

На правах рукописи

КОЗЫРЕВ

Иван Александрович

РЕЗУЛЬТАТЫ РАННЕЙ РАДИКАЛЬНОЙ  
КОРРЕКЦИИ ТЕТРАДЫ ФАЛЛО

14.01.26 – Сердечно-сосудистая хирургия

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2019



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность и степень разработанности темы исследования

Тетрада Фалло является одним из самых часто встречаемых цианотических врожденных пороков сердца. Несмотря на имеющийся обширный опыт лечения данной патологии, на сегодняшний день отсутствует общепринятая тактика введения пациентов с выраженным цианозом, не определен оптимальный возраст проведения радикальной хирургической коррекции тетрады Фалло (ТФ) у бессимптомных пациентов (Van Arsdell G., 2000, Peer, Zurakowski et al. 2014). В последних российских рекомендациях не указан возраст, в котором нужно проводить радикальную коррекцию (Бокерия Л., 2016). В настоящий момент в детской кардиохирургии прослеживается общемировая тенденция более раннего выполнения хирургической коррекции врожденных пороков сердца (ВПС) (Tamesberger M., 2008). Это обусловлено развитием анестезиологического пособия, методов проведения заместительного кровообращения, усовершенствованием кардиоплегических и кардиопротекторных методик. Восстановление нормальной физиологии внутрисердечного, легочного и системного кровообращения, устранение гипоксического влияния на организм в целом в раннем возрасте приводит к адекватному созреванию и развитию всех тканей в организме ребенка.

Наличие системного давления на протяжении времени в полости правого желудочка (ПЖ) при тетраде Фалло приводит к формированию патологической гипертрофии правого желудочка, в том числе к развитию фиброзных изменений в стенке желудочка (Jonas R., 2009). Это снижает комплайнс правого желудочка, что крайне важно для пациентов с коррегированной тетрадой Фалло в долгосрочном периоде. В течение первых недель жизни степень цианоза у пациентов с тетрадой Фалло может нарастать. Это обусловлено увеличением степени обструкции в выносящем отделе правого желудочка (ВОПЖ) за счет мышечной гипертрофии правого желудочка. У большинства пациентов с тетрадой Фалло отмечается умеренная гипоплазия фиброзного кольца (ФК) клапана легочной артерии (Jonas R., 2009). Именно на этом уровне формируется основной градиент в ВОПЖ. Спустя несколько недель или месяцев, вследствие развития компенсаторной гипертрофии нарастает стеноз в ВОПЖ ниже клапана легочной артерии. Тем самым, устранение обструкции в раннем периоде жизни предотвращает ремоделирование правого желудочка (Aritz C., 2009).

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

доказано, что радикальная коррекция в раннем возрасте не будет приводить к более длительному и тяжелому послеоперационному периоду.

Количество кардиомиоцитов удваивается к 21-му дню жизни, в дальнейшем их численность значительно не изменяется (Oparyl S., 1985). Известно, что в организме существует различные виды стволовых клеток. Одними из них являются локальные стволовые клетки сердца или, так называемые, клетки-предшественники кардиомиоцитов (КПК). Одним из подвидов этих клеток являются мезенхимные клетки сердца (МКС). У популяции КПК имеются признаки кардиомиоцитарной дифференцировки, однако, в них не экспрессируются саркомерные белки, характерные для кардиомиоцитов. В настоящее время идет активное изучение этого вида клеток (Klopsch C., 2017, Oldershaw R., 2019). Исследуются механизмы, приводящие к врожденным порокам сердца на моделях этих клеток, изучается способность таких клеток участвовать в регенерации и репарации сердца, особенно у пациентов с врожденными пороками сердца. Было установлено, что клетки от новорожденных пациентов с различными врожденными формами пороков сердца имеют более выраженный регенеративный и пролиферативный потенциалы по сравнению с аналогичными клетками от взрослых пациентов (Simpson D., 2012). В другой работе демонстрировалось, что клетки от пациентов раннего возраста имеют более высокий регенеративный потенциал по сравнению с клетками пациентов более старших возрастных групп, в связи, с чем лечение пациентов с врожденными пороками сердца в более раннем возрасте, с точки зрения тканевой регенерации, представляется предпочтительным (Agarwal U., 2016). Таким образом, данный вид клеток является с одной стороны перспективным новым методом для клеточной терапии различных состояний при врожденных пороках сердца, с другой стороны объектом для активных исследований гомеостаза в миокарде при наличии различных патологий сердца.

Notch-сигнальный путь является высококонсервативной сигнальной системой, которая контролирует спецификацию клеток и тканевую организацию, как у эмбриона, так и у взрослого. Многочисленные исследования выявили участие Notch-сигнального пути в развитии сердца (Niessen K., 2008), формировании различных врожденных пороков (Bruneau B., 2008) и регенерации сердца (Luxan G., 2016). Однако следует отметить, что Notch-сигнальный путь принимает участие не только в кардиогенезе. Он также может быть вовлечен в пролиферативную активность клеток различных тканей и может участвовать в процессах дифференцировки (Grotek B., 2013, Chau M., 2006). Активация Notch необходима для поддержания пролиферации кардиомиоцитов при рождении (Collesi C., 2008). Таким образом, Notch-сигнальный путь является медиатором покоя, пролиферации и дифференцировки различных типов стволовых клеток, включая кардиогенные. В настоящее время существует довольно ограниченное количество работ, посвященных исследованию сигнального пути Notch в клеточных культурах из ткани миокарда пациентов с врожденными пороками сердца, и полностью отсутствуют работы, исследующие вовлеченность этого

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

### **Цель исследования**

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

### **Задачи исследования**

1. Провести сравнительную оценку различных хирургических методик и их применение в различных возрастных группах при коррекции тетрады Фалло для выявления оптимальных условий для клапанно-сохраняющих операций.

2. Провести сравнительный анализ различных методов оценки состояния легочных артерий у пациентов с тетрадой Фалло раннего возраста по данным дооперационных методов обследования и операционным показателям.

3. Проанализировать особенности интраоперационного и раннего послеоперационного периодов при коррекции тетрады Фалло у пациентов раннего возраста в зависимости от сроков проведения операции.

4. Охарактеризовать пролиферативную активность мезенхимных клеток сердца в зависимости от возраста пациентов с тетрадой Фалло.

5. Охарактеризовать уровень экспрессии генов сигнального каскада Notch в мезенхимных клетках сердца у пациентов с различными септальными пороками.

### **Научная новизна исследования**

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

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

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

Проведенный анализ хирургического лечения пациентов с тетрадой Фалло позволяет рекомендовать выполнение ранней радикальной коррекции тетрады Фалло в возрасте до 6 месяцев. Выполнение радикальной коррекции в данном возрасте сочетается с низким риском осложнений и минимальным риском летальности. Применение интраоперационной оценки размеров ветвей легочной артерии позволяет расширить показания к выполнению радикальной коррекции в случаях наличия гипоплазии центрального легочного русла по данным неизвазивных методов исследования и одновременного отсутствия дополнительных источников легочного кровоснабжения.

Применение современных клапан-сохраняющих методов, таких как баллонная и механическая аннулопластика в сочетании с различными вариантами пластики створок позволяют сохранить собственный клапан легочной артерии более чем в 60% случаев при ранней радикальной коррекции тетрады Фалло.

## **Методология и методы исследования**

Набор использованных методов исследования соответствует современному методическому уровню обследования кардиохирургических больных. Примененные методы статистической обработки данных отвечают поставленной цели и задачам исследования.

## **Положения, выносимые на защиту**

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

## **Личный вклад автора**

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

### Апробация работы

Основные материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены: на Всероссийской молодежной медицинской конференции с международным участием «Алмазовские чтения – 2018», Санкт-Петербург; на научной конференции «Границы клеточных технологий: исследования и практика», Москва; на X Всероссийском Конгрессе «Детская кардиология 2018», Москва; на 51-м ежегодном съезде Европейского общества детских кардиологов (51<sup>st</sup> Annual Meeting of the Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPCC)), г. Лион, Франция; на 52-м ежегодном съезде Европейского общества детских кардиологов (52<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPCC)), г. Афины, Греция; на 26-м ежегодном азиатском съезде кардиоваскулярной и торакальной хирургии (26th Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery (ASCVTS)), Москва; на Всероссийской конференции с международным участием «Каспийские Встречи: диалоги специалистов о наджелудочковых нарушениях ритма сердца», Форум молодых кардиологов РКО, Астрахань; на международной конференции на 53-м ежегодном съезде Европейского общества детских кардиологов (53<sup>d</sup> Annual Meeting of the Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPCC)), г. Севилья, Испания.

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

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

### Объем и структура работы

Диссертация изложена на 123 страницах машинописного текста, иллюстрирована 6 таблицами, 33 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы, включающего 180 источников, из которых 25 отечественных, 155 иностранных.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

#### *Клиническая часть исследования*

В исследование были включены 63 пациента старше одного месяца с диагнозом тетрада Фалло (ТФ), находившиеся на лечении в НМИЦ им. В.А. Алмазова с января 2014 по декабрь 2018 гг, которым была выполнена плановая (элективная) радикальная коррекция порока. Из исследования были исключены 7 пациентов, которым на момент сбора данных была выполнена только паллиативная коррекция и не выполнена радикальная коррекция, до окончания исследуемого периода, и также пациенты с ТФ в сочетании с атрезией клапана легочной артерии, с агенезией клапана легочной артерии и с полной формой атриовентрикулярного канала.

Эхокардиографическое исследование проводилось всем пациентам до операции, сразу после операции, ежедневно после операции и в отдаленном периоде на протяжении 4 лет. Компьютерная томография выполнялась всем пациентам перед хирургической коррекцией для оценки степени развитости легочного русла и исключения значимых аорто-легочных коллатералей. Показатель Z-score вычислялся на основе весо-ростовых характеристик при использовании системы данных детского госпиталя Бостона ([zscore.chboston.org](http://zscore.chboston.org)). Индекс Nakata вычислялся по формуле суммы площади поперечного сечения левой и правой легочных артерий разделенной на площадь поверхности тела.

Для проведения исследования все пациенты были разделены на 3 группы в зависимости от возраста радикальной коррекции. Первую группу исследования составляли пациенты возрастом до 3 месяцев, вторую – 3-6 месяцев, третью – старше 6 месяцев. Операция у пациентов в первых двух групп трактовалась как ранняя радикальная коррекция. Пациентам в 3 группе выполнялась первичная радикальная коррекция или радикальная коррекция с предшествующей паллиативной операцией.

Всем пациентами производилось измерение размеров ветвей легочной артерии тремя различными методами: по данным ЭХОКГ, КТ и интраоперационные измерения. Интраоперационные измерения размеров ветвей легочной артерии и первичные размеры пропускного отверстия КЛА для стандартизации выполнялись дилататорами DeVakey. Приведен пример измерения ветвей легочного русла представлен на Рис. 1 (А, Б).



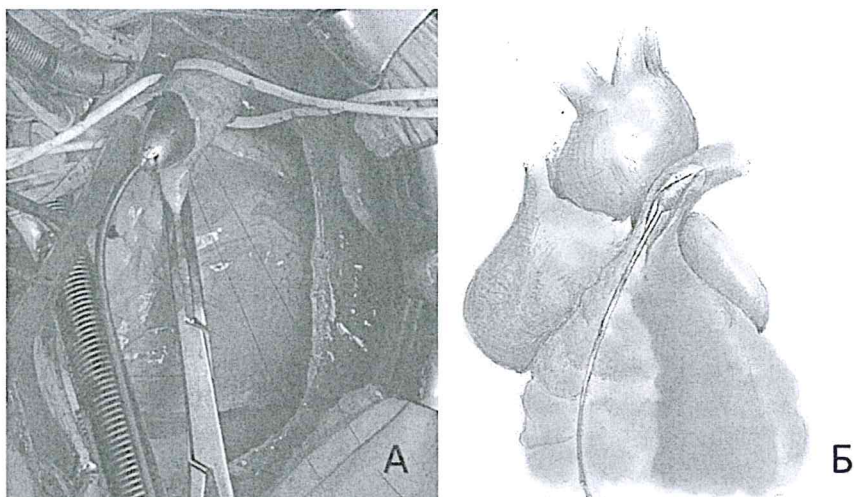


Рисунок 1 - А. Интраоперационное изображение измерения размера левой легочной артерии дилататором DeBakey. Б. Схематическое изображение измерения левой ЛА

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

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

Допамин (мкг/кг/мин) + Добутамин (мкг/кг/мин) + 100хАдреналин (мкг/кг/мин). Значения инотропного индекса оценивались через 24 и 72 часа после операции.

#### *Экспериментальная часть исследования*

В исследовании использовались мезенхимные клетки сердца от пациентов с тетрадой Фалло и дефектом межжелудочковой перегородки, как модель для изучения пролиферативной способности этих клеток и исследования вовлеченности Notch-сигнального пути в тетраде Фалло. Для исследования использовали клеточные культуры клеток миокарда правого желудочка от 42 пациентов с тетрадой Фалло и 16 пациентов с ДМЖП (дефектом межжелудочковой перегородки). Пролиферативная активность клеток оценивалась в реальном времени. Для количественного анализа изменения уровня экспрессии исследуемых генов использовали коммерческие системы ПЦР в реальном времени. Фрагменты миокарда ПЖ пациентов получали в ходе плановых операций по радикальной коррекции порока, осуществляемых в ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России. Забор операционного материала проводился после подписания законными представителями пациентов информированного согласия.

Пролиферативная активность клеток оценивалась в реальном времени при использовании xCELLigence RTCA S16 (Agilent). Значения импеданса каждой ячейки автоматически мониторировались в течении 72 часов и было перенесено на график как CI (cell index – клеточный индекс). Все образцы анализировались в дубликатах. Для анализа данных использовалось программное обеспечение RTCA Software (версия 1.0.0.1304). Для анализа

экспрессии генов в работе использовали праймеры, синтезированные в компании Евроген (Россия) и Applied Biosystems (США).

Выделение РНК из клеток проводили при помощи реагента для экстракции тотальной РНК (Евроген, Россия). Реакция обратной транскрипции необходима для получения из РНК кДНК. Для количественного анализа изменения уровня экспрессии исследуемых генов использовали коммерческие системы ПЦР в реальном времени SYBR Green (Евроген, Россия). Серии экспериментов повторяли трижды (биологические репликаты), для каждого эксперимента проверку уровня экспрессии соответствующего гена повторяли дважды (технические репликаты).

Статистический анализ проводился с использованием непараметрических вариационных рядов — 2 независимые группы сравнивались с помощью U-критерия Манна – Уитни, три группы — с помощью рангового анализа вариаций по Краскелу-Уоллису с последующим парным сравнением групп тестом Манна-Уитни с применением поправки Бонферрони при оценке значения  $p$ . Значение  $p < 0,05$  принималось как статистически значимое. Данные представлены в виде медианы вариационного ряда и интерквартильного размаха (25 и 75 процентиля). Корреляционный анализ выполнялся с использованием непараметрического критерия Спирмена. Надежность используемых статистических оценок принималась не менее 95%. Использовались программные пакеты Microsoft Office Excel 2010, STATISTICA 10.0 (Statsoft, USA), Graphpad Prism ver.5.0 (GraphPad Software, Inc).

## РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего в исследование было включено 63 пациента: в первую группу – 10 пациентов, во вторую группу – 30 пациентов, в третью группу – 23 пациента. При проверке на нормальность по  $W$  критерию Шапиро-Уилка было установлено, что симметричное распределение, близкое к нормальному, имеют только показатели времени искусственного кровообращения и времени пережатия аорты. Поэтому далее при анализе индивидуальных показателей использовались только непараметрические методы. Медиана возрастов составила 88 (44;94) дней для 1 группы, 132 (98;172) дней для 2 группы и 256 (182;1859) дней для 3 группы.

После индексации размеров клапана легочной артерии к весо-ростовым характеристикам, было доказано, что показатели индекса Z-score КЛА не отличаются статистически между группами (рис. 2)

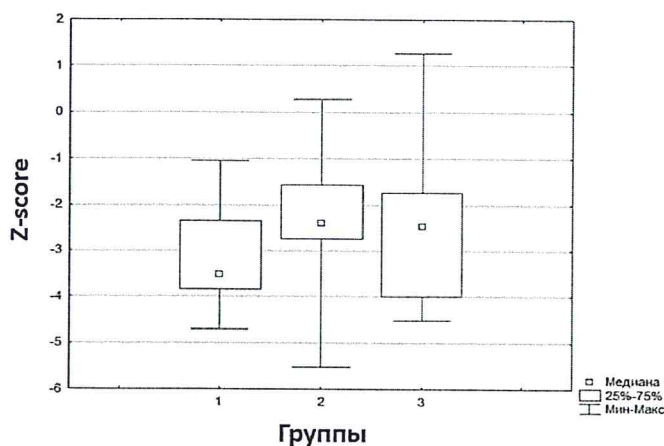


Рисунок 2 - Z-score клапана легочной артерии у пациентов различных групп

Оперативные данные представлены в таблице 1. В таблице приведены медианы и интерквартильные интервалы времени искусственного кровообращения, пережатия аорты, температуры охлаждения и времени операции.

Таблица 1 - Оперативные данные

| Группы                            | 1             | 2             | 3             |
|-----------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| Сохранение КЛА, n (%)             | 4 (40%)       | 18 (60%)      | 10 (43%)      |
| Трансаннулярная пластика, n (%)   | 6 (60%)       | 12 (40%)      | 13 (57%)      |
| Имплантация моностворки           | 1             | 11            | 8             |
| Баллонирование КЛА                | 4             | 8             | 0             |
| Механическая дилатация КЛА, n     | 0             | 5             | 0             |
| Градиент ПЖ/ЛА, мм рт. ст.        | 24 (20; 35)   | 18 (10; 25)   | 14 (11; 27)   |
| Давление ПЖ/ЛЖ, %                 | 51 (45-72)    | 48 (35-69)    | 34 (30-57)    |
| Искусственное кровообращение, мин | 132 (89;235)  | 128 (56;239)  | 154 (81;191)  |
| Пережатие аорты, мин              | 68 (43;102)   | 67 (31;122)   | 79 (38;144)   |
| Температура охлаждения, °С        | 27 (24;32)    | 28 (24;32)    | 28 (24;32)    |
| Время операции, мин               | 220 (185;390) | 223 (135;365) | 283 (170;360) |

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

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

В таблице 2 представлена совокупность до- и интраоперационных измерений ЛА у всех пациентов индексированных в Z-score.

Таблица 2 - Предоперационные и операционные результаты измерения ЛА

| -                       | ЭхоКГ                | КТ                   | Операция             |
|-------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Левая легочная артерия  | -1,63 (-2,24; -0,66) | -0,06 (-1,17; 1,07)  | -0,48 (-0,74; -1,29) |
| Правая легочная артерия | -1,57 (-2,2; -0,72)  | -0,69 (-1,45; -0,81) | -0,34 (-0,33; -0,89) |

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

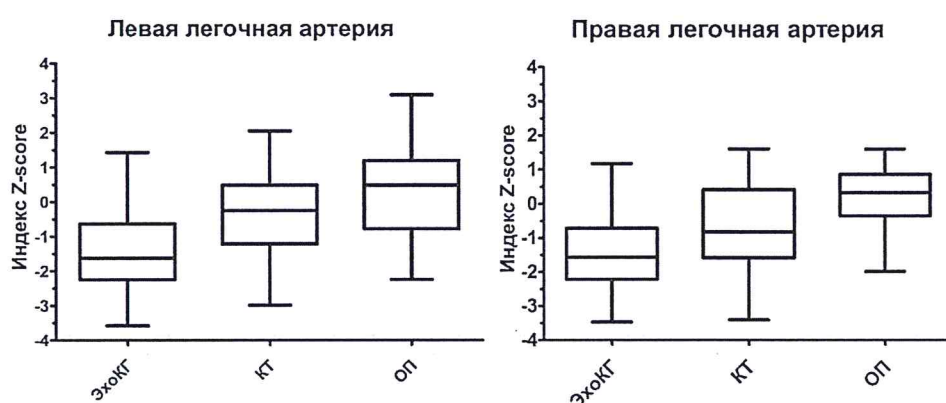


Рисунок 3 - Z-score правой и левой легочных артерий в зависимости от метода оценки, диаграммы размаха (ЛЛА – левая легочная артерия, ПЛА – правая легочная артерия, ЭхоКГ – эхокардиография, КТ – компьютерная томография, ОП – операционные данные)

Расчет индекса Nakata дополнительно иллюстрирует выявленную закономерность, отражая статистическую значимость полученных данных между группами ЭхоКГ и КТ ( $p < 0,01$ ). После применения поправки Бонферрони для преодоления проблем множественных сравнений статистическая значимость между показателями, полученными методами КТ и операционными данными, не была установлена ( $p > 0,05$ ). Использование данных трёх методов оценки размеров ЛА привело к получению трёх различных результатов при расчёте индекса Nakata. При использовании эхокардиографических данных индекс Nakata составил  $106,8 (74,36; 154,7) \text{ мм}^2/\text{м}^2$ , данных КТ -  $187,6 (118,2; 245,9) \text{ мм}^2/\text{м}^2$ , интраоперационных данных -  $223,0 (161,3; 277,2) \text{ мм}^2/\text{м}^2$ . Для большей наглядности результаты полученных расчетов представлены графически (Рис. 4). Полученные гемодинамические данные подчеркивают ценность проведения интраоперационной оценки ЛА, позволяя сделать вывод о влиянии данного метода на выбор радикальной коррекции порока в качестве первичного оперативного вмешательства.

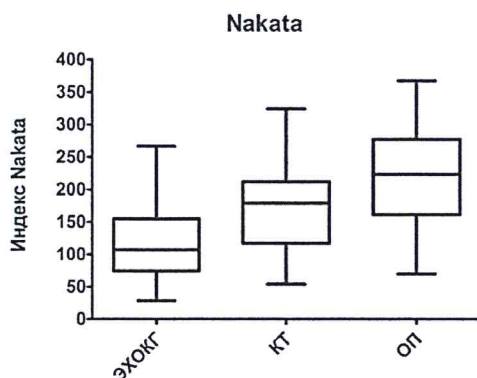


Рисунок 4 - Индекс Nakata (ЭхоКГ-эхокардиография, КТ-компьютерная томография, ОП-операционный протокол)

### *Послеоперационный период*

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

Инотропный индекс через 24 часа и 72 часа представлен в таблице 3.

Таблица 3 - Инотропный индекс

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

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

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

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

Медиана времени ИВЛ составила 23 (8; 45) часов для первой группы, 16 (6; 45) часов для второй группы и 6,3 (6; 32) часа для третьей группы. Статистически значимого различия между группами получено не было. Длительность госпитализации показана на рисунке 5.

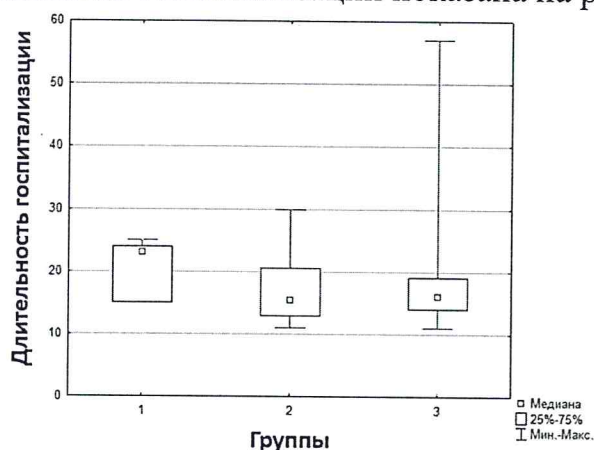


Рисунок 5 – Сравнение длительности госпитализации пациентов в различных группах

В таблице 4 приведены все сводные сведения интраоперационных и послеоперационных параметров, участвующие в анализе. Приведены медианы, квартили, р-значения по критерию Краскела-Уоллиса и пары групп, различия между которыми оказались статистически значимыми.

Таблица 4 - Интра- и послеоперационные параметры

| Показатель                   | Группа 1                 | Группа 2                 | Группа 3                 | р            | Различия              |
|------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------|-----------------------|
| Сатурация, %                 | 85; (80; 96)             | 96; (92; 98)             | 91; (87; 96)             | 0,04         | —                     |
| Клапан ЛА, мм                | 4; (5; 7)                | 7; (6; 8)                | 6; (8; 10)               | <b>0,03</b>  | 1 и 3 группы          |
| Z-score                      | -3,52;<br>(-3,84; -2,34) | -2,39;<br>(-2,86; -1,58) | -2,46;<br>(-3,99; -1,74) | 0,25         | —                     |
| Длительность ИВЛ, час        | 23; (8; 45)              | 16; (6; 45)              | 6; (6; 32)               | 0,46         | —                     |
| Длительность дофамина, сут   | 2,0; (2,0; 2,5)          | 2,3; (1,6; 4,0)          | 1,0; (0,7; 1,5)          | <b>0,004</b> | 1 и 3 гр,<br>2 и 3 гр |
| Длительность адреналина, сут | 3,9; (1,0; 25,0)         | 1,3; (0,5; 4,0)          | 1,0; (0,8; 2,0)          | 0,36         | —                     |
| Время ИК, мин                | 132; (104; 158)          | 128; (111; 160)          | 154; (118; 167)          | 0,67         | —                     |
| Время пережатия аорты, мин   | 68; (43; 74)             | 68; (58; 83)             | 79; (63; 84)             | 0,22         | —                     |
| Температура, °               | 27; (26; 30)             | 28; (27; 30)             | 28; (25; 28)             | 0,68         | —                     |
| Длительность операции, мин   | 220; (190; 240)          | 223; (200; 298)          | 283; (215; 310)          | 0,19         | —                     |

Для применения многомерного анализа шесть показателей с сильной положительной асимметрией (возраст, вес, длительность вентиляции, дофамина, адреналина и длительность пребывания в стационаре) были симметризованы с помощью логарифмирования. К их кодам прибавлен символ р (рВозраст, рВес,

рИВЛ, рДопамин, рАдреналин и рГоспитализация). Для выявления связей между показателями была использована процедура иерархической кластеризации методом Варда с выбором меры связи показателей, равной  $(1-r)$ , где  $r$  — коэффициент корреляции Пирсона. На рисунке 6 видно распределение показателей на две слабо связанные группы - кластера.

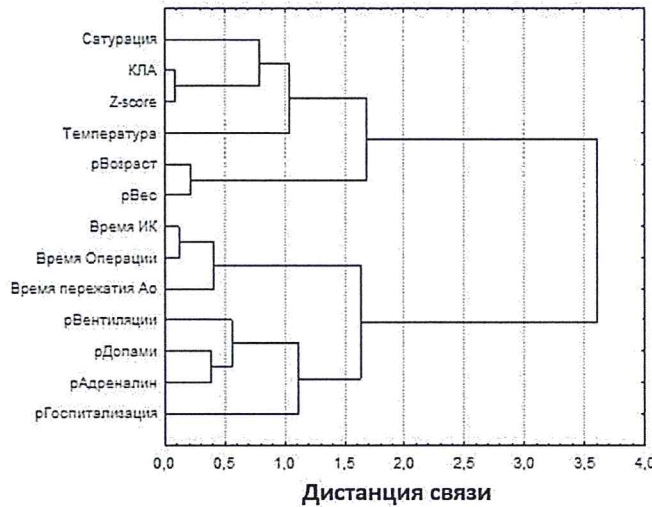


Рисунок 6 - Иерархическая кластеризация методом Варда с выбором меры связи показателей, равной  $(1-r)$ , где  $r$  — коэффициент корреляции Пирсона

На рисунке 7 — диаграмма главных компонент два пучка образуют так называемую «корреляционную плеяду».

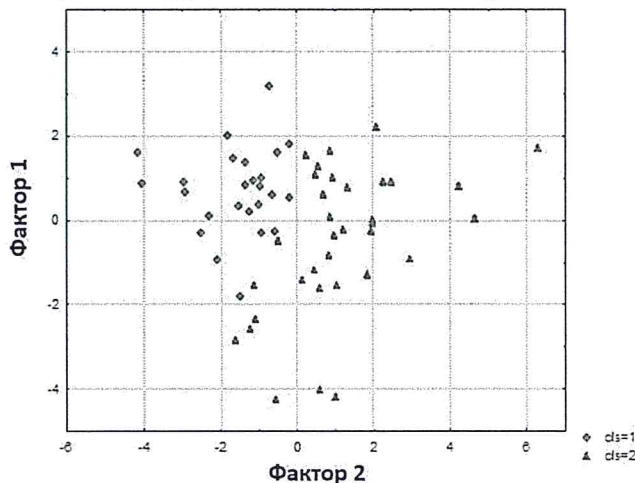


Рисунок 7 - Диаграмма корреляционных плеяд главных компонент на основании иерархической кластеризации методом Варда

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

В таблице 5 приведены медианы, квартили и р-значения по критерию Манна-Уитни.

Таблица 5 - Сравнение кластеров

| Показатель     | Кластер 1             | Кластер 2             | р                 |
|----------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|
| Возраст        | 146; (117; 202)       | 164; (112; 268)       | 0,51              |
| Вес            | 6,4; (5,6; 7,3)       | 6,5; (5,8; 7,8)       | 0,36              |
| SpO2           | 96; (92; 98)          | 91; (85; 96)          | 0,03              |
| КЛА            | 8,0; (7,0; 8,8)       | 6,5; (5,0; 7,5)       | <b>0,002</b>      |
| Z-score        | -1,93; (-2,59; -1,10) | -2,76; (-3,99; -2,20) | <b>0,0008</b>     |
| ИВЛ            | 7; (5; 17)            | 22; (6; 72)           | <b>0,01</b>       |
| Дофамин        | 1,3; (1,0; 2,0)       | 2,0; (1,3; 4,0)       | <b>0,02</b>       |
| Адреналин      | 1,8; (0,5; 3,0)       | 1,0; (0,8; 4,0)       | 0,77              |
| ИК             | 110; (100; 121)       | 159; (137; 177)       | <b>&lt;0,0001</b> |
| Ишемия         | 57; (48; 64)          | 83; (72; 96)          | <b>&lt;0,0001</b> |
| Температура    | 29; (28; 31)          | 27; (25; 28)          | <b>&lt;0,0001</b> |
| Время ОП       | 200; (190; 215)       | 288; (235; 330)       | <b>&lt;0,0001</b> |
| Госпитализация | 15; (13; 19)          | 16; (15; 23)          | 0.10              |

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

Летальность была зафиксирована в 3 случаях. Один летальный случай был отмечен в 2014 г и два летальных случая в 2015г. Первый пациент 5 месяцев имел сопутствующие периферические стенозы легочной артерии. После выполнения первичной радикальной коррекции и бужирования периферических стенозов легочной артерии отмечались эпизоды десатурации, потребовавшие подключение аппарата экстракорпоральной оксигенации. В дальнейшем происходило нарастание признаков полиорганной недостаточности и через 7 дней после операции наступил летальный исход. Второму пациенту 2 месяцев со синистрокардией была выполнена ранняя радикальная коррекция с трансаннулярной пластикой, вентрикулотомией и имплантацией моностворки. В связи с явлениями остаточного стеноза в ВОПЖ потребовалось повторное проведение дополнительной объемной резекции мышечного компонента стеноза ВОПЖ, что отрицательно сказалось на насосной функции ПЖ. В дальнейшем присоединились явления полиорганной недостаточности, приведшие к летальному исходу на 15 сут после операции. У третьего пациента возрастом 1 год 8 мес с гипоплазией центрального легочного русла, на первом этапе выполнялась паллиативное вмешательство – реконструкция пути оттока из ПЖ. На момент радикальной коррекции отмечалось сохранение умеренной гипоплазии правой ЛА. Была выполнена радикальная коррекция с расширенной трансаннулярной резекцией и пластикой ВОПЖ и имплантация



моностворки. В связи с развитием миокардиальной слабости правого желудочка, на фоне высокого сопротивления в малом круге кровообращения в раннем послеоперационном наступил летальный исход.

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

#### *Отдаленный период*

После выписки из стационара было обследовано 28 пациентов с периодом отдаленного наблюдения до 4 лет. В первую группу было включено 6 пациентов, во второй группе 8 пациентов, в 3 группе 14 пациентов. На рисунке 8 представлены медианы показателей градиента в ВОПЖ в разных группах.

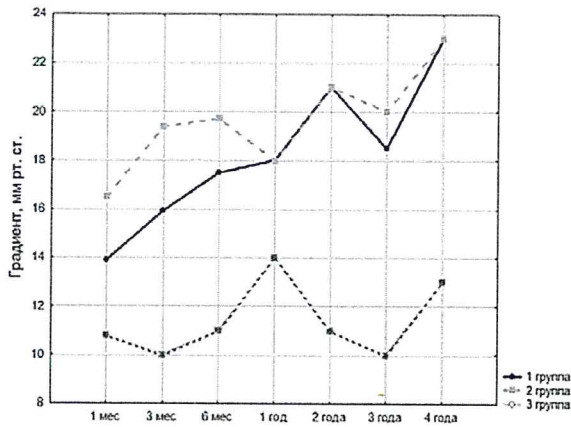


Рисунок 8 – Значения градиентов в выносящем отделе правого желудочка в отдаленном периоде

Было установлено, что среди всех обследованных пациентов максимальный градиент в ВОПЖ среди пациентов с сохраненным клапаном ЛА в отдаленном периоде составил 40 мм. рт. ст., что является приемлемым значением. Во всех группах наблюдалось увеличение градиента к 6 месяцам после операции. В дальнейшем было зафиксировано незначительное увеличение градиента в первых двух группах, где было выполнено больше клапан-сохраняющих операций. На рисунке 9 показаны медианы значений степени регургитаций в проекции клапана легочной артерии.

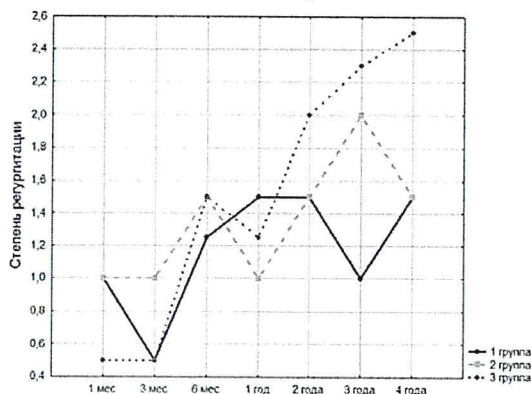


Рисунок 9 - Медианы значений степени регургитации КЛА в отдаленном периоде

Обращает на себя внимание, что в 3-й группе происходило постепенное нарастание степени регургитации, начиная с трехмесячного возраста. Это может быть объяснено, во-первых, наличием имплантированной синтетической моностворки при трансаннулярной пластики и потерей ее функции в большинстве случаев через год после операции. Во-первых, в двух группах ранней радикальной коррекции в госпитальном периоде наблюдения значения пикового градиента в выносящем тракте правого желудочка были приемлемыми, а степень регургитации была меньше, чем в группе более поздней коррекции.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

В нашей работе мы использовали мезенхимные клетки сердца от пациентов с тетрадой Фалло как модель для изучения пролиферативной способности этих клеток и исследования вовлеченности Notch-сигнального пути в ТФ. Мы предположили, что Notch-сигнальный путь может быть дисбалансирован в тканях сердца пациентов с ТФ, и эта дисрегуляция может быть ответственна за ремоделирование тканей сердца у пациентов с ТФ. Хотя репаративный потенциал клеток предшественников кардиомиоцитов остается неизвестным, эти клетки представляют собой удобный и относительно доступный источник клеток сердца человека и могут быть использованы для выявления механизмов и процессов, связанных с развитием сердца. Таким образом, в дополнение к основным задачам, мы анализировали активность Notch-сигнального пути в мезенхимных клетках сердца, полученных из образцов ГЖ у пациентов с ТФ. В качестве группы сравнения мы использовали МКС из тканей пациентов с изолированным дефектом межжелудочковой перегородки (ДМЖП), поскольку этот изолированный дефект не ассоциирован с вовлеченностью Notch-сигнального пути. В качестве экспериментальной части работы нами проводилась оценка уровня мРНК ключевых генов пути Notch *NOTCH1-4* и Notch-лигандов *JAG1*, *DLL4*, Notch-генов-мишеней *HES1*, *HEY1* (рис. 10).

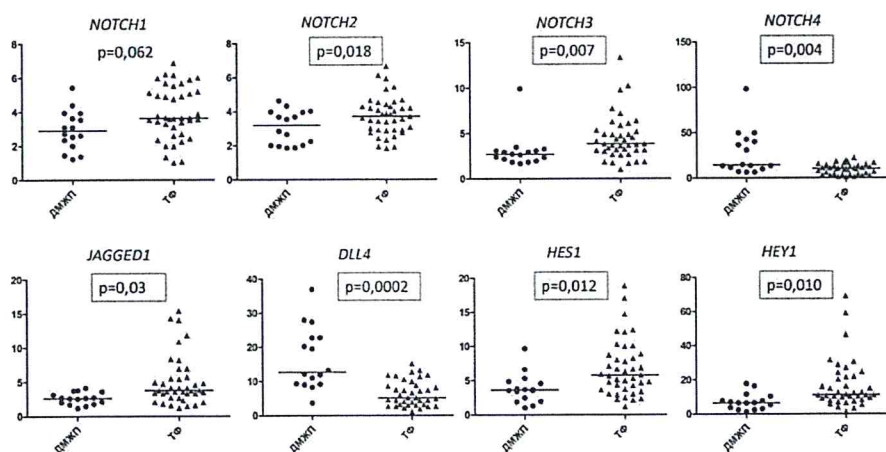


Рисунок 10 - Уровень экспрессии основных рецепторов Notch и мишеней в мезенхимных клетках сердца, от пациентов с дефектом межжелудочковой

перегородки (ДМЖП) и с тетрадой Фалло (ТФ). Вертикальная ось представляет относительное содержание мРНК. Группы сравниваются с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни; горизонтальные линии представляют медиану

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

Для оценки общего уровня активации передачи сигналов Notch в МКС у пациентов с ТФ мы оценили корреляции между генами-мишенями Notch и *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3* (рис.11). Мы нашли корреляции между уровнями *NOTCH1* и их целевыми генами *HES1*, *HEY1*; уровень *NOTCH3* коррелирует с *HES1*. Это говорит о том, что *NOTCH1* и *NOTCH3*, скорее всего, связаны с повышенным уровнем передачи сигналов Notch, который реализуется повышением уровня экспрессии *HES1*, *HEY1* в МКС ТФ. Мы не обнаружили каких-либо ассоциаций высокого/низкого Notch ни с какими клиническими показателями, в т.ч. с возрастом пациентов.

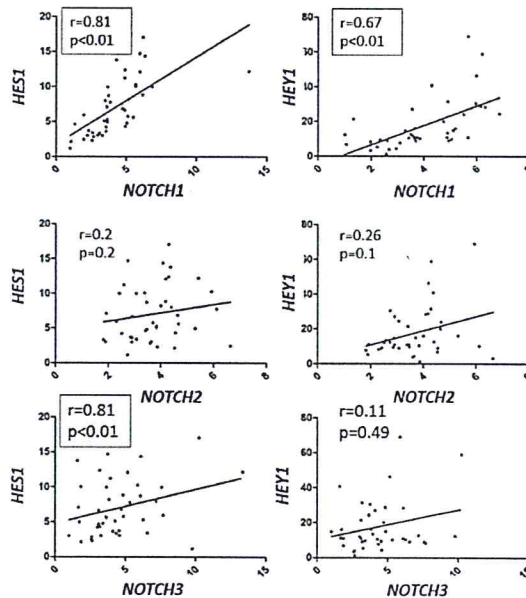


Рисунок 11 - Анализ корреляции между экспрессией генов Notch и генов, являющихся транскрипционными мишенями Notch (*HES1*, *HEY1*) в мезенхимных клетках сердца, полученных у пациентов с ТФ

### Пролиферативная активность мезенхимных клеток сердца. Связь уровня пролиферативной активности мезенхимных клеток сердца с возрастом

В качестве экспериментальной части работы нами проводилось определение степени связи возраста пациентов с ТФ с пролиферативной активностью (ПА) МКС, полученных от 16 пациентов из разных возрастных групп. На рисунке 12 представлен график распределения пациентов по возрасту.

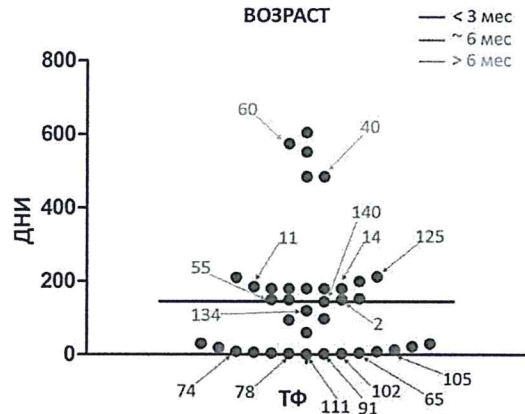


Рисунок 12 - Распределение пациентов по возрасту. Номерами обозначены образцы, которые участвовали в эксперименте по определению уровня пролиферативной активности. Цвет обозначений соответствует возрасту

На рис. 13 представлен график пролиферативной активности МКС. Кривые роста обозначены цветами, соответствующими группам распределения по возрасту на Рис. 12.

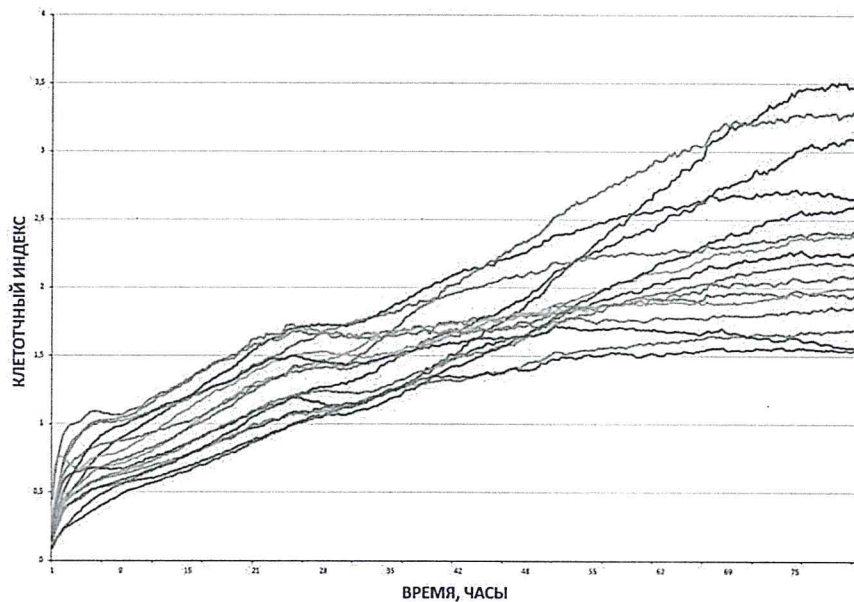


Рисунок 13 - Кривые роста, отражающие пролиферативную активность МКС

Нами не было выявлено ассоциации между возрастом и уровнем пролиферативной активности МКС пациентов (рис. 13). Также в нашей работе определялась связь клинических данных с пролиферативной активностью МКС. Нами не было установлено связи пролиферативной активности этих клеток ни с одним из клинических параметров (уровень сатурации, выраженность гипертрофии ПЖ).

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

После того, как не было получено связи ПА с возрастом, была сформирована гипотеза, что уровень ПА клеток может быть связан с уровнем активности Notch сигнального пути. Для определения уровня активности Notch сигналинга у пациентов с ТФ были оценены уровни экспрессии двух генов - *HEY1* и *HES1*. Белки, кодирующие эти гены, являются генами-мишенями и важными составляющими Notch сигналинга.

При анализе корреляционной взаимосвязи *HEY1* и *HES1*, нами было обнаружено наличие значимой взаимосвязи между этими параметрами. Была выявлена корреляционная взаимосвязь уровней экспрессии *HES1* и *HEY1*. Коэффициент корреляции Спирмена равнялся 0,7 при  $p < 0,01$ .

В дальнейшем, после того как было установлено, что уровни экспрессии генов этих двух компонентов коррелируют между собой, были взяты образцы с высокими и низкими уровнями экспрессии обоих генов (рис. 14).

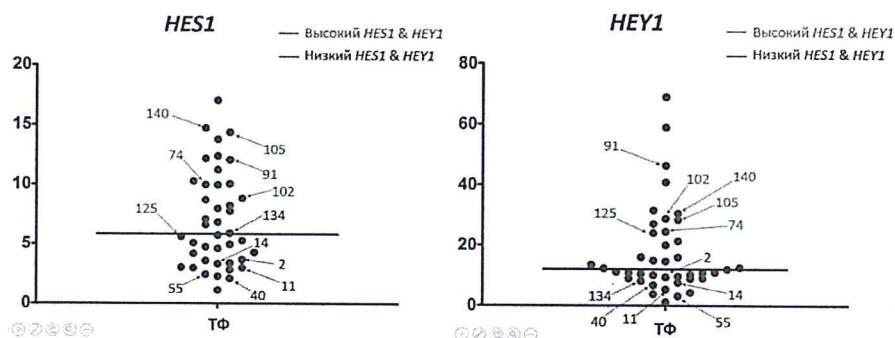


Рисунок 14 - Уровни экспрессии генов *HEY1* и *HES1*. На графиках обозначены номера образцов с высоким и с низким уровнями экспрессии, красным и синим цветом соответственно

На рисунке 15 представлен график пролиферативной активности МКС. Кривые роста обозначены цветами, соответствующие группам распределения по уровню экспрессии *HEY1* и *HES1* на рисунке 15.

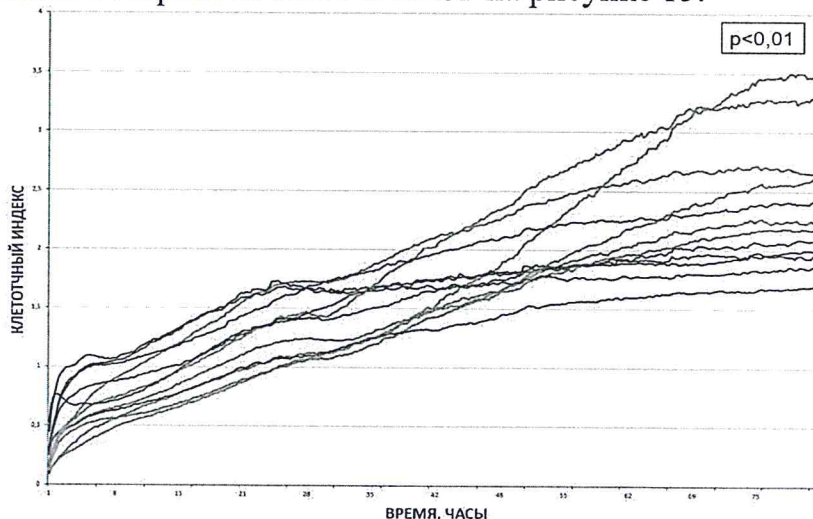


Рисунок 15 - Кривые роста, отражающие пролиферативную активность МКС. р демонстрирует статистическое различие при сравнении клеточных индексов между

группами с «низким уровнем» (синий цвет) и «высоким уровнем» (красный цвет) экспрессии *HEY1* и *HES1*

В результате была установлена прямая связь активности Notch сигнального пути и активностью пролиферации ( $p < 0,01$ ). Также проверялось наличие корреляции между уровнем экспрессии *HEY1* и пролиферативной активностью МКС через 24, 48 и 72 часа. Корреляция была выявлена только через 72 часа эксперимента (рис. 16).

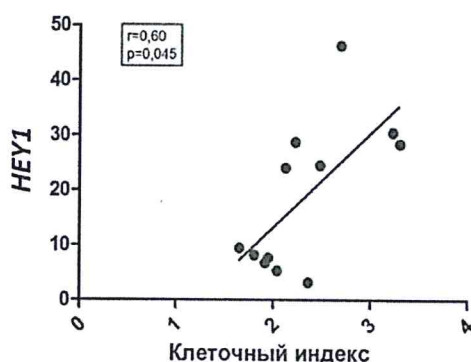


Рисунок 16 - Корреляционная взаимосвязь уровней экспрессии *HEY1* и пролиферативной активности, выраженной в виде клеточного индекса ( $r$  – коэффициент корреляции Спирмена)

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

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

### Выводы

1. Методики интраоперационной баллонной и механической дилатации фиброзного кольца клапана легочной артерии при выполнении первичной ранней радикальной коррекции тетрады Фалло позволяют выполнить клапан-сохраняющую операцию в 60% случаев.
2. У пациентов с тетрадой Фалло размер легочных артерий, оцениваемый по данным неинвазивных методов обследования, значительно меньше их истинного размера, что показывает необходимость интраоперационного измерения размеров ветвей легочной артерии в случаях их гипоплазии.
3. Ранняя радикальная коррекция тетрады Фалло не увеличивает длительность искусственной вентиляции легких, инотропный индекс через 72 часа и длительность инотропной поддержки в послеоперационном периоде, продолжительность госпитализации и не повышает риск летальности.

4. Уровень экспрессии генов сигнального каскада Notch в мезенхимных клетках сердца значительно отличается от такового у пациентов с тетрадой Фалло по сравнению с пациентами с дефектом межжелудочковой перегородки.
5. Уровень активности Notch сигнального пути коррелирует с пролиферативной способностью мезенхимных клеток сердца у пациентов с ТФ в исследуемой возрастной группе.

### Практические рекомендации

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

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Малашичева, А. Сравнительная характеристика стволовых клеток сердца, полученных из миокарда детей и взрослых / А. Б. Малашичева, А. А. Сабирова, И. А. Козырев [и др.] // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2015. – Т.14. – №3. – С.52-8.
2. Козырев, И.А. Реконструкция выходного отдела правого желудочка у пациентов младше 5 месяцев при ранней радикальной коррекции тетрады Фалло / И.А. Козырев, А.К. Латыпов, А.А. Морозов [и др.] // Практическая медицина. — 2018. – Т. 16. – № 6, – С. 205-10.
3. Козырев, И.А. Оценка легочных артерий у пациентов с тетрадой Фалло / И.А. Козырев, А.А. Морозов, А.К. Латыпов [и др.] // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2018. – Т.22. – №4. – С.48-53.
4. Козырев, И.А. Клапан-сохраняющая радикальная коррекция тетрады Фалло: непосредственные результаты / И.А. Козырев, А.А. Морозов, Е.В. Грехов [и др.] // Патология кровообращения и кардиохирургия. —2019. —Т.23. —№1, —С.9-16.
5. Козырев, И.А. Фенотипическая характеристика мезенхимных клеток сердца, полученных от пациентов с тетрадой Фалло и дефектом межжелудочковой перегородки / И.А. Козырев, А.С. Головкин, Е.С. Игнатьева [и др.] // Трансляционная медицина. – 2019. – Том 6, – №5. – С.16–23.