в пределах стенки легочной артерии или адвентиции.

## Продолжение таблицы 12

<p>Тип Ш</p>	<p>Геморрагии не любую глубину меди, в адвентиции и жировой ткани (диаметром более 800 мкм). Диссекция стенки артерии глубиной более 50% толщины меди. Коагуляционный некроз адвентиции и периваскулярной жировой клетчатки с/без повреждения нервных волокон.</p>	<p>Тотальное трансмуральное повреждение стенки легочной артерии, включающее все возможные нервные структуры в пределах стенки легочной артерии и/или адвентиции.</p>
------------------	--	--

Примечание: Мкм – микрометр

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

### 4.1 Стимуляционное картирование легочной артерии

Результаты нашего экспериментального исследования позволяют сделать несколько важных выводов. Во-первых, периваскулярные нервы ЛА могут быть картированы с помощью транскатетерной стимуляции. Во-вторых, картирование с использованием ВЧС выявляет несколько типов вызванных реакций: ускорение предсердного ритма и замедление синусового ритма, которые обнаруживаются у 59% нормотензивных свиней. Мы предполагаем, что эти реакции отражают афферентную активацию нервов в адвентиции ЛА и периваскулярных нервов, что приводит к модуляции функции синусового узла. Эти данные согласуются с результатами предыдущего исследования на собаках, где стимуляция левой ЛА приводила к замедлению сердечного ритма [40].

Непосредственно после нанесения радиочастотных аппликаций, стимуляция в той же области не вызывает наблюдавшихся ранее реакций. Примечательно, что в нашем экспериментальном исследовании количество участков с вызванными реакциями представляется меньшим, чем у пациентов с ЛАГ [30]. Частично это можно объяснить нейрофизиологическими различиями между нормотензивными экспериментальными животными и пациентами с ЛАГ. Другое возможное объяснение – значительное расширение ЛА у пациентов с ЛАГ, в результате чего стенка ЛА приближается к окружающим нервам средостения, и вызванные на стимуляцию реакции могут быть менее специфичными.

Не наблюдалось изменений АД во время стимуляции стенки ЛА, что является существенным отличием от результатов, показанных в клиническом наблюдении Fujisawa и др. у одного пациента [12], что можно объяснить использованием легкой седации по сравнению с общей анестезией, применяемой у свиней во время процедуры. Кроме того, мы предполагаем, что болевые ощущения во время стимуляции и/или аблации могут влиять на гемодинамику. Другой возможной причиной могут быть структурные изменения сердца у

пациентов с ЛАГ, влияющие на АД, в отличие от нормотензивных свиней, использованных в эксперименте. Важно отметить, что в клинической части нашей работы (блок II) мы также не обнаружили реакции артериального давления на ВЧС у пациентов с ЛАГ [12].

Захват диафрагмального и гортанного возвратных нервов во время картирования стимуляции свидетельствует об их близком расположении к стенке ЛА. Левый и правый диафрагмальные нервы располагаются непосредственно у переднего отдела основного ствола ЛА, и их курс можно маркировать на трехмерной модели ЛА. Возвратный нерв гортани расположен по соседству с бифуркацией ЛА. Вследствие прилегания диафрагмальных нервов и возвратных гортанных нервов они могут быть повреждены при аблации, нацеленной на повреждение периваскулярных нервов. В клинической практике сообщалось о серьезных осложнениях, когда РЧА наносилась вблизи диафрагмального нерва [41–43].

Подобно предложенному нами подходу, Romero и соавт. показали, как выполняется картирование левого диафрагмального нерва при эндокардиальной электрической изоляции ушка левого предсердия; авторы использовали сходную технику картирования для профилактики повреждения нерва [44]. Несмотря на то, что при денервации ЛА парез диафрагмального нерва не был описан как следствие процедуры, имеющийся кумулятивный опыт денервации ЛА крайне мал, а последствия потенциального пареза диафрагмального нерва у пациентов с ЛАГ могут оказаться катастрофическими, мы предполагаем, что стимуляционное картирование ЛА должно являться эссенциальным во время процедур денервации. Вызванные реакции на ВЧС не воспроизводятся после короткого сеанса РЧА, что свидетельствует о возможности денервации ЛА путем транскатетерной аблации. Несмотря на то, что гистологическое и иммуногистохимическое исследование не выявляет трансмуральных повреждений стенки ЛА в значительном проценте радиочастотной аппликаций, отсутствие воспроизводимости реакций на стимуляцию свидетельствует о достижении изменений нервной регуляции в системе ЛА. Важно отметить, что в первом блоке



исследований мы не планировали проводить денервацию ЛА, а радиочастотные аппликации наносились с целью формирования маркеров на эндотелии для последующей идентификации зон прицельного гистологического анализа иннервации. Мы предполагаем, что несоответствие между физиологическим эффектом ВЧС и глубиной поражения может частично объясняться повреждением дистальных отростков нервов или функциональным нарушением нервной передачи, не отражающимся в видимом поражении нерва в первые часы после аппликаций. Следовательно, даже относительно поверхностного поражения может быть достаточно для наблюдаемого исчезновения эффектов, вызванных стимуляцией. В то же время, короткая радиочастотная аппликация вызывает модификацию экспрессии нейронных маркеров в ряде случаев, нарушая нейронный сигнал передачи. Таким образом, возможность стимуляционного картирования ЛА делает этот подход полезным в эксперименте и потенциально применимым в клинической практике.

Мы предлагаем наносить радиочастотные аппликации в участках ЛА вблизи диафрагмальных нервов и возвратных нервов гортани при выполнении денервации ЛА. Теоретически, иным подходом в профилактике повреждения диафрагмального нерва во время аблации может быть его стимуляция выше уровня аблации, как используется при криобаллонной аблации правых легочных вен. В случае исчезновения навязывания стимуляции (прекращения сокращений купола диафрагмы) при дисфункции нерва, быстрое прекращение воздействия не приводит к грубому перманентному повреждению. Однако подобный подход может оказаться недостаточным, поскольку случаи перманентного пареза диафрагмального нерва все же встречаются.

В наших экспериментах мы исключили области с захватом предсердий из ВЧС. Теоретически, это ограничение может привести к наличию «серых» зон изучения стимулированных реакций между ветвями ЛА и задними стенками предсердий. Действительно, плотность мелких нервных волокон была сопоставимой между периваскулярной тканью ЛА, взятой с боковой и задней стенок и позади предсердий. С другой стороны, в этой «серой» зоне нет крупных

нервов, которые могут быть случайно повреждены во время аблации. Кроме того, мы предлагаем применять более низкую энергию во время аблации ЛА в непосредственной близости от предсердий для профилактики ненужного повреждения миокарда. Ненамеренная аблация миокарда предсердий может оказаться проаритмогенной, как это показано при эндокардиальной катетерной аблации в левом и правом предсердиях.

Следует отметить, что симпатические и парасимпатические нейронные маркеры были идентифицированы в каждом нерве, подтверждая выводы из предыдущих отчетов о том, что общее нервное волокно обычно содержит оба типа маркеров [45-46].

#### **4.2 Пилотное клиническое исследование денервации легочной артерии с применением стимуляционного картирования**

Главный вывод нашего пилотного исследования заключается в том, что стимуляционное картирование нервных элементов самой ЛА и основных нервов вокруг ЛА воспроизводимо в клинических условиях и дает новое понимание топографических корреляций. Стимуляция ЛА вызывает несколько типов значимых реакций у пациентов. Захват диафрагмального нерва указывает на близость левого диафрагмального нерва к ЛА. Таким образом, мы предполагаем, что зачастую применяемый «анатомический» подход к аблации ЛА может привести к непреднамеренному повреждению диафрагмального нерва.

Применение стимуляционного картирования и маркирование хода диафрагмальных нервов на карте ЛА может быть полезным при определении участков, где стоит избегать аблации. Тот же принцип можно применить к участкам, где стимуляция индуцирует кашель. Кашель может отражать активацию возвратного нерва гортани, прилегающего к левой ЛА, или, что менее вероятно, прямое раздражение ветвей бронхиального нерва. Избегание аблации на этих участках может предотвратить нежелательные побочные эффекты аблации.

Изменения сердечного ритма во время стимуляции были заметными и имели два разных типа: замедление и ускорение. По нашему мнению, эти реакции

нельзя объяснить только парасимпатической или симпатической активацией. Учитывая относительно плотное распределение нервов в адвентиции бифуркации ЛА [11, 26, 54], ожидается одновременная активация парасимпатических ганглиев и симпатических нервов при стимуляции от относительно крупного катетера с кончиком диаметром 3,5 мм. Поэтому мы предполагаем, что любое изменение частоты сердечных сокращений во время стимуляции может отражать неселективное раздражение вегетативных нервов. Исходя из этого, абляция, выполненная у пациентки №1, может быть более подходящей, чем более расширенная абляция, выполняемая у пациентов №2 и №3, где избегались только участки с захватом диафрагмального нерва и кашлем.

Расширенный подход к абляции должен привести к более выраженной денервации, как описано в исследованиях абляции ганглиев левого предсердия [55, 56, 57]. С другой стороны, расширенный «анатомический» доступ может быть связан с повреждением стенки ЛА и привести к ее ремоделированию и дальнейшей потере растяжимости ЛА, что связано с худшим прогнозом при ЛАГ [58, 59, 60].

Следует признать, что при стимуляционном картировании не отмечалось реакций системного артериального давления и изменений давления в ЛА, что не соответствует предыдущему сообщению о стимуляции ЛА у одного пациента с идиопатической ЛАГ, где стимуляция провоцировала существенные реакции давления.

Непосредственные и несущественные изменения системного и легочного давления сразу после абляции могут быть связаны с инфузией жидкости и болевой реакцией во время доставки радиочастотной энергии.

Мы предполагаем, что значительное клиническое улучшение у пациентки №1 напрямую связано с процедурой абляции. У пациентки был длительный анамнез идиопатической ЛАГ (13 лет) с медленным, но прогрессирующим ухудшением симптомов со временем. Поскольку прогрессирование заболевания у этих пациентов неизбежно, клиническое улучшение после абляции на той же медикаментозной терапии следует рассматривать как связанное с инвазивной

процедурой. Важно отметить, что у пациентки № 1 был долгосрочный ответ на антагонисты кальциевых каналов, который считается генетически детерминированным и отличает прогрессирование ЛАГ от других пациентов [61]. Это различие связано с генами, кодирующими сокращение гладкомышечных клеток сосудов и метаболизм кальция в клетках [19]. Единичные сообщения показали изолированную гипертрофию гладкомышечного слоя ЛА с минимальным вовлечением интимы в вазореактивных ответвлениях, тогда как у пациентов с отрицательным вазореактивным тестом описаны утолщение и фиброз эндотелиального слоя [62, 63].

В связи с этим уменьшение степени гипертрофии гладкомышечного слоя и подавление спазма сосудов за счет снижения симпатической нервной активности может быть оправданием для метода денервации ЛА у вазореактивных ответчиков. Однако вклад вегетативной нервной системы в регуляцию сосудистого тонуса у вазоответчиков ЛАГ не изучен. Нет предыдущего клинического опыта денервации ЛА у пациентов с ЛАГ с положительным тестом на вазореактивность.

С другой стороны, причина исчезновения вазореактивности и ухудшения клинико-гемодинамического состояния у пациента №3 остается невыясненной. Это может быть связано со слишком большой площадью денервации ЛА или с естественным прогрессированием идиопатической ЛАГ. Среди пациентов с идиопатической ЛАГ с положительным вазореактивным тестом только 6,8% пациентов остаются долгосрочными ответчиками на блокаторы кальциевых каналов [64].

Различные подходы к денервации ЛА основаны на экспериментах на животных и не могут быть полностью экстраполированы на пациентов с ЛАГ. Информация о распределении симпатических и парасимпатических нервных волокон и ганглиев в ЛА человека скудна. Круговая абляция ствола ЛА и ее основных ветвей с целью снижения давления в ЛА - более эмпирический подход. Тем не менее, несмотря на вариативность в количестве и расположении точек абляции, предложенных разными авторами, а также на различия мощности РЧА и

продолжительность каждой аппликации, а также источник энергии (радиочастотный ток, ультразвук), исследователи сообщают о положительных эффектах денервации ЛА у значительной доли пациентов с различными видами ЛГ [29-32, 39, 69].

#### **4.3 Радиочастотная денервация легочной артерии у нормотензивных животных**

В результате проведенных экспериментов показано, что в условиях нормотензии денервация ЛА не приводит к значимым гемодинамическим изменениям в остром периоде, что несколько противоречит результатам, полученным у пациентов с ЛАГ [35]. Вероятно, структурное ремоделирование и ремоделирование иннервации ЛА при ЛГ являются определяющими факторами острых реакций на денервацию. В то же время, в работах Chen и соавт. также не было выявлено непосредственных изменений гемодинамики сразу после денервации, что подтверждает наши экспериментальные данные и результаты пилотного клинического исследования (блоки II и III). В то же время, отсутствие значимых гемодинамических изменений при денервации ЛА в условиях нормотензии свидетельствует о безопасности процедуры с точки зрения возможных гемодинамических последствий аблации. Известно, что даже кратковременное снижение артериального давления и сердечного выброса у пациентов с тяжелой ЛАГ может привести к катастрофическим последствиям и декомпенсации правожелудочковой недостаточности.

Нами было показано, что повреждение ЛА при аблации может иметь различную выраженность и глубину. Изменения имеют неравномерный, очаговый характер, тем не менее, коагуляция адвентиции и жировой клетчатки может быть выраженной. В подавляющем большинстве случаев морфологического повреждения нервных волокон не отмечалось, однако было выявлено изменение экспрессии нейромаркеров. Нами было показано, что наиболее чувствительным маркером денервации может считаться потеря экспрессии M1-мускаринового ацетилхолинэргического рецептора, в то время как известно, что парасимпатическая активация посредством вагусной стимуляции приводит к

холинергически-опосредованной релаксации легочных артерий [47].

В нашем эксперименте животные подвергались эвтаназии непосредственно после проведения аблации, то есть, в работе анализировались результаты радиочастотного повреждения ЛА в острейший период, нами не исследовались отсроченные результаты аблации.

В работе Rothman и соавт. [48] при ультразвуковой аблации ЛА у свиней описываются сходные гистологические изменения в остром периоде – коагуляция соединительной и жировой ткани, коагуляция, вакуолизация и пикноз нервных структур. Спустя 95 дней после проведения аблации отмечались фиброз и утолщение эпинеурия, что свидетельствует об отсроченном повреждении нервных волокон, проявлявшемся также потерей экспрессии ТН. В ранней работе Rothman и соавт. [11] при проведении РЧА наблюдались повреждения всех слоёв стенки ЛА, аналогичные выявленным в нашем материале.

Также отмечалось снижение экспрессии S100 нервными волокнами в зоне повреждения. Отдельно следует подчеркнуть, что глубина аблации варьировала в зависимости от анатомической локализации и толщины слоя меди. Как сообщают авторы, в сосудах с выраженным слоем меди, таких как аорта и ствол ЛА, повреждение нервных волокон отсутствовало, либо было минимальным. Следовательно, аблация эффективна на сосудах более мелкого калибра.

Помимо аблации ЛА, с целью снижения активации симпатической нервной системы, используется и аблация почечных артерий, как при лечении ЛГ, так и для лечения артериальной гипертензии [46]. По данным работ различных авторов, проводивших эксперименты со свиньями и овцами [49, 50, 51], для острого периода повреждения стенки почечных артерий характерны некроз эндотелия, тромбы, разрывы внутреннего слоя эластических волокон, вакуолярная дегенерация гладкомышечных клеток, коагуляция меди и адвентиции. Непосредственно после аблации в нервных волокнах сохранялась экспрессия S100 и ТН, несмотря на гистологические признаки повреждения в виде вакуолизации и кариопикноза. В подостром периоде (спустя 7-10 дней после проведения аблации) были показаны реэндотелизация и тотальное замещение

фиброзной тканью всей толщи меди в зоне повреждения, а также более значимое повреждение нервных волокон, проявлявшееся уменьшением их числа, размера и дегенеративно-дистрофическими изменениями [52]. При иммуногистохимическом исследовании отмечалась фокальная потеря экспрессии ТН в нервных структурах, находящихся в непосредственной близости от повреждённой артериальной стенки [53].

В целом, экспериментальные работы по морфологическим изменениям при аблации артерий свидетельствуют об эффекте этой процедуры на более поздних сроках, когда образуется фиброзная ткань. В нашем исследовании явный грубый некроз нервных структур был выявлен только в 2 случаях. По-видимому, процесс фиброзного замещения растянут во времени, что обусловлено не прямым повреждением нервных волокон, а опосредованным, ишемическим – при «заболачивании» кровью и коагуляции окружающих тканевых структур.

#### **4.4 Лазерная катетерная денервация легочной артерии**

Одним из основных результатов данного блока исследования является доказательство применимости овечьей модели в исследовании денервации ЛА, в когда изучаются технические и инструментальные аспекты. Специальные катетеры, предназначенные для использования у людей, легко адаптируются к экспериментам на овцах. Другим важным результатом являются данные о плотности и распределении нервов ЛА овцы. Плотность нервов в стволе ЛА, бифуркации и основных ветвях ЛА намного выше, чем в ЛА человека. Это очень похоже на особенности иннервации ЛА у свиней. Овца характеризуется специфической особенностью: нервы проникают в стенку ЛА в области бифуркации и дистальнее. Поэтому мы предполагаем, что овечью модель следует использовать с осторожностью при анализе периваскулярного повреждения нервов при денервации ЛА, поскольку требуемая глубина поражения у ЛА овец намного меньше, чем у ЛА человека для поражения большинства нервных структур.

Теоретически, гемодинамические последствия денервации ЛА у овец могут отличаться от таковых у людей, поскольку плотность нервов в области аблации

значительно выше. Легочные сосуды иннервируются подмножествами симпатических, парасимпатических и чувствительных нервных волокон. Хотя большинство органов имеют максимальную плотность нервов на дистальных уровнях, легочная сосудистая сеть имеет противоположную картину — плотность нервов наиболее высока в сосудах крупного калибра с дальнейшим снижением на периферии [66-67]. У крупных млекопитающих, часто используемых для исследовательских моделей, распределение автономной эфферентной и нейрхимической экспрессии легочной сосудистой сети было описано в нескольких исследованиях.

У младенцев и детей наблюдается тенденция к увеличению плотности нервов в артериях дыхательного аппарата. У младенцев с ЛГ прекапиллярные сосуды характеризуются преимущественной экспрессией сосудосуживающих нервов, что может объяснить их предрасположенность к кризу ЛГ [68]. Степень плотности иннервации от внелегочных сосудов к периферии варьируется от вида к виду и ранее сообщалась у овец, свиней и других крупных животных, а также у людей [67].

Использование животных в трансляционных экспериментальных исследованиях имеет ключевое значение, учитывая размер, анатомию и физиологические характеристики животных, особенно когда результаты необходимо экстраполировать в клиническую практику [69-80]. Свиньи и овцы - крупные животные, которые имеют сходное строение сердца с людьми [81,82]. Однако ни одно экспериментальное животное не может полностью имитировать человеческие особенности.

Для сердечно-сосудистых интервенционных процедур манипуляции с инструментами могут быть сложными, учитывая положение сердца у млекопитающих [83]. Для процедуры денервации ЛА нервные структуры, окружающие ЛА, рассматриваются в качестве мишеней, поэтому гистологические характеристики ЛА, безусловно, имеют значение. Мы не можем исключить различия в иннервации, связанные с весом и возрастом субъектов.

Наши результаты согласуются с предыдущим отчетом, демонстрирующим



расположение нервов ЛА у свиней в возрасте 2-6 месяцев в адвентиции и до 2/3 наружной меди [84]. Аналогичные данные о том, что нервные волокна располагались во внешней трети средней оболочки в ЛА овец и кошек, были представлены Garland и соавт. [9] и Knight и соавт. [85]. Морфометрические характеристики, такие как плотность распределения нервов, диаметр и расстояние до интимы у овец и людей, различны; однако эти характеристики были схожи у млекопитающих. Следовательно, можно предположить, что овцы, так же, как и свиньи, могут быть подходящей моделью для процедур денервации ЛА.

До настоящего времени радиочастотная энергия широко использовалась и изучалась для процедур денервации [86-93], хотя некоторые технические аспекты, связанные с устройством катетеров и настройками мощности, постоянно изучаются. Лазерная энергия была внедрена в медицину несколько лет назад. Однако его роль в процедурах денервации широко не изучена. Радиочастотная и лазерная энергия вызывают тепловое повреждение тканей, хотя их механизм сильно отличается. Морфологические характеристики поражения варьировались от коричневых пятен и грубых дефектов, и при использовании лазерной энергии в наших экспериментах в ЛА не наблюдалось видимых повреждений. Несмотря на этот факт, во время микроскопического анализа во всех срезах ЛА были обнаружены гистологические изменения, из чего можно сделать вывод, что макроскопическая визуализация поражения может быть необязательной.

В отличие от поражений, наблюдаемых при других процедурах аблации, где очевиден очаговый некроз [94], мы предполагаем, что особенности артериальной сосудистой сети, такие как структура, скорость кровотока, а также факторы, такие как скорость орошения во время лазерной аблации, могут влиять на формирование повреждения. Кроме того, мощность аблации имеет решающее значение для оптимальной денервации.

Еще одним важным аспектом, который следует учитывать во время денервации ЛА, является определение успешного лазерного воздействия. Наблюдались трудности во время манипуляций с катетером, которые могли привести к неудачной подаче энергии, в отличие от других процедур, при

которых катетер с электродами способен регистрировать электрограммы. ЛА не имеет собственной электрической активности, наподобие миокарда предсердий или желудочков. Кроме того, использование только флюороскопической навигации может быть недостаточно информативным.

Острые повреждения ЛА в результате лазерной абляции аналогичны гистологическим изменениям, обнаруженным после РЧА. Недавно Sagerer-Gerhardt и др. использовали лазерную энергию для денервации почечных артерий у экспериментальных животных, и было описано острое термическое повреждение стенки почечной артерии [96]. Результаты морфологического анализа повреждений были аналогичны нашим выводам. Коллатеральное повреждение, наблюдаемое в паренхиме легкого после лазерной абляции с использованием мощности 30 Вт и при длительности аппликаций 20 с, имеет сходные характеристики с результатами после лазерной денервации почек [96]. Таким образом, наши выводы согласуются с тем, что лазерная абляция мощностью 20 Вт представляется более безопасной.

### **Ограничения исследования**

На животных проводились острые экспериментальные исследования, не оценивалось хроническое влияние денервации ЛА. Другим важным аспектом является то, что животные не могут полностью имитировать физиологические характеристики человека, поэтому к экстраполяции результатов следует относиться с осторожностью, учитывая тип экспериментальных животных в исследовании. Основным ограничением пилотного клинического исследования является малое количество пациентов. Однако это исследование является эксплоративным, и, учитывая потенциально неизвестные эффекты абляции ЛА под контролем стимуляции, большее количество исследуемых на этом этапе могло бы быть неоправданным. Наша основная цель состояла в оценке потенциальной воспроизводимости стимуляционного картирования ЛА у пациентов с идиопатической ЛАГ. Результаты стимуляционного картирования ЛА у пациентов с другими типами ЛАГ могут отличаться из-за потенциальных различий в нервной регуляции в патогенезе заболевания.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стимуляционное картирование легочной артерии с использованием низкочастотной стимуляции позволяет определить ход близкорасположенных гортанного возвратного и диафрагмальных нервов, области легочной артерии в непосредственной близости от задней стенки предсердий. В то же время, при высокочастотной стимуляции выявляется ряд специфических вегетативных реакций (замедление синусового ритма или учащение предсердного/синусового ритма). Абляция в точках с вегетативными ответами приводит к невоспроизводимости вызванных реакций.

Стимуляционное картирование легочной артерии может быть рекомендовано перед денервацией для определения потенциальных целевых областей для абляции, а также для уменьшения объема избыточного повреждения, которое может быть ассоциировано с уменьшением растяжимости легочной артерии и поражению крупных нервов, не являющихся целью денервации.

Денервация легочной артерии с использованием радиочастотной энергии ограничена и не вызывает значительного повреждения периваскулярных нервов легочной артерии у экспериментальных животных. Лазерная абляция является потенциально альтернативным способом денервации легочной артерии с меньшим риском повреждения интимы.

## ВЫВОДЫ

1. Определены типы реакций ритма сердца при низкочастотной и высокочастотной транссосудистой стимуляции периваскулярных нервов легочной артерии в эксперименте на крупных животных. Так, сформированы карты распределения зон замедления синусового ритма и учащения предсердного ритма в ответ на высокочастотную стимуляцию. Определены карты расположения стволов крупных нервов в зоне бифуркации легочной артерии (диафрагмальные нервы, возвратные ларингеальные нервы).

2. Методика катетерной денервации легочной артерии на основе стимуляционного картирования у пациентов с легочной артериальной гипертензией воспроизводима, выявлены сходные реакции на стимуляцию легочной артерии с таковыми на экспериментальных моделях. Не было выявлено осложнений процедуры, непосредственно связанных со стимуляцией или аблацией артерии.

3. Изучены макроскопические повреждения при транссосудистой радиочастотной аблации легочной артерии: представлены описания основных повреждений на эндотелии и трансмуральные повреждения стенки артерии. На основании микроскопического исследования зон аблации периваскулярных нервов легочной артерии формированы основные группы повреждений, позволяющих сравнивать различные технологии и подходы к аблации. Радиочастотная катетерная аблация имеет ограниченные возможности физической деструкции периваскулярных нервов, при этом мозаично нарушается экспрессия маркеров симпатических и парасимпатических нервов.

4. Катетерная лазерная денервация легочной артерий с применением излучения длиной волны 1064 нм с мощностью до 20 ватт и длительность аппликаций 20 секунд приводит к повреждению стенки артерии с сохранением эндотелиальной выстилки в большинстве случаев. При лазерной аблации отмечается выраженное повреждение адвентиции и периваскулярной клетчатки, что является желаемым эффектом воздействий.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. При выполнении процедур денервации легочной артерии перед аблацией следует выполнить стимуляционное картирование легочной артерии, поскольку гортанный возвратные и диафрагмальные нервы находятся в непосредственной близости от легочной артерии и могут быть повреждены во время денервации. Также передняя стенка легочной артерии находится в непосредственной близости от задней стенки предсердий, и чрезмерная абляция в этой области может приводить к повреждению предсердного миокарда.

2. Непосредственный эффект денервации может быть определен отсутствием воспроизводимости реакций частоты ритма сердца на высокочастотную стимуляцию стенки легочной артерии. При этом отсутствие изменений гемодинамики непосредственно сразу после абляции не свидетельствует о недостаточной денервации легочной артерии.

3. При проведении лазерной денервации легочной артерии с длиной световой волны 1064 нм рекомендуется использовать мощность не более 20 Ватт.

## **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Результаты экспериментального исследования представляют важную основу для дальнейшего изучения стимуляционного картирования в процедурах денервации легочной артерии с точки зрения безопасности и определения потенциальных целевых областей для абляции. В клинических исследованиях денервации легочной артерии может применяться методология стимуляционного картирования, предложенная в данной работе.

Подходы к более эффективному повреждению периваскулярных нервов и в то же время ограниченному повреждению передней стенки легочной артерии с целью предотвращения поражения миокарда предсердий будут изучаться в последующих экспериментах.

Хронические эффекты лазерной энергии при процедуре денервации легочной артерии будут изучены на моделях с индукцией лёгочной артериальной гипертензии.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АД – артериальное давление

ВЧС – высокочастотная стимуляция

ДЗЛА - давление заклинивание в легочной артерии

ИСсАД – систолическое артериальное давление инвазивное системное артериальное давление

ЛА – легочная артерия

ЛАГ – лёгочная артериальная гипертензия

ЛГ - легочная гипертензия

ЛСС – лёгочное сосудистое сопротивление

НЧС – низкочастотная стимуляция

ПП – правое предсердие

РЧА - радиочастотная абляция

ср.ДЛА – среднее давление в лёгочной артерии

ФК - функциональный класс

ХСН – хроническая сердечная недостаточность

ЦВД - центральное венозное давление

ЧСС – частота сердечных сокращений

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ginoux, M. Impact of comorbidities and delay in diagnosis in elderly patients with pulmonary hypertension / M. Ginoux [et al.] // ERJ Open Res. – 2018 - Vol. 4, №4. - P. 00100–02018.
2. Simonneau G. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension / G. Simonneau [et al.] // Eur Respir J. - 2019. – V. 53 №1. – P 1801913.
3. Galiè N. ESC Scientific Document Group, 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) / N. Galiè [et al.] // European Heart Journal – 2016 – Vol.37, № 1 - P.67–119.
4. Gall, H. The Giessen Pulmonary Hypertension Registry: Survival in pulmonary hypertension subgroups. / H. Gall [et al.] // The Journal of Heart and Lung Transplantation – 2017 - Vol.36, P.957–967.
5. McGoon M. Pulmonary arterial hypertension. / M. McGoon [et al.] // Journal of the american college of cardiology – 2013 - Vol. 62, №25 - P. D51–D59.
6. Rudner X. Subtype specific regulation of human vascular alpha (1)-adrenergic receptors by vessel bed and age. / Rudner X. [et al.] // Circulation – 1999 – Vol.100, № 23 - P. 2336-2343.
7. Xin-Fang L. Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. / L. Xin-Fang // BioMed research international – 2015 - Vol. 2015 – P. 528757



8. Cesarovic N. Animals in cardiovascular research: Clinical relevance and translational limitations of animal models in cardiovascular medicine / N. Cesarovic [et al.] // *European Heart Journal* – 2020 – Vol. № 2 – P. 200–203.

9. Garland C. Adrenergic Innervation and Sensitivity to Vasoconstrictor Hormones of Inner Muscle of Sheep Pulmonary Artery. / C. Garland [et al.] // *Artery* - 1982 – Vol. 10 – P. 440–453.

10. Chen S. Percutaneous pulmonary artery denervation completely abolishes experimental pulmonary arterial hypertension in vivo. / S. Chen [et al.] // *EuroIntervention*. - 2013 – Vol. 22; № 9(2) – P. 269-76.

11. Rothman A. Pulmonary artery denervation reduces pulmonary artery pressure and induces histological changes in an acute porcine model of pulmonary hypertension. A. Rothman [et al.] // *Circulation: Cardiovascular Interventions* – 2015. – Vol. 8 - P. e002569.

12. Fujisawa T. Pulmonary artery denervation by determining targeted ablation sites for treatment of pulmonary arterial hypertension. / T. Fusijawa // *Circulation. Cardiovascular Interventions* – 2017 – Vol. 10 - P. e005812.

13. Reddy, V. Pulsed Field Ablation for Pulmonary Vein Isolation in Atrial Fibrillation. / V. Reddy [et al.] // *Journal of the american college of cardiology* – 2019 – Vol.74. №3 – P. 315-326

14. Weber H. Laser catheter ablation of long- lasting persistent atrial fibrillation: Longterm results. / H. Weber [et al.] // *J Atr Fibrillation* - 2017 – Vol.31. №10 - P.588.

15. Liu P. Intravenous Catheter-Guided Laser Ablation: A Novel Alternative for Branch Varicose Veins. / P. Liu [et al.] // *International Surgery* – 2011- Vol. 96 №4 – P. 331–336.

16.Peng, Q. Lasers in medicine. / Q. Peng [et al.] // Reports on Progress in Physics – 2008 – Vol.71. № 5 – P. 056701.

17.Alexander V. Photothermolysis of sebaceous glands in human skin ex vivo with a 1,708 nm Raman fiber laser and contact cooling. / V. Aleksander [et al.] // Lasers in Surgery and Medicine – 2011 – Vol.43 №6 – P.470–480.

18.Stenmark N. The Adventitia: Essential Role in Pulmonary Vascular Remodeling. / N. Stenmark // Compr Physiol. – 2011. – Vol. 1 №1 – P. 141–161.

19.Singh I. Pulmonary Vascular Distensibility and Early Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Hypertension. / I. Singh [et al.] //Chest – 2019 – Vol.156 №4 – P.724-732.

20.McGoon M. Pulmonary arterial hypertension: epidemiology and registries. / M. McGoon [et al.] // J Am Coll Cardiol. - 2013. –Vol. 62. – P. 51-59.

21.Gall H. The Giessen Pulmonary Hypertension Registry: Survival in pulmonary hypertension subgroups. / H. Gall [et al.] // J Heart Lung Transplant. - 2017. – Vol. 36. – P. 957–967.

22.Osorio J. Reflex changes on the pulmonary and systemic pressures elicited by stimulation of baroreceptors in the pulmonary artery. / J. Osorio [et al.] // Circ Res – 1962. – Vol. 10. – P. 664-667.

23.Velez-Roa, S. Increased sympathetic nerve activity in pulmonary artery hypertension. / S. Velez-Roa [et al.] // Circulation. – 2004. – Vol. 10, № 110. – P. 1308–1312.

24.Kummer W. Pulmonary vascular innervation and its role in response to hypoxia. / W. Kummer [et al.] // Proc Am Thorac Soc. – 2011. - Vol. 8 – P. 471-476.

25. Barnes P. Regulation of pulmonary vascular tone. / P. Barnes [et al.] // *Pharmacol Rev.* – 1995. – Vol. 47. – P. 87–131.

26. Митрофанова Л. Б. Гистологическое и иммуногистохимическое исследование нервных волокон и ганглиев в периартериальной жировой ткани бифуркации легочной артерии у пациентов с легочной гипертензией и без нее. / Л. Б. Митрофанова [и др.] // *Артериальная гипертензия.* – 2019. – 25, 5 – С. 498–509.

27. Juratsch C. Experimental pulmonary hypertension produced by surgical and chemical denervation of the pulmonary vasculature. / C. Juratsch [et al.] // *Chest* – 1980 - Vol. 77. – P. 525-530.

28. Zhou L. Pulmonary artery denervation attenuates pulmonary arterial remodeling in dogs with pulmonary arterial hypertension induced by dehydrogenized monocrotaline. / L. Zhou [et al.] // *J Am Coll Cardiol Interv* – 2015. – Vol. 8. – P. 2013–23

29. Chen S. Pulmonary artery denervation to treat pulmonary arterial hypertension: the single-center, prospective, first-in-man PADN-1 study (first-in-man pulmonary artery denervation for treatment of pulmonary artery hypertension). / S. Chen [et al.] // *Journal of the american college of cardiology* – 2013 – Vol. 62. № 12 – P. 1092-1100.

30. Chen, S. L. Hemodynamic, functional, and clinical responses to pulmonary artery denervation in patients with pulmonary arterial hypertension of different causes: phase II results from the Pulmonary Artery Denervation-1 study. / S. L. Chen // *Circ Cardiovasc Interv.* – 2015. – Vol. 8, № 11, 002837.

31. Zhang, H. Pulmonary Artery Denervation for Treatment of a Patient with Pulmonary Hypertension Secondary to Left Heart Disease. / H. Zhang [et al.] // *Pulmonary Circulation.* – 2016 – Vol. 6 №2 – P. 240–243

32.Zhang H. Pulmonary Artery Denervation Significantly Increases 6-minute walk Distance for patients with combined pre- and post-capillary pulmonary hypertension associated with the left heart failure: PADN-5 Study. / H. Zhang [et al.] // JACC: Cardiovascular Interventions. - 2019. - Vol. 12. – P. 274-284.

33.Goncharova N. Electrical stimulation-guided approach to pulmonary artery catheter ablation in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension: a pilot feasibility study with a 12-month follow-up. / N. Goncharova [et al.] // Biomed Res Int. – 2020 – Vol. 5 – P. 8919515.

34.Sheng X. Cardioprotective effects of low-level carotid baroreceptor stimulation against myocardial ischemia-reperfusion injury in canine model. / X. Sheng [et al.] // Journal of interventional cardiac electrophysiology: an international journal of arrhythmias and pacing - 2016 – Vol 45, №2 - P.131-140.

35.Romanov A. Pulmonary Artery Denervation for Patients With Residual Pulmonary Hypertension After Pulmonary Endarterectomy. / A. Romanov [et al.] // Journal of the american college of cardiology – 2020 – Vol.76, №8 - P. 916-926.

36.Железнев С. И. Радиочастотная денервация легочной артерии при хирургической коррекции диспластических пороков митрального клапана с высокой легочной гипертензией. / Железнев С. И. [и др.] // Российский кардиологический журнал – 2016 - 11 - С.70-72.

37.Руденко Б. А. Эндоваскулярное лечение пациентов с резидуальной хронической тромбоэмболической легочной гипертензией после операции легочной тромбэндартерэктомии с использованием системы денервации symplicity./ Б. А. Руденко [и др.] // Кардиоваскулярная терапия и профилактика – 2018 – 17 .2 – С.43-48.

38.Фещенко Д. А. Криоденервация легочных артерий у пациентов с легочной гипертензией, обусловленной поражениями левых отделов сердца: техника вмешательства, безопасность и результаты госпитального этапа

лечения. / Д. А. Фещенко [и др.] // Российский кардиологический журнал – 2019 - 8 – С.29-35.

39.Rothman, A. Intravascular ultrasound pulmonary artery denervation to treat pulmonary arterial hypertension (TROPHY1). / A. Rothman [et al.] // JACC: Cardiovascular Interventions - 2020 – Vol.13 – P.989–999.

40.Scherlag B. Endovascular stimulation within the left pulmonary artery to induce slowing of heart rate and paroxysmal atrial fibrillation. / B. Sherlag [et al.] // Cardiovasc Res. – 2002 – Vol 54, №2 – P.470-475.

41.Ramos-Villalobos L. Postintervention dyspnea after radiofrequency catheter ablation: think of a phrenic nerve injury. / L. Ramos-Villalobos [et al.] //Case Reports in Cardiology – 2017 – Vol.2017 – P. 6418070.

42.Swallow E. Right hemi-diaphragm paralysis following cardiac radiofrequency ablation. / E. Swallow [et al.] // Respiratory Medicine – 2006 – Vol.100 – P. 1657–1659.

43.Pai R. Transient left recurrent laryngeal nerve palsy following catheter ablation of atrial fibrillation. / R. Pai [et al.] // Heart Rhythm – 2005 – Vol. 2 – P.182–184.

44.Romero J. Mapping and localization of the left phrenic nerve during left atrial appendage electrical isolation to avoid inadvertent injury in patients undergoing catheter ablation of atrial fibrillation. / J. Romero [et al.] // Heart Rhythm - 2020 – Vol 17 – P. 527–534.

45.Tan A. Autonomic innervation and segmental muscular disconnections at the human pulmonary vein-atrial junction: implications for catheter ablation of atrial-pulmonary vein junction. / A. Tan [et al.] // Journal of the American College of Cardiology – 2006 – Vol. 48 – P. 132–143.

46.Vaillancourt, M. Autonomic nervous system involvement in pulmonary arterial hypertension / M. Vaillancourt [et al.] // *Respir Res.* – 2017. Vol. 4, №. 18. – P. 124–139.

47.McMahon T. Pulmonary vasodilator response to vagal stimulation is blocked by N omega-nitro-L-arginine methyl ester in the cat. / T. McMahon [et al.] // *Circ Res.* – 1992 – Vol.70 – P.364–9.

48.Rothman A. Pulmonary artery denervation using catheter-based ultrasonic energy. / A. Rothman [et al.] // *EuroIntervention* – 2019 – Vol.15 – P. 722-730

49.Sakaoka A. Acute changes in histopathology and intravascular imaging after catheter-based renal denervation in a porcine model. / A. Sakaoka [et al.] // *Catheterization and Cardiovascular Interventions* – 2017 – Vol.90 №4 - P. 631–638.

50.Su E. Acute changes in morphology and renal vascular relaxation function after renal denervation using temperature-controlled radiofrequency catheter. / E. Su [et al.] // *BMC Cardiovasc Disord* – 2019 – Vol.19 №1 – P.67.

51.Taborsky M. Early morphologic alterations in renal artery wall and renal nerves in response to catheter-based renal denervation procedure in sheep: difference between single-point and multiple-point ablation catheters. / M. Taborsky [et al.] // *Physiol Res* – 2017 – Vol. 66 – P. 601–614.

52.Steigerwald K. Morphological assessment of renal arteries after radiofrequency catheter-based sympathetic denervation in a porcine model. / K. Steigerwald [et al.] // *Journal of Hypertension* – 2012 – Vol.30 №11 – P.2230–2239.

53.Taborsky M. Evaluation of Later Morphologic Alterations in Renal Artery Wall and Renal Nerves in Response to Catheter-Based Renal Denervation in Sheep: Comparison of the Single-Point and Multiple-Point Ablation Catheters. / M. Taborsky [et al.] // *Physiol Res* – 2018 – Vol. 67, №6 –P. 891-901.

54.Мамчур, С. Е. Влияние пульмональной денервации на механическую функцию правых отделов сердца у больных легочной гипертензией / С. Е. Мамчур, Е. В. Токмаков, О. А. Нагирняк // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2019. – Т.8, №2. – С. 49–57.

55.Pokushalov E. Selective ganglionated plexi ablation for paroxysmal atrial fibrillation. / E. Pokushalov [et al.] // Heart Rhythm – 2009 - Vol. 6, № 9 – P.1257–1264,

56.Mikhaylov E. Outcome of anatomic ganglionated plexi ablation to treat paroxysmal atrial fibrillation: a 3-year follow-up study. / E. Mikhaylov [et al.] // Europace – 2011 - Vol.13, №3 - P. 362–370.

57.Stavrakis S. Ganglionated Plexi Ablation: Physiology and Clinical Applications. / S. Stavrakis [et al.] // Arrhythm Electrophysiol Rev. – 2017 – Vol.6, №4 – P.186-190.

58.Cheng X. Prognostic value of pulmonary artery compliance in patients with pulmonary arterial hypertension associated with adult congenital heart disease / X. Cheng [et al.] // International Heart Journal – 2017 - Vol. 58, №. 5 - P. 731–738.

59.Thenappan T. The critical role of pulmonary arterial compliance in pulmonary hypertension, / T. Thenappan [et al.] // Annals of the American Thoracic Society – 2016 – Vol. 13, № 2 - P. 276–284.

60.Haines, D. E. The biophysics of radiofrequency catheter ablation in the heart: the importance of temperature monitoring. / D.E. Haines // Pacing Clin Electrophysiol. – 1993. – Vol. 16. – P. 586–591.

61.Langleben D. Vasodilator responsiveness in idiopathic pulmonary arterial hypertension: identifying a distinct phenotype with distinct physiology and distinct prognosis. / D. Langleben [et al.] // Pulmonary Circulation – 2017 - Vol. 7, № 3 – P 588–597.

62.Hemnes A. Critical genomic networks and vasoreactive variants in idiopathic pulmonary arterial hypertension. / A. Hemnes [et al.] // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine – 2016 - Vol.194, № 4 – P. 464–475.

63.Palevsky H. Primary pulmonary hypertension. Vascular structure, morphometry, and responsiveness to vasodilator agents. / H. Pelevsky [et al.] // Circulation – 1989 - Vol.80, №. 5 – P. 1207–1221.

64.Sitbon O. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. / O. Sitbon [et al.] // Circulation – 2005 - Vol. 111, № 23 – P. 3105–3111.

65.Rudenko B. Simplicity denervation system for pulmonary artery denervation in patients with residual pulmonary hypertension after pulmonary thromboembolism and surgical thrombectomy. / B Rudenko [et al.] // Cardiology and Cardiovascular Medicine – 2017 – Vol. 1, № 5 – P 200–209.

66.Kummer W. Pulmonary Vascular Innervation and Its Role in Responses to Hypoxia: Size Matters! / W. Kummer // Proc. Am. Thorac. Soc. – 2011 – Vol.8 – P.471–476.

67.Maarman, G. A comprehensive review: the evolution of animal models in pulmonary hypertension research; are we there yet? / G. Maarman [et al.] // Pulm.Circ. – 2013. – Vol. 3, № 4. – P. 739–756.

68.Allen K. A Study of Nerves Containing Peptides in the Pulmonary Vasculature of Healthy Infants and Children and of Those with Pulmonary Hypertension. / K. Allen [et al.] // Br. Heart J. - 1989 – Vol.62 – P.353–360.

69.Maron B. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in the pathobiology of pulmonary arterial hypertension (2013 Grover Conference series). / B.Maron [et al.] // Pulm Circ. – 2014. – Vol. 4, № 2. – P. 200– 210.



70.Liu Q. Effects of renal denervation on monocrotaline induced pulmonary remodeling. / Q. Liu [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, № 29. – P. 46846–46855.

71.Prochnau, D. Percutaneous catheter-based cryoablation of the renal artery is effective for sympathetic denervation in a sheep model. / D. Prochnau // *Int J Cardiol*. – 2011. – Vol. 152. – P. 268–270.

72.Voelkel, N. F. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: a model for what human disease? / N. F. Voelkel [et al.] // *J Clin Invest*. – 2000. – Vol. 106. – P. 733–738.

73.Nicolls, M.R. New models of pulmonary hypertension based on VEGF receptor blockade-induced endothelial cell apoptosis. / M.R. Nicolls [et al.] // *Pulm Circ*. – 2012. – Vol. 2. – P. 434–442.

74.Okada, M. Establishment of canine pulmonary hypertension with dehydromonocrotaline. Importance of larger animal model for lung transplantation. / M. Okada [et al.] // *Transplantation*. – 1995. – Vol. 60. – P. 9–13.

75.Zeng, G. Q. Single intraperitoneal injection of monocrotaline as a novel large animal model of chronic pulmonary hypertension in Tibet minipigs. / G. Q. Zeng [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8: e78965.

76.Shelub, I. A model of embolic chronic pulmonary hypertension in the dog. / I. Shelub [et al.] // *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. – 1984. – Vol. 56. – P. 810–815.

77.Roehl, A. B. Comparison of 3 methods to induce acute pulmonary hypertension in pigs. / A. B. Roehl [et al.] // *Comp Med*. – 2009. – Vol. 3, № 59. – P. 280–286.

78.Vakhrushev, A. D. Extended renal artery denervation is associated with artery wall lesions and acute systemic and pulmonary hemodynamic changes: a sham-

controlled experimental study. / A. D. Vakhrushev [et al.] // *Cardiovasc Ther.* – 2020. – Vol. 28.

79.Goncharova, N. S. Modeling of acute pulmonary arterial hypertension in pigs using a stable Thromboxane A2 analogue (U46619): dose adjustment and assessment of hemodynamic reactions. / N. S. Goncharova [et al.] // *Bull Exp Biol Med.* – 2021. – Vol. 6, № 170. –P. 729–733.

80.Da Silva Goncalves. Renal denervation reduces pulmonary vascular remodeling and right ventricular diastolic stiffness in experimental pulmonary hypertension. / Da Silva Goncalves // *JACC Basic Transl Sci.* – 2017. – Vol. 1, № 2. – P. 22–35.

81.Hearse D. Sutherland, F.J. Experimental Models for the Study of Cardiovascular Function and Disease. / D. Hearse [et al.] // *Pharmacol. Res.* – 2000 – Vol.41 – P.597–603.

82.Spannbauer A. Large Animal Models of Heart Failure with Reduced Ejection Fraction (HFrEF). / A. Spannbauer [et al.] // *Front. Cardiovasc. Med.* – 2019 – Vol. 6 – P.117.

83.Emmert M. Transcatheter Aortic Valve Implantation Using Anatomically Oriented, Marrow Stromal Cell-Based, Stented, Tissue-Engineered Heart Valves: Technical Considerations and Implications for Translational Cell-Based Heart Valve Concepts. / M. Emmert [et al.] // *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* – 2014 – Vol. 45 – P. 61–68.

84.Wharton J. Postnatal Development of the Innervation and Paraganglia in the Porcine Pulmonary Arterial Bed. / J. Wharton [et al.] // *J. Pathol.* – 1988 – Vol. 154 – P.19–27.

85.Knight D. A Light and Electron Microscopic Study of the Innervation of Pulmonary Arteries in the Cat. / D. Knight [et al.] // *Anat. Rec* – 1981 – Vol. 201 –

P.513–521.

86.Ogo T. Transthoracic Pulmonary Artery Denervation: New Insight into Autonomic Nervous System in Pulmonary Arterial Hypertension. / T. Ogo [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2019 – Vol.39 – P.979–981.

87.Fontes, M.A.P. Renal sympathetic denervation for resistant hypertension: where do we stand after more than a decade / M. A. Fontes [et al.] // *J Bras Nefrol.* – 2020. – Vol. 1, № 42. – P. 67–76.

88.Schlaich, M. P. Renal sympathetic-nerve ablation for uncontrolled hypertension. / M. P. Schlaich [et al.] // *N Engl J Med.* – 2009. – Vol. 9, № 361. – P. 932–934.

89.Kandzari, D. E. Effect of renal denervation on blood pressure in the presence of antihypertensive drugs: 6-month efficacy and safety results from the SPYRAL HTN-ON MED proof-of-concept randomised trial. / D. E. Kandzari [et al.] // *Lancet.* – 2018. – Vol. 9, № 391. – P. 2346–2355.

90.Townsend, R. R. Catheter-based renal denervation in patients with uncontrolled hypertension in the absence of antihypertensive medications (SPYRAL HTN- OFF MED): a randomised, sham-controlled, proof-of-concept trial. / R.R. Townsend [et al.] // *Lancet.* – 2017. – Vol. 390. – P. 2160–2170.

91.Qingyan, Z. Beneficial effects of renal denervation on pulmonary vascular remodeling in experimental pulmonary artery hypertension. / Z. Qingyan [et al.] // *Rev Esp Cardiol (Engl Ed).* – 2015. – Vol. 7, № 68. – P. 562–570.

92.Bertog, S. Randomised, blinded and controlled comparative study of chemical and radiofrequency-based renal denervation in a porcine model. / S. Bertog [et al.] // *EuroIntervention.* – 2017. – Vol. 12. – P. 1898–1906.

93.Чичкова, Т.Ю. Эффективность и безопасность многополюсной биполярной ренальной денервации и значение стимуляции почечных нервов

для прогнозирования результатов вмешательства / Т.Ю. Чичкова, С.Е. Мамчур, Е. А. Хоменко [и др.] // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2017. – Т.6, - №4. – С. 89–94.

94.Кондори Леандро Э. И. Острые эффекты лазерной абляции миокарда в эксперименте ex-vivo и in vivo / Кондори Леандро Э. И., Вахрушев А. Д., Коробченко Л. Е. [и др.] // Вестник аритмологии. – 2021. - Т. 28. - № 1. - С. 47-54.

95.Condori Leandro H. Stimulation Mapping of the Pulmonary Artery for Denervation Procedures: An Experimental Study. / H. Condori Leandro [et al.] // J. Cardiovasc. Transl. Res. – 2021 – Vol. 14 – P.546–555.

96.Sagerer-Gerhardt, M. Catheter Based Renal Sympathetic Denervation by Segmental Endoluminal Laser Radiation in a Pig Model: Anatomical and Histopathological Results. / M. Sagerer-Gerhardt [et al.] // J Vet Sci Ani Husbandry. – 2021. – Vol. 9, № 1. – P. 103.