

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Кафедра госпитальной терапии

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

НА ТЕМУ: Молекулярно - клеточные, метаболические и структурные причины кальцификации аортального клапана

Работа выполнена в лаборатории молекулярной кардиологии в ФГБУ “ФМИЦ им. В.А.Алмазова”

Выполнила: студент 603 группы
Шишкова Анастасия Алексеевна

Научные руководители:

Заведующая лабораторией молекулярной кардиологии в ФГБУ “ФМИЦ им. В.А.Алмазова”, кандидат биологических наук, доцент каф. эмбриологии СПбГУ Малашичева Анна Борисовна

Заведующий кафедрой госпитальной терапии СПбГУ, главный врач международного медицинского центра “СОГАЗ”, доктор медицинских наук, профессор Обрезан Андрей Григорьевич

Санкт – Петербург

2016

Оглавление

Список сокращений	4
Введение	7
Глава 1. Обзор литературы	10
1. Макро и микроструктура аортального клапана	10
1.1. Трехстворчатый аортальный клапан (TAV – Tricuspid aortic valve) ..	10
1.2. Двустворчатый аортальный клапан (BAV – Bicuspid aortic valve) ..	12
2. Аортальный стеноз	13
2.1. Молекулярные и клеточные механизмы развития аортального стеноза	14
2.1.1. Аортальный стеноз и атеросклероз	14
2.1.2. Эктопическая кальцификация	15
2.1.3. Роль эндотелия	16
2.1.4. Воспаление	17
2.1.5. Отложение липопротеинов	18
2.1.6. Матриксные металлопротеиназы и ремоделирование внеклеточного матрикса	19
2.1.7. Неоангиогенез	21
2.1.8. Роль ренин – ангиотензин – альдостероновой системы (РААС) ..	22
2.1.9. Сигнальный путь Notch и его мишени	23
2.1.10. Терапевтические мишени	28
2.1.11. Роль симпатической нервной системы в процессе стенозирования	31
2.1.12. Кальцификация как воспалительный процесс	31
3. Патофизиология аортального стеноза	33
4. Клиническая картина	34
4.1. Жалобы	34
4.2. Объективные данные	35
4.3. Неинвазивные методы исследования	35
4.4. Инвазивные методы исследования	38
5. Лечение	38
5.1. Медикаментозное лечение	38

	3
5.2. Хирургическое лечение	39
Глава 2. Материалы и методы	40
2.1. Материалы	40
2.1.1. Клеточные культуры	40
2.1.2. Праймеры	40
2.2. Методы	42
2.2.1. Получение и культивирование эндотелиальных и интерстициальных клеток аортального клапана	42
2.2.2. Магнитный сортинг CD31-позитивных клеток	43
2.2.3. Выделение РНК из клеточных культур	44
2.2.4. Полуколичественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией	45
2.2.5. Полимеразная цепная реакция в реальном времени	45
Глава 3. Результаты	47
3.1. Клинико-лабораторная и инструментальная характеристика пациентов, подвергшихся протезированию аортального клапана	47
3.2. Анализ молекулярно-клеточных данных	52
3.2.1. Получение интерстициальных и эндотелиальных клеток клапана и создание биобанка в лаборатории	52
3.2.2. Анализ экспрессии генов-компонентов сигнального пути Notch в интерстициальных клетках аортального клапана	54
3.2.3. Анализ экспрессии генов-компонентов сигнального пути Notch в эндотелиальных клетках аортального клапана	57
3.2.4. Анализ экспрессии генов остеогенной дифференцировки в интерстициальных клетках аортального клапана	58
3.3. Обсуждение результатов	59
Заключение	64
Выводы	65
Благодарности	66
Список литературы	67

Список сокращений

AVA (*aortic valve area*) – площадь отверстия аортального клапана

BAV (*bicuspid aortic valve*) – двустворчатый аортальный клапан

BMP 2 (*bone morphogenetic protein – 2*) – костный морфогенетический протеин

DLL (*Delta-like ligand*) – Delta-like лиганд

DMSO – диметилсульфоксид

EGF (*epidermal growth factor like*) – эпидермальный фактор роста

ENOS (*endothelial nitric oxide synthase*) – эндотелиальная NO синтаза

GAPDH (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) – глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназа

HAEC (*human aortic endothelial cells*) – эндотелиальные клетки аорты человека

MMP – матриксные металлопротеиназы

NICD (*Notch intracellular domain*) – внутриклеточный домен Notch

OPG (*osteoprotegerin*) – остеопротегерин

SMA (*smooth muscle actin*) – гладкомышечный актин

SPRY1 (*protein sprouty 1*) – протеин sprouty 1

TAV (*tricuspid aortic valve*) – трехстворчатый аортальный клапан

TAVI (*transcatheter aortic valve implantation*) – транскатетерная имплантация аортального клапана

TGF (*tumor growth factor beta 1*) – трансформирующий ростовой фактор бэта

TIMP (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) – тканевые ингибиторы металлопротеиназ

TNF (*tumor necrosis factor alpha*) – фактор некроза опухоли альфа

TLR – Toll рецепторы

VEC (*valve endothelial cells*) – эндотелиальные клетки аортального клапана

VEGF (*vascular endothelial growth factor*) – фактор роста эндотелия сосудов

VIC (*valve interstitial cells*) – интерстициальные клетки клапана

АД – артериальное давление

АК – аортальный клапан

АКШ – аортокоронарное шунтирование

АПФ – ангиотензин превращающий фермент

АС – аортальный стеноз

ГАГ – гликозамингликаны

ГБ – гипертоническая болезнь

ГЛЖ – гипертрофия левого желудочка

ГМК – гладкомышечные клетки

БАК – бicuspidальный аортальный клапан

иАПФ – ингибитор ангиотензинпревращающего фермента

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ИМТ – индекс массы тела

КДД – конечное диастолическое давление

КТ – компьютерная томография

ЛП (а) – липопротеины а

ЛПВП – липопротеины высокой плотности

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

МРТ – магнитно-резонансная томография

ПЦР в реальном времени – полимеразная цепная реакция в реальном времени

РААС – ренин-ангиотензин-альдостероновая система

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

СРБ – С - реактивный белок

ТАК – трикуспидальный аортальный клапан

ХС – холестерин

ХСН – хроническая сердечная недостаточность

ЧПЭ – чреспищеводная эхокардиография

ЧСС – частота сердечных сокращений

ЭМТ – эпителиально-мезенхимный переход

ЭХОКГ – эхокардиография

Введение

За последние несколько лет в структуре клапанных пороков сердца произошли существенные изменения, которые характеризуются уменьшением частоты пороков сердца ревматической этиологии и увеличением распространенности склеро-дегенеративных поражений клапанов. Этому способствовали увеличение продолжительности жизни населения и совершенствование медицинских технологий [1]. Самый распространенный клапанный порок сердца в настоящее время – аортальный стеноз (АС). Частота обнаружения АС среди лиц в возрасте 65 лет составляет около 25%, а после достижения возраста 75 лет увеличивается до 48%, хотя среди лиц в возрасте до 65 лет она составляет лишь 4-5% [1, 2]. Основная причина развития АС – кальцификация исходно нормального аортального клапана (АК) или врожденного двухстворчатого клапана аорты. Если раньше развитие АС считалось пассивным дегенеративным процессом и результатом механического износа створок, происходящего на шестом и седьмом десятках жизни, то сейчас стало ясно, что это активный и сложный патологический процесс. Ранее также считалось, что развитие АС это атеросклерозоподобный процесс, так как подтверждалась связь с традиционными факторами риска, такими как артериальная гипертензия, сахарный диабет, курение, повышение уровня холестерина. Однако на сегодняшний день накоплено немало данных, показывающих, что процесс формирования АС не сводится лишь к атеросклеротическому поражению клапанов. Есть данные об участии в этом процессе некоторых специфических сигнальных путей, один из которых сигнальный путь Notch [2]. Сигнальный путь Notch является ключевым в регуляции развития многих систем, органов и тканей, влияет на главные клеточные процессы – пролиферацию, дифференцировку и апоптоз, а также участвует в поддержании гомеостаза

во взрослом организме. Было показано, что мутации в гене *NOTCH1* могут быть ассоциированы с кальцинозом аортального клапана, однако роль сигнального пути Notch в патогенезе АС остается неясной [3]. В пользу участия этого сигнального пути в патогенезе АС свидетельствуют и результаты доклинических исследований, которые показывают, что специфическое блокирование сигнального пути Notch значимо подавляет кальцификацию сосудов и аортального клапана [2, 3].

Целью данной работы являлось исследование экспрессии компонентов сигнального пути Notch и генов остеодифференцировки в интерстициальных и эндотелиальных клетках аортального клапана человека и поиск взаимосвязей между уровнем экспрессии компонентов сигнального пути Notch и клинико-лабораторными показателями у пациентов.

Для достижения поставленной цели были определены следующие экспериментальные **задачи**:

1. Провести клинико-лабораторную и инструментальную характеристику пациентов, подвергшихся протезированию аортального клапана;
2. Получить интерстициальные клетки аортального клапана от пациентов со стенозом и здоровых доноров в качестве контроля;
3. Получить эндотелиальные клетки аортального клапана от пациентов со стенозом и здоровых доноров в качестве контроля;
4. Охарактеризовать интерстициальные клетки аортального клапана по экспрессии генов компонентов сигнального пути Notch;
5. Охарактеризовать эндотелиальные клетки аортального клапана по экспрессии генов компонентов сигнального пути Notch;
6. Охарактеризовать интерстициальные клетки аортального клапана по экспрессии генов, связанных с остеогенной дифференцировкой;

7. Выявить ассоциации клинико-лабораторных, инструментальных и молекулярно-клеточных и генетических компонентов патогенеза кальцификации аортального клапана.

Глава 1. Обзор литературы

1. Макро и микроструктура аортального клапана

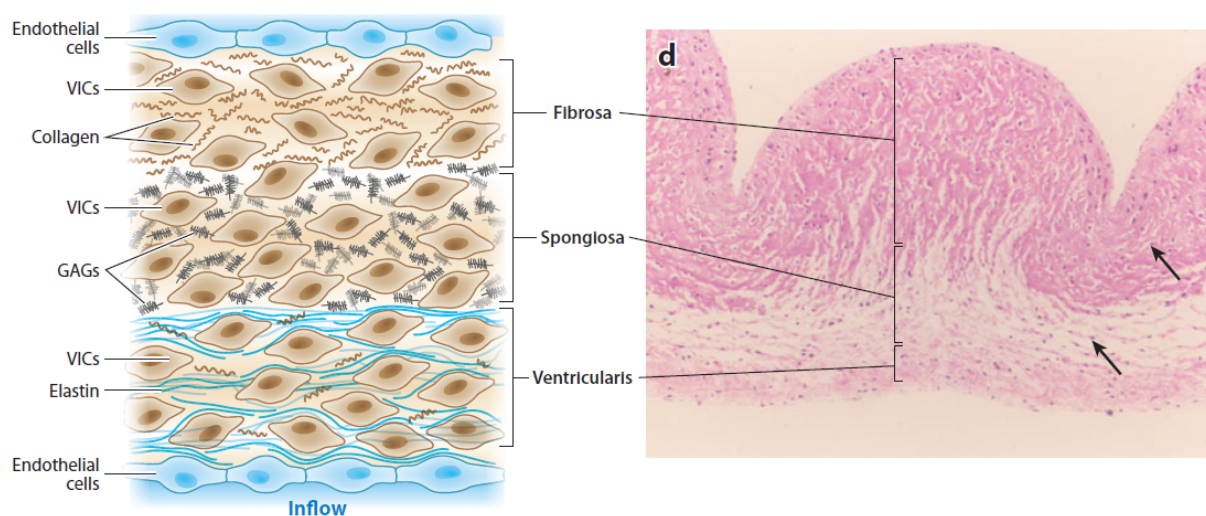
1.1. Трехстворчатый аортальный клапан (TAV – *Tricuspid aortic valve*)

Аортальный клапан является частью корня аорты. По современным представлениям корень аорты является объемной структурой, состоящей из трех синусов Вальсальвы, трех межстворчатых треугольников Генле, трех полулунных створок, трех комиссур, фиброзного кольца, проксимальной и дистальной границей которой являются вентрикулоаортальное и синотубулярное соединение. Створки аортального клапана называются в зависимости от их расположения: левая полулунная (коронарная) створка, правая полулунная (коронарная) створка и задняя (некоронарная) створка аортального клапана [4, 5]. У взрослых периметр клапана – 7,0 см, диаметр отверстия – 2,0-2,3 см, площадь отверстия 2,5-3,0 см, площадь створок 4,0-5,0 см. В левом и правом синусах Вальсальвы находятся устья соответствующих коронарных артерий [6]. Створка состоит из четырех компонентов: тело, основание, поверхность коаптации (смыкания), узелки Аранци (утолщение треугольной формы в зоне коаптации) [4]. Створки представляют собой тонкие (< 1 мм), гибкие, аваскулярные структуры, состоящие из трех слоев: желудочкового (*ventricularis*), аортального (*fibrosa*) и спонгиозного (*spongiosa*) [7]. С аортальной и желудочковой сторон створки покрыты монослоем эндотелиальных клеток. Было доказано, что эндотелиальные клетки аортального клапана (*VEC – valve endothelial cells*) отличаются от эндотелиальных клеток, выстилающих артерии и вены, по способности реагировать на изменения гемодинамики, что подтверждает их уникальную морфологию [7, 8]. Эндотелиальные клетки аорты (*HAEC – human aortic endothelial cells*) располагаются так, чтобы их главная ось

была перпендикулярна направлению растяжения сосуда (круговое), что также является параллельным направлению кровотока. Для эндотелиальных клеток клапана главное направление растяжения является радиальным и клетки будут располагаться перпендикулярно или по окружности к нему, что также является перпендикулярным направлению кровотока [9]. В некоторых источниках указывается 5 слоев соединительной ткани, расположенных между аортальной и желудочковой поверхностью, а именно: *lamina ventricularis*, *lamina radialis*, *lamina spongiosa*, *lamina fibrosa*, *lamina arterialis*, но все-таки общепринятым является выделение трех слоев в структуре клапана [5, 10]. Аортальный слой (*fibrosa*) преимущественно содержит коллагеновые волокна, ориентированные в окружном направлении в виде пучков и тяжей, и небольшого количества эластических волокон [7]. Коллагеновые волокна в теле створки отходят под углом 45 градусов от фиброзного кольца, имеют направление полуэллипса и заканчиваются на противоположной стороне. В зоне коаптации свободного края этот слой присутствует в виде отдельных пучков. Коллагеновые пучки в этой зоне подвешены между комиссуральными стержнями (местами фиксации комиссур на внутренней поверхности аорты) под углом 125 градусов относительно стенки аорты. Подобная ориентация коллагеновых волокон предназначена для передачи нагрузки со створок на фиброзное кольцо во время диастолы [4]. Более тонкий желудочковый (*ventricularis*) слой содержит гораздо большее количество эластических волокон по сравнению с аортальным, более того оба компонента желудочкового слоя – эластические и коллагеновые волокна в ненагруженной створке находятся в гораздо менее организованном состоянии. Спонгиозный слой (*spongiosa*) содержит большое количество гликозамингликанов (ГАГ) и протеогликанов. Между всеми внеклеточными компонентами в трех слоях находятся интерстициальные клетки клапана (*VIC – valve interstitial cells*). VIC необходимы для поддержания функции клапана и гомеостаза, посредством

пролиферации, секреции матриксных металлопротеиназ и компонентов внеклеточного матрикса. VIC – это гетерогенная группа клеток с уникальными характеристиками. У интерстициальных клеток клапана существует 5 фенотипов: эмбриональные клетки – предшественники, “молчащие” интерстициальные клетки, активированные интерстициальные клетки, постнатальные стволовые клетки и интерстициальные клетки, приобретшие черты остеобластов. В аортальных клапанах взрослых людей VIC преимущественно представлены фибробластами (“молчащими клетками”), только 2-5% интерстициальных клеток находятся в активированном состоянии в норме. Их фенотип в норме меняется с возрастом и при изменении условий окружающей среды (например, внезапное изменения давления) [8].

Рисунок 1. Гистологическое строение аортального клапана [8].



1.2. Двустворчатый аортальный клапан (BAV – Bicuspid aortic valve)

Двустворчатый аортальный клапан является широко распространенным вариантом развития клапана, который встречается у 2% населения с соотношением между мужчинами и женщинами 4:1 [11]. Морфологически двустворчатый аортальный клапан представляет собой 2 створки, которые могут быть как одинакового, так и неравного размера (разница может достигать 1,5-2 раз) [6]. Объединенная створка содержит

гребень ложной комиссуры (шов), идущий от основания до свободного края. Наиболее часто объединены правая и левая коронарные створки, гораздо реже встречается вариант, когда объединена правая коронарная и задняя створки. Самый редкий вариант – объединенные левая коронарная и задняя створки [12]. Иногда достаточно сложно отличить врожденный двустворчатый аортальный клапан от приобретенного “двустворчатого” (например, постревматического) клапана. В таких случаях прибегают к гистологическому анализу шва: шов при врожденном двустворчатом аортальном клапане богат эластическими волокнами, тогда как в постревматическом и поствоспалительных швах – шов богат коллагеновыми волокнами [12].

2. Аортальный стеноз

Аортальный стеноз – наиболее частая причина не сегодняшней день для протезирования аортального клапана в развитых странах. Распространенность заболевания увеличивается с возрастом, поражая 2-3% популяции, достигшей 65-летнего возраста [13]. В процессе формирования аортального стеноза принято выделять 3 стадии: первая – обусловлена воспалительными изменениями в клапане, вторая, развитием фиброза, третья, формированием кальциноза аортального клапана [14]. В свою очередь, в процессе развития кальциноза аортального клапана принято также выделять несколько стадий: аортальный склероз (стадия легкой кальцификации) – уплотнение и утолщение створок клапана с локальными участками кальцификации, без слияния комиссур и без выраженной обструкции выходного отдела левого желудочка. В дальнейшем аортальный склероз может переходить в стадию умеренной кальцификации и, наконец, в третью стадию, тяжелую кальцификацию створок, сопровождающуюся обструкцией выходного отдела левого желудочка, единственным эффективным методом лечения которой на сегодняшний день является протезирование [15, 16].

2.1. Молекулярные и клеточные механизмы развития аортального стеноза

На сегодняшний день, дегенеративно-дистрофический аортальный стеноз, встречается гораздо чаще, чем стеноз, обусловленный другими причинами [6]. Основная причина – кальциноз исходно нормального клапана или врожденного двустворчатого аортального клапана (у лиц с двустворчатым аортальным клапаном манифестация аортального стеноза, как правило, происходит на 20 лет раньше, чем у людей с трехстворчатым клапаном и к 45 годам более половины лиц с двустворчатым клапаном имеют выраженный аортальный стеноз) [1]. Менее редкими причинами являются ревматическое поражение, семейная гиперхолестеринемия, гиперпаратиреоз, болезнь Педжета, охроноз, болезнь Фабри, системную красную волчанку [2].

2.1.1. Аортальный стеноз и атеросклероз

Во многих источниках говорится, что аортальный стеноз это атеросклерозоподобный процесс. Безусловно между этими двумя процессами существуют общие патогенетические черты, однако, есть и различия. Сходством являются: факторы риска, такие как гиперхолестеринемия, курение, артериальная гипертензия, сахарный диабет, мужской пол [17]; то, что оба процесса являются хроническими, активными, медленно прогрессирующими; в обоих процессах принимают участие воспаление, ренин-ангиотензин-альдостероновая система (РААС), активные формы кислорода, ремоделирование матрикса клапана, отложение липопротеинов, неоангиогенез [18]. Повреждение в начале развития как атеросклероза, так и аортального стеноза включает в себя нарушение структуры (чаще всего надрывы, разрывы) базальной мембраны, миграцию макрофагов и Т-лимфоцитов, инфильтрацию липопротеинами (апо А, апо В, апо Е). Последующее воспаление вызывает

образование и активизацию миофибробластов, выброс цитокинов (таких как TNF alpha, TGF beta 1) и матриксных металлопротеиназ [19]. Отличия в том, что при развитии аортального стеноза кальцификация гораздо более выражена, чем при развитии атеросклеротической бляшки и в том, что не существует на сегодняшний день ни одного лекарственного препарата, способного уменьшить активность процесса стенозирования [17]. Также на гистологическом уровне отличием от атеросклеротического процесса является то, что в стенозированных створках нет фиброзной покрышки и некротического ядра [15].

2.1.2. Эктопическая кальцификация

Исследования последних лет установили, что в процессе кальцификации аортального клапана участвуют гидроксиапатиты, которые откладываются на коллагеновом матриксе, белок остеопонтин и другие белки костного матрикса [13]. Существует много терминов для описания процесса кальцификации аортального клапана, один из них – эктопическая кальцификация (т.е. отложение кальция в не-костных тканях). Эктопическая кальцификация возникает, когда кальций и фосфаты, которые находились в растворенном состоянии во внеклеточной жидкости, кристаллизируются с образованием гидроксиапатита (такого же кристалла, который составляет основную часть кости). Очагом для начала кальцификации служат везикулы, образовавшиеся из клеток, подвергшихся апоптозу [20]. Обычно кальцификация начинается на створках около их места прикрепления к аорте и в области, близлежащей к месту их соприкосновения. Известно, что гораздо большее кальцификации подвержена аортальная поверхность клапана, нежели желудочковая, что объясняется различием в генах, экспрессируемых на аортальной и желудочковой поверхностях [12].

2.1.3. Роль эндотелия

В норме аортальный клапан покрыт монослоем эндотелия на аортальной и желудочковой поверхностях. На начальных этапах развития аортального стеноза с помощью электронной микроскопии было верифицировано повреждение эндотелия, особенно в участках, испытывающих максимальный механический стресс [20]. Установлено, что эндотелиальные клетки способны выделять BMP 2 (*bone morphogenetic protein – 2*), потенциальный фактор остеоиндукции [21]. Эндотелиальные клетки клапана считаются регуляторами активности интерстициальных клеток клапана. Фенотип интерстициальных клеток коррелирует с уровнем NO, продуцируемым эндотелиальными клетками. Было показано, что экзогенно введенный NO в сокультуру эндотелиальных и интерстициальных клеток значительно уменьшал образование узлов кальцификации [22]. Также показано, что повреждение эндотелия является иницирующим фактором для отложения липопротеинов, включая ЛПНП (липопротеины низкой плотности), и их дальнейшей модификации с образованием их окисленных форм [23]. С возрастом, главным фактором риска аортального стеноза, происходит уменьшение активности антиоксидантных механизмов, уменьшение образования NO, увеличение количества супероксидов. У пациентов с двустворчатым клапаном уровень NO снижается гораздо сильнее и гораздо раньше. В экспериментах, проведенных на мышах, было показано, что выраженный фиброз и кальцификация створок у ENOS (*endothelial nitric oxide synthase*) $-/-$ мышей с двустворчатым клапаном является очень выраженной и развивалась даже при отсутствии других факторов риска. Также отсутствие NO выразилось в увеличении уровня коллагена 3 в аортальных створках, что подтверждает регуляцию работы интерстициальных клеток эндотелием [24].

2.1.4. Воспаление

Воспаление – неотъемлемая черта процесса кальцификации аортального клапана, развивающаяся из-за эндотелиальной дисфункции и поддерживаемая традиционными факторами риска. Адгезионные молекулы (например, – молекула клеточной адгезии 1) в норме не представлены на эндотелии здоровых клапанов, однако имеются в стенозированных. Моноциты прикрепляются к адгезионным молекулам, мигрируют в субэндотелиальное пространство в ответ на местно продуцируемые хемоаттрактанты и дифференцируются в макрофаги. Известно, что такой провоспалительный цитокин как TGF beta также участвует в процессе кальцификации, так как ему присущи черты остеоиндукции. TGF beta является членом суперсемейства, к которому принадлежит BMP2. Последние исследования выявили гораздо более высокий уровень TGF beta 1 в кальцифицированных створках, нежели в некальцифицированных [20]. TGF beta суперсемейство – это семейство цитокинов и факторов роста, которые регулируют многие биологические функции в разных тканях и органах, включая клапаны сердца. На поверхности клетки TGF beta связывается с TGF beta рецептором типа 1 и 2, что приводит к активизации Smad протеина, который, в свою очередь, взаимодействует с транскрипционными факторами такими как FoxH1, c-Jun, c-fos, Gli-3. Этот сигнальный путь регулирует клеточный цикл, пролиферацию, секрецию цитокинов, синтез и деградацию внеклеточного матрикса, т.е. все те процессы, которые важны при ремоделировании и репарации клапана. В кальцифицированных клапанах был обнаружен не только высокий уровень TGF beta, но и алкалин фосфатазы. In vitro, TGF beta приводил к миграции, агрегации и образованию апоптотических, богатых алкалин фосфатазой узлов, что сопровождалось их интенсивной кальцификацией. TGF beta блокирующие АТ приводили к прекращению апоптоза, образованию узлов и кальцификации [18].

В стенозированный клапан присутствуют макрофаги, Т – лимфоциты, тучные клетки и молекулы характерные для типичного воспаления, такие как IL-2, HLA-DR, TNF alpha [25]. Последние исследования показывают, что интерстициальные клетки клапана приобретают черты остеобластов при добавлении в клеточную культуру TNF alpha и IL-2 in vitro. На интерстициальных клетках клапана были обнаружены Toll рецепторы (особенно TLR 2 и TLR 4), которые также участвуют в регуляции образования провоспалительных цитокинов и ответа на них [26, 27]. В ответ на стимуляцию провоспалительными цитокинами через активацию TLR 4 интерстициальные клетки клапана приобретали либо фенотип остеобласта, либо “воспалительный” фенотип. Образование остеобластоподобных клеток сопровождалось продукцией интерстициальными клетками BMP2 (bone morphogenetic protein 2) и других белков, участвующих в остеогенезе. “Воспалительный” фенотип характеризовался образованием адгезионных молекул (например, – молекула клеточной адгезии 1) [28].

2.1.5. Отложение липопротеинов

Доказано, что липопротеины низкой плотности (ЛПНП) и липопротеины а (ЛП(а)) откладываются в пораженный створках аортального клапана. Как и при атеросклерозе, процесс отложения ЛП обеспечивается (хотя бы отчасти) повышенным уровнем протеогликанов (включая бигликан и декорин), находящихся во внеклеточном матриксе. ЛП прикрепляются к протеогликану через взаимодействие между позитивно заряженной аминокислотой на ЛП и отрицательно заряженным ГАГом на протеогликаны. Окисленные формы холестерина (ХС) (например, 25 гидроксистерол) также присутствуют в пораженных створках, особенно в местах прогрессирующей кальцификации. Исследование in vitro показало, что окисленные формы холестерина стимулируют образование узлов кальцификации [17, 25].

Гиперхолестеринемия и другие факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний провоцируют окислительный стресс в эндотелии клапана, также, как и в эндотелии сосудов, что, в свою очередь, активирует секрецию цитокинов, факторов роста и запускает процесс кальцификации. Факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний, пролиферация клеток и циклическое напряжение тканей клапана - все это играет роль в активации миофибробластов и их превращении в остеобластоподобные клетки [29]. Окисленные формы ХС (например, 25 гидроксистерол), обнаруженные на ранних этапах стенозирования клапана, стимулируют процесс кальцификации через ряд механизмов, таких как процесс воспаления, апоптоз и экспрессия матриксных металлопротеиназ. Было показано, что, если кормить кролика пищей с высоким содержанием холестерина, то через некоторое время на створках аортального клапана появляются макрофаги и белки костного матрикса [20].

2.1.6. Матриксные металлопротеиназы и ремоделирование внеклеточного матрикса

В стенозированных створках аортального клапана фибробласты дифференцируются в миофибробласты, что подтверждается экспрессией маркеров характерных для гладкомышечных клеток, а именно: α актин, виментин и десмин. Показано, что миофибробласты при развитии стеноза находятся постоянно в активированном состоянии. Увеличение их количества и, соответственно, продуцируемого ими коллагена и компонентов внеклеточного матрикса, приводит к выраженному фиброзу и к утолщению и уплотнению створок с уменьшением их подвижности. Более того, продукция коллагена и деградация эластина, приводят к повышению коллаген/эластинового коэффициента, что и ответственно за уплотнение створок. Было показано, что курение, провоцируя выброс провоспалительных и потенциально фиброгенных медиаторов, активируя

экспрессию TGF beta, приводит к прогрессии стенозирования, что подтверждает его роль как фактора риска [17].

Матриксные металлопротеиназы – это семейство, состоящее из 23 цинк зависимых эндопептидаз, которые участвуют как в физиологическом, так и патологическом ремоделировании тканей. Источником матриксных металлопротеиназ являются интерстициальные клетки, моноциты, макрофаги, лимфоциты и эндотелиальные клетки [27]. При сравнении клапанов, подвергшихся стенозу, и контрольных клапанов от здоровых доноров был выявлен повышенный уровень матриксных металлопротеиназ 1, 2 и 3, а матриксная металлопротеиназа 9 была найдена только в пораженных створках [17]. В здоровых аортальных клапанах коллаген представлен во всех трех слоях (*fibrosa, spongiosa, ventricularis*), но, безусловно, наибольшее его количество находится в аортальном слое (коллаген I и III типа). Было показано, что в пораженных створках по сравнению со здоровыми клапанами, во-первых, присутствует более плотно упакованный коллаген и, во-вторых, коллагеновые волокна на аортальной поверхности по мере стенозирования становились все более дезорганизованы расположенными. Нарушение структуры внеклеточного матрикса и коллагена приписывают увеличенному уровню матриксных металлопротеиназ (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9) [30]. Матриксные металлопротеиназы постепенно разрушают все компоненты внеклеточного матрикса. У них существуют ингибиторы – TIMP (*tissue inhibitors of metalloproteinases*), уровень которых также повышен при стенозировании клапана [13]. В здоровом аортальном клапане эластин в основном находится в слое *ventricularis*. В пораженном клапане обнаружены фрагментированные и поврежденные волокна. Считается, что за повреждение эластина ответственны MMP-2, MMP-9 и катепсины. Было показано, что фрагменты эластина активируют экспрессию щелочной фосфатазы фибробластами и гладкомышечных клеток (ГМК).

Тенасцин С – это гликопротеин, чья роль очень важна в развитии соединительной ткани. В здоровом аортальном клапане уровень экспрессии тенасцина С очень низкий, и он был обнаружен только в базальной мембране. В пораженном клапане его уровень значительно выше, считается, что он активирует щелочную фосфатазу и активирует синтез коллагена. Также он ответственен за ремоделирование внеклеточного матрикса, так как он активирует MMP-2 [13, 30].

2.1.7. Неоангиогенез

У здорового человека створки аортального клапана представляют собой аваскулярные структуры, получающие питательные вещества путем диффузии [8]. Показано, что в пораженном клапане имеется большое количество вновь образованных сосудов и повышенный уровень фактора роста эндотелия сосудов (*VEGF – vascular endothelial growth factor*) [18]. Более того, повышенный уровень VEGF, MMP и неоангиогенез наблюдались в тех областях, где уровень хондромодулина 1 был понижен [31]. Хондромодулин 1 – это гликопротеин в основном находящийся в аваскулярных тканях, таких как хрящ, роговица. В норме он ингибирует пролиферацию эндотелия и тубулогенез. В антенатальном периоде во время развития сердечно-сосудистой системы ген, кодирующий этот белок, экспрессируется во всех четырех клапанах. В норме его постоянный низкий уровень присутствует в эндотелии клапана на протяжении всей жизни человека, где он блокирует неоангиогенез и поддерживает гомеостаз [30]. В экспериментах на мышях было показано, что у всех мышечей дефектных по гену хондромодулина 1 был повышен уровень VEGF, выраженный неоангиогенез, аккумуляция липидов и кальцификация [31]. Причины, провоцирующие снижение уровня хондромодулина 1 в клапане, остаются неизвестными. Полагают, что в этом участвуют процессы воспаления и механический стресс [32]. Роль ангиогенеза также до конца не определена, считается, что он может

усиливать воспаление, за счет облегчения миграции воспалительных клеток и аккумуляции липидов [17].

2.1.8. Роль ренин – ангиотензин – альдостероновой системы (РААС)

Установлено, что в патогенезе аортального стеноза участвуют АПФ (Ангиотензинпревращающий фермент), ангиотензин II, рецепторы I типа ангиотензина II. Ангиотензин II, образующийся из ангиотензина I под действием АПФ, потенцирует воспаление, аккумуляцию липопротеинов, оксидативный стресс и стимулирует экспрессию фибробластами липопротеин связывающие протеогликаны и бигликаны [25]. В кальцифицированном аортальном клапане были обнаружены: АПФ, катепсин G и химазы. Все они образуются макрофагами (АПФ) или тучными клетками (катепсин G и химазы). Все три фермента способны к инактивации брадикинина (одного из агентов, препятствующих фиброзированию). Однако показано, что главным источником АПФ остаются циркулирующие частицы ЛПНП, к которым прикрепляется АПФ [27]. Таким образом стенозированный клапан содержит ряд источников АПФ: 1) ЛПНП-ассоциированный АПФ; 2) продуцируемый макрофагами; 3) химаза тучных клеток. Рецепторы ангиотензина II имеются на фибробластах стенозированного клапана. Рецепторы I типа ангиотензина II, постоянно экспрессирующиеся ГМК, появляются на интерстициальных клетках клапана только при начинающемся стенозировании. Таким образом, до того момента, когда клетки начинают экспрессировать рецепторы I типа ангиотензина II, клапан защищен от воздействия ангиотензина II [25]. Исходя из того, что известны провоспалительные и профиброгенные черты ангиотензина II, можно заключить, что ангиотензин II играет важную роль в патогенезе аортального стеноза и

блокирование этого пути, возможно, уменьшит выраженность аортального стеноза [17].

2.1.9. Сигнальный путь Notch и его мишени

Сигнальный путь Notch является одним из ключевых в регуляции развития многих систем, органов и тканей, а также в поддержании гомеостаза во взрослом организме. Notch – семейство трансмембранных белков, характеризующихся наличием EGF (*epidermal growth factor like*) повторов и специфических характерных для этого семейства доменов. Notch включает в себя 4 типа трансмембранных рецепторов (Notch 1-4) и 5 трансмембранных Notch лигандов: Jagged-1 и Jagged-2, Delta-like (DLL1, DLL3, DLL4). Пять трансмембранных Notch лигандов объединяют в семейство DSL (*Delta/Serrate/Lag-2*) белков, так как они имеют в своем составе от 7 до 16 EGF-подобных повторов и DSL домен, уникальный именно для Notch лиганда. Принцип действия сигнального пути Notch – конвертирование информации о концентрации внеклеточных лигандов в специфический транскрипционный ответ в ядре [33]. Рецепторы Notch транслируются в виде больших белков-предшественников, имеющих внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный домены. Связывание лиганда с рецептором приводит к конформационным изменениям внеклеточного домена, давая возможность металлопротеазе ADAM17 осуществить S2 расщепление, являющееся ключевым шагом в активации рецептора. За этим расщеплением следуют еще 2 расщепления, осуществляемые γ -секретазным комплексом. В конечном счете образуется внутриклеточный домен NICD (*Notch intracellular domain*), который отщепляется от мембраны и транспортируется в ядро, где способен регулировать транскрипцию генов [34, 35]. Внутриклеточный домен Notch рецептора (NICD) взаимодействует с транскрипционными факторами

семейства CSL, превращая их из репрессора в активатор. Комплекс NICD-CSL активирует транскрипцию генов семейства HES (*hairy enhancer of split*) и HEY (*hairy/enhancer os split related with YYRPW motif*), которые в свою очередь взаимодействуют с различными нижележащими мишенями.

Спектр действия сигнального пути Notch затрагивает большое количество различных генов, среди которых гены, ответственные за дифференцировку и пролиферацию [36]. Известно, что мутация гена *NOTCH1* связана с кальцинозом аортального клапана [3]. Важным является то, что в результатах доклинических исследований было показано, что специфическое блокирование сигнального пути Notch значительно подавляет кальцификацию сосуда и аортального клапана [37]. Показано, что в норме *NOTCH1* ингибирует активацию *Runx2*, блокируя тем самым отложения кальция на клапане [38]. Мутации в гене *NOTCH1* приводят к активации (дерепрессии) *RUNX2*, приводя таким образом к дифференцировке интерстициальных клеток в остеобласты [25].

Кальцификация аортального клапана – активный процесс, в котором участвуют регуляторы кальцификации и оссификации, такие как: остеопонтин, остeonектин, остеокальцин и костный белок BMP (*bone morphogenetic protein*). Остеопротегерин и его лиганд (*RANKL – receptor activated of nuclear factor-kB ligand*) также участвуют в кальцификации клапана [17]. Сигнальная цепь RANK – RANKL – OPG (*osteoprotegerin*) находится под контролем *RUNX2*, который, в свою очередь, находится под контролем сигнального пути Notch [39]. RANKL – это трансмембранный гликопротеин, цитокин семейства фактора некроза опухолей, продуцируемый клетками остеобластного ряда и активированными Т-лимфоцитами, который связываясь с рецептором RANK, подает сигнал для дифференцировки клеток-предшественников и созревания остеокластов. Остеопротегерин также относится к цитокинам суперсемейства фактора некроза опухолей и продуцируется остеобластами. Будучи рецептором к

RANKL, он блокирует его взаимодействие с собственным рецептором RANK, препятствуя остеокластогенезу. RANKL в тканях аортального клапана способствует переходу миофибробластов в остеобласты. [14]. Было показано, что повышенный уровень RANKL присутствует в кальцифицированных створках, а остеопротегерин в здоровых. Мыши дефектные по гену остеопротегерина показали раннюю и выраженную кальцификацию клапана и повышенный уровень RANKL [13]. На клеточной культуре было показано, что стимуляция миофибробластов аортального клапана с помощью RANKL приводит к повышенному уровню экспрессии белков костного матрикса и ускоренной кальцификации. Добавление остеопротегерина к миофибробластам препятствовало их кальцификации [39]. Во время развития аортального стеноза клапанные миофибробласты претерпевают дифференцировку в остеобластоподобные клетки, образующие щелочную фосфатазу, остеопонтин, остеокальцин и остеобласт-специфичные транскрипционные факторы. Эти остеобластоподобные клетки способны к спонтанному образованию узлов кальцификации. Этот процесс ускоряется при воздействии на них окисленных форм холестерина, TGF beta и TNF alpha [17].

Известно, что клетки эндотелия вырабатывают ряд факторов, способных регулировать фенотип подлежащих мезенхимальных и гладкомышечных клеток. Один из важнейших в контексте кальциноза – фактор Wnt (имеет ряд изоформ) – передает сигнал в ядро при помощи посредника β -катенина, и этот сигнал запускает синтез белка Runx2. Данный белок, являясь фактором транскрипции, в свою очередь, запускает синтез белков костного вещества – остеокальцина, остеопонтинина и щелочной фосфатазы [3]. Сигнальная цепь Wnt-Runx2 находится под контролем сигнального пути Notch. Известно, что по крайней мере часть случаев аневризмы аорты и аортальных стенозов связана с генетическими

дефектами сигнального пути Notch [3, 40]. В то же время нельзя исключить и влияние внешних, в частности, гемодинамических факторов. Те из них, которые способны ингибировать цепь Wnt-Runx2 или активировать Notch, должны иметь предупреждающее действие на болезни аортального клапана и аорты. Один из таких факторов – белок периостин, который, согласно опубликованным данным, способен активировать Notch – сигналинг, действуя посредством связывания с интегринами на поверхности клетки [41]. Периостин экспрессируется фибробластами и гладкомышечными клетками, но не клетками эндотелия и не кардиомиоцитами. Периостин является секреторным белком и способен связывать цепочки коллагена, сообщая межклеточному веществу дополнительную прочность [42]. Мыши, нокаутные по гену периостина, рождаются с двустворчатым аортальным клапаном с дезорганизованным межклеточным веществом, которое начинает обызвествляться уже после третьего месяца жизни [41]. Периостин, в свою очередь, регулируется факторами семейства TGF β , в частности, BMP2 и TGF β 3 [42]. Эти белки – факторы роста, которые синтезируются главным образом клетками эндотелия и принимают активное участие в эмбриональном развитии сердечно-сосудистой системы, особенно ее соединительнотканного компонента [43, 44]. Периостин стимулирует активацию BMP1 и появление тенасцина C во внеклеточном матриксе, что приводит к усиленному фиброзированию клапана. Также он стимулирует секрецию MMP-2 и MMP-13, но не MMP-9. Повышенный уровень периостина был обнаружен в зонах неоваскуляризации стенозированного клапана. Было показано, что периостин также экспрессировался и секретировался CD-14 позитивными макрофагами, вновь пришедшими из костного мозга, а не только миофибробластами клапана. [32].

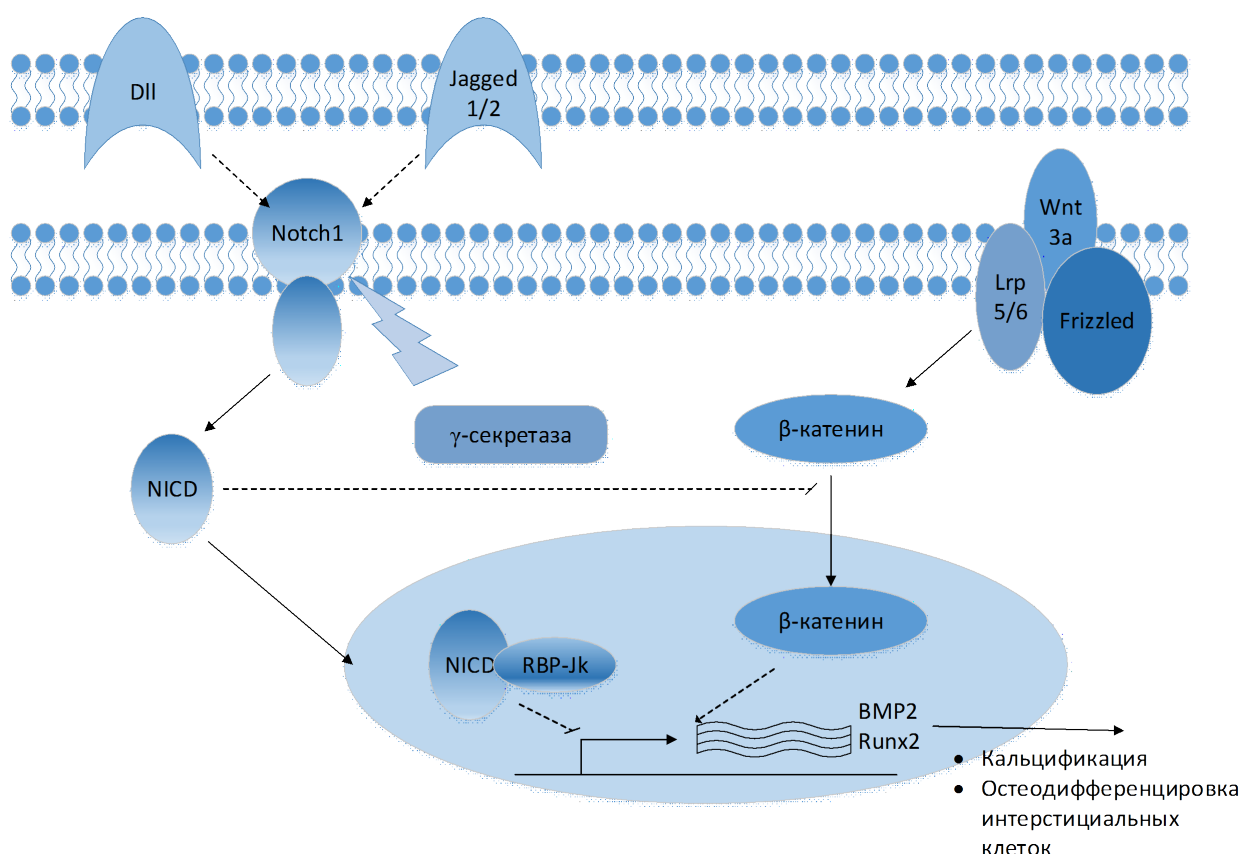
На интерстициальных клетках аортального клапана свиньи было показано, что их стимуляция при помощи TGF –beta 1 *in vitro* увеличивала

дифференцировку в миофибробласты и многократно усиливала ремоделирование внеклеточного матрикса. В интерстициальных клетках стенозированный клапан человека уровень экспрессии щелочной фосфатазы, MMP-9 и TGF –beta 1 был значительно повышен, также, как и уровень BMP-2 и костного сиалопротеина [31]. Как на эндотелиальных клетках коронарных артерий, так и на эндотелиальных клетках клапана было показано, что окисленные ЛПНП повышают уровень экспрессии BMP-2, что подтверждает проостеогенную роль ЛПНП и их роль в развитии стеноза аортального клапана. Недавние исследования показали, что, если ингибировать γ -секретазу, которая вызывает протеолитическое отщепление внутриклеточного домена Notch1 рецептора (NICD), уменьшает липопротеин индуцированное выделение провоспалительных цитокинов макрофагами, уровень BMP-2 и щелочной фосфатазы, что позволяет вновь убедиться в том, что активация Notch1 именно тот самый механизм, с помощью которого окисленные ЛПНП стимулируют остеогенную дифференцировку интерстициальных клеток [45, 46].

Многие исследования показали, что эндотелиальные клетки клапана – ключевой регулятор в развитии стеноза. Клетки эндотелия могут привлечь иммунные и воспалительные клетки в клапан, могут выделять проостеогенные маркеры, а также могут претерпевать эпителиально-мезенхимный переход (ЭМТ – это биологический процесс, при котором поляризованная, связанная с базальной мембраной эпителиальная клетка претерпевает множественные биохимические изменения и приобретает мезенхимный фенотип, характеризующийся усиленной продукцией внеклеточного матрикса) под воздействием воспалительных цитокинов (напр. TNF alpha), механического стресса, повышенного уровня TGF –beta или активации Notch 1. Но в клапане также существует уникальная популяция эндотелиальных клеток устойчивых к ЭМТ под воздействием

TNF alpha. Изучение клеток устойчивых к ЭМТ – шаг к пониманию молекулярных механизмов защиты против стенозирования [47].

Рисунок 2. Роль сигнального пути Notch в кальцификации аортального клапана



2.1.10. Терапевтические мишени

Уровень щелочной фосфатазы – один из показателей дифференцировки интерстициальных клеток в остеобластоподобные, играет ключевую роль в процессе кальцификации. Было показано, что ингибирование щелочной фосфатазы Левамизолом предотвращает формирование узлов кальцификации в клапане [48]. Также существует большое количество исследований, посвященных влиянию статинов на развитие аортального стеноза. Показано, что в стенозированном клапане

присутствуют окисленные липопротеины, апо А, апо В и апо Е ЛП, макрофаги, Т – лимфоциты, пенистые клетки, факторы роста и провоспалительные цитокины, а статины обладают гиполипидемическими и плейотропными свойствами (снижают уровень С реактивного белка (СРБ), улучшают функцию эндотелия, усбливают противовоспалительные и регенеративные процессы) [1]. Статины значимо снижают выделение провоспалительных цитокинов, а имеено TGF beta 1, TNF alpha интерстициальными клетками клапана и выделение TNF alpha макрофагами и эндотелиальными клетками. Было показано, что статины также ингибируют процесс кальцификации за счет снижения уровня BMP-2, BMP-6 и щелочной фосфатазы [19].

В исследовании SALTIRE (SALTIRE: Scottish Aortic Stenosis and Lipid Lowering Trial, Impact on Regression) при анализе 155 человек с умеренным аортальным стенозом принимавших Аторвастатин в максимальной дозировке (80 мг) не выявлено уменьшения выраженности стеноза (оценка проводилась по максимальной скорости на аортальном клапане). При сравнении с контрольной группой ни одна из конечных точек эффективности достоверно не отличалась (конечные точки эффективности: протезирование клапана, госпитализация, смерть).

В другом исследовании ASTRONOMER (Aortic Stenosis Progression Observation: Measuring the Effect of Rosuvastatin), включающим 272 человека с умеренными аортальными стенозами, у кого отсутствовали абсолютные показания для приема статинов. Первичной конечной точкой эффективности является прогрессирование стеноза (оценивается по градиенту давления на клапане), вторичной – время от начала приема препарата до смерти или протезирования аортального клапана. В настоящий момент это исследование еще не закончено, результаты будут опубликованы в течение ближайших трех лет.

Самое глобальное исследование - SEAS (Simvastatin and Ezetimib in Aortic Stenosis) не показало положительного эффекта от приема статинов на прогрессию стеноза. В исследование было включено 1900 человек с умеренным аортальным стенозом, кто принимал либо Симвастатин, либо Эзетимиб, либо плацебо. Первичной конечной точкой эффективности являлись: смерть, протезирование аортального клапана, декомпенсация хронической сердечной недостаточности (ХСН), инсульт, инфаркт миокарда и нестабильная стенокардия. Вторичной точкой эффективности являлось прогрессирование стеноза, оцененное по эхокардиографическим (ЭХОКГ) критериям. В отчете по данному исследованию, опубликованному 21 июля 2008 года, четко написано, что нет отличий ни по первичной, ни по вторичным точкам эффективности между группами, принимавшими лекарственные препараты и плацебо [49].

Существует несколько исследований, изучавших влияние ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (иАПФ) на процесс стенозирования, так как доказано, что АПФ, ангиотензин II и рецепторы I типа ангиотензина II присутствуют в кальцифицированных створках. иАПФ обладают антипролиферативным действием (уменьшают гипертрофию стенок сосудов и миокарда и пролиферацию внеклеточного матрикса), снижают сосудистое сопротивление, не вызывая рефлекторную тахикардию, вызывают регресс гипертрофии миокарда, улучшают эндотелиальную функцию (усиливают выработку NO), улучшают функцию почек и тормозят прогрессирование атеросклероза (так как блокируют образование ангиотензина и приводят к повышению уровня брадикинина и NO, что, в свою очередь, приводит к подавлению миграции и пролиферации гладкомышечных клеток (ГМК) сосудов, таксиса и активации воспалительных клеток, снижению окислительного стресса и улучшению эндотелиальной функции) [1]. Ретроспективный анализ показал, что иАПФ несколько замедляют отложения кальция на створках,

но не замедляют прогрессирование стеноза. Достаточно сложно доказать влияние иАПФ на процесс стенозирования, так как иАПФ изменяют гемодинамику, что затеняет все остальные эффекты [7, 19]. На сегодняшний день исследование, посвященное изучению влияния каптоприла и трандолаприла на прогрессию аортального стеноза, находится в ходу и, возможно, именно оно поможет понять нам роль иАПФ в данной точке приложения [7].

2.1.11. Роль симпатической нервной системы в процессе стенозирования

Симпатическая нервная система играет важную роль в регуляции остеогенеза через β_2 - адренорецепторы. β_2 – адренорецепторы экспрессируются на остеобластах и их стимуляция приводит к активизации остеокластов и уменьшению костеобразования. Активированные β_2 – адренорецепторы стимулируют образование RANKL, который связывается с RANK на предшественниках остеокластов и стимулирует их превращение в остеокласты. Было показано, что на створках аортального клапана существуют β_{1-2} – адренорецепторы и что в стенозированных створках в узлах кальцификации повышен уровень экспрессии как β – адренорецепторов, так и RANK. Стимуляция β_2 – адренорецепторов резко снижала остеогенную дифференцировку интерстициальных клеток клапана, что сопровождалось снижением продукции щелочной фосфатазы, остеокальцина и периостина. Обратный эффект наблюдался при использовании β – блокаторов. Повышенный уровень экспрессии β_2 – адренорецепторов и RANK в кальцифицированном аортальном клапане наводит на мысль о том, что симпатическая нервная система также участвует в регуляции процесса стенозирования [50].

2.1.12. Кальцификация как воспалительный процесс

Процесс кальцификации аортального клапана можно условно разделить на 3 этапа: 1) начальный: инфильтрация клапана макрофагами и

другими воспалительными клетками, выделяющими проостеогенные цитокины (IL1 β , IL6, IL8, TNF α , TGF β), что активирует остеогенную дифференцировку интерстициальных клеток; 2) в стадии развития происходит собственно сама остеогенная дифференцировка, что подтверждается экспрессией щелочной фосфатазы, остеопонтина, остеокальцина, BMP и др. Также в этой стадии образуются везикулы и апоптотические тельца, которые служат базой для узла кальцификации; 3) финальная стадия характеризуется дальнейшим отложением гидроксиапатитов в клапане [51, 52].

Для процесса кальцификации аортального клапана можно выделить следующие неотъемлемые черты:

- Эндотелиальная дисфункция (образуется молекула клеточной адгезии – 1 и другие хемоаттрактанты, стимулирующие адгезию лимфоцитов на эндотелии [9, 53]; атерогенные факторы и/или механический стресс могут вызвать повреждение эндотелия, что, в свою очередь, является стимулом для пролиферации интерстициальных клеток. С использованием бычьих клеток было показано, что эндотелиальные клетки в интактном клапане могут ингибировать пролиферацию интерстициальных клеток и синтез ими компонентов внеклеточного матрикса [9, 54]. Также было показано, что механический стресс способен активировать клетки-предшественники, скрывающиеся в эндотелиальном слое, к трансформации в мезенхимальноподобные [52].
- Оксидативный стресс, снижение экспрессии NO и супероксид дисмутазы;
- Наличие воспалительных клеток (Т-лимфоцитов, макрофагов);
- Наличие провоспалительных цитокинов (IL1 β , IL6, IL8, TNF α , INF gamma) и матриксных металлопротеиназ [53]; Было показано, что IL6 индуцирует экспрессию остеогенных факторов, а именно Runx2

и BMP2 и блокирование IL6 значительно уменьшало выраженность кальцификации *in vitro* [55].

- Участие РААС, особенно АПФ, ангиотензина II, рецепторов I типа ангиотензина II;
- Дислипидемия, с повышенным уровнем ЛПНП и Липопротеина а;
- Окисление липопротеинов и формирование узлов кальцификации [53]. Доказано, что основой для формирования узлов кальцификации являются апоптотические тельца и матриксные везикулы [52,56];
- Эктопическая оссификация, подтверждаемая экспрессией остеопонтина, костного морфопротеина (BMP2,4), RANKL, остеонектина, остеокальцина, костного сиалопротеина [53, 57].

3. Патофизиология аортального стеноза

В норме площадь аортального клапана составляет 3-4 см². Градиент давления между левым желудочком и аортой возникает при уменьшении площади выходного отверстия до 1,5 см² [1]. Двустворчатые аортальные клапаны по распределению механической нагрузки менее эффективны, чем трехстворчатые, что приводит к более быстрому развитию стеноза [2]. Сужение клапана развивается достаточно медленно и приводит к постепенно возрастающему систолическому давлению в левом желудочке, что впоследствии вызывает концентрическую гипертрофию, степень которой может существенно отличаться у разных пациентов. Гипертрофия левого желудочка (ГЛЖ) – ключевой адаптационный механизм, противодействующий перегрузке давлением [1, 2]. Диастолическое давление в желудочке долго остается нормальным, так как при сохранной систолической функции какой-либо избыточный объем крови в желудочке отсутствует [58]. Со временем развивается диастолическая дисфункция левого желудочка, вследствие нарушения податливости мышечной массы желудочка и угнетения процесса активного расслабления миокарда.

Нарушение диастолического наполнения желудочка сопровождается ростом КДД (конечного диастолического давления). Из-за этого уменьшается перфузионное давление в коронарных артериях и происходит сдавление их мелких субэндокардиальных ветвей. В результате снижается коронарный резерв, а несоответствие между потребностью миокарда в кислороде и его доставкой ведет к стенокардии напряжения [59]. Левое предсердие усиливает свои сокращения, что является важным компенсаторным механизмом поддержания нормального сердечного выброса. Нарушение диастолической функции левого желудочка сопровождается ростом давления в левом предсердии, а также в венах малого круга кровообращения [60]. Важным звеном патогенеза является неспособность левого желудочка к адекватному увеличению ударного объема во время нагрузки (фиксированный ударный объем), что объясняет частое появление у этих больных признаков нарушения перфузии головного мозга. Нарушению перфузии периферических органов и тканей способствуют вазоконстрикторные сосудистые реакции, обусловленные в том числе активацией симпатической нервной системы, РААС и вазоконстрикторных эндотелиальных факторов [59].

4. Клиническая картина

4.1. Жалобы

Больные со стенозом аортального клапана в течение длительного времени не испытывают заметного дискомфорта, что свидетельствует о полной компенсации порока. Среди жалоб, предъявляемых больными с аортальными стенозами, наиболее характерны снижение толерантности к физической нагрузке, одышка, обмороки и головокружения, также связанные с физической нагрузкой [1]. У пациентов старшего возраста бывает сложно получить описание симптомов и времени начала болезни. У

таких больных часто отмечают атипичное течение заболевания, причем наиболее частой жалобой служит утомляемость. Более того, симптомы могут быть связаны с сопутствующим заболеванием [2].

4.2. Объективные данные

При общем осмотре обращает на себя внимание бледность кожных покровов, обусловленная снижением сердечного выброса и возникающей на этом фоне склонностью периферических сосудов к вазоконстрикторным реакциям [59]. Для больных характерен медленный и малый пульс (*pulsus tardus et parvus*), резко усиленный, но не разлитой (в стадии компенсации) верхушечный толчок. Может быть двойной верхушечный толчок, обусловленный усиленным сокращением левого предсердия. В стадии декомпенсации наблюдается дилатация полости левого желудочка, что приведет к расположению верхушечного толчка в V-VI межреберье кнаружи от левой срединно-ключичной линии и смещению влево границы относительной сердечной тупости [58, 60]. При выраженном аортальном стенозе наблюдается уменьшение систолического и пульсового артериального давления (АД). Наиболее характерным для аортально-стеноза является систолический шум на аортальном клапане, который имеет характер “крещендо-декрещендо”, шум сопровождается систолическим дрожанием. Шум выслушивается на основании сердца и проводится на сонные артерии. Также характерно ослабление I и II тонов [61].

4.3. Неинвазивные методы исследования

Эхокардиография (ЭХОКГ) позволяет оценить выраженность стеноза, определить число полулуний, судить о причинах развития стеноза.

Таблица 1. Рекомендации по классификации тяжести аортального стеноза [1].

Показатели	Аортальный стеноз	Мягкий	Умеренный	Тяжелый
Скорость аортального потока, м/с	$\leq 2,5$	2,6-2,9	3-4	>4
Средний градиент, мм.рт.ст.	-	<20	20-40	>40
Площадь отверстия аортального клапана (AVA), см ²	-	$>1,5$	1,0-1,5	$<1,0$
Индексированный AVA		0,85	0,6-0,85	$<0,6$
Отношение скоростей (V_{LVOT}/V_{AV})		$>0,5$	0,25-0,5	$<0,25$

ЭХОКГ проводят всем больным с подозрением на аортальный стеноз. Почти у всех пациентов тяжесть стеноза может быть определена измерением максимальной скорости кровотока, среднего трансклапанного градиента давления и площади отверстия клапана с помощью доплеровского исследования [62]. У пациентов с тяжелым аортальным стенозом при низкой скорости кровотока, обычно связанной с ухудшением функции левого желудочка, можно зарегистрировать низкий градиент давления [2]. При развитии выраженного кальциноза на ЭХОКГ выявляется единый конгломерат интенсивных эхо-сигналов, часто малоподвижных, что не дает возможность определить число полулуний [1]. Помимо прямой оценки морфологии клапана, двухмерная ЭХОКГ

также помогает в оценке размеров полостей желудочков и предсердий, в оценке толщины стенок. Кроме того, при тяжелых стенозах нередко наблюдается постстенотическое расширение восходящей аорты [58].

Чреспищеводную ЭХОКГ (ЧПЭ) проводят при необходимости получения более точных планиметрических данных о площади аортального клапана [1, 62].

ЭКГ в 80% случаев выявляет ГЛЖ и связанные с ней нарушения внутрижелудочковой проводимости (неполная или полная блокада левой ножки пучка Гиса) [1, 2].

Стресс – ЭКГ и стресс – ЭХО не должны выполняться у симптомных пациентов вследствие высокого риска осложнений. У бессимптомных пациентов нагрузочное тестирование относительно безопасно и может дать информацию, которая не была получена в течение предыдущего клинического исследования. Нагрузочный тест может определить толерантность к физической нагрузке, неадекватный ответ артериального давления или вызванные нагрузкой симптомы [62].

Рентгенография грудной клетки на сегодняшний день несколько утрачивает свое значение, так как в основном выявляет “аортальную” конфигурацию, которая появляется при значительном смещении верхушки сердца влево (при декомпенсации и развитии миогенной дилатации желудочка). Полезной рентгенография может быть для выявления постстенотического расширения аорты [1, 59].

Компьютерная томография (КТ) и магнитно-резонансная томография (МРТ) позволяет улучшить оценку восходящей аорты и степень выраженности кальцификации клапана. КТ позволяет не только в определении степени кальцификации клапана, но помогает также измерить площадь клапана, размер кольца аорты, расстояние между створками

клапана и коронарными устьями, что необходимо перед выполнением транскатетерной имплантации аортального клапана [2].

4.4. Инвазивные методы исследования

Коронароангиография является обязательным и необходимым методом для решения вопроса о возможности и объеме оперативного вмешательства у больных с аортальным стенозом [1]. Ретроградную катетеризацию левого желудочка применяют только тогда, когда ЭХОКГ не информативна или, когда имеется несоответствие между неинвазивными тестами и клиническими данными [2, 62].

5. Лечение

5.1. Медикаментозное лечение

При наличии противопоказаний к хирургическому лечению и признаков ХСН проводят консервативную терапию с применением диуретиков, иАПФ или сартанов. Необходимо помнить, что вазодилататоры должны применять с осторожностью, так как прием артериолярных вазодилататоров снижает сопротивление выбросу, но способствует повышению трансортального градиента давления. Использование венозных вазодилататоров – снижает градиент давления, но и снижает объем выброса [1, 58]. Данные об эффективности статинов для профилактики аортального стеноза являются противоречивыми, но безусловно должны применяться при наличии у пациента дислипидемии и аортального стеноза [1, 2].

5.2. Хирургическое лечение

Протезирование аортального клапана – радикальный метод лечения аортального стеноза, “золотой стандарт”. С этой целью могут быть использованы как механические, так и биологические протезы. Механические протезы требуют пожизненной антикоагулянтной терапии, биологические в течение 6 месяцев, однако всегда присутствует риск несостоятельности ткани биопротеза [58, 62]. Помимо протезирования аортального клапана существует еще ряд хирургических подходов. Один из них – транскатетерная имплантация аортального клапана (TAVI - *transcatheter aortic valve implantation*). На современном этапе кандидатами для TAVI являются пациенты преклонного возраста, у которых рутинное протезирование нежелательно в связи с критическим нарушением функции левого желудочка, наличием сопутствующей патологии и высоким риском осложнений, связанных с экстракорпоральным кровообращением [2]. Что касается баллонной вальвулопластики, то сегодня она рассматривается исключительно как мост к протезированию или TAVI у гемодинамически нестабильных пациентов [1]. Операция показана всем больным с симптомами заболевания, так как эти больные имеют 10% ежегодную летальность, если оперативное лечение не проводится. Протезирование аортального клапана у бессимптомных больных остается спорным вопросом. При отсутствии симптомов показаниями к протезированию являются фракция выброса < 50% и/или планируемое аортокоронарное шунтирование (АКШ). Однако многие исследователи утверждают, что существует множество пациентов с бессимптомным аортальным стенозом, имеющих высокий риск внезапной смерти или необратимой депрессии миокарда левого желудочка, которым хирургическое лечение показано до появления клинических признаков [63, 64].

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Материалы

2.1.1. Клеточные культуры

В работе использовались интерстициальные (*VIC – valve interstitial cells*) и эндотелиальные (*VEC – valve endothelial cells*) клетки аортального клапана человека. Все клеточные популяции были получены в Федеральном медицинском исследовательском центре им. В.А. Алмазова в ходе операции по протезированию аортального клапана. Забор операционного материала осуществлялся после подписания пациентами информированного согласия. Материал от здоровых доноров получали в рамках программы мультиорганного забора для трансплантаций.

2.1.2. Праймеры

Для оценки уровня экспрессии компонентов сигнального пути Notch использовались следующие праймеры:

Таблица 2. Праймеры, использованные в полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР в реальном времени).

Notch 1		
Прямой	5'_GTCAACGCCGTAGATGACC_3'	NOTCH1_F1
Обратный	5'_TTGTTAGCCCCGTTCTTCAG_3'	NOTCH1_R1
Notch 2		
Прямой	5'_ATGGTGGCAGAACTGATCAAC_3'	NOTCH2_F1
Обратный	5'_TTGGCAAATGGTCTAACAGG_3'	NOTCH2_R1
Notch 3		
Прямой	5'_GGAGCCAATAAGGACATGCAGGAT_3'	NOTCH3_F1
Обратный	5'_GGCAAAGTGGTCCAACAGCAGC_3'	NOTCH3_R1

Notch 4		
Прямой	5'_GTTGTGACAGGGTTGGGACT_3'	NOTCH4_F1
Обратный	5'_CAGCCCAGTGGGTATCTCTG_3'	NOTCH4_R1
DLL1		
Прямой	5'_СТАСТАСГГАГАГАГГГСТГСТ_3'	DLL1_F1
Обратный	5'_ССАГГГСТТГСАСАСТТТСТС_3'	DLL1_R1
DLL4		
Прямой	5'_АГГССТГТТТТГТГАССААГ_3'	DLL4_F1
Обратный	5'_СТССАГСТСАСАСТССАСАС_3'	DLL4_R1
JAGGED		
Прямой	5'_ТГССААГТГССАГГААГТ_3'	JAGGED1_F1
Обратный	5'_ГССССАТСТГГТАТСАСАСТ_3'	JAGGED1_R1
Runx2		
Прямой	5'_ТГГАТСАСТГААААТГСТГ_3'	Runx2_F1
Обратный	5'_СГАААТСССАААСТССГАТА_3'	Runx2_R1
BMP2		
Прямой	5'_АГСАСАГАААГТСАТСАААГ_3'	BMP2_F1
Обратный	5'_АГГТГСТТСАСТГТСАТТТС_3'	BMP2_R1
Periostin		
Прямой	5'_АТГАГАААТСТГГСТГСТГТ_3'	Periostin_F1
Обратный	5'_САГГАГААААТГССТТТГГА_3'	Periostin_R1
SPRY1 (protein sprouty 1)		
Прямой	5'_ААСТАААГГАГСТГСТГАССС_3'	SPRY1_F1
Обратный	5'_ААГТССАСТСГТТГТССС_3'	SPRY1_R1
GAPDH		
Прямой	5'_ТГАСАСТГГСААААСААТГСА_3'	GAPDH_F1
Обратный	5'_ГГТССТТТТСАССАГААГСТ_3'	GAPDH_R1

2.2. Методы

2.2.1. Получение и культивирование эндотелиальных и интерстициальных клеток аортального клапана

Створки аортального клапана, как от пациентов с аортальным стенозом, так и от здоровых доноров помещали в стерильную пробирку, содержащую фосфатно-солевой буфер и антибиотики (пенициллин и стрептомицин), и транспортировали в лабораторию. Далее дважды промывали створку стерильным фосфатно-солевым буфером (PBS) и инкубировали в растворе коллагеназы IV (1 мкг/мл) в среде DMEM в водяной бане при температуре 37°C в течение 15 минут. Затем пробирку с клапаном резко встряхивали при помощи перемешивающего устройства в течение одной минуты, для открепления эндотелиальных клеток клапана. Клеточную суспензию откручивали в течение 5 минут при 300 g, отбирали жидкость над осадком, разводили клетки в свежей эндотелиальной среде, тщательно ресуспендировали, еще раз откручивали в течение 5 минут при 300 g, помещали клетки в чашку Петри, покрытую раствором 0,2% желатина, и культивировали в эндотелиальной среде. Для получения интерстициальных клеток оставляли клапан в растворе коллагеназы при температуре 37°C еще на 10-12 часов. По прошествии нужного времени раствор коллагеназы с клапаном дважды промывали свежим раствором PBS. Затем интерстициальные клетки помещали в чашку Петри. Культивирование проводили в среде DMEM, содержащей 15% фетальной телячьей сыворотки, 1% глутамин и 1% пенициллина-стрептомицина (Invitrogen, США). Среду заменяли на свежую раз в три дня и культивировали клетки до появления характерных интерстициальных

колоний. Затем клетки пересевали и использовали в экспериментах 2-4 пассажа.

2.2.2. Магнитный сортинг CD31-позитивных клеток

Эндотелиальные клетки культивировали до 70-90% конфлюэнтности и затем осуществляли сортировку при помощи антител против эндотелиального маркера CD31. Принцип магнитной сепарации клеток основан на взаимодействии клеток со специфическими антителами, которые конъюгированы с магнитными микрочастицами. Суспензию меченых клеток помещают в магнитное поле, они задерживаются в колонке, а остальные клетки промываются. Таким образом, возможно получение определенного типа клеток с высокой специфичностью. Для очистки культуры эндотелиальных клеток от фибробластов использовали антитела против CD31, конъюгированные с магнитными частицами (Myltenyi Biotec, Германия). Брали культуру клеток, полученных после коллагеназного расщепления створки клапана, с конфлюэнтностью 70-90%. Отбирали среду, промывали фосфатно-солевым буфером (PBS). Добавляли 300 мкл трипсина, ставили в инкубатор на несколько минут. Затем добавляли среду для нейтрализации трипсина, ресуспендировали и переносили в пробирку. Центрифугировали в течение 5 минут при 300 g. Осадок клеток ресуспендировали в 60 мкл среды. Для предотвращения неспецифического связывания добавляли 20 мкл блокирующего реагента (FcR Blocking Reagent) и ресуспендировали. Затем добавляли 20 мкл магнитных микрочастиц, конъюгированных с CD31. Инкубировали в течение 15 минут при 4°C, затем добавляли 1 мл среды, тщательно ресуспендировали и центрифугировали клетки в течение 5 минут при 300 g. Среду над осадком убирали. Сам осадок разводили в 1 мл среды, после чего приступали к магнитной сепарации клеток. Для магнитной сепарации

использовали MS колонки (Miltenyi Biotec, Германия). Колонку помещали в паз магнита и промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) 3 раза по 500 мкл. Затем переносили клеточную суспензию в колонку и промывали колонку фосфатно-солевым буфером (PBS) 3 раза по 500 мкл. После чего переносили колонку в новую пробирку, добавляли 1 мл буфера и выдавливали клетки резким движением с помощью поршня. Далее откручивали клетки в течение 5 минут при 300 g, отбирали жидкость над осадком, разводили клетки в свежей эндотелиальной среде. Полученные культуры клеток использовали для последующих экспериментов и биобанкирования.

2.2.3. Выделение РНК из клеточных культур

Для выделения РНК из клеток использовали ExtractRNA (Евроген). На чашку Петри диаметром 10 см наливали 1 мл ExtractRNA и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем при помощи лабораторного скребка соскабливали лизированные клетки, и помещали в пробирку. Далее центрифугировали в течение 10 минут на 12000 g при температуре 4°C и переносили супернатант в новую пробирку. Далее добавляли 200 мкл хлороформа, встряхивали вручную содержимое пробирки в течение 15 секунд, инкубировали в течение 2-3 минут при комнатной температуре и центрифугировали в течение 15 минут на 12000 g при температуре 4°C. Из трех разделившихся фаз аккуратно отбирали верхнюю прозрачную водную фазу, избегая касания интерфазы или органической фазы, и переносили её в новую пробирку. Добавляли 500 мкл изопропанола, активно перемешивали и оставляли на ночь при температуре -20°C. На следующий день центрифугировали 30 минут на 12000 g при температуре 4°C, после чего аккуратно удаляли супернатант. К осадку добавляли 1 мл 75% этанола, перемешивали и центрифугировали 5

минут на 7600 g при 4°C. Супенатант удаляли. Повторяли отмывку этанолом еще один раз, после чего убирали супернатант и оставляли сушиться осадок при комнатной температуре на 20-30 минут. Сухой осадок разводили в 20 мкл воды. Проверка качества полученной РНК проводилась с помощью электрофореза в 0,8% агарозном геле при силе тока 80 мА. Количественная оценка проводилась с помощью спектрофотометра Nanodrop, при этом оценивали чистоту образцов (соотношение пиков поглощения 260 нм/ 280 нм – примеси белков и аминокислот и 260 нм/ 230 нм – примеси солей и фенола).

2.2.4. Полуколичественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

1 мкг выделенной РНК брали в реакцию обратной транскрипции. В работе использовали набор MMLV RT kit (Евроген). Для проведения реакции подготавливали две смеси: первая смесь (общий объем 9 мкл) включала 1 мкг выделенной РНК, 1 мкл случайного праймера, объем доводили до 9 мкл стерильной водой; вторая смесь (общий объем 11 мкл) содержала 4 мкл 5x буфера, 2 мкл нуклеотдтрифосфатов (dNTP) (10мМ каждого), 2 мкл DTT (дитиотреитола), 2 мкл стерильной воды и 1 мкл обратной транскриптазы. Первую смесь инкубировали 2 минуты в термостате при температуре 70°C, после чего смешивали со второй смесью. Реакцию обратной транскрипции проводили в амплификаторе при следующих условиях: 60 мин при 42°C, 10 минут при 70°C. Полученную кДНК хранили при температуре -40°C.

2.2.5. Полимеразная цепная реакция в реальном времени

ПЦР в реальном времени проводили при помощи амплификатора нуклеиновых кислот ABI 7500 (Applied Biosystems, США), используя технологию SYBR GREEN по следующей схеме: 5 мин 95°, затем 45 циклов, включающих денатурацию 15 сек при 95°C и отжиг праймеров с

амплификацией 60 сек при 60°C. Температура отжига всех праймеров составляла 60°C. Праймеры для ПЦР в реальном времени подбирали с использованием программы “Oligo 6” (Molecular Biology Insights, США). Каждая реакция была выполнена в трех повторах. Рассчитанные количества кДНК каждого из генов нормировали по уровню экспрессии гена “GAPDH” – Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназа) и представляли как относительный уровень экспрессии гена, принимая за единицу уровень экспрессии в контрольных клетках. Обсчет результатов производили в программах Excel и STATISTICA10.

Глава 3. Результаты

3.1. Клинико-лабораторная и инструментальная характеристика пациентов, подвергшихся протезированию аортального клапана

В исследование было включено 68 пациентов с аортальным стенозом (таблица 3), планово оперированных в ФМИЦ им. В. А. Алмазова. Среди них 32 человека с трикуспидальным клапаном, из которых умеренный АС был у 6 человек, тяжелый АС у 26 человек (средний возраст $62,09 \pm 5,64$) и 36 человек с бicuspidальным, из которых умеренный АС у 2 человек, тяжелый АС у 34 человек (средний возраст $59,0 \pm 8,0$). Контрольную группу составили 10 донорских клапанов, полученных в ходе трансплантации сердца. В группе пациентов с аортальным стенозом из 68 человек статины принимали только 32 человека (47%) (10-20 мг Аторвастатина). В группе тех, кто принимал статины среднее значение ХС было $5,48 \pm 2,08$ ммоль/л, ЛПНП – $3,16 \pm 1,2$ ммоль/л, а тех, кто не принимал статины – $5,72 \pm 1,54$ ммоль/л, ЛПНП – $4,16 \pm 1,23$ ммоль/л. Целевой уровень холестерина не был достигнут у 88% человек. 33 человека (48,5%) принимали иАПФ или сартаны, 48 человек (70,59%) принимали β -блокаторы.

Группы больных с бicuspidальным и трикуспидальным аортальным клапаном достоверно отличались между собой по ИМТ (индексу массы тела) ($p=0,024336$): в группе больных с трикуспидальным клапаном средний ИМТ - $31,0479 \pm 5,33020$ кг/м², в группе больных с бicuspidальным клапаном - $28,4409 \pm 4,6653$ кг/м², что говорит о том, что большинство пациентов с трикуспидальным клапаном имеют ожирение 1 степени, а с бicuspidальным – избыточную массу тела. Также достоверно

больше человек с ишемической болезнью сердца (ИБС) ($p=0,041367$) и с гипертонической болезнью (ГБ) ($p=0,011034$) в группе пациентов с трикуспидальным клапаном. СОЭ (скорость оседания эритроцитов) ($p=0,003824$), мочевая кислота ($p=0,011271$) и глюкоза ($p=0,048167$) также достоверно выше у пациентов с трикуспидальным клапаном.

По данным ЭХОКГ (таблица 4) группы пациентов с бicuspidальным и трикуспидальным аортальным клапаном достоверно отличались между собой по максимальной скорости на аортальном клапане (V_{max}) ($p=0,007973$) по максимальному (dP_{max}) ($p=0,008410$) и среднему (dP_{mean}) ($p=0,006628$) градиенту давления на аортальном клапане: более высокие градиенты наблюдались при бicuspidальном клапане ($dP_{max} - 92,6270 \pm 26,41895$ мм рт. ст., $dP_{mean} - 58,2068 \pm 16,40151$ мм рт. ст.), чем при трикуспидальном клапане ($dP_{max} - 77,1719 \pm 22,0622$ мм рт. ст., $dP_{mean} - 47,7950 \pm 17,4867$ мм рт. ст.). Размер фиброзного кольца (BAV - $2,4472 \pm 0,22739$ см; TAV - $2,2300 \pm 0,2855$ см; $p=0,000165$) и диаметр аорты в восходящем отделе (BAV - $4,0000 \pm 0,63770$ см; TAV - $3,6806 \pm 0,5770$ см; $p=0,038002$) достоверно больше в группе пациентов с бicuspidальным клапаном.

Таблица 3. Характеристика пациентов по клинико – лабораторным показателям

	БАК (n=36), M \pm SD	ТАК (n=32), M \pm SD	Тест Манна-Уитни: пациенты с БАК vs пациенты с ТАК (<i>курсивом</i> выделены значения с $p<0,05$)
Вес, кг	81,7632 \pm 13,2388	86,5000 \pm 15,00323	0,143771
ИМТ, кг/м ²	28,4409 \pm 4,6653	31,0479 \pm 5,33020	0,024336

Пол	13 (36%) женщин и 23 (64%) мужчины	15 женщин (47%) и 17 (53%) мужчин	0,618042
Возраст	59,0000± 8,0000	62,0938± 5,64749	0,134113
Ишемическая болезнь сердца (ИБС)	15(41, 67%)	21 (65, 63%)	0,041367
Функциональный класс стенокардии	II – 6 (16, 67%), III – 9 (25, 0%)	II -12(37, 50%), III – 9(28, 13%)	0,082943
Гипертоническая болезнь (ГБ)	II – 2 (5, 56%), III – 25 (69, 44%)	III – 32 (100%)	0,011134
Риск сердечно- сосудистых осложнений	2,7500± 1,8362	4,0000± 0,00000	0,011134
Артериальная гипертензия	1 – 6 (21, 43%), 2 – 3 (10, 71%), 3 – 19 (67, 86%)	1 – 3 (9, 38%), 2 – 4 (12, 5%), 3 – 25 (78, 13%)	0,326080
Хроническая сердечная недостаточность (функциональный класс)	I – 2 (5, 56%), II – 27 (75%), III – 7 (19, 44%)	1 – 1 (3, 13%), 2 – 17 (53, 13%), 3 – 10 (31, 25%)	0,102707
S поверхности тела (Мостеллера)	0,7628± 0,2153	0,8626± 0,14126	0,019571
Факт гемодинамически значимого стеноза коронарных артерий	7 (19, 44%)	10 (31, 25%)	0,318641
Холестерин, ммоль/л	5,6685± 1,4596	5,5433± 2,14660	0,307983
ЛПВП (липопротеины высокой плотности), ммоль/л	1,2913± 0,2883	1,1882± 0,28618	0,533417
ЛПНП, ммоль/л	3,7884± 1,4023	3,4700± 1,16306	0,758878
Кальций общий, ммоль/л	2,3946± 0,1169	2,4018± 0,09827	0,706480
СРБ, мг/л	2,2870± 1,8711	3,0876± 2,31141	0,451817
Калий, ммоль/л	4,4542± 0,4160	4,6673± 0,55424	0,172764
Лимфоциты, %	28,7297± 8,6582	30,0156± 6,89708	0,383004
СОЭ, мм/ч	13,8462± 9,9318	25,2857± 5,15475	0,003824

Факт гемодинамически значимого стеноза брахиоцефальных артерий	4 (13, 33%)	4 (15, 38%)	0,872710
Креатинин, ммоль/л	76,2222± 11,4070	79,0937± 19,28957	0,995098
Мочевина, ммоль/л	5,6572± 1,8035	5,3520± 1,24960	0,703902
Мочевая кислота, мкмоль/л	369,4667± 97,53012	475,3178± 101,5460	0,011271
Глюкоза, ммоль/л	5,9026± 0,7248	6,4440± 1,39312	0,048167
Факт приема иАПФ или сартанов	17 (47, 22%)	16 (50%)	0,586471
Частота сердечных сокращений (ЧСС)	73,9444± 7,8228	70,7419± 11,94143	0,011694
Систолическое АД, мм рт. ст.	135,5833± 12,79369	139,6129 ± 21,73427	0,489177
Диастолическое АД, мм рт. ст.	78,8611 ± 5,11107	80,3871 ± 12,02408	0,934856
Факт приема диуретиков	8 (22, 22%)	10 (31, 25%)	0,414537
Факт приема β блокаторов	25 (69, 44%)	23 (71, 88%)	0,559475
Факт приема статинов	17 (47, 22%)	15 (46, 88%)	0,751009

Таблица 4. Характеристика пациентов по данным ЭХОКГ

	БАК (n=36), M±SD	ТАК (n=32), M±SD	Тест Манна-Уитни: пациенты с БАК vs пациенты с ТАК (курсивом выделены значения с p<0,05)
Гипертрофия левого желудочка	0,9000± 0,30382	1,0000± 0,0000	0,468282
АК Vmax (скорость аортального потока), м/с	4,7141± 0,87038	4,3338± 0,6963	0,007973
Степень стеноза (по скорости аортального потока)	Умеренная - 2 человека (5%), тяжелая -34 человека (95%)	Умеренная -6 человек (19%), тяжелая - 25 человек (81%)	0,341728
АК dPmax (максимальный градиент), мм рт. ст.	92,6270± 26,41895	77,1719± 22,0622	0,008410
АК dPmean (средний градиент), мм рт. ст.	58,2068± 16,40151	47,7950± 17,4867	0,006628
Степень стеноза (по среднему градиенту)	Умеренная - 3 человека (8%), тяжелая - 33 человека (92%)	Умеренная - 10 человек (32%), тяжелая - 20 человек (68%)	0,031704
Степень аортальной недостаточности	0,8378± 0,86646	0,8125± 0,8590	0,894699
Фиброзное кольцо, см	2,4472± 0,22739	2,2300± 0,2855	0,000165
Левое предсердие, см	4,2946± 0,66706	4,4742± 0,7047	0,482758
Конечно-диастолический объем, мл	145,1892± 41,66456	146,8710± 49,5962	0,995088
Конечно-систолический объем, мл	60,5946± 40,07248	59,0000± 33,0898	0,911757
Конечно-диастолический размер,	5,4081±	5,4065±	0,877673

мм	0,62333	0,6995	
Конечно-систолический размер, мм	3,6222± 0,90683	3,6258± 0,8676	0,835631
Масса миокарда левого желудочка, г	366,5112± 154,2158	353,7095± 153,1075	0,324171
Индекс массы миокарда, г/м ²	197,2671± 67,0490	180,2135± 61,3398	0,100877
Относительная толщина стенки	0,5472± 0,1154	0,4910± 0,1156	0,070282
Относительная толщина стенки (концентрическая/эксцентрическая гипертрофия)	Концентриче ская - 30 человек (83%), эксцентриче ская - 6 человек (17%)	Концентриче ская - 23 человека (72 %), эксцентриче ская - 9 человек (28 %)	0,365441
Диаметр аорты на уровне синусов Вальсальвы, см	3,6833± 0,45513	3,4226± 0,5971	0,081576
Диаметр восходящей аорты, см	4,0000± 0,63770	3,6806± 0,5770	0,038002
Фракция выброса, %	59,7459± 16,61757	61,5313± 14,7035	0,918536
Задняя стенка левого желудочка, мм	1,4624± 0,26182	1,3250± 0,2951	0,033689
Межжелудочковая перегородка, мм	1,7139± 0,28501	1,6094± 0,2955	0,093514

3.2. Анализ молекулярно-клеточных данных

3.2.1. Получение интерстициальных и эндотелиальных клеток клапана и создание биобанка в лаборатории

В ходе работы был отработан успешный способ получения интерстициальных и эндотелиальных клеток путем их ферментативного выделения из створок аортального клапана от пациентов, направленных на протезирование, а также из створок клапанов доноров. Выделенные

интерстициальные (рисунок 3) и эндотелиальные (рисунок 4) клетки образовывали характерные колонии на 3-5 день культивирования и достигали конфлюэнтного состояния на 10-14 день.

Рисунок 3. Интерстициальные клетки аортального клапана на 7 день культивирования (А – от пациента с аортальным стенозом, Б – от донора)

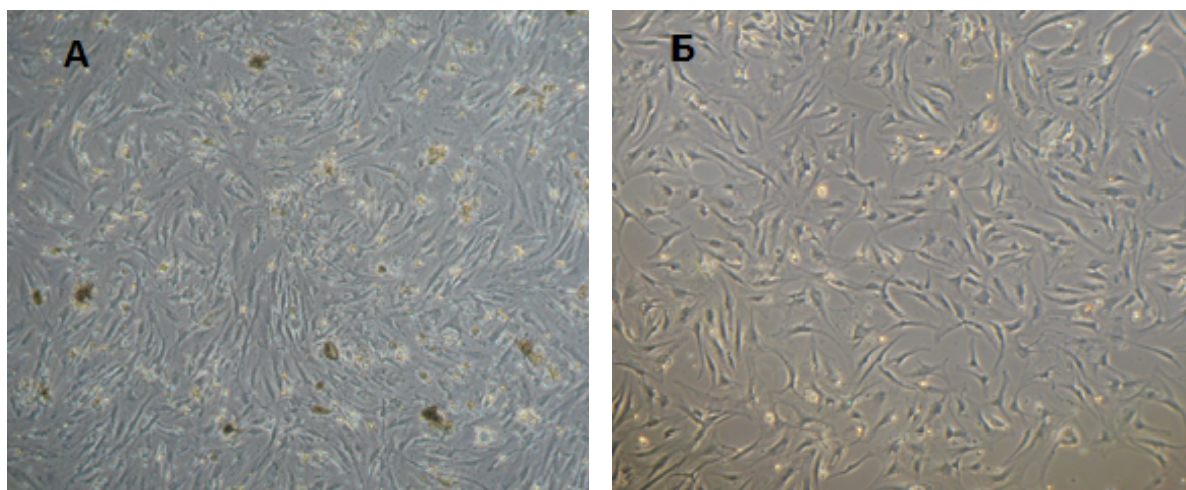
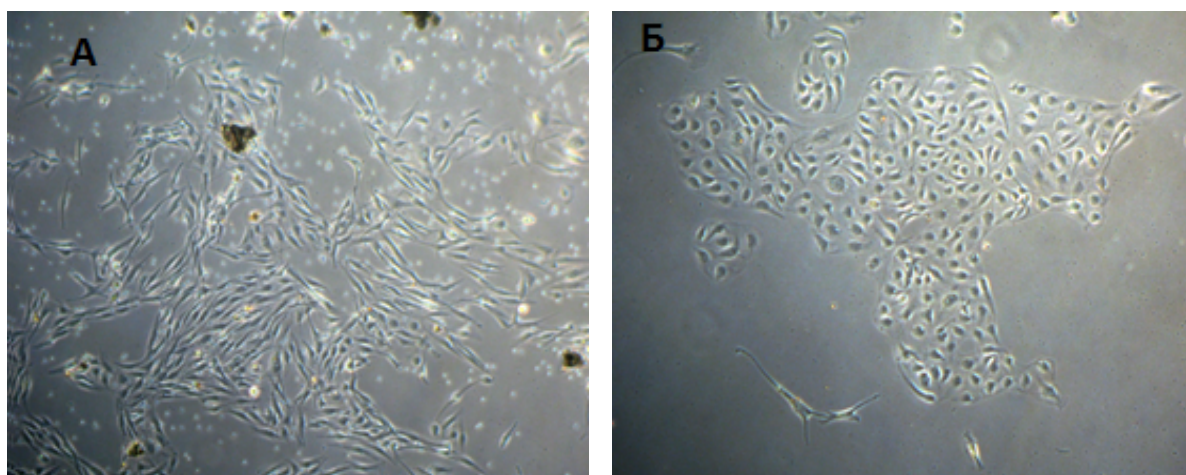


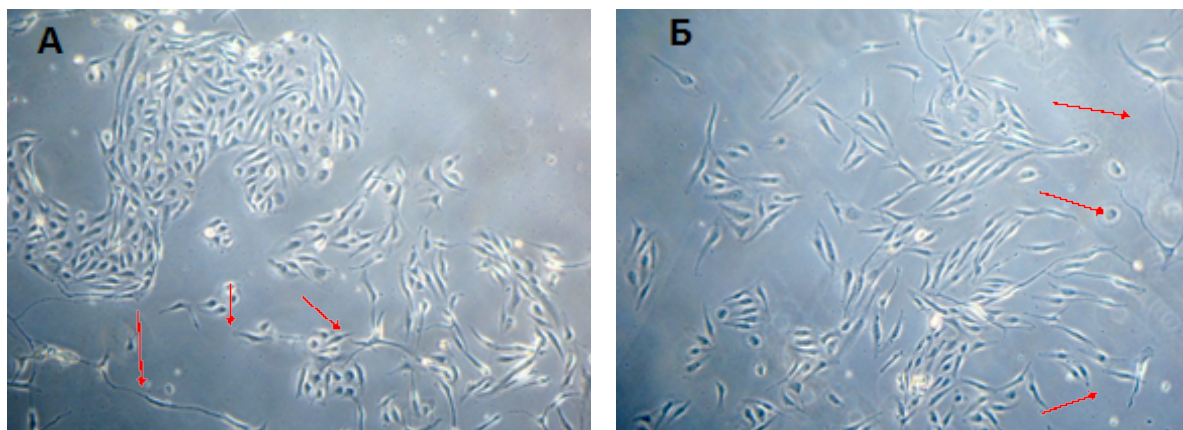
Рисунок 4. Эндотелиальные клетки аортального клапана на 7 день культивирования (А – от пациента с аортальным стенозом, Б – от донора)



Эндотелиальные клетки культивировали до 70-90% конфлюэнтности и затем осуществляли сортировку при помощи антител против эндотелиального маркера CD31 для очистки культуры эндотелиальных клеток от интерстициальных клеток (рисунок 5).

Рисунок 5. Эндотелиальные клетки аортального клапана от пациентов с аортальным стенозом на 5 день культивирования (А, Б). Некоторые

клетки начинали трансформироваться в “мезенхимальноподобные” (указаны стрелкой), поэтому было принято решение проводить магнитный сортинг CD31- позитивных клеток.



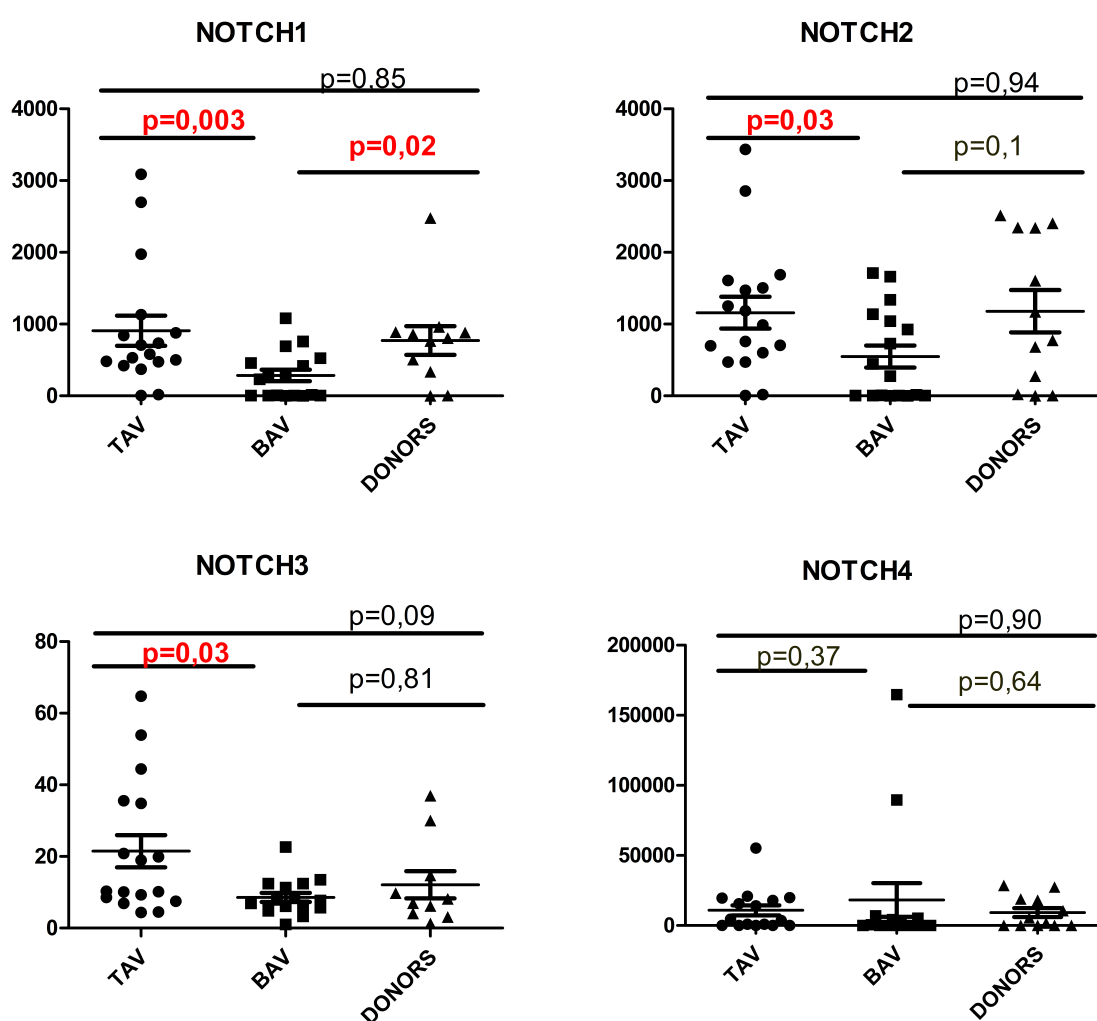
В ходе работы, помимо выделения интерстициальных клеток клапана для последующего изучения экспрессии компонентов сигнального пути Notch и генов остеодифференцировки, мы наращивали клетки до состояния конfluence и замораживали, с целью создать биобанк эндотелиальных и интерстициальных клеток от пациентов с аортальным стенозом.

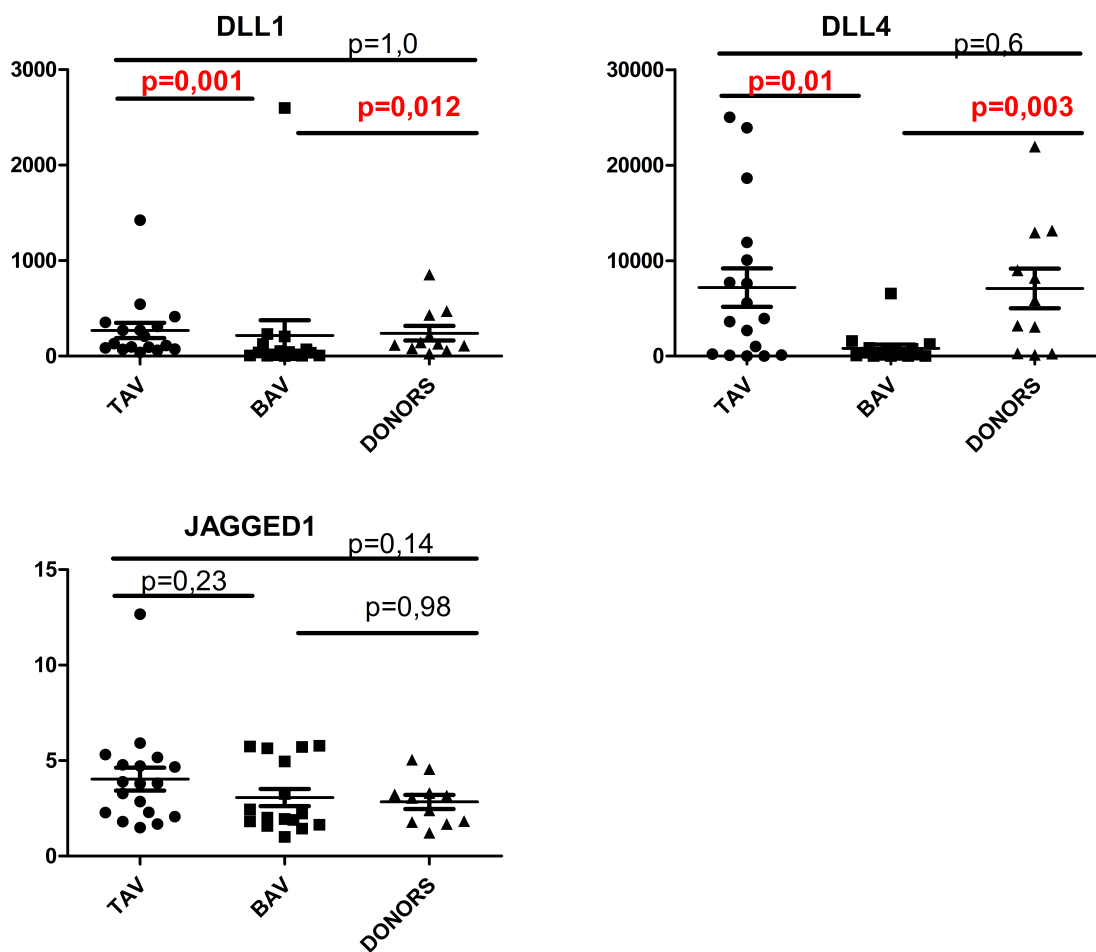
3.2.2. Анализ экспрессии генов-компонентов сигнального пути Notch в интерстициальных клетках аортального клапана

Для того чтобы сравнить популяции интерстициальных клеток здоровых доноров и пациентов с аортальным стенозом по уровню экспрессии генов-компонентов сигнального пути Notch, мы проанализировали уровень экспрессии соответствующих генов при помощи метода ПЦР в реальном времени (рисунок 5). Анализируя уровень экспрессии генов компонентов сигнального пути Notch в интерстициальных клетках, мы выяснили, что достоверные различия по уровню экспрессии генов *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3* имеются между группами пациентов с трикуспидальным и бикуспидальным аортальным

клапаном. В интерстициальных клетках, происходящих от пациентов с бicuspidальным клапаном уровень экспрессии генов *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3* был значимо ниже, чем в клетках от пациентов с трикуспидальным клапаном; также уровень экспрессии гена *NOTCH1* был значимо ниже в клетках, происходящих от пациентов с бicuspidальным клапаном, чем в клетках от доноров.

Рисунок 5. Уровень экспрессии генов-компонентов сигнального пути Notch в интерстициальных клетках аортального клапана





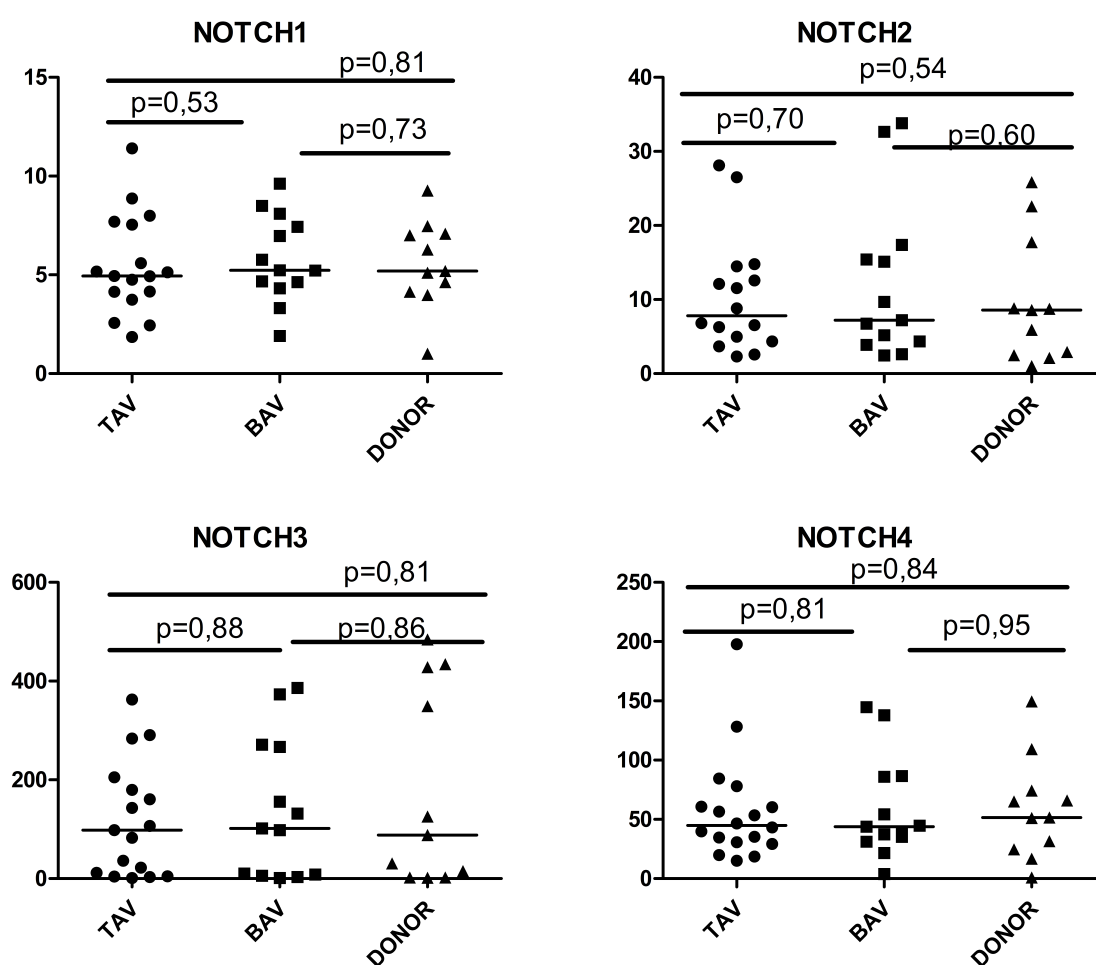
Мы проверили уровень экспрессии *JAGGED1*, *DLL1*, *DLL4* (рисунок 5). В клетках, происходящих от пациентов с бicuspidальным клапаном, уровень экспрессии генов *DLL1*, *DLL4* был значимо ниже, чем в клетках от пациентов с трикуспидальным клапаном, также уровень экспрессии генов *DLL1*, *DLL4* был значимо ниже в клетках, происходящих от пациентов с бicuspidальным клапаном, чем в клетках от доноров.

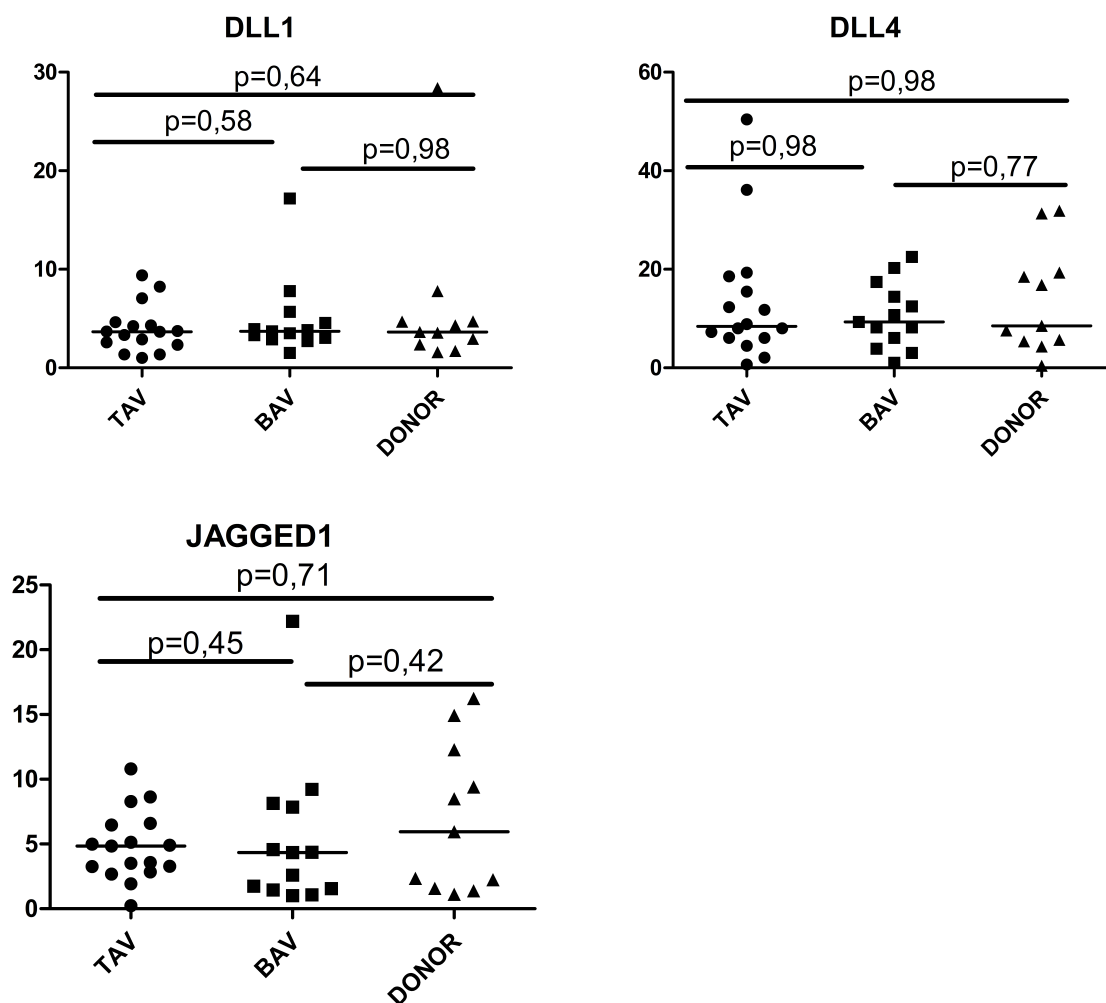
Таким образом, интерстициальные клетки пациентов со стенозом отличаются по уровню экспрессии генов-компонентов сигнального пути Notch от клеток здоровых доноров; интерстициальные клетки аортального клапана пациентов с бicuspidальным аортальным клапаном и пациентов с трикуспидальным аортальным клапаном также различаются между собой по уровню экспрессии генов-компонентов сигнального пути Notch.

3.2.3. Анализ экспрессии генов-компонентов сигнального пути Notch в эндотелиальных клетках аортального клапана

Следующей задачей исследования являлась оценка экспрессии генов-компонентов сигнального пути Notch в эндотелиальных клетках аортального клапана пациентов со стенозом и сравнение уровней экспрессии с таковыми в клетках здоровых доноров. Для этого при помощи метода ПЦР в реальном времени мы проанализировали экспрессию генов Notch в полученных эндотелиальных клетках пациентов и здоровых доноров (рисунок 6). Достоверных различий между группами пациентов и доноров по экспрессии генов-компонентов сигнального пути Notch в эндотелиальных клетках выявлено не было.

Рисунок 6. Уровень экспрессии генов-компонентов сигнального пути Notch в эндотелиальных клетках аортального клапана



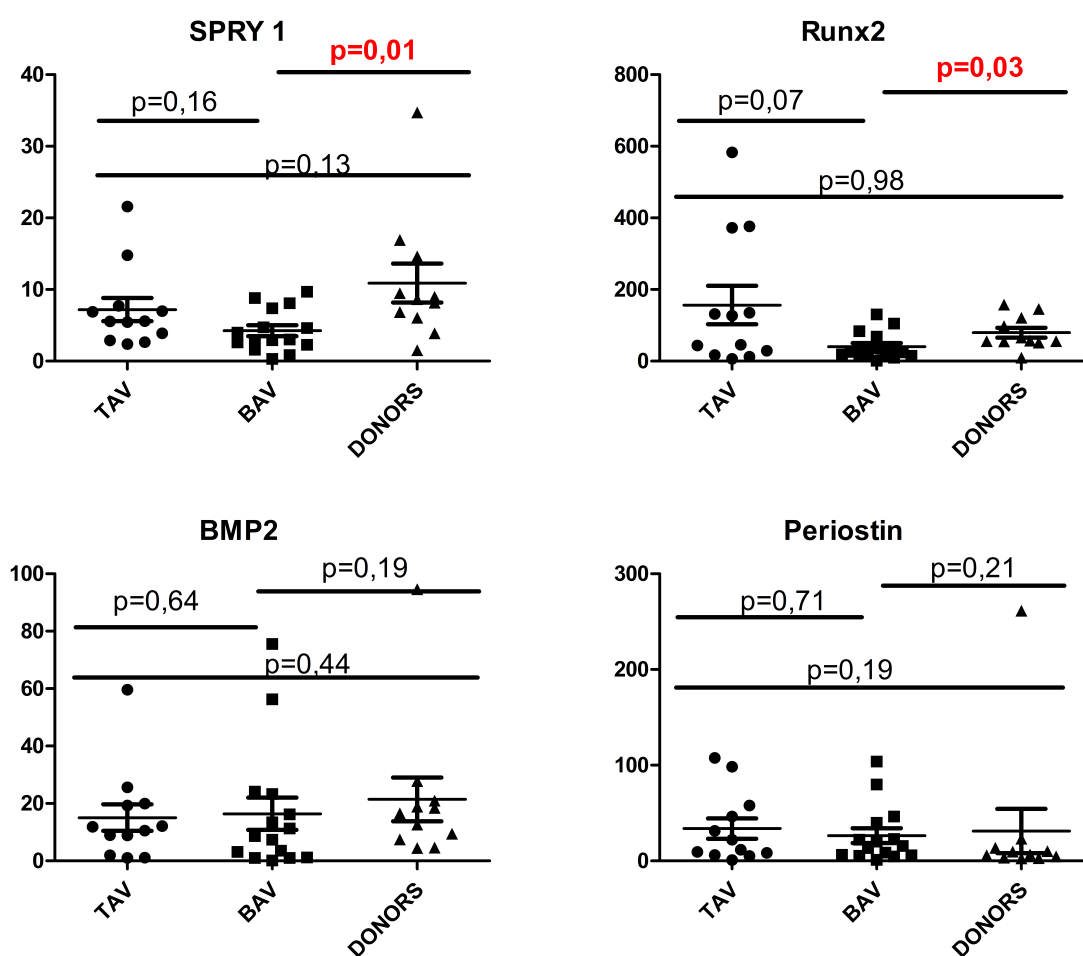


3.2.4. Анализ экспрессии генов остеогенной дифференцировки в интерстициальных клетках аортального клапана

На сегодняшний день развитие кальцификации аортального клапана связывают с дифференцировкой и приобретением интерстициальными клетками свойств остеобластов, благодаря чему они становятся способны экспрессировать гены белков костного матрикса и минерализовать клапан, почти превращая его в костную ткань [65]. Следующей задачей нашего исследования было сравнение интерстициальных клеток здоровых доноров и пациентов с аортальным стенозом по уровню экспрессии генов, связанных с остеогенной дифференцировкой. При помощи метода ПЦР в реальном времени мы проанализировали экспрессию следующих генов в интерстициальных клетках: *SPRY1*, *RUNX2*, *BMP2*, *POSTN* (Periostin)

(рисунок 7). В клетках, происходящих от пациентов с бicuspidальным клапаном, уровень экспрессии генов *SPRY1*, *RUNX2* был значимо ниже, чем в клетках от доноров. По уровню *BMP2*, *POSTN* различия найдены не были.

Рисунок 7. Уровень экспрессии генов остеогенной дифференцировки в интерстициальных клетках аортального клапана



3.3. Обсуждение результатов

На сегодняшний день установлено, что аортальный стеноз – это активный, сложный и регулируемый патологический процесс, в развитии которого участвует множество компонентов [2]. Среди компонентов,

влияющих на развитие аортального стеноза находятся следующие факторы: РААС, дислипидемия, дезорганизация межклеточного матрикса металлопротеиназами, воспалительные элементы (макрофаги, Т – лимфоциты, тучные клетки и молекулы характерные для типичного воспаления, такие как IL-2, HLA-DR, TNF alpha), эндотелиальная дисфункция, влияние симпатической нервной системы, эктопическая оссификация, подтверждаемая экспрессией таких остеомаркеров как остеопонтин, костный морфопротеин (BMP2,4), RANKL, остеоонектин, остеокальцин, костный сиалопропротеин, генетические мутации [52, 53].

При анализе историй болезни пациентов, подвергшихся протезированию аортального клапана, мы разделили их на 2 группы – пациенты с трикуспидальным и бicuspidальным клапаном. При сравнении этих двух групп, мы выяснили, что для пациентов с бicuspidальным клапаном характерны более тяжелые показатели гемодинамики и больший диаметр аорты при лучшем метаболическом профиле. Для пациентов с трикуспидальным клапаном, наоборот, характерна большая сохранность показателей гемодинамики, при худших биохимических и клинических данных.

Полученные в данной работе результаты позволяют говорить о том, что, по-видимому, развитие стеноза у пациентов с трикуспидальным клапаном связано с более тяжелыми нарушениями клинико-метаболического профиля. Такой сильной выраженности нарушений не требуется для развития стеноза у пациентов с бicuspidальным клапаном.

Сигнальный путь Notch, исследованный в нашей работе, является одним из важнейших регулирующих механизмов в ходе процессов развития, таких как определение судьбы того или иного клеточного зачатка, пролиферации клеток и их дифференцировки [33]. В последнее десятилетие стало ясно, что сигнальный путь Notch участвует в формировании и функционировании сердечно – сосудистой системы, а

мутации в генах-компонентах этого пути могут приводить к возникновению различных врожденных дефектов сердца и сосудов [67]. В нескольких последних обзорах Роберто Феррари, экс - президент Европейского кардиологического общества, указывает на актуальность многостороннего изучения сигнального пути Notch в сердечно-сосудистой системе [68]. До настоящего времени роль сигнального пути Notch в процессе развития аортального стеноза остается до конца не ясной. Данная работа была главным образом посвящена изучению уровня экспрессии генов-компонентов сигнального пути Notch и генов остеогенной дифференцировки у пациентов с аортальным стенозом.

Исследования сигнального пути Notch в тканях и клетках аортального клапана проводились ранее; однако анализ отдельных популяций интерстициальных и эндотелиальных клеток по уровню экспрессии компонентов сигнального пути Notch и сравнение клеток пациентов со стенозом и клеток здоровых доноров, проведенные в данной работе, были сделаны впервые.

Мы обнаружили снижение уровня экспрессии генов *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *DLL1*, *DLL4* в интерстициальных клетках от пациентов с бicuspidальным клапаном в сравнении с клетками от пациентов с трикуспидальным клапаном. Также мы обнаружили снижение уровня экспрессии генов *NOTCH1*, *DLL1*, *DLL4* в клетках, происходящих от пациентов с бicuspidальным клапаном, в сравнении с клетками от доноров.

В то же время при анализе данных по экспрессии генов-компонентов сигнального пути Notch в эндотелиальных клетках нам не удалось выявить достоверных различий между группами пациентов со стенозом аортального клапана и донорами. В последнее время получено все больше данных, что в пределах клапана эндотелиальные и интерстициальные клетки взаимодействуют между собой и влияют друг на друга. У

эндотелиальных клеток также обнаружен остеогенный потенциал, и показана возможность влияния эндотелиальных на дифференцировку интерстициальных. Полученные в данной работе результаты позволяют говорить о том, что, по-видимому, в правильном функционировании сообщества этих клеток лежит механизм поддержания целостного состояния аортального клапана. Нарушение баланса между этими клетками может, по-видимому, приводить к нарушениям дифференцировки и приводить к изменениям клапана и, в частности, к кальцификации.

Полученные нами данные позволяют заключить, что при развитии у пациента аортального стеноза нарушена регуляция активности сигнального пути Notch и что изменения в регуляции сигнального пути Notch. Значимое изменение уровня экспрессии ряда генов сигнального пути Notch исключительно в клетках от пациентов с бicuspidальным клапаном позволяет предположить его важную роль в развитии у данной категории больных аортального стеноза.

Анализируя гены остеогенной дифференцировки в интерстициальных клетках, мы выяснили, что достоверно между собой различаются только группы пациентов с бicuspidальным клапаном и доноры (по генам *SPRY1*, *RUNX2*). Это позволяет говорить о возможном предрасположении к оксификации клеток от пациентов со стенозом бicuspidального клапана. *SPRY1* – антагонист FGF (*Fibroblast growth factor*) – фактора роста фибробластов, повышающегося при остеогенной дифференцировке клеток. Всегда при повышении FGF, по механизму положительной обратной связи, повышается и *SPRY1* [66]. *Runx2* является фактором транскрипции и запускает синтез белков костного вещества. Известно, что в норме *NOTCH1* ингибирует активацию *Runx2*, блокируя тем самым отложения кальция на клапане [38]. Мутации в гене *NOTCH1* приводят к активации *Runx2*, приводя таким образом к остеобластной дифференцировке

интерстициальных клеток [25]. Полученные нами результаты, позволяют предположить, что как нарушения в сигнальном пути Notch, так и нарушения в экспрессии генов остеодифференцировки характерны именно для пациентов с бicuspidальным клапаном.

Заключение

На сегодняшний день не существует лекарственной терапии, способной остановить прогрессирование аортального стеноза, поэтому единственным радикальным методом остается протезирование аортального клапана. Однако, с учетом продолжительности жизни населения, сопровождающегося ежегодным ростом числа пациентов с дегенеративным аортальным стенозом, очевидно, что требуется дальнейшее изучение механизмов кальцификации аортального клапана с целью поиска потенциальной мишени для терапии этого опасного заболевания.

Выводы

Полученные в представленной работе результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. Интерстициальные клетки от пациентов со стенозом бicuspidального аортального клапана отличаются от пациентов со стенозом трикуспидального клапана по уровню экспрессии генов-компонентов сигнального пути Notch.

2. Интерстициальные клетки от пациентов со стенозом бicuspidального аортального клапана отличаются от доноров по уровню экспрессии генов-компонентов сигнального пути Notch

3. Интерстициальные клетки от пациентов со стенозом бicuspidального аортального клапана отличаются от доноров по уровню экспрессии генов, отвечающих за остеогенную дифференцировку.

4. Для пациентов с бicuspidальным клапаном характерны более тяжелые показатели гемодинамики и больший диаметр аорты при лучшем метаболическом профиле.

5. Для пациентов с трикуспидальным клапаном характерна большая сохранность показателей гемодинамики, при худших биохимических и клинических данных.

6. Нарушение экспрессии генов-компонентов сигнального пути Notch в интерстициальных клетках пациентов с бicuspidальным аортальным клапаном может быть вовлечено в патогенез аортального стеноза.

Благодарности

В заключение хотелось бы искренне поблагодарить моих научных руководителей – заведующую лабораторией Молекулярной кардиологией, кандидата биологических наук, доцента Малашичеву Анну Борисовну и заведующего кафедрой госпитальной терапии, главного врача международного медицинского центра “СОГАЗ”, доктора медицинских наук, профессора Обрезана Андрея Григорьевича за помощь, поддержку, понимание и руководство на всех этапах выполнения работы. Выражаю благодарность директору института молекулярной биологии и генетики ФГБУ “ФМИЦ им. В.А.Алмазова” Костаревой Анне Александровне за возможность проведения исследования в ФГБУ “ФМИЦ им. В.А.Алмазова”. Также выражаю благодарность всем сотрудникам института за полезные советы, помощь в постановке экспериментов и приятную и доброжелательную обстановку в лаборатории.

Список литературы

1. Национальное руководство “Кардиология”, под редакцией Е.В.Шляхто. – М.: Гэотар-Медиа. – 2015. – С.582-592.
2. *Кэмм. А. Джон.* Болезни сердца и сосудов: Руководство Европейского общества кардиологов / Под ред. Е.В.Шляхто. – М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2011. – С.780-790.
3. *Garg V.* Molecular genetics of aortic valve disease // Current opinion in Cardiology. – 2006. – №21. – P.180-184, doi: 10.1097/01.hco.0000221578.18254.70.
4. *Орловский П.И., Гриценко В.В., Юхнев А.Д., Евдокимов С.В., Гавриленков В.И.* Искусственные клапаны сердца / Под ред. Ю.Л.Шевченко. – СПб.: ЗАО “ОЛМА Медиа Групп”. – 2007. – С.9-21.
5. *Misfeld M., Sievers H-H.* Heart valve macro – and microstructure // Philosophical transactions of the royal society. – 2007. – №362. – P. 1421-1436, doi: 10.1098/rtsb.2007.2125.
6. *Митрофанова Л.Б.* Клапанные пороки сердца. Новый взгляд на этиологию, патогенез и морфологию / Под ред. Е.В.Шляхто и Г.Б.Ковалевского. – СПб.: ООО “Медицинское издательство”. – 2007. – С. 26-41, 142-146.
7. *Butcher J.T., Mahler G.J., Hockaday L.A.* Aortic valve disease and treatment: The need for naturally engineered solutions // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2011. – №63. – P. 242-268, doi: 10.1016/j.addr.2011.01.008.
8. *Schoen F.J.* Mechanisms of Function and Disease of Natural and Replacement Heart Valves //The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. – 2012. – №7. – P.161-183.
9. *Butcher J.T., Nerem R.M.* Valvular endothelial cells and the mechanoregulation of valvular pathology // Philosophical transactions of the royal society. – 2007. – №362. – P.1442-1457,doi:10.1098/rstb.2007.2127.

10. *Gross L., Kugel M.* Topographic anatomy and histology of the valves in the human heart // *The American Journal of Pathology.* – 1939. – №7. – P.445-473.
11. *Rajamannan N.M.* Bicuspid aortic valve disease: the role of oxidative stress in Lrp5 bone formation // *Cardiovascular pathology.* – 2011. – №20. – P. 168-176.
12. *Ladich E., Nakano M., Carter-Monroe N., Virmani R.* Pathology of calcific aortic stenosis // *Future Cardiology.* – 2011. – №7. – P. 629-642.
13. *Yetkin E., Waltensberger J.* Molecular and cellular mechanisms of aortic stenosis // *International Journal of Cardiology.* – 2009. – №135. – P.4-13.
14. *Иртюга О.Б., Жидулева Е.В., Муртазалиева П.П., Малашичева А.Б., Мусеева О.М.* Патогенетические механизмы развития кальциноза аортального клапана: взгляд клинициста // Под ред. Е.В.Шляхто. – СПб. – 2015. – С.34-44.
15. *Guerray M., Mohler III E.R.* Models of Aortic Valve Calcification // *Journal of Investigative Medicine.* – 2007. – №55. – P.278-283, doi: 10.2310/6650.2007.00012.
16. *Otto C.M., Lind B.K., Kitzman D.W., Gersh B.J., Siscovick D.S.* Association aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly // *The New England Journal of Medicine.* – 1999. – №341. – P. 142-147.
17. *Helske S., Kupari M., Lindstedt K.A., Kovanen K.P.* Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process // *Current Opinion in Lipidology.* – 2007. – № 18. – P. 483-491.
18. *Xu S., Liu A.C., Gotlieb A.I.* Common pathogenic features of atherosclerosis and calcific aortic stenosis: role of transforming growth factor – β // *Cardiovascular Pathology.* – 2010. – № 13. – P. 236-247.
19. *Goldberg S.H., Elmariah S., Miller M.A., Fuster V.* Insights into Degenerative Aortic Valve Disease // *Journal of the American College of Cardiology.* – 2007. – №50. – P. 1205-1213, doi: 10.1016/j.jacc.2007.06.024.

20. *Mohler E.R.* Mechanisms of aortic Valve Calcification // *The American Journal of Cardiology*. – 2004. – №94. – P. 1396-1402, doi: 10.1016/j.amjcard.2004.08.013.
21. *Shin V., Zebboudi A.F., Bostrom K.* Endothelial Cells Modulate Osteogenesis in Calcifying Vascular Cells // *Journal of Vascular Research*. – 2004. – №41. – P. 193-201, doi: 10.1159/000077394.
22. *Gould S.T., Matherly E.E., Smith J.N., Heistad D.D., Anseth K.S.* The role of valvular endothelial cell paracrine signaling and matrix elasticity on valvular interstitial cell activation // *Biomaterials*. – 2014. – №35. – P. 3596-3606, doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.01.005.
23. *Galeone A., Brunetti G., Oranger A., Greco G., Benedetto A., Mori G., Colucci S., Zallone A., Paparella D., Grano M.* Aortic valve interstitial cells apoptosis and calcification are mediated by TNF-related apoptosis-inducing ligand // *International Journal of Cardiology*. – 2013. – № 169. – P. 296-304, doi: 10.1016/j.ijcard.2013.09.012.
24. *Accaoui R.N., Gould S.T., Hajj G.P., Chu Y., Davis M.K., Kraft D.C., Lund D.D., Brooks R.M., Doshi H., Zimmerman K.A., Kutschke W.* Aortic valve sclerosis in mice deficient in endothelial nitric oxide synthase // *The American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*. – 2014. – №306. – P.1302-1313, doi: 10.1152/ajpheart.00392.2013
25. *O'Brien K.* Pathogenesis of Calcific Aortic Valve Disease // *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. – 2006. – №26. – P. 1721-1728, doi:10.1161/01.ATV.0000227513.13697.ac
26. *Meng X., Ao L., Song Y., Babu A., Yang X., Wang M., Weyant M.J., Dinarello C.A., Cleveland J.C., Fullerton D.A.* Expression of functional Toll-like receptors 2 and 4 in human aortic valve interstitial cells: potential roles in aortic valve inflammation and stenosis // *The American Journal of Physiology: Cell Physiology*. – 2007. – №294. – P. 29-35, doi: 10.1152/ajpcell.00137.2007.

27. Akat K., Borggreffe M., Kaden J.J. Aortic valve calcification: basic science to clinical practice //Heart. – 2009. – №95. – P.616-623, doi: 10.1136/hrt.2007.134783.
28. Venardos N., Nadlonek N.A., Zhan Q., Weyant M.J., Meng X., Fullerton D.A. Aortic valve calcification is mediated by a differential response of aortic valve interstitial cells to inflammation // Journal of Surgical Research. – 2014. – P.1-8.
29. Rajamannan N.M. Mechanisms of aortic valve calcification: the LDL-density-radius theory: a translation from cell signaling to physiology // The American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology. – 2010. – №298. – P.H5-H15, doi: 10.1152/ajpheart.00824.2009.
30. Chen J.H., Simmons C.A. Cell-Matrix Interactions in the Pathobiology of Calcific Aortic Valve Disease. Critical Roles for Matricellular, Matricrine and Matrix Mechanics Cues // Circulation Research. – 2011. – P. 1510-1524, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.234237.
31. Hakuno D., Kimura N., Yoshioka M., Fukuda K. Molecular mechanisms underlying the onset of degenerative aortic valve disease // Journal of Molecular Biology. – 2009. – №87. – P.17-24, doi: 10.1007/s00109-008-0400-9.
32. Hakuno D., Kimura N., Yoshioka M., Fukuda K. Role of Angiogenetic Factors in Cardiac Valve Homeostasis and Disease // Journal of Cardiovascular Translational Research. - 2011. – №4. – P. 727-740, doi:10.1007/s.12265-011-9317-8.
33. Lai E.C. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. // Development. –2004. – P.965-973.
34. Niessen K., Karsan A. Notch signaling in the developing cardiovascular system // Cell Physiology. – 2007. – Vol. 293. – №. 1. – P. C1-C11.

35. *Mathieu Patrick, Boulanger Marie-Chloe, Bouchareb Rihab*. Molecular biology of calcific aortic valve disease: towards new pharmacological therapies. // *Expert review of cardiovascular therapy*. – 2014. – №12. – P.851-862.
36. *Zhou X.L., Liu J.C.* Role of Notch signaling in the mammalian heart. // *Brazilian Journal of Medical and Biological research*. – 2014. – №47. – P.1-10.
37. *Fukuda D. et al.* Notch ligand Delta-like 4 blockade attenuates atherosclerosis and metabolic disorders // *Proceedings of the national Academy of Sciences*. – 2012. - №27. – P.1868 – 1877.
38. *Garg V.* Molecular genetics of aortic valve disease // *Current opinion in Cardiology*. – 2006. – №21. – P.180-184.
39. *Miller J.D., Weiss R.M., Heistad D.D.* Calcific Aortic Valve Stenosis: Methods, Models and Mechanisms // *Circulation Research*. – 2011. – №108. – P. 1392-1412, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.234138.
40. *McKellar S.H., Tester D.J., Yagubyan M., Majumdar R., Ackerman M.J., Sundt T.M.*, Novel NOTCH1 mutations in patients with bicuspid aortic valve disease and thoracic aortic aneurysms. // *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. – 2007. – №134. – P.290-296, doi:10.1016/j.jtcvs.2007.02.041.
41. *Tkatchenko T.V., Moreno-Rodriguez R.A., Conway S.J., Molkentin J.D., Markwald R.R., Tkatchenko A.V.* Lack of periostin leads to suppression of Notch1 signaling and calcific aortic valve disease. // *Physiological Genomics*. – 2009. – №39. – P.160-168, doi:10.1152/physiolgenomics.00078.2009.
42. *Snider P., Hinton R.B., Moreno-Rodriguez R.A., Wang J., Rogers R., Lindsley A., Li F., Ingram D.A., Menick D., Field I., Firulli A.B., Molkentin*

J.D., Markwald R., Conway S.J. Periostin is required for maturation and extracellular matrix stabilization of noncardiomyocyte lineages of the heart. // *Circulation Research*. – 2008. – №102 (7). – P.752-760, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.159517.

43. *Potts J.D., Dagle J.M., Walder J.A., Weeks D.L., Runyan R.B.* Epithelial-mesenchymal transformation of embryonic cardiac endothelial cells is inhibited by a modified antisense oligodeoxynucleotide to transforming growth factor beta 3. // *Proceedings of the National Academy of Science of the U S A*. – 1991. – №88. – P.1516-1520.

44. *Rivera-Feliciano J., Tabin C.J.* Bmp2 instructs cardiac progenitors to form the heart-valve-inducing field. // *Developmental Biology*. – 2006. – №295. – P.580-588, doi:10.1016/j.ydbio.2006.03.043.

45. *Mathieu Patrick, Boulanger Marie-Chloe, Bouchareb Rihab.* Molecular biology of calcific aortic valve disease: towards new pharmacological therapies. // *Expert review of cardiovascular therapy*. – 2014. – №12. – P.851-862.

46. *Zeng Q., Song R., Ao L., Xu D., Venardos N., Fullerton D.A., Meng X.* Augmented Osteogenic Responses in Human aortic Valve Cells Exposed to oxLDL and TLR4 Agonist: A Mechanistic Role of Notch1 and NF- κ B Interaction // *Plos One*. – 2014. – №9. – P.1-10.

47. *Farrar E.J., Butcher J.T.* Heterogeneous Susceptibility of Valve Endothelial Cells to Mesenchymal Transformation in Response to TNF α // *Annals of Biomedical Engineering*. – 2014. – №42. – P.149-161, doi: 10.1007/s104399-013-0894-3.

48. *Osman L., Yacoub M.H., Latif N., Amrani M., Chester A.H.* Role of Human Valve Interstitial Cells in Valve Calcification and Their Response to

Atorvastatin // *Circulation*. – 2006. – P.546-552, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001115.

49. *Cawley P.J., Otto C.M.* Prevention of calcific aortic valve stenosis – fact or fiction? // *Annals of Medicine*. – 2009. – №41. – P. 100-108, doi: 10.1080/07853890802331394.

50. *Osman L., Chester A.H., Sarathchandra P., Laima N., Meng W., Taylor M.M., Yacoub M.H.* A Novel role of the Sympatho-Adrenergic System in Regulating Valve Calcification // *Circulation*. – 2007. – P.281-287, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.681072.

51. *New S.P., Aikawa E.* Molecular Imaging Insight Into Early Inflammatory Stages of Arterial and Aortic Valve Calcification // *Circulation*. – 2011. – P.1380-1391, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.234146.

52. *New S.P., Aikawa E.* Cardiovascular Calcification: an Inflammatory Disease // *Circulation*. – 2011. – №75. – P.1305-1313, doi: 10.1253/circj.CJ-11-0395.

53. *Sherif H.M.* Calcification of Left-Sided Valvular Structures: Evidence of a Pro-Inflammatory Milieu // *Journal of Heart Valve Disease*. – 2009. – №1. – P. 52-60.

54. *Butcher J.T., Nerem R.M.* Valvular Endothelial Cells Regulate the Phenotype of Interstitial Cells in Co-Culture: Effects of Steady Shear Stress // *Tissue Engineering*. - 2006. – №12. – P. 905-915.

55. *Husseini D.E., Boulanger M.C., Mahmut A., Bouchareb R., Laflamme M.H., Fournier D., Pibarot P., Bosse Y., Mathieu P.* P2Y12 receptor represses IL-6 expression by valve interstitial cells through Akt: Implication for calcific aortic valve disease // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2014. –№72. – P. 146-156.

56. *Farzaneh – Far.A., Proudfoot D., Shanahan C., Weissberg P.L.* Vascular and valvar calcification: recent advances // *Heart*. – 2001. – №85. – P.13-17.
57. *Giachelli C.M.* Ectopic Calcification // *American Journal of Pathology*. – 1999. – №3. – P.671-675.
58. *Новиков В.Н., Новикова В.Н.* Клапанные Пороки Сердца. – СПб.: СпецЛит. – 2015. – С.7-26.
59. *Ройтеберг Г.Е., Струтынский А.В.* Внутренние болезни - Сердечно-Сосудистая Система. М.: “МЕДпресс-информ”. – 2013. – С. 705-719.
60. *Гриффин.Б., Тополь Э.* Кардиология. М.: Практика. – 2011. – С. 281-295.
61. *Zigelman C.Z., Edelstein P.M.* Aortic Valve Stenosis // *International Journal of Clinical Anesthesiology*. – 2009. – P. 519-532, doi:10.1016./j.anclin.2009.07.012.
62. *Ассоциация Сердечно-Сосудистых Хирургов России.* Клинические рекомендации по ведению, диагностике и лечению клапанных пороков сердца. М., 2009. – С.59-80.
63. *Островский Ю.П.* Хирургия Сердца. М.: Мед.Лит. – 2007. – С. 249-255.
64. *Браунвальд Е.* Болезни сердца по Браунвальду: руководство по сердечно-сосудистой медицине/ Под ред. П.Либби. – М.:Логосфера. – 2013. – С.1833-1846.
65. *Chen J-H., Simmons C.A.* cell- matrix interactions in the pathobiology of calcific aortic valve disease: critical roles for matricellular, matricrine and matrix mechanics cues // *Circulation Research*. – 2013. – №113. – P. 327-340. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.300675.

66. *Takei Y., Minamizaki T., Yoshiko Y.* Functional Diversity of Fibroblast Growth Factors in Bone Formation // International Journal of Endocrinology. – 2015. – P.1-13.

67. *Pompa J.A., Epstein J.L.* Coordinating tissue interactions: Notch signaling in Cardiac Development and Disease // Developmental Cell Journal. – 2012. – №22. – P. 244-254.

68. *Ferrari R., Rizzo P.* The Notch pathway: a novel target for myocardial remodeling therapy? // European Heart Journal. – 2014. – №35. – P.2140-2145.