Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Przemysław Kapusta

Wpływ inhibitorów konwertazy angiotensyny oraz statyn na ekspresję czynników krzepnięcia w zwężonych zastawkach aortalnych – związki z kalcyfikacją, neowaskularyzacją i zapaleniem w stenozie aortalnej

Praca doktorska

Promotorzy:
prof. dr hab. med. Anetta Undas
prof. dr hab. Zbigniew Adamczyk

Pracę wykonano w Instytucie Kardiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, dyrektor instytutu: prof. dr hab. med. Piotr Podolec
oraz w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk dyrektor instytutu: prof. dr hab. Małgorzata Witko

Kraków, 2015

Serdecznie dziękuję moim promotorom, prof. dr. hab. med. Anecie Undas oraz prof. dr. hab. Zbigniewowi Adamczyk za stworzenie szansy realizacji niniejszej pracy oraz wszelką pomoc, jaką mi udzielili w czasie dotychczasowej współpracy.

Ponadto dziękuję dr. Ewie Wypasek oraz dr. Joannie Natorskiej za cenne wskazówki, zaangażowanie, wyrozumiałość i okazaną pomoc, bez której ninijesza praca w obecnej formie by nie powstała.

Dziękuję również wszystkim pracownikom Pracowni Biologii Molekularnej Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II za okazane wsparcie.

Niniejsza rozprawa doktorska została wykonana w ramach projektu pn. Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „Nauki molekularne dla medycyny” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego - Program Operacyjny Kapitał Ludzki 2007-2013

KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY

This PhD thesis was completed thanks to the financial support from the project Interdisciplinary PhD Studies "Molecular sciences for medicine" (co-financed by the European Social Fund within the Human Capital Operational Programme)

Spis treści

1. Wprowadzenie ... 7
1.1 Patobiologia stenozy aortalnej ... 7
1.2 Białka krzepnięcia krwi w stenozie aortalnej ... 10
1.2.1 Czynnik tkankowy ... 11
1.2.2 Protrombina i trombina ... 14
1.2.3 Fibrynogen i fibryna ... 16
1.2.4 Czynnik XIII ... 17
1.2.5 Fibrynoliza ... 18
1.2.6 Czynnik von Willebranda ... 20
1.3 Statyny ... 21
1.3.1 Przeciwzapalne działanie statyn ... 23
1.3.2 Przeciwzakrzepowe działanie statyn ... 25
1.4. Inhibitory konwertazy angiotensyny i antagoniści receptora angiotensyny II ... 27
1.4.1 Przeciwzapalne działanie ACEI i ARB ... 29
1.4.2 ACEI, ARB a układ krzepnięcia ... 29
1.4.3 ACEI i ARB a układ fibrynolizy ... 30
2. Założenia i cele pracy ... 32
3. Pacjenci i metody ... 33
3.1 Odczynniki ... 33
3.2 Grupa badana ... 35
3.2.1 Kryteria włączenia ... 35
3.2.2 Kryteria wyłączenia ... 36
3.2.3 Echokardiografia ... 37
3.2.4 Badania laboratoryjne ... 37
3.3 Analiza zastawek aortalnych ... 37
3.3.1 Immunofluorescencja ... 38
3.3.2 Pomiar ekspresji mRNA wybranych genów we fragmentach zastawek ... 39
3.3.3 Ocena ilości wapnia w homogenizatach zastawek ... 41
3.4 Hodowla VICs ... 41
3.4.1 Izolacja komórek z zastawki aortalnej ... 41

3.4.2 Ocena czystości otrzymanych hodowli komórkowych 42
3.4.3 Stymulacja hodowli komórkowej 43
3.4.4 Pomiar ekspresji mRNA w hodowlach komórkowych..... 46
3.4.5 Immunofluorescencja..... 47
3.4.6 Ocena kalcyfikacji komórek 47
3.4.7 Ocena aktywności fosfatazy alkalicznej (ALP)..... 48
3.4.8 Pomiar białka metodą BCA (metoda z kwasem bis-cynchoninowym) 48
3.4.9 Analiza ekspresji TF i FX na poziomie białka metodą Western blot. 49
3.5 Analiza statystyczna..... 50
4. Wyniki..... 51
4.1 Charakterystyka grupy badanej..... 51
4.2 Analizy in loco w stenotycznej zastawce aortalnej..... 52
4.2.1 Zapalenie..... 52
4.2.2 Kalcyfikacja 53
4.2.3 Białka układu krzepnięcia..... 54
4.2.4 Neowaskularyzacja 55
4.3 Analizy *in vitro* w hodowli VICs 56
4.3.1 Zapalenie..... 56
4.3.2 Kalcyfikacja 63
4.3.3 Ekspresja czynników krzepnięcia i receptorów PAR 69
4.3.4 Neowaskularyzacja 74
5. Dyskusja..... 75
5.1 Statyny..... 75
5.2 ACEI oraz antagoniści receptora angiotensyny AT_1 78
5.3 FX, FVII, FXI i receptory PAR 79
5.4 Ograniczenia badania 80
5.5 Podsumowanie 82
6. Wnioski 83
7. Streszczenie..... 84
8. Summary..... 87
9. Piśmiennictwo..... 90

Wykaz najczęściej używanych skrótów

ACE	*(ang. angiotensin converting enzyme)* enzym konwertujący angiotensynę
ACEI	*(ang. angiotensin converting enzyme inhibitors)* inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę
ADAMTS13	*(ang. disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13)* dezintegryna i metaloproteinaza zawierająca domeny podobne do trombospondyny, metaloproteinaza ADAMTS13
AngI	(*ang. angiotensin I*) angiotensyna I
AngII	(*ang. angiotensin II*) angiotensyna II
APC	*(ang. activated protein C)* aktywowane białko C
AS	*(ang. aortic stenosis)* stenoza aortalna
BMPs	*(ang. bone morphogenetic proteins)* białka morfogenetyczne kości
CAD	*(ang. coronary artery disease)* choroba niedokrwienna serca
CRP	*(ang. C-reactive protein)* białko C-reaktywne
ECM	*(ang. extracellular matrix)* macierz pozakomórkowa
F1+2	*(ang. prothrombin fragments 1+2)* fragment protrombiny 1+2
FPP	*(ang. farnesyl pyrophosphate)* pirofosforan farnezylu
GAGs	*(ang. glycosaminoglycans)* glikozaminoglikany
GGPP	*(ang. geranylgeranyl pyrophosphate)* pirofosforan geranylogeranylu
HDL	*(ang. high density lipoprotein)* lipoproteina wysokiej gęstości
HMG-CoA	*(ang. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A)* 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzym A
IL-1, -6	*(ang. interleukin 1, -6)* interleukina 1, -6
LDL	*(ang. low-density lipoprotein)* lipoproteina niskiej gęstości
LFA	*(ang. lymphocyte function-associated antygen)* antygen funkcji limfocytów
LPS	*(ang. lipopolysaccharides)* lipopolisacharydy
MCP-1	*(ang. monocyte chemotactic protein 1)* białko chemotaktyczne monocytów typu 1

MMPs	*(ang. matrix metalloproteinases)* metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej
mRNA	*(ang. messenger RNA)* przekaźnikowy kwas rybonukleinowy
NF-κB	(*ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)* czynnik transkrypcyjny NF-κB
OSP	*(ang. osteopontin)* osteopontyna
PAI-1	*(ang. plasminogen activator inhibitor-1)* inhibitor aktywatora plazminogenu 1
PAR-1	*(ang. protease activated receptor 1)* receptor aktywowany proteazami typu 1
PAR-2	*(ang. protease activated receptor 2)* receptor aktywowany proteazami typu 2
PGI_2	*(ang. prostaglandin I_2)* prostaglandyna I_2, prostacyklina
PGN	*(ang. peptidoglycan)* peptydoglikan
PPARs	*(ang. peroxisome proliferator-activated receptors)* receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów
RUNX2/Cfba1	*(ang. runt-related transcription factor 2/ core-binding factor subunit alpha-1)* czynnik transkrypcyjny RUNX2/Cfba1
STAT3	*(ang. signal transducer and activator of transcription 3)* czynnik transkrypcyjny STAT3
TF	*(ang. tisse factor)* czynnik tkankowy
TFPI	*(ang. tissue factor pathway inhibitor)* inhibitor zależnej od czynnika tkankowego drogi krzepnięcia
TGF-β	*(ang. transforming growth factor β)* transformujący czynnik wzrostu β
TNF-α	*(ang. tumor necrosis factor α)* czynnik martwicy nowotworów α
tPA	*(ang. tissue plasminogen activator)* tkankowy aktywator plazminogenu
VEGF	*(ang. vascular endothelial growth factor)* czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego
VICs	*(ang. valve interstitial cells)* komórki śródmiąższowe zastawki
vWF	*(ang. von Willebrand factor)* czynnik von Willebranda

1. Wprowadzenie

1.1 Patobiologia stenozy aortalnej

Zastawkowe wady serca stanowią poważny problem dla zdrowia publicznego na całym świecie. Przy spadku częstości występowania choroby reumatycznej serca, zwężenie zastawki aortalnej (*ang. aortic stenosis,* AS) staje się najczęstszą wadą zastawkową w krajach zachodnich. Częstość jej występowania zwiększa się z wiekiem. Obecnie AS dotyczy ok. 0,2% osób pomiędzy 55 a 64 rokiem życia [1] oraz 2-3% osób powyżej 65 roku życia [2].

Historycznie, zwapniała AS postrzegana była jako choroba „zwyrodnieniowa" osób w podeszłym wieku. Skłonność do wcześniejszego rozwoju klinicznie istotnej AS obserwowano jedynie u ok 1% populacji obejmującej osoby z dwupłatkową zastawką aortalną. Wiele badań wskazuje, że rozwój i progresja AS są związane z powszechnie uznanymi czynnikami ryzyka chorób sercowo-naczyniowych, takimi jak nadciśnienie tętnicze [3], palenie tytoniu [4], hipercholesterolemia [5], oraz cukrzyca [6]. Obecnie nie ma jednoznacznej odpowiedzi, czy istnieją czynniki genetyczne predysponujące do AS, podobnie jak to ma miejsce w przypadku miażdżycy [7]. Zidentyfikowano dotąd kilka mutacji, które mogą sprzyjać większym zwapnieniom w obrębie zastawki aortalnej, m.in. mutacja receptora błonowego NOTCH1, allel B genu receptora witaminy D, allel E4 apolipoproteiny E i polimorfizm receptora estrogenowego alfa [8-10]. U około 50% pacjentów z AS stwierdza się jednocześnie chorobę niedokrwienną serca (*ang. coronary artery disease*, CAD), jednak u co drugiego pacjenta z AS nie występują jawne klinicznie objawy miażdżycy [11].

Prawidłowa zastawka aortalna składa się z kilku warstw: (1) komorowej, znajdującej się od strony lewej komory serca, składającej się z włókien bogatych w elastynę, (2) gąbczastej, stanowiącej warstwę tkanki łącznej u podstawy zastawki, w skład której wchodzą fibroblasty, komórki mezenchymalne oraz macierz zewnątrzkomórkowa bogata w mukopolisacharydy, niezbędne do reorganizacji warstw kolagenu i elastyny, (3) włóknistej, znajdującej się od strony aorty, która poddawana jest działaniu dużych sił ścinających. Warstwa włóknista zbudowana jest głównie z fibroblastów i włókien kola-

genowych ułożonych obwodowo. Całość zastawki mająca styczność z krwią pokryta jest warstwą śródbłonka [12, 13]. W prawidłowych zastawkach aortalnych przeważają śródmiąższowe komórki mezenchymalne przypominające fibroblasty (*ang. valve interstitial cells*, VICs) [14]. We wszystkich trzech warstwach zastawki obserwuje się nieliczne makrofagi oraz limfocyty T [15]. Zwykle VICs wydzielają składniki macierzy zewnątrzkomórkowej (*ang. extracellular matrix*, ECM), takie jak: kolagen, fibronektyna, glikozaminoglikany (*ang. glycosaminoglycans*, GAGs) [16], jak również enzymy degradujące ECM, w szczególności metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej [17].

W warunkach fizjologicznych w czasie przebudowy (remodelingu) płatków zastawki aktywowane VICs usuwane są na drodze apoptozy [18]. Jednak w przypadku długo trwającej stymulacji komórek proces ten jest zaburzony, w wyniku czego aktywowane VICs produkują w sposób ciągły ECM, co prowadzi do patologicznych zmian w zastawce [18].

Patogeneza AS obejmuje swoiście postępujące zwłóknienie oraz zwapnienie wraz ze stopniowym zmniejszaniem się powierzchni ujścia zastawki. Obecna koncepcja rozwoju AS kładzie nacisk na rolę procesu zapalnego wewnątrz płatków zastawki aortalnej, któremu towarzyszy naciek makrofagów, podobnie jak w miażdżycy tętnic. Zwiększone zwłóknienie i stan zapalny przyczyniają się do przebudowy zastawki aortalnej i powstania złogów wapnia w obrębie płatków zastawki, co jest typowe dla zaawansowanej AS. Mimo wielu patobiologicznych podobieństw pomiędzy AS a miażdżycą [19], w tym nagromadzenie cholesterolu, naciek komórek zapalnych, neowaskularyzacja oraz przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej, mechanizmy powstawania AS i CAD są różne. Coraz więcej danych wskazuje, że VICs odgrywają kluczową rolę w określonych zmianach patologicznych zastawki aortalnej, odpowiadając za główne różnice pomiędzy patobiologią AS oraz miażdżycy [20]. Komórki tego typu są nieobecne w zmianach miażdżycowych.

Kalcyfikacja zastawki aortalnej jest regulowana przez różnicowanie i transformację VICs w kierunku fenotypu osteoblastycznego w wyniku współdziałania szeregu mechanizmów prowadzących do wzrostu ekspresji markerów prokalcyfikacyjnych

i prozapalnych, sił biomechanicznych oraz sił ścinających. Na początku procesu kalcyfikacji dochodzi do nagromadzenia się depozytów wapniowych w regionach utlenionych lipidów [21], co prowadzi do zwłóknienia płatka zastawki. Wraz z postępem choroby, zwapnienia rozprzestrzeniają się na powierzchni całego płatka zastawki, prowadząc do zaburzeń hemodynamicznych. Subpopulacja VICs, która ulega aktywacji w wyniku uszkodzenia zastawki, różnicuje się do miofibroblastów lub komórek o fenotypie osteoblastów charakteryzujących się ekspresją specyficznych markerów, takich jak α-aktyna dla miofibroblastów i fosfataza alkaliczna *(ang. alkaline phosphatase,* ALP), osteopontyna (*ang. osteopontin,* OSP), sialoproteina kości (*ang. integrin-binding sialoprotein,* IBSP), białka morfogenetyczne kości -2 i -4 (*ang. bone morphogenetic protein -2, -4;* BMP2/4) dla fibroblastów o fenotypie osteoblastycznym [22].

Aktywowane miofibroblasty wraz z komórkami T i makrofagami są w dużej mierze zaangażowane w przyspieszenie procesu zwłóknienia i zwapnienia, częściowo poprzez ich kluczową rolę w aktywacji prozapalnych cytokin, metaloproteinaz macierzy i białek biorących udział w odkładaniu wapnia w płatkach zastawki (np. OSP, osteokalcyna, BMP2/4, kostno-chondrogenny czynnik transkrypcyjny, osteoblastyczny czynnik transkrypcyjny Msx2) [23]. Mechanizmy, które przyczyniają się do zwiększonej kalcyfikacji płatków zastawki nie są do końca poznane, ale wydaje się, że nielaminarny przepływ krwi po stronie aortalnej zastawki, reaktywne formy tlenu (*ang. reactive oxygen species,* ROS) i prozapalne cytokiny mogą być kluczowymi inicjatorami wydzielania BMP2/4 ze śródbłonka zastawki [24, 25]. BMP2/4 mogą stymulować proces zwapnienia poprzez aktywację szlaków sygnalizacyjnych Smad1/5/8 i Wnt/β-katenina. Aktywacja Smad indukuje ekspresję głównego osteoblastycznego czynnika transkrypcyjnego, jakim jest Runx2 (*ang. runt-related transcription factor 2*), który zwiększa ekspresję białek bezpośrednio związanych z kalcyfikacją, takich jak OSP, IBSP, osteokalcyna [26, 27]. BMP2/4 stymulują również ekspresję czynnika transkrypcyjnego Msx2, istotnego dla wewnątrz-błonowej transformacji kostnej. Aktywacja ścieżki sygnałowej Wnt/β-katenina prowadzi do zwiększonej ekspresji ALP przyśpieszającej proces zwapnienia. Ponadto wiele cytokin prozapalnych, takich jak transformujący czynnik wzrostu β *(ang. transforming growth factor β,* TGF-β), interleukina-1 (*ang. interleukin-1,* IL-1), czynnik martwicy nowotworów α *(ang. tumor necrosis factor α,* TNF-α) oraz metalo-

proteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej-1, -3, -9 *(ang. matrix metalloproteinases,* MMP-1, -3, -9) może aktywować w/w szlaki sygnałowe, prowadząc do zwapnienia, a co za tym idzie, dysfunkcji płatków zastawki [28]. Wiadomo również, że zwapnienie zastawki aortalnej może być przyspieszone przez inne choroby współtowarzyszące, jak np. przewlekła choroba nerek [29], cukrzyca [30], niski poziom witaminy D [31], niskie stężenie wapnia w surowicy [32].

1.2 Białka krzepnięcia krwi w stenozie aortalnej

Liczne badania sugerują aktywną rolę białek krzepnięcia krwi w regulacji wczesnej miażdżycy i jej dalszego rozwoju [33-36]. Obecnie uważa się, że duża ekspresja czynników krzepnięcia w obrębie wczesnych zmian miażdżycowych oraz lokalne wytwarzanie trombiny, a tym samym fibryny, może stanowić główny ochronny mechanizm przed uszkodzeniem naczyń krwionośnych [33]. Jednak proces zapalny w obrębie ściany tętnicy, wspierany przez czynniki regulowane przez układ krzepnięcia, takie jak adhezja komórkowa, migracja oraz angiogeneza, może zwiększyć lokalną generację trombiny. Takie działanie może doprowadzić do pojawienia się białek krzepnięcia pochodzenia zarówno płytkowego, jak i makrofagowego, które zaangażowane są w produkcję cytokin prozapalnych, zwiększenie migracji monocytów do blaszki miażdżycowej oraz proliferację komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych, przyczyniając się tym samym do progresji choroby [33]. Ponadto fibrynoliza i produkty degradacji fibryny mogą upośledzać funkcje śródbłonka, a to z kolei prowadzi do zwiększenia przepuszczalności i migracji komórek śródbłonka. Produkty degradacji fibryny również zwiększają chemotaksję monocytów i stymulują je do produkcji IL-6 [34]. Dostępne dane wskazują, że w warunkach hemostazy komórki śródbłonka naczyniowego produkują zarówno, przeciwzakrzepowe jak i prozakrzepowe mediatory w celu zapewnienia prawidłowej hemostazy i zapobieganiu powstawania zakrzepu. Obserwacje te stanowią uzasadnienie dla hipotezy o istotnej roli zaburzonej hemostazy we wczesnych i zaawansowanych etapach AS. Jeżeli tak jest, to powinny istnieć kliniczne dowody na zwiększone ryzyko powikłań zakrzepowo-zatorowych u osób z AS, jak to zostało przekonywująco wykazane w przypadku CAD i miażdżycy innych tętnic. Otto i wsp. wykazali

zwiększone ryzyko zdarzeń sercowo-naczyniowych, w dużej mierze o etiologii zakrzepowo-zatorowej u pacjentów z AS [21, 37]. Incydenty te nie wydają się być związane wyłącznie z towarzyszącą miażdżycą lub innymi współistniejącymi chorobami, zwłaszcza migotaniem przedsionków.

Istnieje coraz więcej dowodów, że różne czynniki prozakrzepowe i/lub fibrynolityczne wykazują zwiększoną ekspresję w tkance zastawek uzyskanych od pacjentów z AS z lub bez jednocześnie klinicznie stwierdzonej miażdżycy. Ponadto liczne obserwacje wskazują na zależności między zapaleniem, a układem krzepnięcia w AS [15, 38-43]. Oba te procesy ściśle współdziałają w procesie powstawania AS. Zapalenie prowadzi do nasilenia krzepnięcia krwi, natomiast układ krzepnięcia istotnie moduluje odpowiedź zapalną, m.in. poprzez aktywację swoistych receptorów na monocytach oraz komórkach śródbłonka, co może wpływać na produkcję cytokin [44].

1.2.1 Czynnik tkankowy

Czynnik tkankowy (*ang. tissue factor*, TF) jest transbłonowym białkiem o masie 46-kDa, składającym się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o długości 263 aminokwasów, na który składa się zewnątrzkomórkowa 219-aminokwasowa N-terminalna część, transbłonowa 23-aminokwasowa część, oraz wewnątrzkomórkowa 21-aminokwasowa C-terminalna część [45, 46]. Istnieją dwie izoformy TF: „pełnej długości" (fl)TF (*ang. full lenght tissue factor*), który stanowi integralne białko błonowe oraz alternatywnie składany (as)TF (*ang. alternatively spliced tissue factor*), który nie posiada domeny transbłonowej i może być wydzielany w postaci rozpuszczalnej. (as)TF może wykazywać pewną aktywność prozakrzepową w przypadku obecności fosfolipidów [47], jednak doniesienia na temat rzeczywistej roli (as)TF w krzepnięciu krwi u ludzi są sprzeczne [48, 49]. (fl)TF ulega konstytutywnej ekspresji m.in. w komórkach mięśni gładkich ściany naczyń krwionośnych oraz fibroblastach [50]. Sugerowano, że TF, który został zidentyfikowany w blaszkach miażdżycowych, może odgrywać znaczącą rolę w rozwoju chorób sercowo-naczyniowych i powikłaniach zakrzepowo-zatorowych [51]. Postulowano, że komórki śródbłonka mogą produkować TF *in vitro* pod wpływem silnej stymulacji cytokinami [52]; mimo to nadal nie ma bezpośrednich

dowodów na ekspresję TF przez komórki śródbłonka u pacjentów z chorobami sercowo-naczyniowymi [53]. Osterud i wsp. wykazał, że jedynymi komórkami krwi, które są zdolne do syntezy TF są monocyty [53]. Innym źródłem TF pochodzącego z komórek krwi są mikrocząstki uwalniane przez komórki wykazujące ekspresję TF [54, 55]. Po ekspozycji na przepływającą krew, TF wiąże się z czynnikiem VIIa. Kompleks TF-czynnik VIIa katalizuje przemianę czynnika X do Xa, który tworzy kompleks protrombinazy razem z czynnikiem Va, protrombiną oraz jonami wapnia, generując tym samym trombinę oraz aktywując czynnik XIII, stabilizujacy powstającą fibrynę. Aktywność TF jest regulowana przez jego fizjologiczny inhibitor, inhibitor zależnej od TF drogi krzepnięcia (*ang. tissue factor pathway inhibitor*, TFPI), który nie tylko powoduje zahamowanie katalitycznego kompleksu czynnika VIIa/TF, ale również bezpośrednio hamuje czynnik Xa [56]. Ekspresja TF wewnątrz płatków zastawki aortalnej została po raz pierwszy odnotowana w króliczym modelu AS [38]. Antygen TF został zidentyfikowany w obrębie stenotycznych zmian po aortalnej stronie zastawki aortalnej, gdzie procent obszaru ekspresji TF był prawie trzykrotnie wyższy w porównaniu z grupą kontrolną i wynosił 20 ± 3% [38]. Ekspresji TF towarzyszyła również duża infiltracja makrofagów w obrębie zwężonej zastawki [38].

W 2009 roku zidentyfikowano TF w zwężonych zastawkach aortalnych pacjentów z zaawansowaną AS bez klinicznie stwierdzonej miażdżycy lub CAD [15]. Procent obszarów pozytywnych dla TF u pacjentów z AS był podobny do tego obserwowanego na modelu zwierzęcym (odpowiednio 20 ± 3% vs 24.6 ± 6.93%) [38]. U ludzi, podobnie jak i u królików, TF był obecny głównie w miejscach bogatych w makrofagi, co może sugerować, że makrofagi odgrywają istotną rolę w lokalnej syntezie TF w AS, oraz że ekspresja TF jest ściśle powiązana z zapaleniem w obrębie zwężonych płatków zastawki aortalnej. Jednak ekspresja TF była również obserwowana w obszarach płatków, gdzie liczba makrofagów była niewielka lub były nawet nieobecne [15]. Sugerowano, że w takich rejonach TF może ulegać ekspresji na powierzchni miofibroblastów, o czym świadczy nadmierna ekspresja enzymów katabolicznych: metaloproteinaz i katepsyn, co zostało zaobserwowane zarówno w zastawkach ludzkich [57] jak i króliczych [38].

Wykazano, że zaawansowanie AS jest związane ze zwiększoną ekspresją TF w obrębie zwapniałych zastawek aortalnych. U pacjentów z AS z wysokim gradientem

przezzastawkowym zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy procentową powierzchnią ekspresji TF w zastawce a maksymalnym oraz średnim gradientem przezzastawkowym, co może sugerować, że zaburzenia hemodynamiki tej wady zastawkowej wzmagają ekspresję TF w stenotycznych płatkach zastawki [15]. Co więcej, stwierdzono dodatnią korelację między obszarami ekspresji TF oraz cholesterolu LDL (*ang. low-density lipoprotein*), co dodatkowo wspiera hipotezę, że hipercholesterolemia przez stymulację powstawania komórek piankowych w płatkach zastawki aortalnej i w zmianach miażdżycowych, zwiększa ekspresję TF na powierzchni makrofagów [15]. Stwierdzono także, że obecność TF jest powiązana nie tylko z naciekiem komórek zapalnych, ale również z obszarem zwapnień w zwężonych zastawkach aortalnych [15, 39]. Największą ekspresję TF stwierdzono w silnie zwapniałych fragmentach zastawki aortalnej w powiązaniu z wysoką aktywnością ALP [58] oraz markerem transformacji miofibroblastów Runx2 [59], który jest niezbędny do mineralizacji tkanki. Dodatkowo wykazano ekspresję osteopontyny, fosforylowanej glikoproteiny niekolagenowej, występującej m.in. w kościach. Osteopontyna wykazuje silne działanie hamujące procesy zwapnienia [60]. Jej ekspresję zidentyfikowano w zwapniałych zastawkach aortalnych, gdzie występowała razem z TF oraz depozytami wapnia [39, 60]. Badania *in vitro* i *in vivo* wykazały, że TF zwiększa wytwarzanie czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (*ang. vascular endothelial growth factor*, VEGF), a tym samym indukuje angiogenezę [61]. Wytworzenie nowych naczyń krwionośnych w tkance zastawki umożliwia trwałe połączenie układu krążenia ze zwapniałą zastawką aortalną, zwiększając wynaczynienie leukocytów i erytrocytów. Nowopowstałe naczynia ułatwiają również dostęp do warstwy włóknistej zastawki dla szeregu mediatorów zaangażowanych w degenerację tkanki. Breyne i wsp. [39] wykazali, że w zwężonych zastawkach aortalnych formowanie się nowych naczyń krwionośnych związane jest z ekspresją VEGF, który ulegał większej ekspresji w obszarach zwapniałych. Ponadto zastawkowa ekspresja TF oraz VEGF były ze sobą skorelowane, co sugeruje kluczowe zaangażowanie TF w neowaskularyzację w obrębie zwężonych zastawek aortalnych [39].

Dalsze badania pokazały, że aktywacja układu krzepnięcia w zastawce na drodze TF hamowana jest poprzez znaczną ekspresję TFPI, silnego inhibitora czynnika Xa, w obrębie płatków zastawki pacjentów z AS [39, 62]. Wykazano również, że TFPI wy-

stępuje w tych samych obszarach zwapniałej zastawki aortalnej, co TF i protrombina [62]. Z kolei Breyne i wsp. [39] stwierdzili znaczną ekspresję TFPI w obrębie zastawek aortalnych u pacjentów z AS, co sugeruje większy stosunek TF/TFPI w regionach zwapniałych i wskazuje na lokalny nadmiar TF [39].

Łuszczak i wsp. [63] wykazali, że u niektórych pacjentów z zaawansowaną AS obserwuje się osoczową aktywność TF (0,4-3,4 pmol/l), mierzoną za pomocą testu krzepnięcia w osoczu. Pacjenci, którzy wykazywali osoczową aktywność TF (34,2% wszystkich chorych) mieli wyższy maksymalny i średni gradient przezzastawkowy w porównaniu z osobami bez takiej aktywności [63]. Ponadto pacjenci z AS, z wykrywalnym poziomem aktywnego TF, mieli większą generację trombiny, niż pozostała cześć badanych [63]. Te intrygujące obserwacje sugerują, że zaawansowaną AS, podobnie jak ostre zespoły wieńcowe i stabilne CAD [64], charakteryzuje stan pozakrzepowy z niewielką ilością aktywnego TF w krążącej krwi, co zwiększa ryzyko powikłań zakrzepowo-zatorowych. Stan zwiększonej krzepliwości jest związany ze stanem zapalnym [65], dlatego można podejrzewać, że ogólnoustrojowy stan zapalny odzwierciedlony przez zwiększone stężenie białka C reaktywnego (*ang. C-reactive protein,* CRP) promuje lokalną ekspresję TF. Pomimo braku związku pomiędzy zastawkową ekspresją TF a poziomem CRP w osoczu, u pacjentów z AS [15], u których poziom CRP wynosił powyżej 3 mg/l, taką zależność wykazano zarówno dla zastawkowego TF, jak i osoczowego TF.

Dostępne dane wskazują, że TF prawdopodobnie odgrywa rolę w zwapnieniu i mineralizacji płatków zastawki aortalnej, co przyczynia się do progresji i zaawansowania AS. Zaburzona równowaga pomiędzy TF i TFPI może wpływać na homeostazę TF w zastawce aortalnej. Jednak niejasne jest, czy ekspresja TF może aktywnie inicjować proces krzepnięcia i późniejszą lokalną generację trombiny wewnątrz płatków aortalnych i prowadzić do powstania fibryny.

1.2.2 Protrombina i trombina

Trombina jest wielofunkcyjną proteazą serynową powstającą w miejscu uszkodzenia naczynia. Trombina przekształca fibrynogen w fibrynę, aktywuje płytki krwi

i wywołuje silny efekt na różnorodne typy komórek, wliczając komórki śródbłonka, komórki mięśni gładkich naczyń, monocyty, limfocyty T i fibroblasty [66]. Trombina jest generowana po ekspozycji TF w obecności aktywowanego czynnika VIII oraz czynnika X. Kompleks protrombinazy składający się z czynnika Xa, czynnika Va oraz jonów wapnia przekształca protrombinę w trombinę. Trombina również aktywuje białko C (*ang. activated protein C,* APC), naturalny antykoagulant, który hamuje dalszą jej generację. Kluczową cząsteczką regulującą aktywność trombiny jest antytrombina, glikoproteina osoczowa syntetyzowana głównie w wątrobie [67]. Szereg działań mediowanych przez trombinę, które mogą brać udział w progresji AS może również obejmować zaburzenia czynności śródbłonka [68], aktywację płytek krwi, komórek śródbłonka, makrofagów i komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych [66], zwiększenie migracji leukocytów [69] oraz angiogenezę [70].

Przeprowadzone badania wykazały ekspresję protrombiny na poziomie tak samo białka [62], jak i mRNA [41] w zastawce aortalnej u pacjentów z AS, co sugeruję, że trombina może być tworzona lokalnie. Warto zauważyć, że protrombina występowała głównie razem z TF i TFPI, jednak niektóre obszary pozytywne dla protrombiny znajdowały się w regionach bez ekspresji TF. Dodatkowo protrombina obecna w obrębie zwapniałej zastawki aortalnej korelowała dodatnio z ekspresją TF [62]. Zaobserwowano także korelację między ekspresją protrombiny a maksymalnym i średnim gradientem przezzastawkowym, które są markerami nasilenia AS [62].

Zastawkowa ekspresja trombiny była również obserwowana w zwężonych ludzkich zastawkach aortalnych, głównie po stronie aortalnej płatków [39]. Ekspresja trombiny pokrywała się z obszarami ekspresji TF oraz OSP [39]. Ponadto α-trombina istotnie korelowała z poziomem TF oraz wskaźnikiem TF/TFPI w zwapniałych zastawkach aortalnych [39]. Wykazano, że OSP ulega proteolizie przez α-trombinę, uwalniając N-terminalny fragment OSP, który bierze udział w zapaleniu [39]. Ponieważ ekspresja trombiny wykazywała korelację z OSP, można spekulować, że trombina przyczynia się do zwiększenia reakcji zapalnej w obrębie zwężonych zastawek serca [39]. Co ciekawe, Al-Jallad i wsp. [71] wykazali, że stymulacja trombiną mysich fibroblastów może istotnie zwiększyć ich transformację w osteoblasty. Podobny proces może odbywać się w zwężonych zastawkach aortalnych.

U pacjentów z AS wykazano, że systemowa generacja trombiny, która jest odzwierciedlona poprzez podwyższony poziom fragmentów 1+2 protrombiny (F1+2), wiąże się z obszarami zastawek pozytywnymi dla fibryny [40]. Sugeruje się, że zwiększony stres ścinający, generowany poprzez zwężoną zastawkę, powoduje powstanie stanu prozakrzepowego, czego odzwierciedleniem jest podwyższony poziom generacji trombiny i aktywacji płytek krwi [72]. Taki stan może dodatkowo powodować progresję AS. W oparciu o dostępne dane, uważa się, że trombina i protrombina są zaangażowane w rozwój/progresję AS, choć dokładny wkład pozostaje do ustalenia.

1.2.3 Fibrynogen i fibryna

Fibrynogen, rozpuszczalny prekursor fibryny, jest wielofunkcyjną glikoproteiną, złożoną z 2 kopii każdego z 3 łańcuchów polipeptydowych, $(A\alpha B\beta\gamma)_2$ [73]. Fibrynogen jest białkiem ostrej fazy produkowanym w wątrobie [74]. Tworzenie fibryny jest inicjowane przez ograniczoną proteolizę fibrynogenu przez trombinę. Fibrynogen jest przekształcany w fibrynę przez uwolnienie dwóch fibrynopeptydów A (16 reszt) oraz dwóch fibrynopeptydów B (14 reszt) z łańcuchów Aα oraz Bβ [75]. Fibryna jest końcowym produktem krzepnięcia krwi, który prowadzi do powstania zakrzepu stosunkowo opornego na degradację mechaniczną i enzymatyczną [75, 76].

Obecność fibryny wykazano w blaszkach miażdżycowych, gdzie może mieć istotny wpływ na ich rozwój [77]. Fibrynę wykazano również w dużych ilościach w obrębie i na powierzchni zastawek aortalnych u pacjentów z AS, bez klinicznie potwierdzonej miażdżycy [40]. Dwie trzecie powierzchni pozytywnej dla fibryny pokrywało się z powierzchnią pozytywną dla TF, co sugeruje, że przekształcenie fibrynogenu w fibrynę może nastąpić w obrębie płatków zastawki [40]. Obszary pozytywne dla fibryny w obrębie płatków zastawki korelowały dodatnio z maksymalnym i średnim gradientem przezzaztawkowym u pacjentów z ciężką AS bez CAD, co wskazuje, że wysoki gradient u pacjentów z AS może wywołać stan prozakrzepowy [30]. Biorąc pod uwagę brak związku między stężeniem fibrynogenu w osoczu a powierzchnią pozytywną dla fibryny, lub grubością warstwy fibryny w obrębie zwężonej zastawki aortalnej u pacjentów z AS [40] można stwierdzić, że nagromadzenie fibryny w obrębie płatków

zwapniałej zastawki aortalnej jest raczej konsekwencją złożonego procesu krzepnięcia na powierzchni lub wewnątrz tkanki płatków.

Istnieje wiele czynników mogących zmieniać właściwości skrzepu, m.in. zwiększone zapalenie lub podniesiona produkcja trombiny [78, 79]. Wiadomo, że gęste skrzepy fibrynowe składające się z cienkich włókien są stosunkowo odporne na lizę [80]. Mimo to nie udało się wykazać, że tworzenie bardziej zbitych skrzepów z osocza *ex vivo* predysponuje do nagromadzenia się fibryny w zastawkach AS [40]. Warto zauważyć, że czas tworzenia się skrzepów fibryny *ex vivo* składających się z cienkich włókien wykazywał korelację z wielkością depozytów fibryny w zwapniałych zastawkach. Co ciekawe, im grubsze były włókna fibryny w tworzonych skrzepach, tym grubsza była warstwa fibryny po aortalnej stronie zastawek pozyskanych od pacjentów z AS [40]. To sugeruje, że zmodyfikowane powstawanie struktury fibryny i tworzenie się skrzepu może przyczynić się do akumulacji fibryny w zwapniałych zastawkach niezależnie od poziomu fibrynogenu w osoczu. Prawdopodobny mechanizm łączący akumulację fibryny z progresją AS może obejmować dodatkowy wkład do całkowitej masy ECM, która przez wzrost objętości zastawki promuje lokalne unieruchomienie monocytów oraz wspiera miejscową proliferację i migrację komórek zapalnych.

Można przypuszczać, że układ krzepnięcia krwi, a w szczególności generacja fibryny, przyczynia się do rozwoju i progresji AS, w sposób podobny do tego jaki obserwuje się w blaszce miażdżycowej.

1.2.4 Czynnik XIII

Czynnik (F)XIII jest tetramerem, składającym się z dwóch podjednostek A i dwóch podjednostek B. Podjednostka A zawiera miejsce aktywne enzymu, natomiast podjednostka B zapewnia ochronę hydrofobowych podjednostek A we krwi. Aktywacja FXIII obejmuje proteolityczne odcięcie przez trombinę 37 reszt od podjednostki A, a następnie przy udziale jonów wapnia oddysocjowanie podjednostki B, tworząc aktywny enzym (FXIIIa) [81]. FXIIIa jest transglutaminazą, która katalizuje tworzenie się wiązań kowalencyjnych pomiędzy łańcuchami γ-γ i łańcuchami α-α, stabilizując protofibryle i późniejszą strukturę skrzepu [81]. FXIII wiąże się do regionu α-C fibrynogenu

[82]. FXIIIa również włącza antyplazminę w strukturę skrzepu, która w dużej mierze przyczynia się do odporności skrzepu na lizę [83]. Wiadomo jest, że FXIIIa jest obecny w cytoplazmie monocytów/makrofagów [84]. W 2012 roku wykazano ekspresję FXIIIa, głównie po aortalnej stronie zastawki stenotycznej, podobnie jak w przypadku fibryny. Obserwacje te odnotowano u pacjentów z umiarkowaną lub ciężką AS, bez klinicznie stwierdzonej miażdżycy naczyń wieńcowych [41]. Analiza mRNA dla genu *F13A* pokazała jego zwiększoną ekspresję w zastawkach, co dodatnio korelowało z obecnością FXIII i fibryny [41]. FXIII był głównie obecny w makrofagach CD163-pozytywnych (alternatywnie aktywowanych), co sugeruje, że te komórki są głównym źródłem FXIII w obrębie zwapniałych zastawek [41]. Hipotezę tę popiera obserwacja, że poziom *F13A* mRNA korelował z naciekiem makrofagów w obrębie zwężonej zastawki. Prawdopodobne jest, że FXIII-A jest uwalniany z alternatywnie aktywowanych makrofagów w środowisku prozapalnym, a tym samym zwiększa osadzanie się fibryny w zwężonych zastawkach aortalnych. Ponadto FXIII-A może regulować osadzanie się ECM poprzez aktywność transglutaminazy 2, która odgrywa również rolę w różnicowaniu osteoblastów [85], a zatem może przyczyniać się do zwapnienia zastawki. Co ciekawe, zaobserwowano również zwiększoną aktywność FXIII w osoczu pacjentów z AS, bez klinicznie stwierdzonej miażdżycy [41]. Ponadto, podwyższona aktywność FXIII w osoczu u pacjentów z AS była związana z większą ilością fibryny na zastawkach [41], co potwierdza hipotezę, że ogólnoustrojowa i lokalna aktywność FXIII może wpływać na rozwój AS [41].

1.2.5 Fibrynoliza

Aktywatory plazminogenu: tkankowy aktywator plazminogenu (*ang. tissue plasminogen activator*, t-PA) oraz aktywator plazminogenu typu urokinazy (*ang. urokinase-type plasminogen activator*, u-PA) konwertują plazminogen w plazminę, kluczowy enzym biorący udział w fibrynolizie [86]. Krążący w osoczu t-PA, pochodzący głównie z komórek śródbłonka, bierze udział w wewnątrznaczyniowej aktywacji plazminogenu i jego aktywność jest regulowana przez obecność fibryny [86]. Natomiast u-PA, który wydzielany jest przez różne komórki, wiąże się ze swoim specyficznym receptorem

komórkowym u-PAR i odpowiedzialny jest za generację plazminogenu na powierzchni komórek [87]. Zdolność do generowania plazminogenu przez t-PA i u-PA jest kontrolowana przez inhibitor aktywatora plazminogenu 1 (*ang. plasminogen activator inhibitor*, PAI-1), który hamuje wewnątrznaczyniową fibrynolizę [88]. Wśród wszystkich składników układu fibrynolizy, PAI-1 ma kluczowe znaczenie w patofizjologii chorób układu krążenia [88]. W 2013 roku, Natorska i wsp. pokazali zaburzenia fibrynolizy mierzone w osoczu pacjentów z AS [89], co sugeruje rolę systemowej hipofibrynolizy w progresji AS. Wykazano także, że u pacjentów z AS czas lizy skrzepu był dodatnio skorelowany z grubością płatka zastawki aortalnej, stopniem zwapnienia zastawki oraz zastawkową ekspresją fibryny i PAI-1 [89]. Wysunięto hipotezę, że osoby o mniejszej wydajności lizy, ze względu na różne genetyczne lub/i nabyte czynniki są bardziej narażone na rozwinięcie zaawansowanej postaci AS. U pacjentów z AS wydłużony czas lizy był skorelowany ze zwiększoną warstwą fibryny w obrębie zastawki aortalnej oraz większymi złogami wapnia [89], co wskazuje na związek pomiędzy wydajnością całkowitej lizy w krwi krążącej i składem zwapniałej zastawki aortalnej. Zaobserwowano jednocześnie korelację pomiędzy hipofibrynolizą, gradientami przezzastawkowymi i powierzchnią zastawki aortalnej.

Ostatnio Kochtebane i wsp. [43] pokazali, że 69% ludzi z AS ma podwyższony poziom PAI-1. Zauważyli oni, że komórki hodowane ze zwapniałych zastawek uwalniają u-PA, t-PA oraz PAI-1 po umieszczeniu w pożywce, po 24 godz. inkubacji. Ponadto t-PA i PAI-1 były silnie ze sobą skorelowane [43]. Zaobserwowano również, że komórki tuczne stanowią dodatkowe źródło PAI-1 w zwapniałych zastawkach aortalnych [90]. Wiadomo, że w przewlekłym zapaleniu profibrynolityczne, przeciwzakrzepowe komórki tuczne, które wytwarzają aktywne t-PA, zmieniają się w antyfibrynolityczny, prozakrzepowy fenotyp, który charakteryzuje się wydzielaniem PAI-1 [91]. Można wnioskować, że komórki tuczne są zaangażowane w lokalnie osłabioną fibrynolizę, odkładanie fibryny i kolagenu, a tym samym w progresję AS. Hipoteza ta jest zgodna z obserwacją dotyczącą obecności niewielkich ilości t-PA w obrębie zwężonej zastawki aortalnej [89, 43].

Podsumowując, wydaje się, że wysoki poziom ekspresji PAI-1 w obrębie zastawki stenotycznej jest związany zarówno ze zwapnieniem zastawki, jak i z postępują-

cym zapaleniem w obrębie zastawki. Pozostaje do ustalenia, w jakim zakresie lokalnie, a w jakim ustrojowo, mechanizmy hipofibrynolizy mogą uczestniczyć w powstawaniu AS i czy modulacja fibrynolizy może mieć wpływ na progresję AS.

1.2.6 Czynnik von Willebranda

Czynnik von Willebranda (*ang. von Willebrand factor*, vWF) jest multimeryczną glikoproteiną osocza, syntetyzowaną w komórkach śródbłonka [92] oraz megakariocytach [93]. Pierwotny produkt translacji zbudowany jest z 2813 aminokwasów o masie cząsteczkowej 250 kDa, a następnie przechodzi proces dimeryzacji i multimeryzacji do dużych form vWF o masie >20 000 kDa [94]. vWF, który ulega ekspresji w komórkach śródbłonka, megakariocytach i płytkach krwi jest niezbędny do adhezji płytek do śródbłonka, interakcji pomiędzy płytkami, jak również agregacji płytek krwi przy zwiększonych naprężeniach ścinających. Największe multimery (*ang. high molecular weight multimers*, HMWM) vWF są najbardziej skuteczne w hemostazie zależnej od płytek [95].

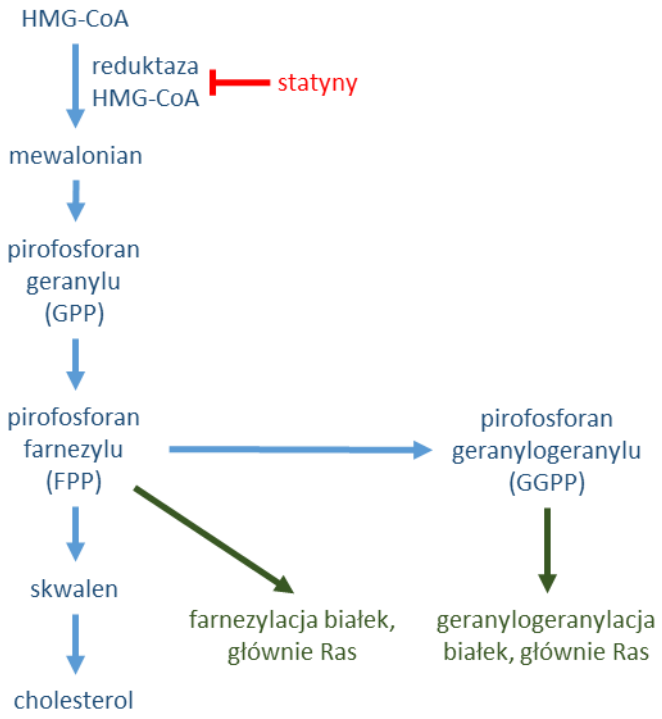
Liczne badania wykazały, że skłonność do krwawień, w większości z błon śluzowych i przewodu pokarmowego (zespół Heyde'a) jest obserwowany u ok. 20% pacjentów z ciężką AS [96]. Podstawą związku między AS i skłonnościami do krwawień jest nabyty zespół von Willebranda, typu 2A, charakteryzujący się zmniejszoną ilością HMWM vWF, co wynika ze zwiększonej proteolizy multimetrów vWF [97]. U pacjentów z AS, zmieniony przepływ krwi i siły ścinające generowane w miejscu zwężenia zastawki zmieniają strukturę cząsteczki vWF, prowadząc do ekspozycji wiązania pomiędzy Tyr842 i Met843, które jest wrażliwe na działanie specyficznej metaloproteinazy ADAMTS13 (*ang. a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13*) [98]. Chirurgiczna korekcja zastawki u pacjenta z AS normalizuje rozkład HMWM vWF [96]. Jednak nie wszystkie epizody krwawienia, które normalizują się po wymianie zastawki aortalnej są związane z obniżoną ilością HMWM vWF w krążącej krwi [99]. Natorska i wsp. [100] pokazali, że u pacjentów z AS znaczący spadek HMWM oraz zwiększona proteoliza multimetrów vWF były związane ze zwiększeniem gradientu przezzastawkowego i zmniejszeniem ilości dużych multime-

trów vWF, któremu towarzyszył wzrost generacji trombiny i aktywacji płytek. Co ciekawe, pacjenci z AS z niskim odsetkiem HMWM mieli podwyższone stężenia markerów generacji trombiny i markerów aktywacji płytek m.in. tromboglobulinę i rozpuszczalny ligand CD40 [100]. Można sugerować, że zwiększona aktywacja krzepnięcia wraz z ułatwioną interakcją płytek z komórkami śródbłonka w pewnym stopniu kompensuje niedobór HMWM i zmniejszać ryzyko krwawienia pacjentów z AS. Ostatnio zaobserwowano lokalną ekspresję vWF w świńskich zastawkach aortalnych [42]. Ponadto, świńskie komórki endotelialne zastawki aortalnej stymulowane histaminą uwalniały vWF i ADAMTS13 do medium hodowlanego [42]. Dodatkowo, vWF znacząco zwiększył powstawanie jąder kalcyfikacji przez VICs oraz samą kalcyfikację [42]. Akumulacja tych dwóch białek w obrębie warstwy podśródbłonkowej zastawki może przyczyniać się do rozwoju i progresji AS.

1.3 Statyny

Statyny to grupa związków biologicznie czynnych o aktywności inhibitorów reduktazy 3-hydroksy-3-metylo-glutarylokoenzymu A (HMG-CoA), która katalizuje redukcję 3-hydroksy-3-metylo-glutarylo-CoA do kwasu mewalonowego [101]. Zahamowanie produkcji kwasu mewalonowego skutkuje zahamowaniem syntezy poszczególnych związków w szlaku biosyntezy cholesterolu, m.in. pochodnych pirofosforanowych związanych z prenylacją białek. Odkrycia pierwszego związku z tej grupy, mewastatyny, wyizolowanej z pleśni *Penicillium citrinum,* dokonali japońscy naukowcy Akiro Endo i Masudo Kuroda w 1976 roku [102]. Statyny obejmują związki lipofilowe (atorwastatyna, simwastatyna oraz fluwastatyna) jak i hydrofilowe (rozuwastatyna oraz prawastatyna), które są powszechnie stosowane od 1987 roku w celu zmniejszenia stężenia cholesterolu we krwi. Statyny, będące strukturalnymi analogami HMG-CoA, w sposób kompetycyjny i odwracalny hamują reduktazę HMG-CoA (Rycina 1). Bezpośrednim skutkiem działania statyn jest nasilenie transkrypcji genu kodującego receptor cholesterolu LDL na powierzchni hepatocytów, co skutkuje zwiększonym wychwytem cząsteczek LDL z krwi. W rezultacie dochodzi do zmniejszenia stężenia cholesterolu LDL o 18-60% i triglicerydów o 10-30% oraz niewielkiego zwiększenia cholesterolu

HDL (*ang. high density lipoprotein*) o ok. 8%. Dane z badań klinicznych i doświadczalnych nad statynami wskazują na wiele dodatkowych korzyści wykraczających poza efekt zmniejszenia stężenia cholesterolu. Stwierdzono, że statyny działają na układ krążenia przez 1) poprawę funkcji śródbłonka [103], 2) stabilizację blaszki miażdżycowej [104, 105], 3) hamowanie układu krzepnięcia i stymulację fibrynolizy [106-108], 4) hamowanie reakcji zapalnej [109], 5) immunomodulację [110], 6) hamowanie proliferacji komórek mięśni gładkich [111] oraz 7) hamowanie przerostu mięśnia sercowego [112].



Rycina 1. Szlak syntezy cholesterolu z uwzględnieniem miejsca działania statyn.

Obecnie dominuje pogląd, że zmniejszenie prenylacji białek jest głównym mechanizmem występowania efektów plejotropowych statyn. Prenylacja wpływa na funkcję białek przez zmianę ich lipofilności, konformacji i/lub rozmieszczenia w komórce. W prenylacji białek uczestniczy pirofosforan farnezylu (*ang. farnesyl pyrophosphate*, FPP) oraz pirofosforan geranylogeranylu (*ang. geranylgeranylpyrophosphate*, GGPP). Oba te związki należą do izoprenoidów, czyli niesteroidowych grup lipidowych, które umożliwiają zakotwiczenie białek sygnałowych w błonie komórkowej [113]. Izopreny-

lacja dotyczy głównie białek sygnałowych o aktywności GTPazy, należących do nadrodziny białek Ras, Rho, Rac, Rab oraz CdC42. Białka te są odpowiedzialne głównie za procesy rearanżacji cytoszkieletu, proliferację, ekspresję molekuł adhezyjnych, uwalnianie cytokin i ekspresję genów m.in. IL-1β, IL-6 oraz IL-8 [114].

1.3.1 Przeciwzapalne działanie statyn

Liczne badania eksperymentalne od ponad 10 lat wskazują na efekty przeciwzapalne statyn, głównie związane z zahamowaniem prenylacji białek Rho, Rac oraz Ras. Jednym z podstawowych markerów klinicznych wykorzystywanych do oceny toczącego się procesu zapalnego jest CRP. Jest to białko ostrej fazy wytwarzane głównie w wątrobie w odpowiedzi na prozapalne cytokiny m.in. IL-6 [115].

U pacjentów z miażdżycą lub o dużym ryzyku incydentów sercowo-naczyniowych statyny zmniejszają nieznacznie stężenie CRP we krwi. Opublikowane w 1999 roku wyniki badania klinicznego CARE (Cholesterol and Recurrent Events) pokazały, że leczenie prawastatyną powoduje zmniejszenie stężenia CRP, niezależne od stężenia cholesterolu całkowitego i cholesterolu LDL [116]. W 2001 roku opublikowano wyniki kolejnego badania klinicznego PRINCE (Pravastatin Inflammation/CRP Evaluation), w którym podawano prawastatynę osobom zdrowym oraz z CAD. W obu grupach stwierdzono, że 24-tygodniowa terapia prawastatyną jest w stanie obniżyć poziom CRP o ok. 13% [117]. W badaniu JUPITER (Justification for the Use of statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluatin Rosuvastatin) stosowano rozuwastatynę w dawce 20 mg u osób zdrowych bez hiperlipidemii i ze zwiększonym stężeniem CRP w surowicy. W grupie przyjmującej statynę stwierdzono zmniejszenie stężenia CRP w surowicy o ok. 37% [118]. U pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym wykazano, że simwastatyna jest w stanie zmniejszyć poziom CRP oraz IL-6 w surowicy [119]. Wydaje się, że zmniejszenie poziomu CRP może mieć związek z fosforylacją białka STAT3 (*ang. signal transducer and activator of transcription 3*), które odpowiedzialne jest za transdukcje sygnału podczas prozapalnej stymulacji IL6 [120].

W badaniach *in vitro* przeprowadzonych na komórkach śródbłonka stymulowanych LPS stwierdzono, że statyny hamują ekspresję cytokin prozapalnych, takich jak:

IL-1, IL-6 oraz IL-8. Kolejne doświadczenia na kokulturze komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych oraz komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej pokazały, że różne statyny: simwastatyna, atorwastatyna, fluwastatyna oraz prawastatyna są w stanie zahamować produkcję IL-6 podczas stymulacji LPS [121].

Statyny oddziałują również na receptory aktywowane proliferatorami peroksysomów (*ang. peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR*). Receptory te znajdują się na terenie jądra komórkowego i wpływają na ekspresją wielu genów [122], głównie zaangażowanych w odpowiedź komórki na stan zapalny m.in. aktywację i proliferację limfocytów T oraz produkcję IL-2 [123, 124]. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że działanie statynami powoduje pobudzenie receptora PPAR-γ w makrofagach i monocytach, co w efekcie powoduje zmniejszenie produkcji TNF-α oraz czynnika transkrypcyjnego NF-κB (*ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) [125, 126]. Statyny mogą również wiązać się z integryną LFA (*ang. lymphocyte function-associated antigen*) na powierzchni limfocytów T, osłabiając ich reaktywność i zmniejszając odczyn zapalny. Takie działanie jest niezależne od receptorów PPAR [127].

Badania przeprowadzone przy użyciu modeli zwierzęcych potwierdziły też przeciwzapalne działanie statyn. Prawastatyna stosowana w szczurzym modelu zapalenia naczyń wieńcowych zmniejszała istotnie infiltrację i proliferacje monocytów/makrofagów, jak również ekspresję białka chemotaktycznego monocytów typu 1 (*ang. monocyte chemotactic protein 1,* MCP-1) [128]. W kolejnych doświadczeniach stwierdzono, że stosowanie simwastatyny zmniejszało adhezję, toczenie się i transmigrację leukocytów [129]. Dodatkowo simawastatyna wpływała na ekspresję białek adhezyjnych produkowanych przez śródbłonek naczyń krwionośnych [130] oraz ekspresję CD11b przez monocyty [131].

1.3.2 Przeciwzakrzepowe działanie statyn

1.3.2.1 Czynnik tkankowy

Colli i wsp. [132] stwierdzili, że simwastatyna i fluwastatyna zmniejszają ekspresję mRNA dla genu *F3* jak i aktywność TF w hodowlach monocytów/makrofagów. Efekt ten był ściśle zależny od inhibicji NF-κB i był odwracalny podczas inkubacji z mewalonianem lub GGPP [132]. Kolejne doświadczenia z udziałem atorwastatyny, simwastatyny, prawastatyny, lowastatyny oraz fluwastatyny potwierdziły efekt inhibicji NF-κB przez zahamowanie szlaku kinaz RhoA/ROCK regulujących aktywność NF-κB na zmniejszenie ekspresji TF [133]. Simwastatyna zmniejszała również ekspresję TF na powierzchni komórek śródbłonka oraz mięśni gładkich aorty, a podanie mewalonianu znosiło ten efekt [134, 135]. Banfi i wsp. [136] dodatkowo zaobserwowali, że inhibicja szlaku kinaz Rho/ROCK tylko częściowo odpowiada za redukcję ekspresji TF przez komórki śródbłonka podczas stymulacji trombiną, która zwiększa ekspresję TF poprzez aktywację receptorów PAR (*ang. protease activated receptors*), głównie PAR1. Receptory PAR zostały odkryte w 1991 przez Coughlin i wsp. [137]. Obecnie zidentyfikowano cztery rodzaje receptorów PAR (PAR1-4) należących do grupy receptorów 7-transbłonowych sprzężonych z białkiem G. Receptory te posiadają 3 domeny: N-terminalną, która jest na zewnątrz komórki, domenę centralną 7-krotnie przechodzącą przez błonę komórkowa i domenę C-terminalną znajdującą się wewnątrz komórki [138]. Dużą ekspresję receptorów PAR wykazują płytki krwi, komórki śródbłonka naczyń krwionośnych, monocyty, limfocyty T, fibroblasty, komórki mięśni gładkich, neurony oraz niektóre linie komórek nowotworowych [139]. Cechą charakterystyczną receptorów PAR jest posiadanie swojego własnego ligandu, który po proteolizie wiąże się nieodwracalnie ze środkową zewnątrzkomórkową pętlą tego samego receptora. To połączenie powoduje aktywację receptora i uruchomienie szlaków przekazywania sygnałów [140].

Trombina aktywuje zarówno receptor PAR1, jak i PAR3 i PAR4, natomiast PAR2 jest aktywowany przez kompleks TF/FVIIa i FXa [139]. Simwastatyna oraz rozuwastatyna hamują efekt aktywacji receptora PAR1 poprzez inhibicję fosforylacji kinazy ERK1/2 (*ang. extracellular-signal-regulated kinase 1/2*, ERK1/2), co powoduje

zmianę ułożenia PAR1 w błonie komórkowej. Mechanizm ten jest niezależny od izoprenoidów, ale może być zależny od stężenia cholesterolu w błonie komórkowej [136]. W modelu mysim miażdżycy, z wyłączonym genem apolipoproteiny E, zaobserwowano obniżenie poziomu TF wraz z zmniejszeniem odczynu zapalnego, ale bez zmiany stężenia cholesterolu [141, 142]. U pacjentów stosujących przez 4-6 miesięcy atorwastatynę zaobserwowano zmniejszenie o 29% poziomu antygenu TF i o 56% aktywności TF w blaszkach miażdżycowych usuniętych z tętnic szyjnych [143]. Podobne wyniki uzyskano w blaszkach miażdżycowych usuniętych z tętnic wieńcowych pacjentów leczonych statynami [144].

1.3.2.2 Generacja trombiny

Eksperymentalne i kliniczne dane z przeprowadzonych doświadczeń wykazały, że atorwastatyna, simwastatyna oraz prawastatyna mogą zmniejszać generację trombiny i w konsekwencji ograniczać powstawanie fibryny [106, 145-147]. Zaobserwowano również osłabienie aktywacji FV i FXIII, zmniejszenie proteolizy fibrynogenu i zwolnienie jego konwersji do fibryny, a także zwiększenie inaktywacji czynnika FVa i ekspresji trombomoduliny [148]. Zmniejszenie generacji trombiny zaobserwowano u pacjentów z hipercholesterolemią lub CAD przyjmujących simwastatynę 20-40 mg dziennie (mg/d) przez 3 dni oraz u pacjentów leczonych zarówno miesiąc jak i 3 miesiące [149-151]. Podobny efekt zaobserwowano u pacjentów przyjmujących 40 mg/d atorwastatyny [152]. Sanguigni i wsp. [153] stwierdzili, że u pacjentów z hipercholesterolemią dawka 10 mg/d atorwastatyny przez 3 dni może istotnie zmniejszyć poziom F1+2 w osoczu, co potwierdza wczesny efekt antykoagulacyjny, prawdopodobnie związany ze zmniejszeniem ekspresji ligandu CD40 i jednoczesnym zwiększeniem ekspresji TF oraz generacji trombiny [153]. Dodatkowo, zaobserwowano zwiększenie aktywności APC oraz zależną od niego przyśpieszoną inaktywację FVa [142]. Osłabienie konwersji fibrynogenu do fibryny stwierdzono także po 3 miesiącach stosowania simwastatyny [106]. Potwierdzono również zmniejszenie generacji trombiny w testach *in vitro* pod wpływem stosowanej atorwastatyny przy użyciu automatycznego trombogramu [145].

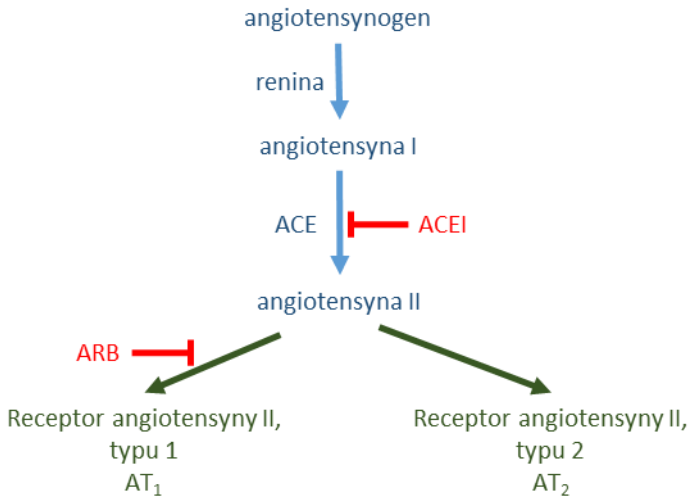
1.3.2.3 Trombomodulina

Ważnym składnikiem mechanizmu antykoagulacji *in vivo* jest trombomodulina (TM), białko znajdujące się na powierzchni śródbłonka naczyniowego. Trombina przyłącza się do TM, a następnie aktywuje białko C, które inaktywuje FVa oraz FVIIIa, niszcząc kompleks protrombinazy i tenazy. Komórki śródbłonka mogą uwalniać TM do krwi, tzw. rozpuszczalna TM, jednak nie ma ona takiej aktywności jak TM zlokalizowana na powierzchni śródbłonka [154, 155]. Zaobserwowano zwiększenie ekspresji mRNA genu *TM* w komórkach śródbłonka po stosowaniu statyn [151, 156, 157]. Wzrost obserwowano już po 24 godz. od zastosowania atorwastatyny [158]. Innym mechanizmem mogącym zwiększać ekspresję trombomoduliny jest synteza tlenku azotu (*ang. nitric oxide,* NO) przez komórki śródbłonka [159].

1.4. Inhibitory konwertazy angiotensyny i antagoniści receptora angiotensyny II

Inhibitory konwertazy angiotensyny (*ang. angiotensin converting enzyme inhibitors,* ACEI) należą do grupy związków blokujących ścieżkę renina-angiotensyna-aldosteron. Pierwszą substancją z tej grupy jest czynnik zwany BFB (*ang. bradykinin potentiating factor*), wyodrębniony z jadu żmii brazylijskiej *Bothrops jararaca* w 1965 roku przez Sergio Ferreira. BFB blokował *in vitro* rozpad bradykininy oraz przekształcenie angiotensyny I (AngI) do angiotensyny II (AngII) przez zahamowanie konwertazy angiotensyny (*ang. angiotensin converting enzyme,* ACE) (Rycina 2). AngI jest hormonem peptydowym powstającym z przekształcenia przez reninę angiotensynogenu, syntezowanego w nerkach, wątrobie, mózgu, sercu i ścianach naczyń krwionośnych, do 10-aminokwasowego peptydu. W dalszym etapie AngI ulega przekształceniu przez ACE do AngII. Innymi enzymami zdolnymi przekształcać AngI do Ang II są chymaza oraz katepsyna G. Tkankowa frakcja AngII reguluje homeostazę lokalną, natomiast krążąca AngII reguluje homeostazę wodno-elektrolitową oraz ciśnienie krwi [160].

Mechanizm działania ACEI polega na hamowaniu ACE i jest identyczny dla wszystkich leków z tej grupy. Około 90% ACE zlokalizowane jest w śródbłonku naczyniowym i w obrębie warstw ściany naczynia narządów takich jak płuca, nerki, nadnercza, mózg, serce, natomiast tylko 10% znajduje się w krwi [161-163].



Rycina 2. Szlak powstawania angiotensyny II z uwzględnieniem miejsca działania inhibitorów konwertazy angiotensyny (ACEI) oraz antagonistów receptora angiotensyn II (ARB).

W zależności od zdolności ACEI do hamowania ACE na poziomie tkankowym można podzielić je na dwie grupy: osoczowe (kaptopryl, enalapryl, lizynopryl) oraz tkankowe (zofenopryl, ramipryl, perindopryl, chinapryl, benazepryl, fozynopryl). Liczne badania dowiodły, że ACEI poprawiają funkcję śródbłonka naczyniowego, powodując uwalnianie NO, prostacykliny (PGI_2) oraz t-PA [164-166]. Te efekty wiążą się głównie z zahamowaniem rozkładu bradykininy przez ACEI.

Drugą grupą leków działających na osi renina-angiotensyna-aldosteron są antagoniści receptora angiotensyny (*ang. angiotensyn II receptor blockers*, ARB). Pierwszym analogiem peptydowym receptora angiotensyny II, typu 1 (*ang. angiotensin II receptor type 1*, AT_1) była salarazyna opisana w 1971 przez Pals i wsp. [167]. Odkrycie to przyczyniło się do poznania i scharakteryzowania struktury przestrzennej receptora AT_1 oraz wprowadzenia w 1995 roku pierwszego niepeptydowego ARB, losartanu. Wszystkie ARB współzawodniczą z angiotensyną II, selektywnie blokują receptor AT_1. Różnice pomiędzy poszczególnymi ARB polegają na różnej sile wiązania do receptora AT_1 [168].

1.4.1 Przeciwzapalne działanie ACEI i ARB

Postuluje się, że jednym z głównych mechanizmów przeciwzapalnych ACEI jest zmniejszenie dostępności AngII. Obecne wykazano, że zarówno AngI jak i AngII stymulują komórki ścian naczyń krwionośnych do produkcji IL-6 oraz powodują aktywacje NF-κB, który odpowiedzialny jest za transkrypcję prozapalnych cytokin. Efekt ten był zahamowany po dodaniu losartanu, blokera receptora AT_1, oraz należących do ACEI kaptoprylu i enalaprilu [169, 170]. Badania przeprowadzone na króliczym modelu miażdżycy pokazały, że oprócz zmniejszenia aktywacji NF-κB, ACEI zmniejszają również ekspresję MCP-1 w ścianie naczyń, tym samym przyczyniając się do zmniejszenia nacieku monocytów [171]. Niedawne badania przeprowadzone na fragmentach ściany aorty pokazały, że stosowanie ACEI obniżyło poziom ekspresji mRNA dla genów czynników prozapalnych takich jak: *IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, MCP-1* oraz antygenów IL-8 oraz MCP-1 [172]. Badania przeprowadzone na pacjentach poddanych pomostowaniu wieńcowo-aortalnemu pokazały, że stosowanie ACEI zmniejsza pooperacyjną zachorowalność i śmiertelność, co może być związane z obserwowanym zmniejszeniem poziomu IL-6 w osoczu [173]. U pacjentów ze stabilną dławicą piersiową enalapril i losartan obniżały o 51% poziom IL-6 w osoczu [174].

1.4.2 ACEI, ARB a układ krzepnięcia

Bardzo niewiele jest doniesień dotyczących modulowania działania układu krzepnięcia przez ACEI i ARB. Obecnie wykazano, że ACEI są w stanie obniżać ekspresję TF w ludzkich monocytach/makrofagach u pacjentów z CAD [175]. Badania przeprowadzone na ludzkich monocytach wykazały zdolność kaptoprylu do redukcji aktywności TF na powierzchni monocytów przed i po indukcji lipopolisacharydami (*ang. lipopolysaccharides*, LPS) [176]. Zahamowanie aktywności TF na powierzchni monocytów zarówno przed, jak i po stymulacji LPS wydaje się być związane ze zmniejszeniem ogólnej dostępności AngII przez kaptopryl [177]. Kolejne badania *in vitro* przeprowadzone na monocytach ludzkich potwierdziły skuteczność kaptoprylu, fozynoprylu oraz idraprylu w obniżeniu ekspresji mRNA dla genu *F3* i antygenu TF [178]. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem kokultur komórek śródbłonka i mo-

nocytów potwierdziły również zdolność enalaprilu do obniżenia poziomu TF w badanych hodowlach [179].

Dodatkowo wykazano, że ACEI obniżają stężenia kompleksów trombina-antytrombina (TAT) oraz fragmentów F1+2 [180]. Wydaje się to być związane z działaniem ACEI na śródbłonek naczyniowy, gdzie dochodzi do wzrostu uwalniania NO, głównie przez zahamowanie rozkładu bradykininy oraz zmniejszenie uwalniania TF ze śródbłonka, przez ograniczenie lokalnej dostępności AngII [181]. U pacjentów z nadciśnieniem tętniczym przyjmującym losartan, zaobserwowano 23% obniżenie poziomu TF w osoczu krwi [182]. Badania przeprowadzone na pacjentach z nadciśnieniem pokazały zdolność enalaprilu do obniżenia poziomu F1+2 o 26,3%, w porównaniu z pacjentami nieleczonymi [183]. U pacjentów z CAD po 28 dniach terapii chinaprylem obserwowano zmniejszenie poziomu łańcucha B trombiny (o 40%), maksymalnego stężenia TAT (o 40%), zmniejszenia aktywacji FV (o 21,8%) oraz maksymalnego wyczerpania ilości dostępnego fibrynogenu (o 32,7%) w miejscu standaryzowanego nacięcia skóry pacjentów [152].

1.4.3 ACEI i ARB a układ fibrynolizy

Działanie profibrynolityczne ACEI polega głównie na zmianie czynności śródbłonka naczyniowego, efektem czego jest obniżenie poziomu PAI-1 na skutek zahamowania syntezy AngII, oraz wzrostu uwalniania t-PA poprzez zahamowanie rozkładu bradykininy [184, 185]. Badania przeprowadzone na szczurach z indukowaną zakrzepicą tętniczą i żylną wykazały, że ACEI zmniejszają adhezję i agregację płytek. Dodatkowo, chinarapryl i peryndopryl zmniejszają generację trombiny i skracają czas fibrynolizy, co świadczy o zwiększonej aktywacji śródbłonka naczyniowego [186]. Podobnych zjawisk nie zaobserwowano jednak u zwierząt, u których nie było toczącego się procesu zakrzepowego [187]. Sugeruje to, że skuteczność działania profibrynolitycznego ACEI może zależeć od zwiększonej aktywności układu krzepnięcia.

W szczurzym modelu przebudowy naczyń krwionośnych obserwuje się zwiększenie ekspresji mRNA oraz antygenu PAI-1 w komórkach śródbłonka aorty oraz tętnic wieńcowych [188]. Zaobserwowano również wzrost uwalniania antygenu PAI-1 przez

komórki śródbłonka do medium. Podanie imidaprylu skutecznie zahamowało wzrost poziomu PAI-1 u szczurów zarówno na poziomie mRNA jak i antygenu [189].

W klinicznych badaniach porównawczych wykazano, że u pacjentów po przebytym zawale serca chinapryl oraz enalapryl obniżały stężenie antygenu PAI-1 w ciągu 4 tygodni leczenia [190]. Silniejsze obniżenie stężenia antygenu PAI-1 zaobserwowano po podaniu imidaprylu pacjentom po świeżym zawale serca [191]. Zmniejszenie aktywności PAI-1 odnotowano również 2 trakcie 4-tygodniowej terapii losartanem, należącym do ARB [182].

2. Założenia i cele pracy

Odkładanie soli wapnia na zastawce aortalnej jest procesem aktywnym, w którym główną rolę odgrywają komórki zrębu zastawki aortalnej (VICs), ulegajace osteoblastycznej transformacji pod wpływem przewlekłego procesu zapalnego.

Jednym z głównych czynników ryzyka AS są hiperlipemia oraz nadciśnienie z powodzeniem leczone odpowiednio statynami i ACEI. Przeprowadzone dotychczas badania kliniczne nad wpływem statyn i ACEI na progresję AS dały niejednoznaczne wyniki. Mechanizmy działania statyn, ACEI i antagonistów receptorów angiotensyny na VICs oraz procesy zapalenia i kalcyfikacji zastawek aortalnych, a także ekspresję białek krzepnięcia są słabo poznane.

Cele badania obejmowały następujące zagadnienia:

1. Ocena działania statyn, ACEI oraz antagonisty receptora angiotensyny na proces kalcyfikacji VICs izolowanych ze stenotycznych płatków ludzkich zastawek aortalnych w hodowlach *in vitro*
2. Ocena zmian ekspresji białek biorących udział w procesie zapalnym, neowasklaryzacji i białek układu krzepnięcia *in vitro* oraz *in loco* w płatkach ludzkich zastawek aortalnych pod wpływem statyn, ACEI i antagonisty receptora angiotensyny.

3. Pacjenci i metody

3.1 Odczynniki

Pożywki hodowlane i suplementy

Akutaza (PAA Laboratories, Pasching, Austria)

Angiotensyna I (Santa Cruz Biotech., Dallas, USA)

Angiotensyna II (Santa Cruz Biotech., Dallas, USA)

β-glicerofosforan sodu (Sigma-Aldrich, Bonn, Niemcy)

Chlorek wapnia (POCH S.A., Gliwice, Polska)

DMEM z pirogronianem sodu, (PAA Laboratories, Pasching, Austria)

Kolagenaza (Sigma-Aldrich, Bonn, Niemcy)

Kwas L-askorbinowy (Sigma-Aldrich, Bonn, Niemcy

Kwas mewalonowy (Santa Cruz Biotech., Dallas, USA)

L-glutamina, termostabilna (PAA Laboratories, Pasching, Austria)

Lipopolisacharydy (InvivoGen, Toulouse, Francja)

PBS Dulbecco's bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} (PAA Laboratories, Pasching, Austria)

Penicylina/Streptomycyna (PAA Laboratories, Pasching, Austria)

Peptydoglikan (InvivoGen, Toulouse, Francja)

Płodowa surowica bydlęca (PAA Laboratories, Pasching, Austria)

TNF-α (Santa Cruz Biotech., Dallas, USA)

Leki stosowane w hodowli

Atorwastatyna (Zentiva PL, Warszawa, Polska)

Enalapril (TEVA, Warszawa, Polska)

Kandesartan (TEVA, Warszawa, Polska)

Ramipril (TEVA, Warszawa, Polska)

Rozuwastatyna (Zentiva PL, Warszawa, Polska)

Odczynniki do cytometrii przepływowej

Przeciwciała anty-α-aktyna FITC, ab11005 (Abcam, Cambridge, Wielka Brytania)

Przeciwciała anty-wimentyna PE, ab49918 (Abcam, Cambridge, Wielka Brytania)

Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, Bonn, Niemcy)

Odczynniki do immunofluorescencji

Tissue-Tek O.C.T (Sakura, Torrance, USA)

Surowicza albumina bydlęca, BSA (Sigma-Aldrich, Bonn, Niemcy)

Woda ulteniona, H_2O_2 (Farmina, Kraków, Polska)

Przeciwciała IgG anty-TF, sc-20160 (Santa Cruz Biotech., Dallas, USA)

Przeciwciała IgG anty-FVII, GTX101238 (GeneTex, Irvine, CA, USA)

Przeciwciała IgG anty-FX, GTX110300 (GeneTex, Irvine, CA, USA)

Przeciwciała IgG anty-FXI, GTX105974 (GeneTex, Irvine, CA, USA)

Przeciwciała IgG anty-PAR1, GTX11603 (GeneTex, Irvine, CA, USA)

Przeciwciała IgG anty-PAR2, GTX70621 (GeneTex, Irvine, CA, USA)

Przeciwciała drugorzędowe antykrólicze-IgG, sprzężone z FITC, GTX27090, (Gene-Tex, Irvine, CA, USA)

Odczynniki do analizy ekspresji genów

RNAlater RNA Stabilization Reagent (Qiagen, Hilden, Niemcy)

Blank qPCR Master Mix (Eurx Ltd, Gdańsk, Polska)

GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (Eurx Ltd, Gdańsk, Polska)

NG dART RT kit (Eurx Ltd, Gdańsk, Polska)

TaqMan Gene Expression Assay (Life Technologies, Carlsbad, USA)

Odczynniki do metody western-blot

Bufor RIPA (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)

Marker masy C3437 (Sigma-Aldrich, Bonn, Niemcy)

Coomassie Brilliant Blue (Sigma-Aldrich, Bonn, Niemcy)

Membrana PVDF (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)

Przeciwciała IgG anty-TF, GTX 100808 (GeneTex, Irvine, CA, USA)

Przeciwciała IgG anty-FX, GTX 110300 (GeneTex, Irvine, CA, USA)
Przeciwciała drugorzędowe anty-IgG, GTX27090, (GeneTex, Irvine, CA, USA)
Tetrametylobenzydyny (Sigma-Aldrich, Bonn, Niemcy)

Pozostałe odczynniki i materiały

Bicinchoninic Acid Kit (Sigma-Aldrich, Bonn, Niemcy)
Czerwień alizarynowa S (Sigma-Aldrich, Bonn, Niemcy)
PBS Dulbecco's z jonami Ca^{2+} i Mg^{2+} (PAA Laboratories, Pasching, Austria)
Płytki 6-dołkowe do hodowli komórek (PAA Laboratories, Pasching, Austria)
Płytki 12-dołkowe do hodowli komórek (PAA Laboratories, Pasching, Austria)

3.2 Grupa badana

Do badania włączono 61 chorych ze stwierdzoną AS, bez istotnych zmian miażdżycowych, zakwalifikowanych do izolowanej operacji wszczepienia biologicznej lub sztucznej zastawki aortalnej. Rekrutacja pacjentów została przeprowadzona na oddziale Kliniki Chorób Serca, Naczyń i Transplantologii Instytutu Kardiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowskim Szpitalu Specjalistycznym im. Jana Pawła II. Wszyscy uczestnicy badania wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu. Badanie uzyskało zgodę komisji bioetycznej (Nr KBET/140/B2012).

3.2.1 Kryteria włączenia

1. Ciężka objawowa AS, definiowana jako maksymalna prędkość przepływu krwi przez zastawkę (V_{max}) >4 m/s, powierzchnia ujścia zastawkowego *(ang. aortic valve area,* AVA) <1 cm^2, indeksu AVA/BSA (współczynnika AVA w stosunku do powierzchni ciała, *ang. body surface area,* BSA) <0,6 cm^2/m^2, średni gradient ciśnień przez zastawkę aortalną (*ang. mean arotic gradient,* AG_{mean}) >40 mm Hg w echokardiografii przezklatkowej wg wytycznych ESC z 2012 [192]
2. Rytm zatokowy
3. Brak wrodzonych chorób serca i istotnych wad pozostałych zastawek serca
4. Brak udokumentowanych angiograficznie istotnych zmian miażdżycowych (zmniejszenie światła tętnic <50%) w tętnicach wieńcowych i tętnicach szyjnych

5. Wiek >18 lat
6. Świadoma, pisemna zgoda na udział w badaniu

3.2.2 Kryteria wyłączenia

1. Wymagana dodatkowa interwencja kardiochirurgiczna
2. Objawy świeżej infekcji lub zapalenia z CRP >10 mg/l
3. Skaza krwotoczna w wywiadzie
4. Przebyty epizod sercowo-naczyniowy (zawał serca, niestabilna dławica piersiowa, udar mózgu) udokumentowany w karcie informacyjnej leczenia szpitalnego w ciągu ostatnich 6 miesięcy poprzedzających włączenie do badania
5. Choroby współistniejące: nowotwór złośliwy, choroby autoimmunologiczne, niewydolność nerek, uszkodzenie wątroby, cukrzyca wymagająca insulinoterapii, nadczynność lub niedoczynność tarczycy
6. Aktualne stosowanie leków immunosupresyjnych, heparyny, doustnych antykoagulantów, tienopirydyn i kwasu acetylosalicylowego
7. Brak zgody na udział w badaniu

U wszystkich badanych przy przyjęciu przeprowadzono badanie podmiotowe i przedmiotowe. Indeks masy ciała (*ang. body mass index*, BMI) obliczono, dzieląc masę ciała (w kilogramach) przez wzrost do kwadratu (w metrach). Otyłość definiowano jako BMI ≥30 kg/m^2. Aktualne palenie tytoniu definiowano jako palenie minimum 1 papierosa dziennie. Za nadciśnienie tętnicze uznano wartości przekraczające 140 mm Hg dla ciśnienia skurczowego lub 90 mm Hg dla ciśnienia rozkurczowego, lub leczone nadciśnienie. Hipercholesterolemię definiowano jako nieprawidłowe stężenie w surowicy na czczo jednej lub więcej frakcji lipoprotein: całkowitego cholesterolu (≥ 5mmol/l), cholesterolu LDL (≥3 mmol/l) i/lub rozpoznane uprzednio z wdrożoną farmakoterapią. Cukrzycę definiowano jako dwukrotne przekroczenie poziomu glukozy na czczo >7,0 mmol/l lub rozpoznaną wcześniej, a pacjent jest w trakcie farmakoterapii. Niewydolność nerek rozpoznawano w przypadku wartości GFR <30 ml/min/1,73 m^2. Uszkodzenie wątroby definiowano w przypadku przekroczenia wartości ALT >1,5 raza górnej

granicy normy. Nadczynność tarczycy definiowano jako TSH (*ang. thyroid-stimulating hormone*) <0,27 µlU/ml, a niedoczynność jako TSH >4,20 µlU/ml.

3.2.3 Echokardiografia

U wszystkich pacjentów wykonano badanie echokardiograficzne przezklatkowe w spoczynku aparatem Phillips ie 33 (Phillips Electronics, Andover, USA) zgodnie z zaleceniami ESC. Oceniano następujące parametry echokardiograficzne: liczbę płatków zastawki aortalnej, V_{max}, AVA, AG_{mean}, maksymalny gradient ciśnień przez zastawkę aortalną (*ang. maximal arotic gradient*, AG_{max}), frakcję wyrzutową (*ang. ejection fraction*, EF). AG_{mean} oraz AG_{max} był mierzony za pomocą badania dopplerowskiego z użyciem wzoru Bernoulliego. AVA zostało obliczone za pomocą równania ciągłości.

3.2.4 Badania laboratoryjne

Od wszystkich włączonych do badania pacjentów pobrano na czczo krew żylną 24 godziny przed zabiegiem pomiędzy godziną 7.00 a 9.00. Próbki krwi pobrane na EDTA (2,6 ml, K3-EDTA) posłużyły do izolacji materiału genetycznego pacjentów. Lipidogram, poziom glukozy, kreatyniny, aminotransferazy alaninowej (ALAT), aminotransferazy asparaginowej (AspAT), morfologia krwi obwodowej zostały oznaczone za pomocą rutynowych technik laboratoryjnych. Wysokoczułe CRP (hs-CRP) było mierzone turbidymetrycznie w surowicy krwi (Roche Diagnostics, Cambridge, Wielka Brytania).

3.3 Analiza zastawek aortalnych

Płatki zastawki aortalnej usuniętej podczas operacji wymiany zastawki posłużyły do przeprowadzenia:

1) analiz immunofluorescencyjnych antygenów wybranych czynników związanych z układem krzepnięcia,

2) analizy czynników zapalnych, kalcyfikacji, neowaskularyzacji i czynników układu krzepnięcia na poziomie mRNA i białka w hodowlach VICs.

3.3.1 Immunofluorescencja

Niezwapniałe fragmenty płatków zastawki zostały zanurzone w Tissue Tek-O.C.T (Sakura, Torrance, CA, USA) w celu utrwalenia tkanki, a następnie zostały pocięte na kriostacie (Leica Microsystems, GmbH, Vienna, Austria) poprzecznie z fragmentu środkowego i z części spoidłowej. Skrawki zamrożono na szkiełkach (Super-Frost slides, Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany) w -20°C do czasu barwienia przeciwciałami.

Przed inkubacją z odpowiednim przeciwciałem pierwszorzędowym skrawki nawadniano (3 x 3 min) zbuforowanym PBS (pH 7,4), a następnie inkubowano z 3% H_2O_2 przez 15 min w temperaturze pokojowej w celu dezaktywacji endogennych peroksydaz tkankowych. Po wypłukaniu skrawków w PBS (3 x 3 min) poddano je inkubacji z 3% BSA w PBS przez 30 min w celu zablokowania niespecyficznych miejsc wiązania przeciwciał. Po tym czasie skrawki inkubowano przez 12 godzin w temperaturze 4°C z pierwszorzędowym przeciwciałem rozcieńczonym 1:100 przeciwko TF (sc-20160), FVII (GTX101238), FX (GTX 110300), FXI (GTX105974), receptorom PAR1 (GTX116035) lub PAR2 (GTX70621), (TF firmy Santa Cruz Biotech., Dallas, USA; pozostałe GeneTex, Irvine, CA, USA). Po odpłukaniu nadmiaru przeciwciał skrawki inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z fluorochromem: izotiocjanianem fluoresceiny (1:500, FITC, kolor zielony, AbD Serotec, Oxford, Wielka Brytania) lub fikoerytryną (1:500, PE, kolor czerwony, AbD Serotec, Oxford, Wielka Brytania). Wszystkie przeciwciała rozcieńczano za pomocą 1% BSA. Kontrolę negatywną stanowiły skrawki barwione tylko przeciwciałami drugorzędowymi lub/i przeciwciałami izotypowymi (zamiast odpowiednich przeciwciał pierwszorzędowych). Skrawki analizowano przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego (Nikon Eclipse 50i) wyposażonego w kamerę i odpowiednie oprogramowanie (Motic Images Advanced 3.2). Powierzchnię immunopozytywną dla poszczególnych antygenów wyznaczono przy pomocy następującego wzoru:

suma immunoreaktywnych powierzchni (w 10 polach widzenia)/ całkowita powierzchnia skrawka [193].

3.3.2 Pomiar ekspresji mRNA wybranych genów we fragmentach zastawek

3.3.2.1 Izolacja mRNA z homogenizatów płatka zastawki

Fragment zastawki przeznaczony do izolacji mRNA został natychmiast po pobraniu umieszczony w roztworze buforu stabilizującego RNA (RNALater, Qiagen, Hilden, Niemcy) na 24-48 godziny a następnie przeniesiony do -80°C. Zamrożone płatki zastawki aortalnej podzielono na fragmenty odpowiadające stopniu zwapnienia zastawki, odpowiednio: 0 – brak zwapnień, 1 – zgrubienie bez obecnych dużych złogów, 2 – fragmenty zwapniałe. Tak przygotowane fragmenty zostały zhomogenizowane przy użyciu Mikro-Dismembrator S (Satorius Stedim Biotech, Gottingen, Niemcy) przez 3 min 1500 rpm. RNA wyizolowano przy użyciu zestawu GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (Eurx, Gdańska, Polska), zgodnie z instrukcją producenta. Odważono odpowiednio 40-70 mg homogenatu, a następnie dodano 400 µl buforu RL zawierającego β-merkaptoetanol i dokładnie wymieszano przez worteksowanie. Próbkę zwirowano przy prędkości 12 000 x g przez 3 min. Supernatant przeniesiono do minikolumny homogenizacyjnej umieszczonej w 2 ml probówce i wirowano przez 2 min przy prędkości 12 000 x g. Do przesączonego lizatu dodano 350 µl 70% etanolu i wymieszano za pomocą pipety. Następnie przeniesiono mieszaninę na kolumnę wiążącą RNA, którą wirowano przez 1 min przy prędkości 11 000 x g w celu związania całkowitego RNA. Następnie kolumnę przepłukano dodając 400 µl buforu Wash DN1 i odwirowano 1 min przy prędkości 11 000 x g. Po umieszczeniu kolumny w nowej probówce 2 ml, przepłukano ją ponownie używając 650 µl buforu Wash RBW a następnie zwirowano 1 min przy prędkości 11 000 x g. Po kolejnym przepłukaniu kolumny 350 µl buforem Wash RBW, została ona zwirowana przez 2 min przy prędkości 11 000 x g, a następnie umieszczona w nowej probówce typu eppendorf o pojemności 1,5 ml. W celu elucji RNA do kolumny dodano 50 µl wody wolnej od rybonukleaz i zwirowano 1 min przy 11 000 x g. Wyizolowane próbki RNA trzymano na lodzie do czasu zmierzenia stężenia i czystości RNA przy użyciu aparatu Pico100 (Picodrop LTD, Saffron,Walden, Wielka Brytania). Otrzymane RNA posłużyło do przeprowadzenia syntezy cDNA i analizy ekspresji badanych genów. Pozostałe RNA umieszczono w temperaturze -80°C.

3.3.2.2 Synteza cDNA

Do przeprowadzenia syntezy cDNA użyto zestawu do odwrotnej transkrypcji (*ang. reverse transcription*, RT) NG dART RT kit (Eurx, Gdańsk, Polska). Do każdej reakcji użyto 4 µg RNA w objętości 5 µl i 15 µl koktajlu RT, zawierającego bufor z jonami Mg^{2+}, oligo$(dT)_{20}$, nukleotydy oraz enzym odwrotną transkryptazę. Próbki inkubowano w 50°C, przez 30 min w celu przepisania mRNA na cDNA przez enzym odwrotną transkryptazę, a następnie w 85°C przez 5 min w celu zahamowania reakcji. Każdą próbkę rozcieńczono do stężenia cDNA 50 ng/µl, dodając 60 µl wody i umieszczono w -20°C.

3.3.2.3 Analiza ekspresji genów za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (Real – time PCR)

Zsyntetyzowane nici cDNA wykorzystano do przeprowadzenia oznaczenia ekspresji mRNA wybranych genów. W tym celu zastosowano zestaw Blank qPCR Master Mix (Eurx) oraz zestawy sond TaqMan Gene Expression Assay (Life Technologies, Carlsbad, USA) dla mRNA następujących genów: *IL-1β* – interleukina 1β, *IL-6* – interleukina 6, *BMP2* – czynnik morfogenetyczny kości 2, *F3* – czynnik tkankowy, *F10* – czynnik krzepnięcia X, *RUNX2/Cfba1* –czynnik transkrypcyjny Runx2, *SPP1* - osteopontyna, *IBSP* – sialoproteina kości, geny metabolizmu podstawowego jako geny referencyjne: *GAPDH* – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego). Dla każdego genu przygotowano mieszaninę reakcyjną o całkowitej objętości 23 µl złożoną z: 12,5 µl PCR Master Mix, 0,3 µl ROX Solution 25 µM, 1,25 µl odpowiedniej sondy, 8,95 µl wody wolnej od nukleaz. Mieszaninę nałożono na płytkę 96-dołkową, a do każdego dołka dodano 2 µl odpowiedniego cDNA. Po zwirowaniu płytki przez 2 min 3000 rpm w temperaturze pokojowej, umieszczono ją w termocyklerze ABI 7900 HT Real-time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, USA). Podczas reakcji PCR następowała wstępna 10 minowa denaturacja nici DNA w temperaturze 95ºC i aktywacja polimerazy DNA. Następnie próbki cDNA były powielane w 45 cyklach, składających się z denaturacji (15 sekund w 94ºC), hybrydyzacji odcinków starterowych i elongacji (60 sekund w 72ºC). Na podstawie rejestracji sygnału fluorescencyjnego zachodzącego po każdym

cyklu uzyskano wartości C_t (*ang threshold cycle,* cykl graniczny) dla każdej próbki [194].

Analiza otrzymanych danych została wykonana przy pomocy oprogramowania DataAssist v3.0 (Life Technologies). W pierwszej kolejności wykonano normalizację wartości C_t badanych genów względem genów referencyjnych *GAPDH* oraz *ACTB*. Następnie od wartości C_t badanego genu odjęto wartość C_t próbki kontrolnej, a zmianę ekspresji genu wyrażono jako $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [165]. Relatywną zmianę poziomu ekspresji badanych genów mierzono w odniesieniu do fragmentów niezwapnianych zastawki.

3.3.3 Ocena ilości wapnia w homogenizatach zastawek

Ilościowy pomiar wapnia w homogenizatach wykonano w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk wg modyfikacji wcześniej opisanej metody [196] przy użyciu testu Calcium Colorimetric Assay Kit (Genetex, Hsinchu City, Tajwan). Odważono odpowiednio 100-150 mg homogenizatu zastawki i umieszczono w 1,5 ml probówce typu eppendorf, następnie dodano 500 µl 0,5 M HCl i inkubowano w 4ºC przez 24 godziny w celu uwolnienia jonów wapnia ze zwapnień. Po tym czasie próbki zostały zwirowane 5 min przy 12 000 x g. Do 96-dołkowej płytki przeniesiono po 50 µl supernatantu oraz standardów o stężeniach od 0,1 do 25 mM Ca^{2+}. Wszystkie oznaczenia oraz standardy wykonano w duplikatach. Następnie dodano 90 µl Chromogenic Reagent oraz 60 µl Calcium Assay Buffer i inkubowano w ciemności 10 min. Odczytu absorbancji dokonano przy użyciu czytnika spektrofotometrycznego przy długości fali 575 nm. Stężenie jonów wapnia przeliczono na objętość próbki, a następnie na wagę homogenizatu.

3.4 Hodowla VICs

3.4.1 Izolacja komórek z zastawki aortalnej

VICs wyizolowano z zastawek aortalnych według wcześniej opisanej metody [197]. Płatki zastawki aortalnej pobrane od pacjentów podczas operacji przepłukano ciepłym PBS i umieszczono w roztworze kolagenazy (Sigma-Aldrich, Bonn, Niemcy)

o stężeniu 2,4 mg/ml, rozpuszczonej w pożywce hodowlanej DMEM. Tak przygotowane fragmenty zastawek inkubowano w 37°C przez 30 min w celu usunięcia warstwy śródbłonka. Wytrawione zastawki umieszczano następnie w roztworze 0,8 mg/ml kolagenazy w DMEM i inkubowano 37°C przez następne 3 godziny. Uzyskaną zawiesinę komórek wirowano (200 x g) w temperaturze pokojowej przez 2 min w celu usunięcia niestrawionych fragmentów tkanki. Uzyskany supernatant wirowano w 1100 x g przez 8 min. Pelet komórek zawieszono w pożywce hodowlanej DMEM z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (*ang. fetal bovine serum*, FBS), 2 mM glutaminy, 100 IU/ml penicyliny i 100 mg/ml streptomycyny (wszystkie odczynniki z PAA Laboratories, Pasching, Austria). Zawiesinę komórek w butelce hodowlanej 25 cm^2 umieszczono w inkubatorze ze stałą temperaturą 37°C i 8,5% CO_2. Po 24 godzinach pożywka została zmieniona w celu usunięcia martwych komórek.

Pożywkę zmieniano co 3 dni. Pasaż do butelki 75 cm^2 przeprowadzano po zajęciu przez komórki około 90% powierzchni dna naczynia. W tym celu komórki płukano dwukrotnie roztworem PBS bez jonów wapnia i magnezu, aby usunąć nadmiar tych jonów z pożywki, po czym oddzielono komórki z dna naczynia używając roztworu Accutase® Solution (PAA Laboratories, Pasching, Austria). Następnie zawiesinę komórek odwirowywano przez 5 min (800 x g) w temp. pokojowej. Po usunięciu supernatantu, pelet zawieszano w pożywce i umieszczano w kolejnych naczyniach hodowlanych o powierzchni 75 cm^2. Do doświadczeń używano komórek pomiędzy drugim a piątym pasażem.

3.4.2 Ocena czystości otrzymanych hodowli komórkowych

Komórki hodowane oceniano pod względem ekspresji białek α-aktyny i wimentyny, których obecność jest cechą charakterystyczną dla VICs. W tym celu do probówki cytometrycznej przenoszono 500 µl zawiesiny komórek o całkowitej liczbie $1*10^5$, dodano 500 µl 8% roztworu paraformaldehydu i inkubowano 30 min w temp. pokojowej. Następnie odwirowano 800 x g, przez 5 min a pelet zawieszono w 1 ml 0,1% roztworu Triton X-100 w celu permabilizacji błony komórkowej. Po tym czasie komórki dwukrotnie przepłukano 1 ml PBS bez jonów wapnia i magnezu, wirując 800 x g przez 5 min Do tak przygotowanej zawiesiny komórek dodano po 10 µl przeciwciał anty-α-

aktyna (2,6 mg/ml) sprzężonych z FITC (Abcam, Cambridge, Wielka Brytania) oraz anty-wimentyna (0,1 mg/ml) sprzężonych z PE (Abcam, Cambridge, Wielka Brytania). Zawiesinę inkubowano 30 min w temp. Pokojowej, a następnie analizowano na cytometrze przepływowym FACS Calibur (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, USA).

3.4.3 Stymulacja hodowli komórkowej

W celu zainicjowania procesów zapalnych VICs zostały wysiane w ilości $5*10^5$/dołek i 48 godz. później zostały poddane inkubacji z TNF-α, peptydoglikanem (*ang. peptidoglycan*, PGN) oraz LPS. Stężenia stymulantów dobrano na podstawie danych literaturowych z własnymi modyfikacjami [198-200]:

TNF-α: 1 ng/ml, 10ng/ml, 50 ng/ml

PGN: 1 µg/ml, 5 µg/ml; 10 µg/ml

LPS: 100 ng/ml, 200 ng/ml, 500 ng/ml

Celem określenia wpływu układu angiotensyny na hodowle VICs na podstawie danych literaturowych [201-203] dobrano stężenia AngI i AngII: 0,1 µM, 1 µM, 10µM.

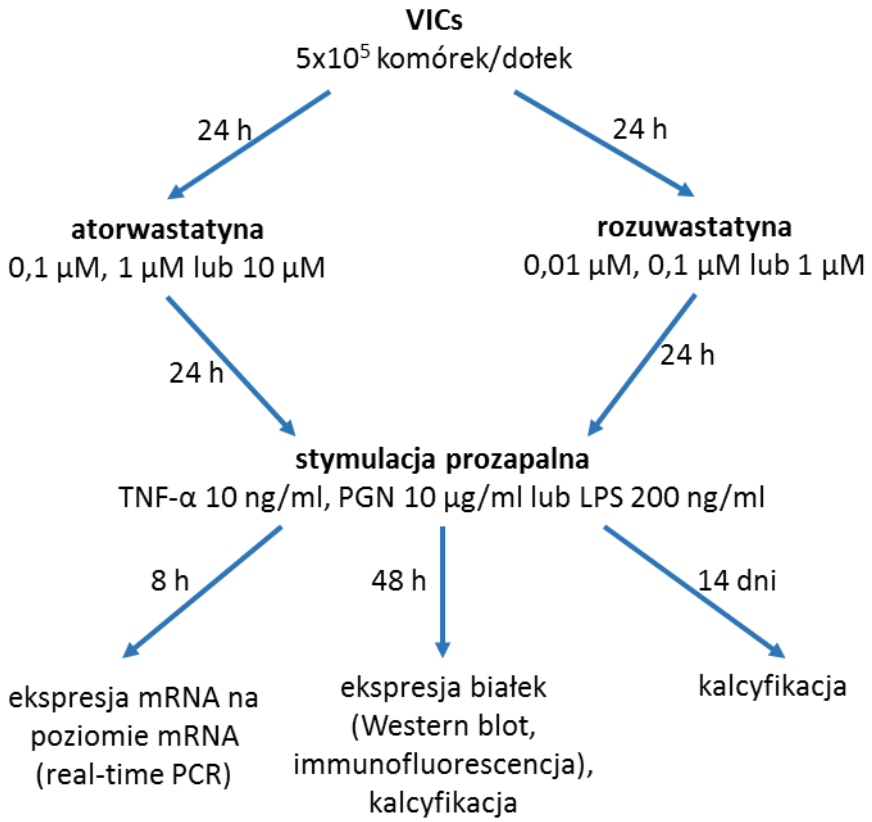
Wybrane stężenia substancji stymulujących posłużyły do przeprowadzenia wstępnych doświadczeń i określenia najmniejszej dawki powodującej wzrost procesu zapalenia oraz kalcyfikacji, która później posłużyła do określenia wpływu statyn oraz ACEI na procesy zapalne, kalcyfikację i ekspresję białek układu krzepnięcia.

Określenia wpływu statyn i ACEI dokonano, stosując 24 godz. preinkubację odpowiednich leków przed dodaniem substancji stymulujących.

Leki podawano w objętości 20 µl/dołek. Wszystkie leki ze względu na swoją niską rozpuszczalność w wodzie zostały rozpuszczone w dimetylosulfotleneku (DMSO, *ang. dimethyl sulfoxide*) i przechowywane w –80°C. Bezpośrednio przed przeprowadzeniem doświadczenia leki były rozmrażane i dodatkowo rozcieńczane w PBS, tak aby końcowe stężenie DMSO wynosiło 0,01%. Kontrolę w/w eksperymentów stanowiły komórki, do których zamiast leków dodano 20 µl PBS z 0,01% DMSO.

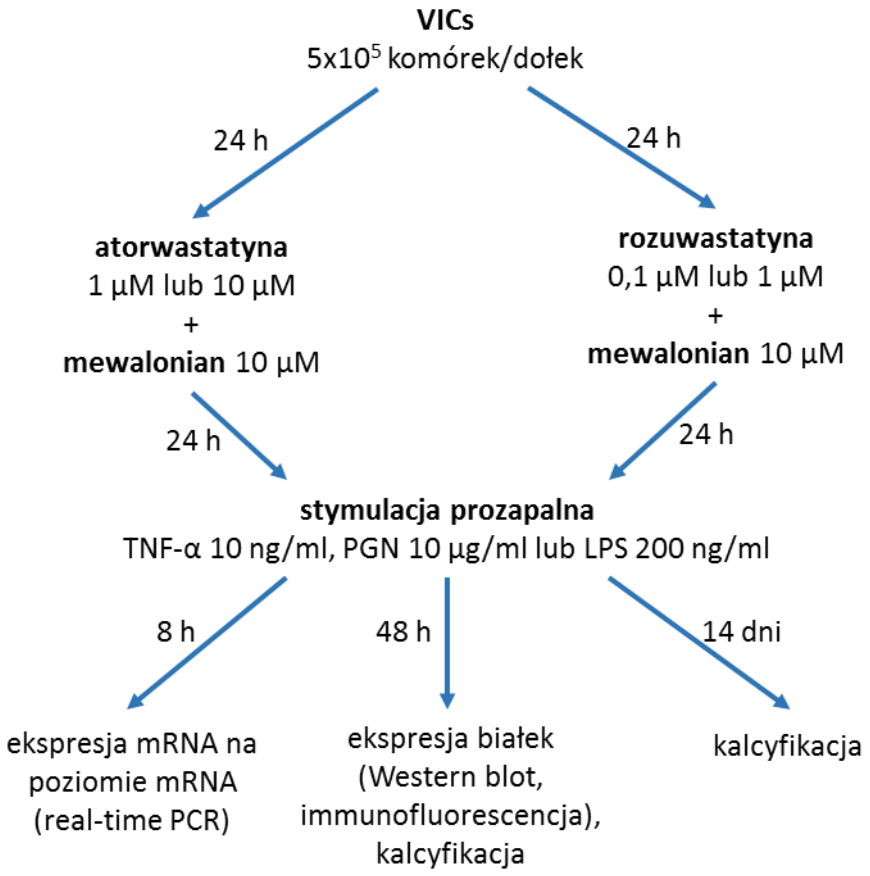
3.4.3.1 Statyny

W celu udowodnienia udziału szlaku cholesterolowego w procesach zapalnych, kalcyfikacji i układu krzepnięcia prowadzących do rozwoju stenozy aortalnej zaplanowano następujący model *in vitro* (Rycina 3):



Rycina 3. Schemat przeprowadzonych doświadczeń z użyciem statyn

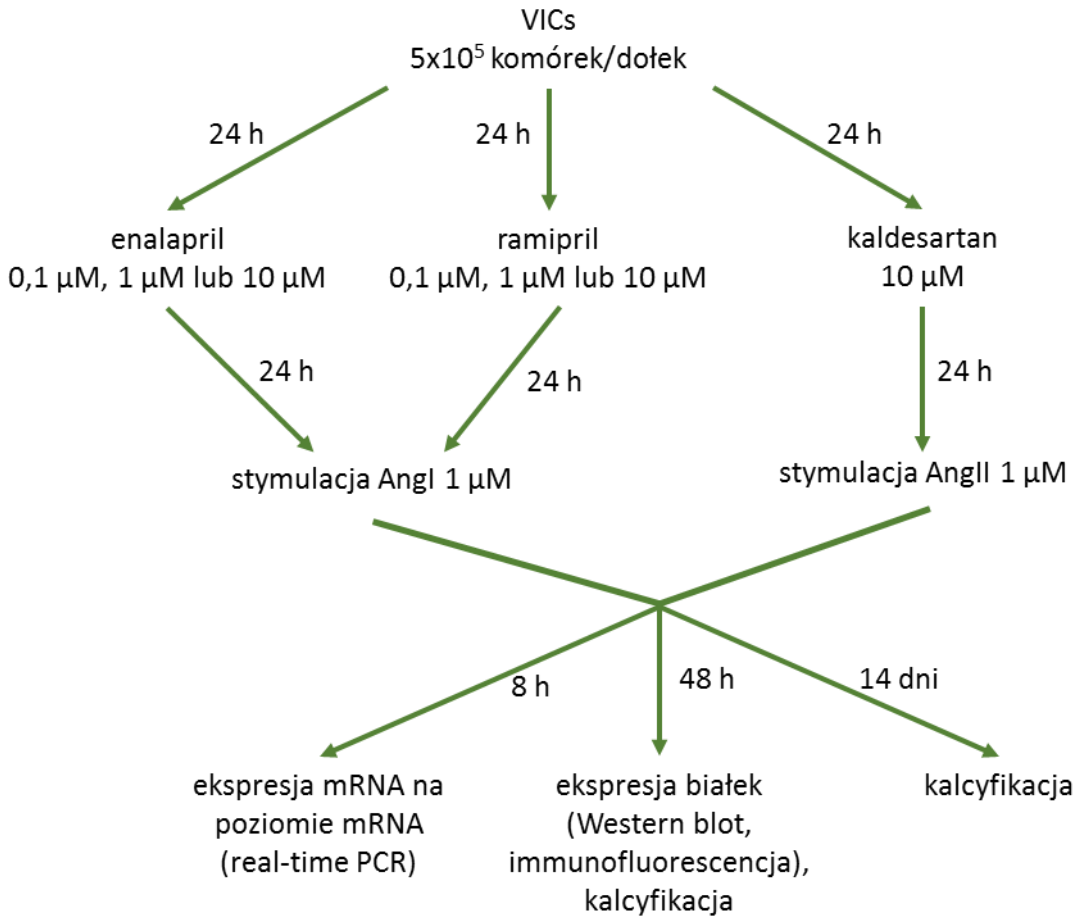
W celu potwierdzenia działania statyn na badane procesy zachodzące w stenotycznych zastawkach aortalnych dodano mewalonianu, którego synteza zostaje zahamowana pod wpływem statyn. W tym celu dokonano dodatkowych doświadczeń *in vitro* wg następującego schematu (Rycina 4):



Rycina 4. Schemat przeprowadzonych doświadczeń z użyciem statyn oraz dodatku mewalonianu

3.4.3.2 ACEI

W celu udowodnienia udziału szlaku angiotensyny w procesach zapalnych, kalcyfikacji i układu krzepnięcia prowadzących do rozwoju stenozy aortalnej zaplanowano model *in vitro* z zastosowaniem ACEI: enalaprilu i ramiprilu, oraz ARB: kandesartanu następujący model *in vitro* (Rycina 5) :



Rycina 5. Schemat przeprowadzonych doświadczeń z użyciem enalaprilu, ramiprilu oraz kandesartanu

3.4.4 Pomiar ekspresji mRNA w hodowlach komórkowych

Analizę zmiany ekspresji badanych genów przeprowadzono po 8 godz. inkubacji z w/w stymulantami. Do 6-dołkowych płytek wysiano komórki ($5*10^5$ komórek) w medium hodowlanym DMEM a po 24 godz. medium wymieniono na DMEM bez surowicy i antybiotyków. Po kolejnych 24 godz. przystąpiono do doświadczeń wg schematu z rozdziału 3.4.3.

RNA zostało wyizolowane z hodowli VICs przy użyciu zestawu GeneMATRIX Universal RNA purification Kit (Eurx), zgodnie z instrukcją producenta. Komórki poddano lizie poprzez dodanie 350 µl buforu RTL Plus zawierającego β-merkaptoetanol. Lizat komórek przeniesiono na kolumnę homogenizacyjną i postępowano tak jak opisa-

no w punkcie 3.3.2.1. Syntezę cDNA i ekspresję wybranych genów przeprowadzono jak opisano w podrozdziałach: 3.3.2.2 i 3.3.2.3.

3.4.5 Immunofluorescencja

VICs wysiano na szkiełko hodowlane 4-dołkowe, a następnie przeprowadzono doświadczenia zgodnie z podrozdziałem 3.4.3. Po 3 dniach hodowli medium usunięto, a komórki przepłukano 2-krotnie PBS-em bez jonów wapnia i magnezu. Tak przygotowane komórki utrwalono 2% paraformaldehydem przez 15 min w temp. pokojowej. Następnie po wypłukaniu szkiełek w PBS poddano je inkubacji z 3% BSA w PBS przez 30 min w celu zablokowania niespecyficznych miejsc wiązania przeciwciał. Inkubację z przeciwciałami pierwszo i drugorzędowymi przeprowadzono tak jak opisano w podrozdziale 3.3.1. Kontrolę negatywną stanowiły hodowle VICs barwione tylko przeciwciałami drugorzędowymi lub/i przeciwciałami izotypowymi (zamiast odpowiednich przeciwciał pierwszorzędowych).

3.4.6 Ocena kalcyfikacji komórek

Ocenę kalcyfikacji przeprowadzono w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk wg modyfikacji wcześniej opisanych metod [197, 204]. Przygotowane komórki wysiano na 12-dołkowe płytki i pozostawiono w medium hodowlanym na 24 godz. Następnie usunięto medium hodowlane i dodano medium osteogenne, zawierające β-glicerofosforan, $CaCl_2$, kwas askorbinowy wraz z jednym z leków, a po 24 godz. odpowiedni stymulant (zgodnie z opisem w podrozdziale 3.4.3). Medium z w/w czynnikami zmieniano co 3 dni. Po 14 dniach hodowli komórki zostały przepłukane 2-krotnie PBS-em bez jonów wapnia i magnezu, a następnie utrwalone w 10% paraformaldehydzie przez 15 min w temp. pokojowej. Utrwalone komórki przepłukano dwukrotnie dH_2O a następnie wybarwiono jądra kalcyfikacji przy użyciu 40 mM roztworu czerwieni alizarynowej (ARS) o pH 4,1. Nadmiar niezwiązanej ARS usunięto, płucząc komórki 4-krotnie w dH_2O. W celu ilościowej analizy kalcyfikacji dokonano spektrofotometrycznego pomiaru związanej z jądrami kalcyfikacji ARS wg wcześniej opisanej metody z modyfikacjami [166]. Związana ARS została odbarwiona przy użyciu 1 ml 10% kwasu octowego. Następnie do 800 µl powstałego roztwo-

ru dodano 200 µl 10% wody amoniakalnej w celu zobojętnienia działania kwasu. Pomiaru związanej ARS dokonano na płytce 96-dołkowej przy długości fali 405 nm.

Pozostałe po pomiarze komórki przytwierdzone do podłoża zostały zlizowane poprzez dodanie 100 µl M-PER™ Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, Cambridge, USA). Uzyskany lizat przeniesiono do probówek i przechowywano w temperaturze -20°C w celu późniejszego pomiaru białka metodą BCA (metoda z kwasem bis-cynchoninowym).

3.4.7 Ocena aktywności fosfatazy alkalicznej (ALP)

Ocenę aktywności fosfatazy alkalicznej dokonano w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk wg wcześniej opisanej metody z modyfikacjami [200]. Komórki wysiano na 6-dołkowe płytki i pozostawiono w medium hodowlanym na 24h. Następnie dodano odpowiedni stymulant lub kombinację stymulant/lek (zgodnie z opisem w podrozdziale 3.4.3). Hodowle prowadzono przez kolejne 48h. Następnie komórki zostały poddane lizie przy użyciu 150 µl M-PER™. W celu oznaczenia aktywności ALP, 20 µl lizatu zostało przeniesione na płytki 96-dołkowe, dodano 180 µl buforu glicynowego o pH 9,0 (0,1 M glicyloglicyny, 10 mM $MgCl_2$ oraz 10 mM p-nitrofenolu), a następnie inkubowano 1 godz. w temp. 37°C. Reakcję barwną zatrzymano przy użyciu 0,5M NaOH, a absorbancję zmierzono przy długości fali 405 nm. Aktywność ALP została odczytana w oparciu o krzywą standardową i normalizowana o stężenie białka zmierzone metodą BCA. Wynik wyrażono jako µU/mg białka.

3.4.8 Pomiar białka metodą BCA (metoda z kwasem bis-cynchoninowym)

W celu oznaczenia białka wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw Bicinchoninic Acid Kit (Sigma-Aldrich). Zgodnie z instrukcją oznaczenie wykonano na 96-dołkowych płytkach, na które naniesiono po 25 µl lizatów komórkowych oraz standardów białka w ilości od 20 do 100 µg, a następnie dodano 200 µl mieszaniny reakcyjnej BCA (1 część reagentu A + 8 części reagentu B). Płytkę inkubowano 30 min w 37°C, a następnie odczytano absorbancję przy długości fali 562 nm. Stężenia białka odczytano w oparciu o krzywą standardową.

3.4.9 Analiza ekspresji TF i FX na poziomie białka metodą Western blot.

Komórki VICs poddano lizie w buforze RIPA (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) zawierającym mieszaninę inhibitora proteazy i fosfatazy (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) przez 30 min na lodzie (co 5 min wytrząsając). Próbki wirowano przy prędkości 10 tys. rpm przez 10 min w 4ºC. Nadsącz porcjowano po 20 µl. Ekstrakty przechowywano w temperaturze -20°C do czasu dalszej analizy.

Po zmierzeniu ilości białka metodą BCA, 30 µg białka w objętości 15 µl na próbkę zawieszano w 15 µl buforu obciążającego (1 ml 100mM Tris pH 6,8; 2 ml 20% SDS, 0,02 g błękitu bromofenolowego, 2 ml glicerolu dopełniono H_2O do 10 ml; bezpośrednio przed użyciem dodano 100 µl/ml merkaptoetanolu), gotowano przez 5 min w celu denaturacji termicznej a następnie nanoszono na 10% żel poliakrylamidowy i przeprowadzano elektroforezę SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electophoresis*). Zawarty w buforze do elektroforezy detergent SDS nadaje wszystkim białkom ładunek ujemny dzięki czemu białka poruszają się w żelu w kierunku elektrody dodatniej z szybkością zależną jedynie od ich wielkości. Próbki wędrowały przez ok. 20 min przy napięciu 45 V przez żel zagęszczający o mniejszym stopniu usieciowienia, gdzie próbka ulega zagęszczeniu, a następnie przez żel rozdzielający (przy napięciu 75 V), gdzie następuje właściwy rozdział mieszaniny białkowej na poszczególne frakcje. Bufor do elektroforezy zawierał 25 mM Tris, 192 mM glicynę i 0,1% SDS, pH 8,3. Aby ocenić, czy rozdział białek przebiegł prawidłowo, po zakończonej elektroforezie jeden z żeli został wybarwiony Coomassie Brilliant Blue (cząsteczki barwnika wiążą się do grup aminowych łańcucha polipeptydowego) przez 4 godziny. a następnie odbarwiany przez noc w celu usunięcia nadmiaru barwnika. Po tej procedurze uzyskano obraz prążków, w którym każdy prążek odpowiadał białku o określonej masie molekularnej i był rozpoznawalny dzięki naniesionemu markerowi masy (C3437, Sigma-Aldrich, Bonn, Niemcy). Rozdzielone białka z drugiego żelu poddano półsuchemu transferowi na membranę z fluorku poliwinylidenu (PVDF) (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Przed transferem membranę aktywowano przez 5 min w metanolu, a następnie zarówno żel, jak i membranę inkubowano przez 5 min w buforze do transferu (25 mM Tris, 190 mM glicyna, 20% metanol, pH 8.3). Po tym czasie złożono

„kanapkę” składającą się kolejno z: bibuły, filtru papierowego, żelu, membrany, filtru papierowego i bibuły. Transfer prowadzono przez 30 min. w temperaturze pokojowej przy napięciu 100 V. Następnie membranę z przeniesionymi na nią białkami blokowano w 5% odtłuszczonym mleku w roztworze 0,5% PBS-Tween-20 przez 1 godz. w temperaturze pokojowej w celu zablokowania miejsc niespecyficznego wiązania przeciwciał. Po tym czasie membranę inkubowano przez noc, w temperaturze 4°C z króliczymi poliklonalnymi przeciwciałami pierwszorzędowym IgG anty-TF (GTX 100808) lub anty-FX (GTX 110300) i anty-GAPDH (GTX 100118) w rozcieńczeniu 1:1000 dla TF i FX 1:10000 dla GAPDH.

Po inkubacji membranę płukano trzykrotnie po 15 min w 0,5% PBS-Tween-20 a następnie inkubowano z króliczymi przeciwciałami drugorzędowymi anty-IgG (GTX27090) skoniugowanymi z peroksydazą chrzanową (HRP) przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie membranę barwiono roztworem tetrametylobenzydyny (TMB, Sigma) stanowiącym substrat dla HRP. Po ok 10 minach membranę przemyto H_2O i zrobiono zdjęcie prążków. Dokonano analizy densytometrycznej prążków przy użyciu programu Image Studio™ Lite (LI-COR Biotechnology, Cambridge, Wielka Brytania).

3.5 Analiza statystyczna

Wartości liczbowe przedstawiono jako średnie ± odchylenie standardowe (SD) w przypadku rozkładów normalnych lub jako medianę (Q1 – Q3) dla rozkładów niezgodnych z normalnymi. Rozkład zgodny z rozkładem normalnym weryfikowano testem Shapiro-Wilka. Test analizy wariancji (ANOVA) lub Kruskal-Wallisa został zastosowany do oceny istotności statystycznej pomiędzy grupami. W celu oceny różnic pomiędzy wynikami wykonano test post-hoc Tukey’a. Wartości $p < 0,05$ przyjęto jako statystycznie istotne. Do wykonania obliczeń wykorzystano programy Statistica 10 (Statsoft, Tulsa, Stany Zjednoczone) oraz Excel 2013 (Microsoft, Redmond, Stany Zjednoczone).

4. Wyniki

4.1 Charakterystyka grupy badanej

Ostateczna analiza objęła 61 chorych z AS zakwalifikowanych do operacji wymiany zastawki aortalnej. W badanej grupie przeważały kobiety i osoby w podeszłym wieku. Na podstawie koronarografii nie odnotowano istotnych zwężeń w tętnicach wieńcowych u żadnego z pacjentów, jak również żaden pacjent nie był poddany rewaskularyzacji metodą przezskórnej angioplastyki wieńcowej.

Tabela 1. Charakterystyka badanej grupy.

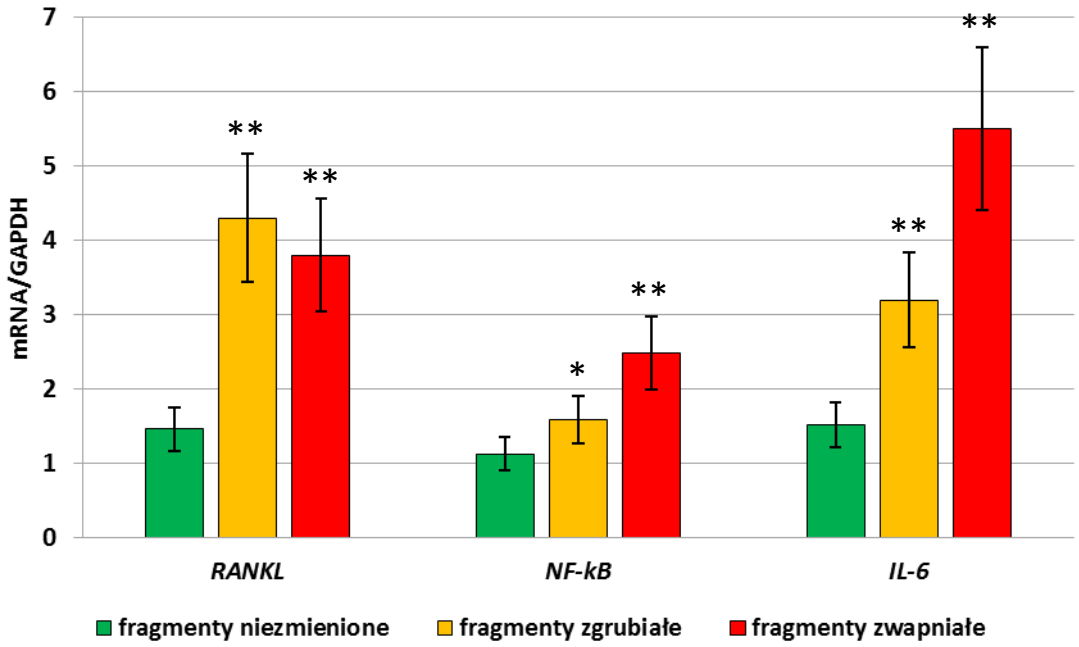
Mężczyźni n (%)	24 (39)
Wiek, lata	68 ± 9,5
BMI (kg/m^2)	29,3 ± 5,5
Czynniki ryzyka	
Nadciśnienie tętnicze, n (%)	30 (49,1)
Hipercholesterolemia, n (%)	32 (52,4)
Palenie tytoniu, n (%)	15 (24)
Otyłość, n (%)	38 (52,4)
Cukrzyca, n (%)	0 (0)
Przebyty zawał serca, n (%)	0 (0)
Parametry echokardiograficzne serca	
Średni gradient przezzastawkowy (mm Hg)	53 (44-68)
Maksymalny gradient przezzastawkowy (mm Hg)	85,1 (72-109)
AVA (cm^2)	0.7 (0,6-0,8)
EF (%)	60 (60-65)
Leczenie przed zabiegiem	
Beta-blokery, n (%)	34 (52,5)
Kwas acetylosalicylowy, n (%)	30 (49,1)
ACEI, n (%)	32 (52,4)
Statyny, n (%)	33 (54,1)
Statyny+ACEI, n (%)	20 (32,7)

Dane przedstawiono jako średnią ± SD, medianę (przedział międzykwartylowy) lub liczbę (%).
AVA – powierzchnia zastawki aortalnej, ACEI –inhibitory konwertazy angiotensyny, BMI –wskaźnik masy ciała, EF – frakcja wyrzutowa lewej komory.

4.2 Analizy in loco w stenotycznej zastawce aortalnej

4.2.1 Zapalenie

W analizowanych metodą Real-time PCR zgrubiałych i zwapniałych fragmentach zastawki w porównaniu do obszarów niezmienionych chorobowo stwierdzono wzrost ekspresji mRNA genów *RANKL*, *NF-kB* i *IL-6* biorących udział w regulacji procesu zapalnego (Rycina 6).



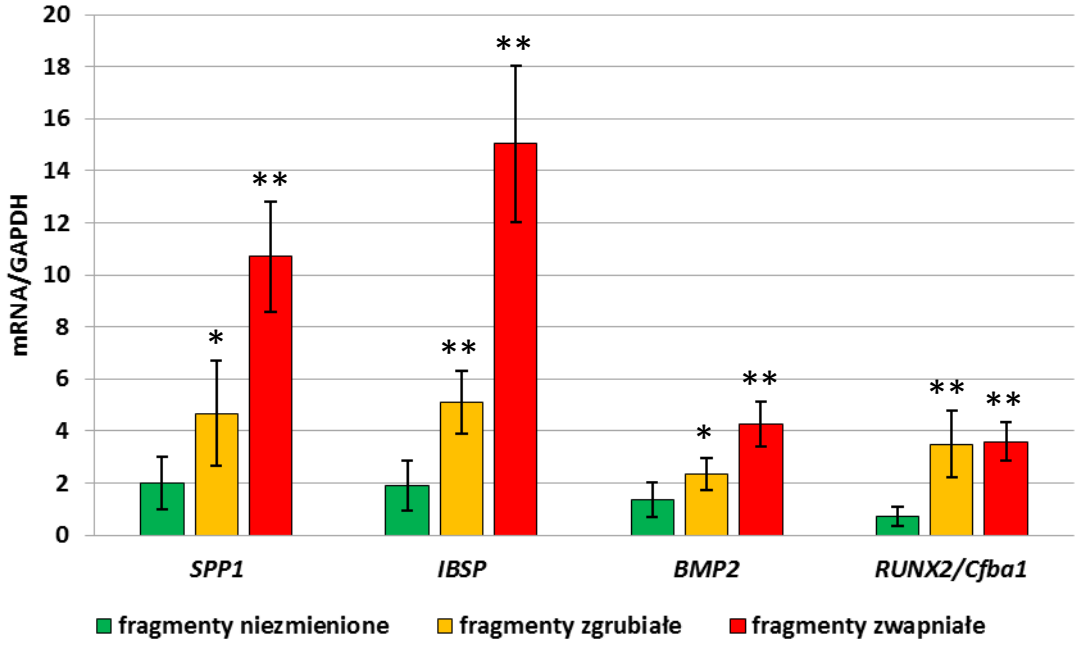
Rycina 6. Ekspresja mRNA genów *RANKL* (ligand aktywatora receptora czynnika jądrowego kβ), *NF-kB* (jądrowy czynnik transkrypcyjny kB) i *IL-6* (interleukina-6) znormalizowana względem genu metabolizmu podstawowego *GAPDH* (dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego) w zgrubiałych i zwapniałych fragmentach zastawki aortalnej względem fragmentów niezmienionych. Przedstawiono średnie ±SD z 3-5 eksperymentów. *p <0,05; **p <0,001.

Stwierdzono 4,2-krotny wzrost ekspresji mRNA genu *RANKL* we fragmentach zgrubiałych i 3,8-krotny wzrost w przypadku fragmentów zwapniałych (p <0,001 dla każdego porównania) w odniesieniu do fragmentów niezmienionych. W przypadku genu *NF-kB* zaobserwowano 1,6-krotny wzrost ekspresji we fragmentach zgrubiałych zastawki (p=0,02) oraz 2,3-krotny wzrost we fragmentach zwapniałych (p <0,001).

W przypadku mRNA dla *IL-6* zaobserwowano dwukrotny wzrost ekspresji we fragmentach zgrubiałych (p <0,001) oraz 3,6-krotny we fragmentach zwapniałych (p <0,001).

4.2.2 Kalcyfikacja

Analiza real-time PCR badanych fragmentów zastawek aortalnych wykazała podwyższoną ekspresję mRNA genów kodujących białka (SPP1, IBSP, BMP2), jak i czynniki transkrypcyjne (Runx2/Cfba1) związanye z kalcyfikacją i osteoblastyczną transformacją komórek zastawek aortalnych zarówno we fragmentach zgrubiałych, jak i zwapniałych (Rycina 7).



Rycina 7. Ekspresja mRNA genów *SPP1* (osteopontyna), *IBSP* (sialoproteina kości 2), *BMP2* (czynnik morfogenetyczny kości 2) oraz *RUNX2/Cfba1* (czynnik transkrypcyjny RUNX2/Cfba1) znormalizowana względem genu metabolizmu podstawowego *GAPDH*, związanych z procesem zapalnym w zgrubiałych i zwapniałych fragmentach zastawki aortalnej względem fragmentów niezmienionych. Przedstawiono średnie ±SD z 3-5 eksperymentów. *p <0,05; **p <0,001.

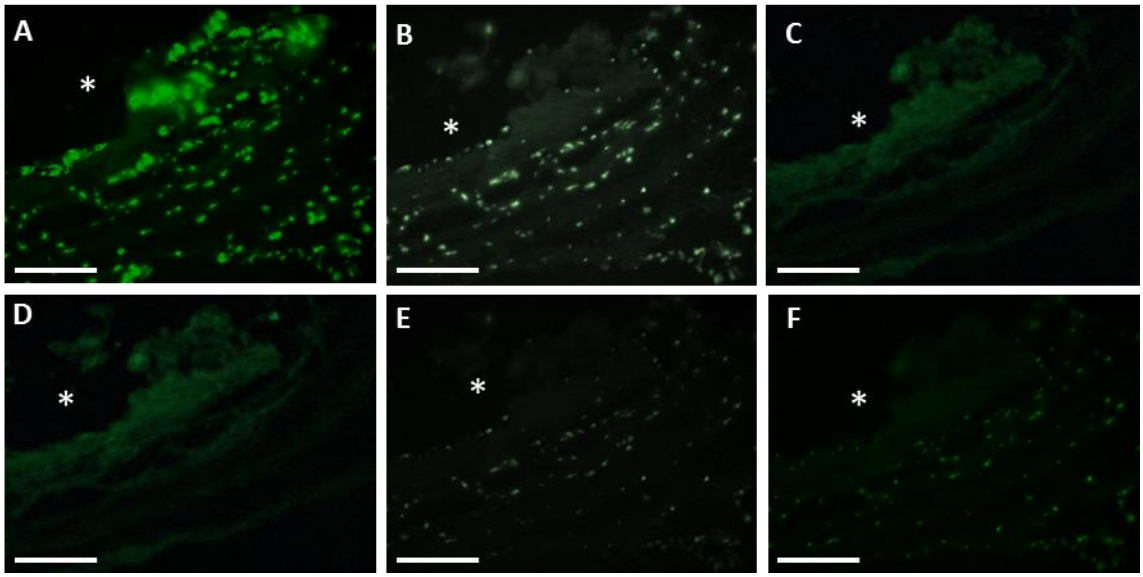
W przeprowadzonych badaniach stwierdzono 2,3-krotny wzrost ekspresji mRNA genu *SPP1* we fragmentach zgrubiałych (p <0,05) i 5,3-krotny wzrost we fragmentach zwapniałych (p <0,001) w porównaniu z fragmentami niezmienionymi za-

stawki. Ekspresja genu *IBSP* wzrosła 2,6-krotnie we fragmentach zgrubiałych oraz 10,9-krotnie we fragmentach zwapniałych w stosunku do fragmentów niezmienionych (p <0,001 dla wszystkich porównań). Analiza mRNA genu *BMP2* wykazała 1,7-krotny wzrost ekspresji dla fragmentów zgrubiałych (p=0,02) oraz 3,2-krotny wzrost dla fragmentów zwapniałych (p <0,001) i odpowiednio 4,9-krotny i 5-krotny wzrost dla czynnika transkrypcyjnego *RUNX2/Cfba1* (p <0,001 dla wszystkich porównań).

4.2.3 Białka układu krzepnięcia

Analiza immunohistochemiczna fragmentów stenotycznych zastawek wykazała obecność TF *in loco*. TF zajmował średnio 26,3 ± 4,8% powierzchni skrawka płatka zastawki (Rycina 8 A).

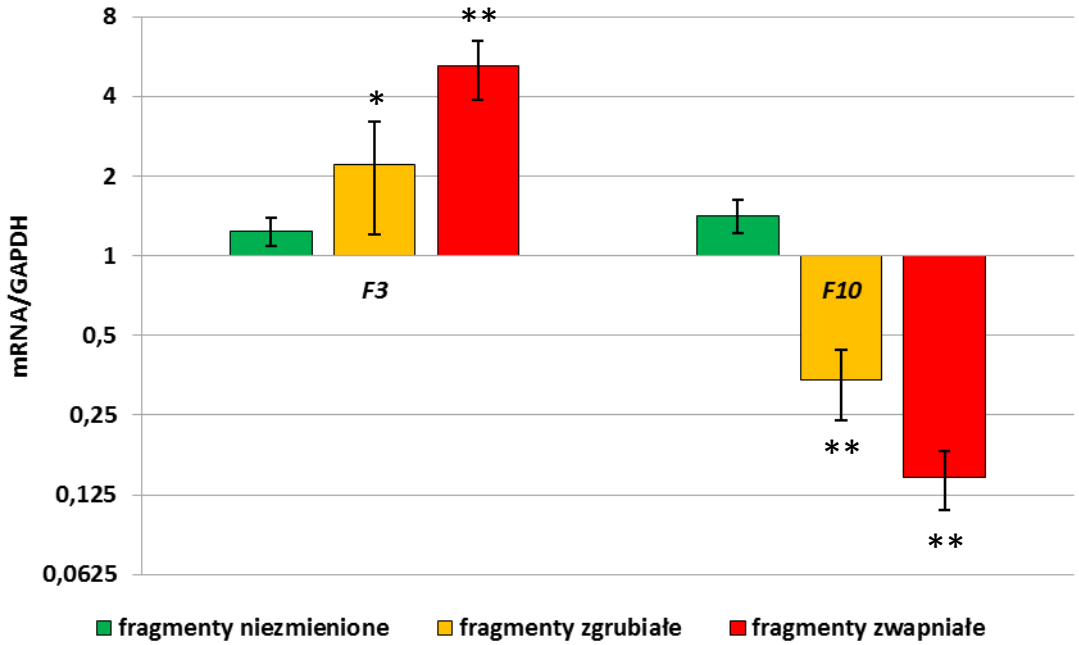
Wykazano również obecność FX, który rozproszony był w obrębie całej powierzchni zastawki (podobne ilości po stronie aortalnej i komorowej) i zajmował średnio 12,4 ± 3,2% powierzchni skrawka płatka zastawki (Rycina 8 B). Nie zaobserwowano ekspresji FVII i FX (Rycina 8 C i D) na powierzchni badanych skrawków zastawki aortalnej.



Rycina 8. Analiza immunohistohemiczna fragmentów stenotycznych zastawek. Opis A-F w tekście. * oznacza stronę aortalną, biała linia reprezentuje 200 µm.

Obecność receptorów PAR1 i PAR2, podobnie jak w przypadku FX, wykazano w obrębie całej powierzchni zastawki, a ich ilość wynosiła odpowiednio 3,8 ± 1,5% oraz 4,8 ± 2,1% (Rycina 8 E i F).

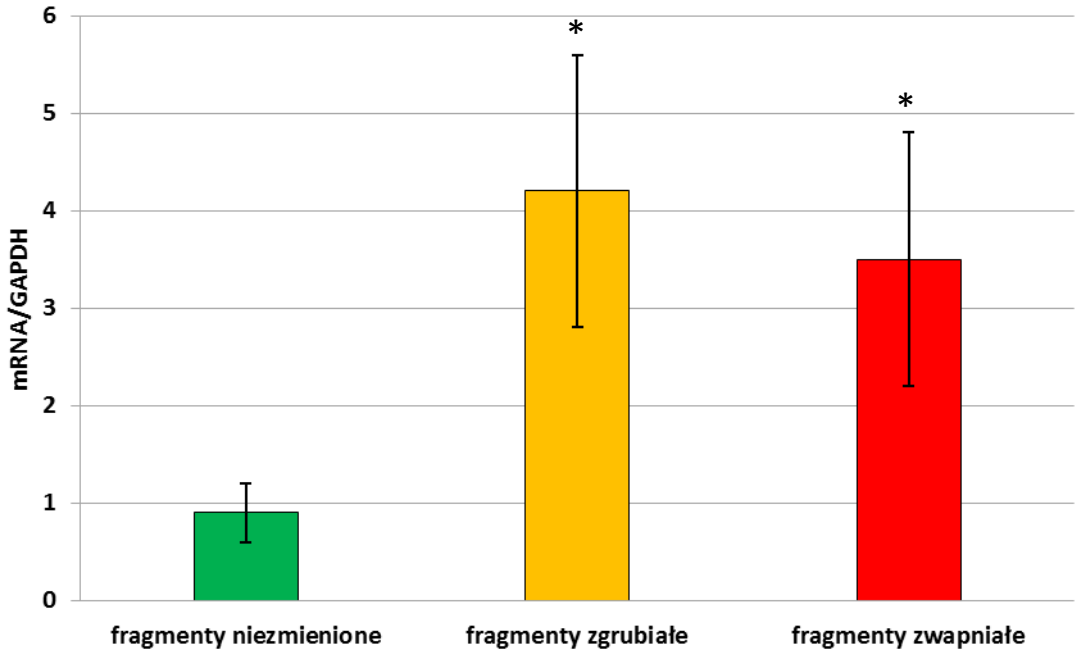
Analiza real-time PCR badanych fragmentów zastawki aortalnej wykazała podwyższoną ekspresję mRNA genu *F3* we fragmentach zgrubiałych (1,7-krotnie, p <0,02) i zwapniałych (4,1 krotnie p <0,001) oraz obniżoną ekspresję mRNA genu *FX* (odpowiednio 4,2- i 9,7-krotnie, p <0,001 dla obu porównań) w stosunku do kontroli (Rycina 9). Nie wykazano żadnych zmian w ekspresji mRNA genów *F2R* oraz *F2RL1*.



Rycina 9. Ekspresja mRNA genów *F3* (czynnik tkankowy) i *F10* (czynnik X krzepnięcia krwi) znormalizowana względem genu metabolizmu podstawowego *GAPDH* w zgrubiałych i zwapniałych fragmentach zastawki aortalnej względem fragmentów niezmienionych. Przedstawiono średnie ±SD z 3-5 eksperymentów. *p <0,05; **p <0,001.

4.2.4 Neowaskularyzacja

Analiza real-time PCR badanych fragmentów zastawek aortalnych wykazała podwyższoną ekspresję mRNA genu *VEGF* we fragmentach zgrubiałych i zwapniałych, odpowiednio 4,3- i 3,6-krotnie (p <0,001 dla obu porównań) (Rycina 10).



Rycina 10. Ekspresja mRNA genu *VEGFA* (czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego) znormalizowana względem genu metabolizmu podstawowego *GAPDH* w zgrubiałych i zwapniałych fragmentach zastawki aortalnej względem fragmentów niezmienionych. Przedstawiono średnie ±SD z 3-5 eksperymentów. *p <0,001.

4.3 Analizy *in vitro* w hodowli VICs

4.3.1 Zapalenie

4.3.1.1 Statyny

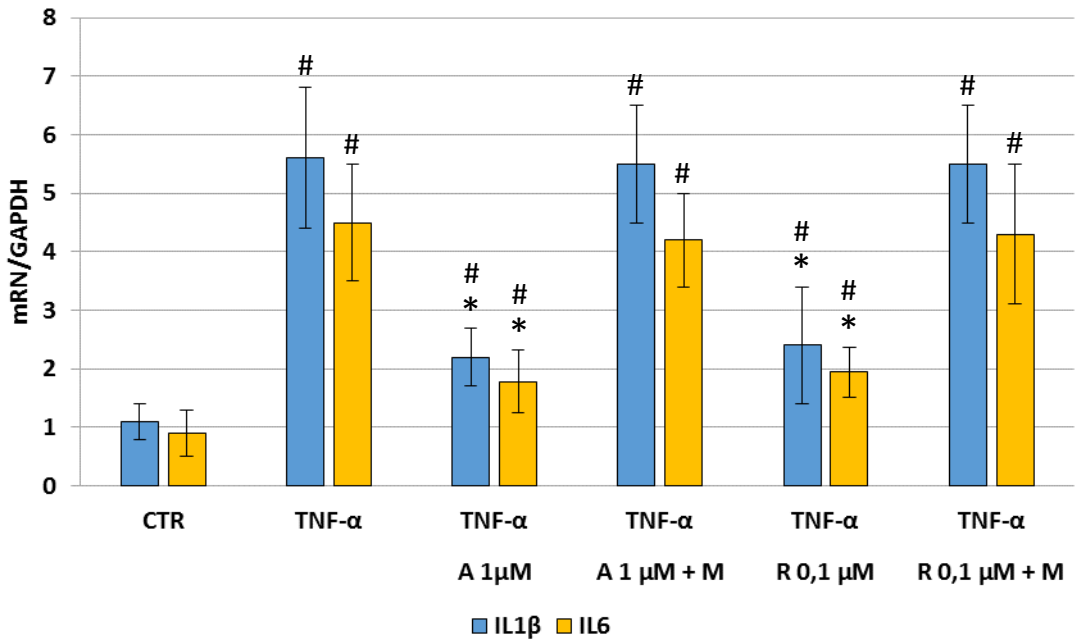
Stymulacja TNF-α

Po stymulacji TNF-α w stężeniu 10 ng/ml zaobserwowano 5,2-krotny wzrost ekspresji mRNA genu *IL-1β* (p <0,001) oraz 4,2-krotny wzrost ekspresji mRNA genu *IL-6* w stosunku do kontroli (p <0,001 dla obu porównań).

Preinkubacja hodowli z 0,1 µM atorwastatyny lub 0,01 µM rozuwastatyny nie zmieniła ekspresji badanych genów, podczas gdy stosując wyższe stężenia atorwastatyny (1 µM oraz 10 µM) jak i rozuwastatyny (0,1 µM oraz 1 µM) zaobserwowano spadek ekspresji mRNA genu *IL-1β* o odpowiednio 64% i 82%, dla atorwastatyny oraz 55% i 80% dla rozuwastatyny (p <0,001 dla wszystkich porównań). Podobnie odnotowano

spadek ekspresji genu *IL6* o odpowiednio 60% i 75% dla atorwastatyny oraz 60% i 78% dla rozuwastatyny (p <0,001 dla wszystkich porównań).

Dodanie mewalonianiu w stężeniu 10 µM wraz z atorwastatyną lub rozuwastatyną do hodowli VICs całkowicie zniosło hamujący wpływ statyn na poziom ekspresji mRNA genów *IL-1β* i *IL-6* indukowany stymulacją TNF-α niezależnie od stężenia statyny (Rycina 11).



Rycina 11. Ekspresja mRNA genów *IL-1β* (interleukiny-1)oraz *IL-6* (interleukiny-6) w hodowli VICs pod wpływem stymulacji TNF-α 10 ng/ml oraz po preinkubacji z atorwastatyną (A) w stężeniu 1 µM lub rozuwastatyną (R) w stężeniu 0,1 µM z dodatkiem lub bez mewalonianu (M) w stężeniu 10 µM; *p <0,001, #p <0,001 (* wskazuje na różnice w stosunku do grupy po stymulacji TNF-α; # wskazuje na różnice w stosunku do grupy kontrolnej - CTR).

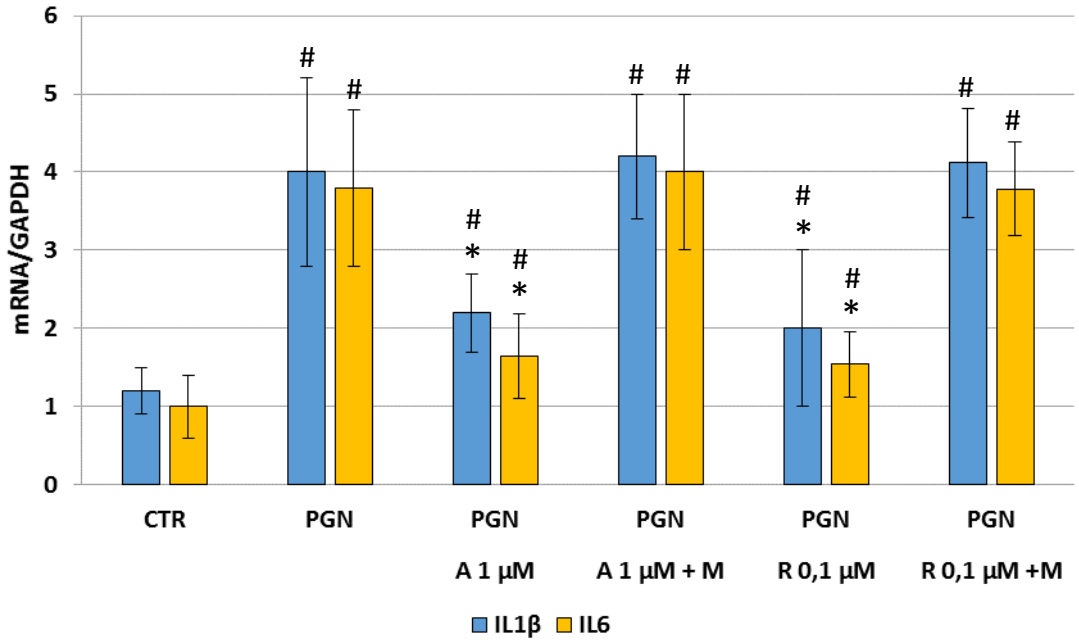
Stymulacja PGN

W przypadku stężenia 10 µg/ml PGN odnotowano 3,3-krotny wzrost ekspresji mRNA genu *IL-1β* oraz 3,8-krotny genu *IL-6* w stosunku do grupy kontrolnej (p <0,001 dla obu porównań).

Najniższe stężenia statyn nie spowodowały istotnej zmiany ekspresji mRNA badanych genów. Wyższe stężenia atorwastatyny tj. 1 i 10 µM zahamowały ekspresję mRNA zarówno genu *IL-1β* jak i *IL-6* (o odpowiednio 45% i 72% dla *IL-1β* oraz 57%

i 70% dla *IL-6*, p <0,001 dla wszystkich porównań). W przypadku zastosowania rozuwastatyny w stężeniach 0,1 µM i 1 µM obniżenie ekspresji mRNA genów *IL-1β* i *IL-6* wynosiło odpowiednio 50% i 75% dla *IL-1β* oraz 59% i 76% dla IL-6 (p <0,001 dla wszystkich powtórzeń).

Dodanie mewalonianiu w stężeniu 10 µM wraz z atorwastatyną lub rozuwastatyną do hodowli VICs całkowicie zniosło hamujący wpływ statyn na poziom ekspresji mRNA genów *IL-1β* i *IL-6* indukowany stymulacją TNF-α niezależnie od stężenia statyny (Rycina 12).



Rycina 12. Wykres ekspresji mRNA genów *IL-1β* (interleukiny 1) oraz *IL-6* (interleukiny 6) w hodowli VICs pod wpływem stymulacji PGN 10 µg/ml oraz preinkubacji z atorwastatyną (A) w stężeniu 1 µM lub rozuwastatyną (R) w stężeniu 0,1 µM z dodatkiem lub bez mewalonianu (M) 10 µM.*p <0,001, #p <0,001 (* wskazuje na różnice w stosunku do grupy po stymulacji PGN; # wskazuje na różnice w stosunku do hodowli kontrolnej - CTR).

Stymulacja LPS

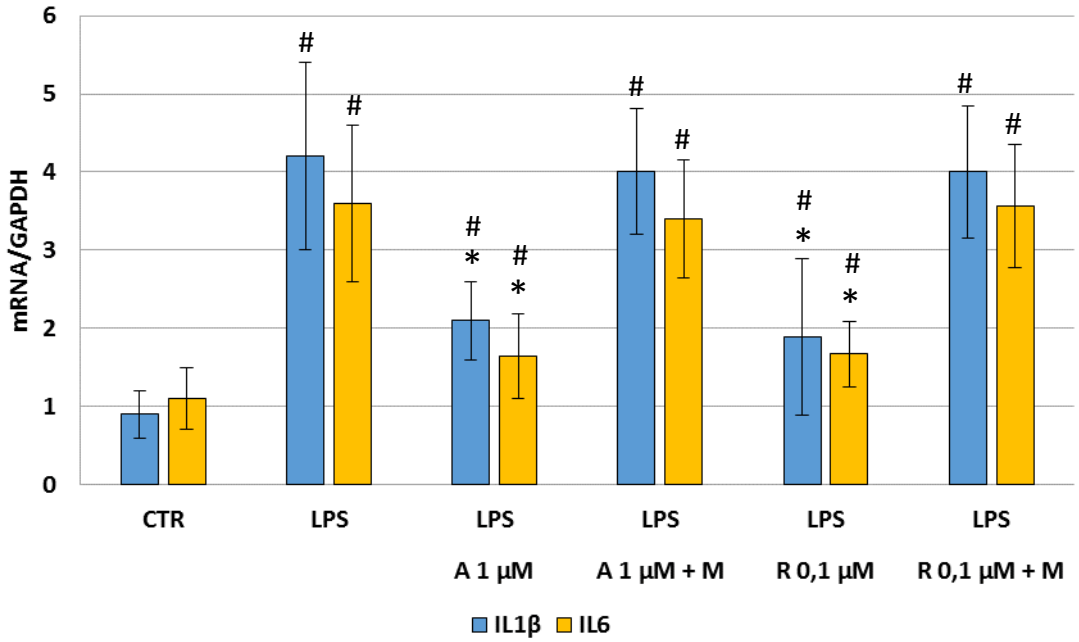
LPS w stężeniu 200 ng/ml spowodował 4,6-krotny wzrost ekspresji mRNA genu *IL-1β* oraz 3,3-krotny wzrost ekspresji genu *IL-6* w stosunku do grupy kontrolnej (p <0,001 dla obu porównań). Najmniejsze stężenia atorwastatyny (0,1 µM) oraz rozu-

wastatyny (0,01 µM) nie wywołały istotnej zmiany w ekspresji mRNA *IL-1β* oraz *IL-6* po stymulacji hodowli VICs LPS-em.

Preinkubacja VICs z 1 µM i 10 µM atorwastatyny zahamowała ekspresję mRNA genu *IL-1β* (odpowiednio o 45% i 72%), jak również genu *IL-6* (o odpowiednio 54% i 68%; p <0,001 dla wszystkich porównań).

Zastosowanie rozuwastatyny w stężeniach 0,1 µM i 1 µM zahamowało ekspresję mRNA dla *IL-1β* o odpowiednio 50% i 77%, a dla *IL-6* o odpowiednio 53% i 71% (p <0,001 dla wszystkich porównań).

Dodanie mewalonianiu w stężeniu 10 µM wraz z atorwastatyną lub rozuwastatyną do hodowli VICs całkowicie zniosło hamujący wpływ statyn na poziom ekspresji mRNA genów *IL-1β* i *IL-6* indukowany stymulacją TNF-α niezależnie od stężenia statyny. (Rycina 13).



Rycina 13. Wykres ekspresji mRNA genów *IL-1β* (interleukiny 1) oraz *IL-6* (interleukiny 6) w hodowli VICs pod wpływem stymulacji LPS 200 ng/ml oraz preinkubacji z atorwastatyną (A) w stężeniu 1 µM lub rozuwastatyną (R) w stężeniu 0,1 µM z dodatkiem lub bez mewalonianu (M) 10µM. *p <0,001, #p <0,001 (* wskazuje na różnice w stosunku do grupy po stymulacji LPS; # wskazuje na różnice w stosunku do hodowli kontrolnej - CTR).

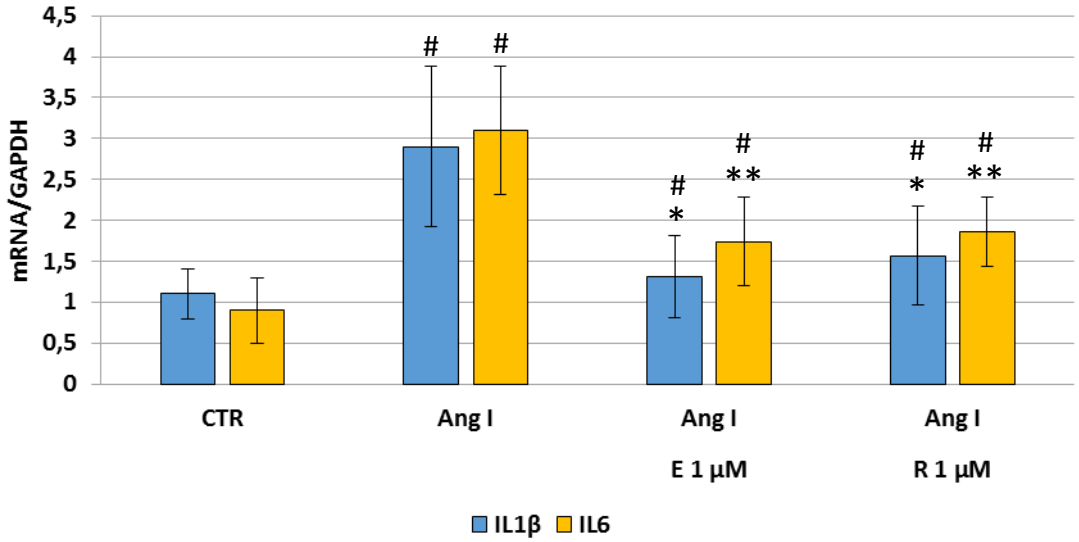
Podsumowując, wszystkie zastosowane czynniki prozapalne zwiększyły ekspresję mRNA genów *IL-1β* i *IL-6* na podobnym poziomie. Najmniejsze stężenia atorwastatyny (0,1 μM) i rozuwastatyny (0,01 μM) nie zahamowały wzrostu ekspresji badanych genów po stymulacji TNF-α, PGN czy LPS. Dziesięciokrotne zwiększenie stężenia leku (odpowiednio 1 μM dla atorwastatyny oraz 0,1 μM dla rozuwastatyny) zmniejszyło ekspresję *IL-1β* i *IL-6* średnio o ok. 55%. Kolejne dziesięciokrotne zwiększenie stężenia do 10 μM atorwastatyny oraz 1 μM rozuwastatyny zahamowało ekspresję genów *IL-1β* oraz *IL-6* w badanych hodowlach *in vitro* (średnio o ok. 75% w porównaniu do grupy po stymulacji).

4.3.1.2 ACEI i antagonista receptora AT_1

Stymulacja AngI

AngI w stężeniu 1 μM spowodowała 2,9-krotny wzrost ekspresji mRNA genu *IL-1β* oraz 3,1-krotny wzrost ekspresji mRNA genu *IL-6* w stosunku do grupy kontrolnej ($p < 0{,}001$ dla obu porównań).

Zastosowanie inhibitorów angiotensyny enalaprilu oraz ramiprilu w stężeniu 0,1 μM nie wpłynęło istotnie na ekspresję mRNA badanych genów. Większe stężenie enalaprilu i ramiprilu (1 μM) zahamowało ekspresję mRNA genu *IL-1β* o odpowiednio 55% i 46%, a genu *IL-6* o odpowiednio 44% i 40% ($p < 0{,}001$ dla wszystkich porównań). Enalapril i ramipril w stężeniu 10 μM zahamowały ekspresję mRNA genu *IL-1β* odpowiednio o 66% oraz 69% i genu *IL-6* o odpowiednio 60% oraz 64% ($p < 0{,}001$ dla wszystkich porównań) (Rycina 14).

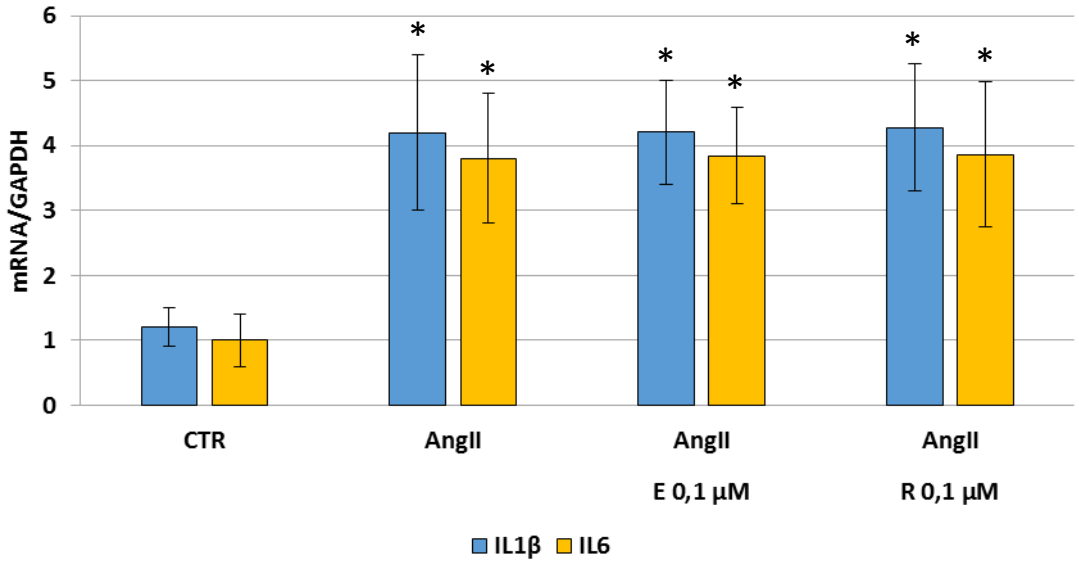


Rycina 14. Wykres ekspresji mRNA genów *IL-1β* (interleukiny 1) oraz *IL-6* (interleukiny 6) w hodowli VICs pod wpływem stymulacji AngI 1 µM (angiotensyną I) oraz preinkubacji z enalaprilem (E) w stężeniu 1 µM lub ramiprilem (R) w stężeniu 1 µM oraz kandesartanem (K) 10 µM. *p <0,05; **p <0,001, #p <0,001 (* wskazuje na różnice w stosunku do grupy po stymulacji AngI; # wskazuje na różnice w stosunku do hodowli kontrolnej - CTR).

Stymulacja AngII

Użycie AngII w stężeniu 1 µM spowodowało 3,5-krotny wzrost ekspresji mRNA genu *IL-1β* oraz 3,8-krotny wzrost ekspresji mRNA genu *IL-6* w stosunku do grupy kontrolnej (p <0,001 dla wszystkich porównań).

Dodatek kandesartanu (10 µM) do hodowli VICs zamiast ACEI 4-krotnie zmniejszył ekspresję mRNA genu *IL-1β* oraz 3,8-krotne zmniejszył ekspresję mRNA genu *IL-6* w stosunku do ekspresji po stymulacji AngII (p <0,001 dla wszystkich porównań) (Rycina 15).



Rycina 15. Wykres ekspresji mRNA genów *IL-1β* (interleukiny 1) oraz *IL-6* (interleukiny 6) w hodowli VICs pod wpływem stymulacji AngII 1 µM (angiotensyną I) oraz preinkubacji z enalaprilem (E) w stężeniu 1 µM lub ramiprilem (R) w stężeniu 1 µM oraz kandesartanem (K) 10 µM. *p <0,05 w stosunku do hodowli kontrolnej - CTR.

Podsumowując, przy stężeniu 1 µM AngI oraz AngII w hodowlach VICs, silniejszą odpowiedź prozapalną zaobserwowano po stymulacji AngII (p=0,01). Zastosowanie leków z grupy ACEI (enalapril oraz ramipril) w najniższym stężeniu (0,1 µM) nie zmniejszyło ekspresji mRNA genów *IL-1β* oraz *IL-6*. Dziesięciokrotnie wyższe stężenie enalaprilu i ramiprilu częściowo zahamowało ekspresję badanych genów średnio o ok. 45%. Zastosowanie stężenia 10 µM przyczyniło się do zahamowania ekspresji mRNA genów *IL-1β* oraz *IL-6* średnio o 65%.

Zablokowanie receptora AT_1 przez kandesartan całkowicie zahamowało ekspresję mRNA genów *IL-1β* i *IL-6* po stymulacji AngII.

4.3.2 Kalcyfikacja

4.3.2.1 Statyny

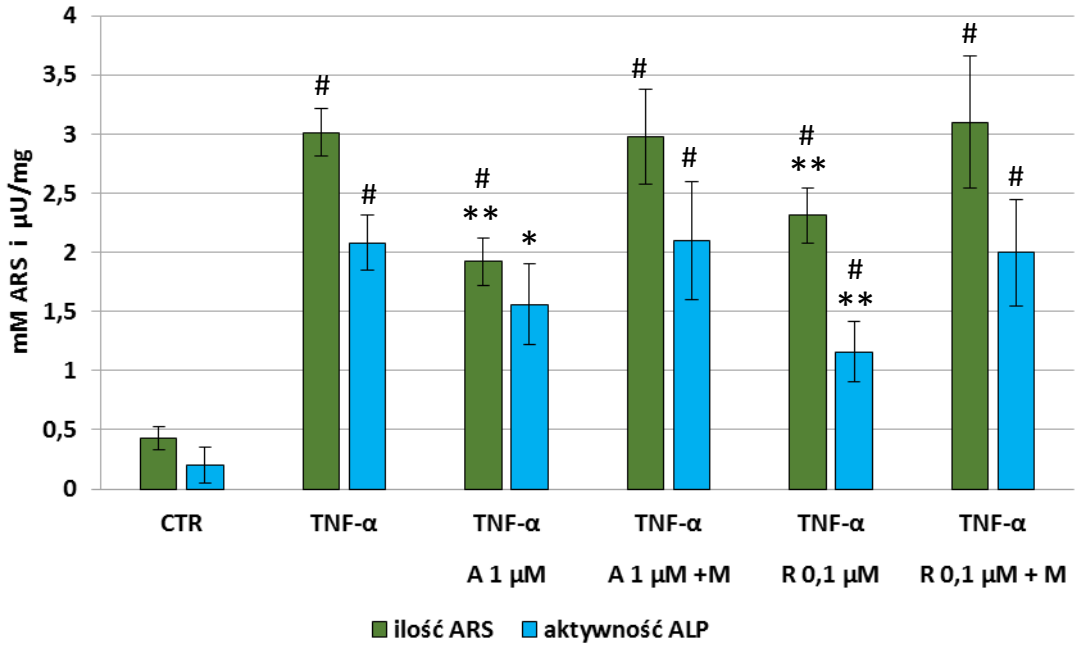
Stymulacja TNF-α

Stymulacja hodowli VICs przez 10 ng/ml TNF-α spowodowała 10-krotny wzrost kalcyfikacji proporcjonalnej do ilości jonów Ca^{2+} związanych z ARS oraz 7,5-krotny wzrost aktywności ALP w stosunku do grupy kontrolnej ($p < 0,001$ dla wszystkich porównań).

Zastosowanie atorwastatyny i rozuwastatyny w najniższych stężeniach nie zahamowało procesu kalcyfikacji. Po zastosowaniu większych stężeń atorwastatyny i rozuwastatyny zaobserwowano dawko-zależne zmniejszenie ilości jonów Ca^{2+} związanych z ARS i aktywności ALP. Dodanie do hodowli atorwastatyny w stężeniu 1 μM i 10 μM wpłynęło na zmniejszenie ilości jonów Ca^{2+} związanych z ARS odpowiednio o 25% i 85% ($p < 0,001$ dla obu porównań) oraz zahamowało aktywność ALP odpowiednio o 38% ($p < 0,01$) i 74% ($p < 0,001$).

Rozuwastatyna w stężeniach 0,1 μM, jak i 1 μM zmniejszyła ilość jonów Ca^{2+} związanych z ARS o 42% dla obu stężeń ($p < 0,001$) jak również zahamowała aktywność ALP o odpowiednio 23% i 87% ($p < 0,001$ dla obu porównań)

Dodanie mewalonianiu w stężeniu 10 μM wraz z atorwastatyną lub rozuwastatyną do hodowli VICs zniosło hamujący wpływ statyn na kalcyfikację komórek. Ilość jonów Ca^{2+} związanych z ARS oraz aktywność ALP pozostawały na takim samym poziomie, jak w przypadku hodowli stymulowanej TNF-α bez dodatku statyn. (Rycina 16).



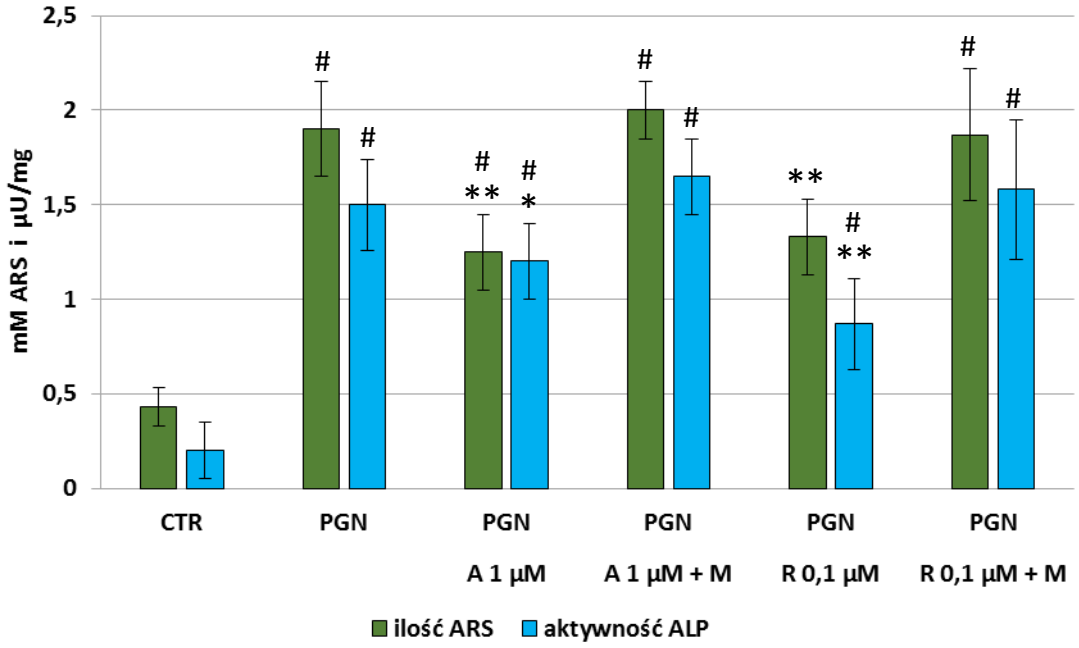
Rycina 16 Wykres pomiaru ilości jonów $Ca2^{+}$ związanych z czerwienią alizarynową (ARS) oraz aktywności fosfatazy alkalicznej (ALP) w hodowli VICs pod wpływem stymulacji TNF-α 10 ng/ml oraz preinkubacji z atorwastatyną (A) w stężeniu 1 µM lub rozuwastatyną (R) w stężeniu 0,1 µM z dodatkiem lub bez mewalonianu (M) w stężeniu 10 µM. *p <0,01; **p <0,001, #p <0,001 (* wskazuje na różnice w stosunku do grupy po stymulacji TNF-α; # wskazuje na różnice w stosunku do hodowli kontrolnej - CTR).

Stymulacja PGN

Stymulacja 10 µg/ml PGN komórek VICs spowodowała 4,4-krotny wzrost ilości jonów Ca^{2+} związanych z ARS oraz 7,5-krotny wzrost aktywności ALP w stosunku do grupy kontrolnej (p <0,001 dla wszystkich porównań). Dodanie statyn w najniższych stężeniach: 0,1 µM atorwastatyny i 0,01 µM rozuwastatyny nie miało wpływu na kalcyfikację. Większe stężenia statyn zmniejszyły ilości jonów Ca^{2+} związanych z ARS i zahamowały aktywność ALP stymulowaną PGN. W przypadku atorwastatyny kalcyfikacja komórek zmniejszyła się o 34% dla dawki 1 µM (p <0,01) oraz 74% dla dawki 10 µM (p <0,01). Obserwowano również spadek o 20% aktywności ALP dla 1 µM atorwastatyny (p=0,03) oraz o 84% dla 10 µM atorwastatyny (p <0,001). Zmniejszenie ilości jonów Ca^{2+} związanych z ARS dla dawki 0,1 µM i 1 µM rozuwastatyny wynosiło odpowiednio 30% i 87% (p <0,001 dla obu porównań). Zahamowanie aktywności ALP

wynosiło odpowiednio 42% dla 0,1 µM oraz 87% dla 10 µM rozuwastatyny (p <0,001 dla wszystkich porównań).

Dodanie mewalonianiu w stężeniu 10 µM wraz z wyższymi stężeniami statyn zniosło hamujący wpływ statyn na kalcyfikację. Ilość jonów Ca2+ związanych z ARS oraz aktywność ALP pozostawały na takim samym poziomie jak w przypadku hodowli VICs stymulowanej PGN bez dodatku statyn (Rycina 17).



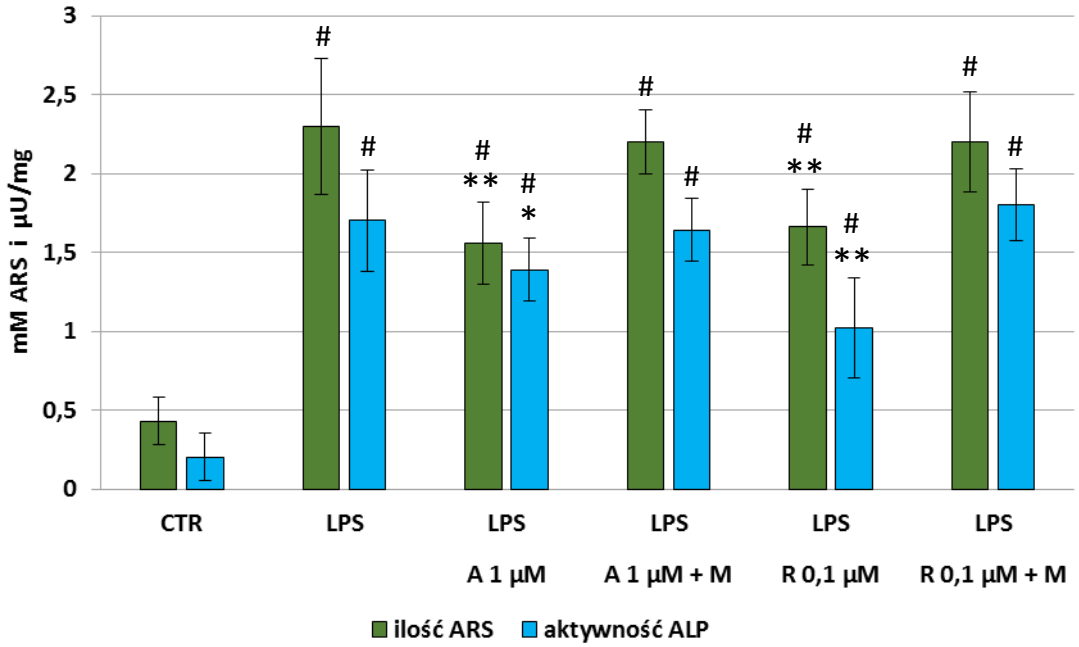
Rycina 17. Wykres pomiaru mM ARS oraz aktywności ALP w hodowli VICs pod wpływem stymulacji PGN 10 µg/ml oraz preinkubacji z atorwastatyną (A) w stężeniu 1 µM lub rozuwastatyną (R) w stężeniu 0,1 µM z dodatkiem lub bez mewalonianu (M) 10 µM. *p <0,01, **p <0,001 #p <0,001 (* wskazuje na różnice w stosunku do grupy po stymulacji PGN; # wskazuje na różnice w stosunku do hodowli kontrolnej - CTR)

Stymulacja LPS

Stymulacja hodowli VICs przy użyciu 200 ng/ml LPS zwiększyła 5,3-krotnie ilość jonów Ca^{2+} związanych z ARS oraz 8,5-krotnie aktywność ALP w stosunku do grupy kontrolnej (p <0,001 dla wszystkich porównań). Preinkubacja hodowli z atorwastatyną w stężeniu 0,1 µM i rozuwastatyną w stężeniu 0,01 µM nie miała wpływu na kalcyfikację VICs. Atorwastatyna w stężeniu 1 µM i 10 µM zmniejszyła ilość jonów

Ca^{2+} związanych z ARS o odpowiednio 32% i 70% (p <0,001 w obu porównaniach). Spadek aktywności ALP wynosił odpowiednio 18% dla 1 µM atorwastatyny (p=0,03) oraz 77% dla 10 µM atorwastatyny (p <0,001). Rozuwastatyna w stężeniu 0,1 µM i 1 µM zmniejszyła ilość jonów Ca^{2+} związanych z ARS odpowiednio o 28% i 80% (p <0,001 dla wszystkich porównań). Zahamowanie aktywności ALP wynosiło odpowiednio 40% dla 0,1 µM oraz 88% dla 10 µM rozuwastatyny (p <0,001 dla wszystkich porównań).

Dodanie mewalonianiu w stężeniu 10 µM wraz z wyższymi stężeniami statyn zniosło hamujący wpływ statyn na kalcyfikację. Ilość jonów Ca^{2+} związanych z ARS oraz aktywność ALP pozostawały na takim samym poziomie jak w przypadku hodowli stymulowanej LPS bez dodatku statyn (Rycina 18).



Rycina 18. Wykres pomiaru mM ARS oraz aktywności ALP w hodowli VICs pod wpływem stymulacji LPS 10 µg/ml oraz preinkubacji z atorwastatyną (A) w stężeniu 1 µM lub rozuwastatyną (R) w stężeniu 0,1 µM z dodatkiem lub bez mewalonianu (M) 10 µM. *p <0,05; **p <0,001, #p <0,001 (* wskazuje na różnice w stosunku do grupy po stymulacji LPS; # wskazuje na różnice w stosunku do hodowli kontrolnej - CTR)

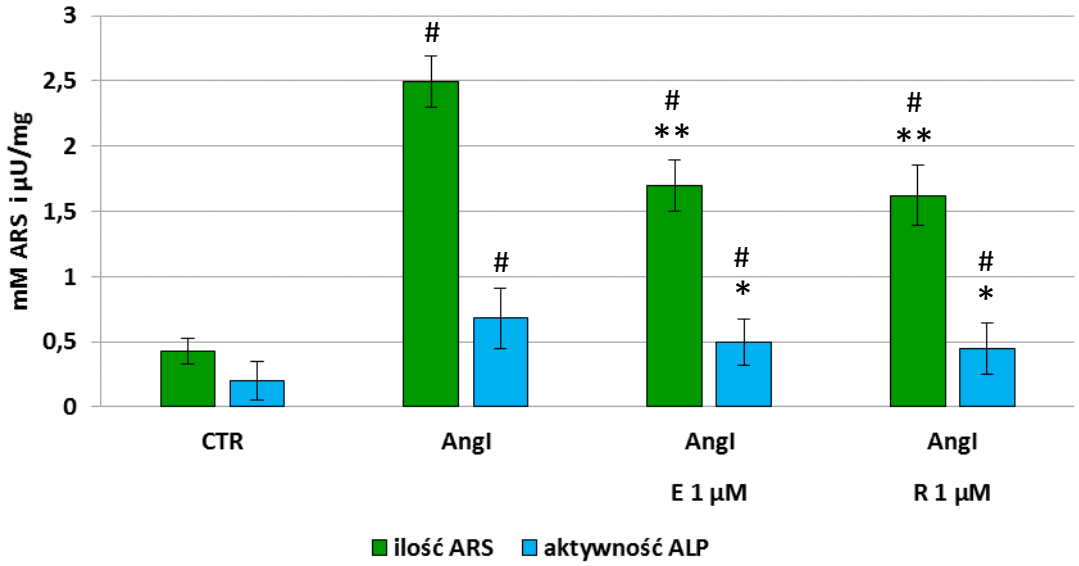
Podsumowując, najsilniejszy efekt stymulujący kalcyfikację zaobserwowano w przypadku TNF-α 10 ng/ml w porównaniu do PGN i LPS ($p < 0,01$). Zastosowanie statyn w najmniejszych stężeniach (0,1 μM atorwastatyny i 0,01 μM rozuwastatyny) nie zmieniło aktywności ALP oraz ilości jonów Ca^{2+} związanych z ARS. Dziesięciokrotne zwiększenie dawki statyn wpłynęło na zmniejszenie kalcyfikacji VICs średnio o 35%. Zastosowanie najwyższych dawek atorwastatyny i rozuwastatyny (odpowiednio 10 μM i 1 μM) zahamowało kalcyfikacją komórek średnio o 80%.

4.3.2.2 ACEI i antagonista receptora AT_1

Stymulacja AngI

Po stymulacji hodowli VICs przy użyciu AngI w stężeniu 1 μM odnotowano 5,8-krotny wzrost ilości związanej ARS oraz 3,4-krotny wzrost aktywności ALP w stosunku do grupy kontrolnej ($p < 0,001$ dla wszystkich porównań).

Zastosowanie inhibitorów konwertazy angiotensyny enalaprilu oraz ramiprilu w dawce 0,01 μM nie zmieniło ilości jonów Ca^{2+} związanych z ARS oraz aktywności ALP. Zwiększenie dawki enalaprilu i ramiprilu do 0,1 μM zmniejszyło ilość jonów Ca^{2+} związanych z ARS odpowiednio o 32% i 35% ($p < 0,01$ dla wszystkich porównań) oraz zahamowało aktywność ALP o odpowiednio 27% i 34% ($p < 0,05$ dla wszystkich porównań). Zwiększenie dawki enalaprilu i ramiprilu do 1 μM zahamowało ilość jonów Ca^{2+} związanych z ARS o odpowiednio 78% i 76% oraz obniżyło aktywność ALP o odpowiednio 67% i 72% ($p < 0,001$ dla wszystkich porównań) (Rycina 19).



Rycina 19. Wykres ilości ARS oraz aktywności w hodowli VICs pod wpływem stymulacji AngI 1 µM (angiotensyną I) oraz preinkubacji z enalaprilem (E) w stężeniu 1µM lub ramiprilem (R) w stężeniu 1µM oraz kandesartanem (K) 10µM. *p <0,05; **p <0,01;, # p <0,001 (* wskazuje na różnice w stosunku do grupy po stymulacji AngI; # wskazuje na różnice w stosunku do hodowli kontrolnej - CTR).

Stymulacja AngII

Po stymulacji hodowli AngII w stężeniu 1µM odnotowano 8,3-krotny wzrost ilości jonów Ca^{2+} związanych z ARS oraz 4,5-krotny wzrost aktywności ALP (p <0,001 w obu przypadkach).

Zablokowanie receptora AT_1 przez kandesartan w stężeniu 10 µM całkowicie zahamowało kalcyfikację VICs.

Podsumowując, w przypadku równych stężeń AngI oraz AngII silniejszy efekt kalcyfikacji obserwuje się w hodowli VICs stymulowanej AngII. Enalapril oraz ramipril w stężeniu 0,1 µM nie zahamowały aktywności ALP oraz nie zmniejszyły ilości jonów Ca^{2+} związanych z ARS w hodowli *in vitro*. Wyższe stężenia leków z grupy ACEI, 1 µM oraz 10 µM, zmniejszyły aktywność ALP i ilość jonów Ca^{2+} związanych z ARS średnio o 50% w przypadku stymulacji AngI. Natomiast zablokowanie receptora AT_1 przez kandesartan całkowicie zahamowało kalcyfikację hodowli VICs.

4.3.3 Ekspresja czynników krzepnięcia i receptorów PAR

4.3.3.1 Statyny

Stymulacja TNF-α – analiza immunofluorescencyjna hodowli VICs

Analiza immunohistochemiczna kontrolnych hodowli VICs wykazała obecność antygenów TF, FX, PAR1 i PAR2. TF zajmował średnio 1,2 ± 0,4% powierzchni preparatu, FX – 3,4 ± 0,6% a PAR1 i PAR2 odpowiednio 0,8 ± 0,4% i 1,6 ± 0,5%. Nie stwierdzono ekspresji FVII i FXI w hodowli VICs.

Po stymulacji hodowli przez TNF-α (o stężeniu 10 ng/ml) zaobserwowano zwiększenie immunopozytywnej powierzchni hodowli dla TF w porównaniu do kontroli (3,2 ± 0,8% vs. 1,2 ± 0,4%, p <0,01). Podobnego zjawiska nie zaobserwowano w przypadku FX, PAR1 i PAR-2, których poziom po stymulacji TNF-α nie zmienił się.

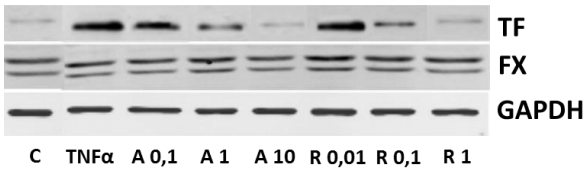
Dodanie większych stężeń statyn do hodowli VICs (1 μM atorwastatyny oraz 0,1 μM rozuwastatyny) zmniejszyło powierzchnię immunopozytywną dla TF, odpowiednio o 1,2 ± 0,4% oraz 1,4 ± 0,5%, w porównaniu do tej po stymulacji (p <0,01 dla wszystkich porównań) ale nie wpłynęło na wielkość obszaru immunopozytywnego dla FX i PAR1 i 2.

Dodanie mewalonianiu w stężeniu 10 μM wraz z 1 μM atorwastatyny oraz 0,1 μM rozuwastatyny zniosło hamujący wpływ statyn na produkcję TF przez VICs i zwiększyło powierzchnię immunopozytywną do poziomu obserwowanego po stymulacji TNF-α (odpowiednio o 3,0 ± 0,5% oraz 2,8 ± 0,6% w porównaniu do tej po statynach, p <0,01 dla wszystkich porównań).

Stymulacja TNF-α – analiza Western blot

Analiza densytometryczna prążków znormalizowanych względem genu metabolizmu podstawowego (GAPDH) wykazała wzrost ekspresji TF po stymulacji TNF-α w stosunku do kontroli (54,2 ± 11% vs. 3,0 ± 1,2, p=0,01). Dodanie atorwastatyny lub rozuwastatyny spowodowało dawko-zależne obniżenie ekspresji TF (odpowiednio o 51,5 ± 9,2%, p=0,01 dla dawki 1 μM oraz o 73,1 ± 11,9%, p=0,01 dla dawki 10 μM atorwastatyny i o 54,8 ± 15,3%, p=0,01 dla dawki 0,1 μM oraz 69,2 ± 8,7%, dla dawki

1 μM rozuwastatyny). Zarówno atorwastatyna jak i rozuwastatyna w najniższych dawkach nie miały wpływu na ekspresję TF (Rycina 20).



Rycina 20. Reprezentatywny immunoblot z 3 eksperymentów pokazujący ekspresję TF (37 kDa) i FX (55 kDa) w lizatach komórkowych VICs w grupie kontrolnej (C) i po stymulacji TNF-α (o stężeniu 10 ng/ml) z atorwastatyną (A, w stężeniach 0,1; 1 i 10 μM) lub rozuwastatyną (R, 0,01; 0,1 i 1 μM). Poziom ekspresji badanych białek został znormalizowany względem genu metabolizmu podstawowego (GAPDH).

Stymulacja TNF-α jak również preinkubacja z atorwastatyną lub rozuwastatyną nie miały wpływu na ekspresję FX, która utrzymywała się na poziomie kontroli.

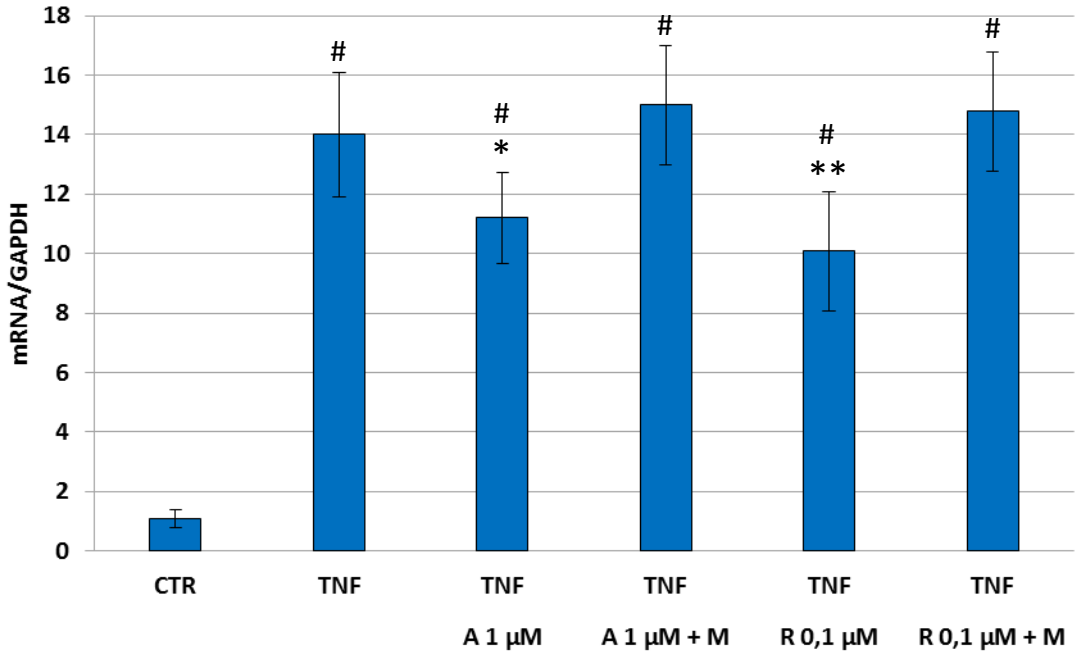
Stymulacja TNF-α – analiza ekspresji mRNA

Po stymulacji hodowli VICs przy użyciu TNF-α 10 ng/ml zaobserwowano 12,7-krotny wzrost ekspresji mRNA genu *F3* ($p < 0{,}001$), natomiast nie zaobserwowano zmiany w poziomie ekspresji mRNA dla genów *F10, F2R i F2RL1*.

Preinkubacja hodowli komórkowej z 0,1 μM atorwastatyny lub 0,01 μM rozuwastatyny nie zmieniła ekspresji *F3*.

Zastosowanie atorwastatyny w stężeniu 1 μM oraz 10 μM obniżyło ekspresję genu *F3* odpowiednio o 20% ($p < 0{,}05$) i 93% ($p < 0{,}001$). Zastosowanie wyższych stężeń rozuwastatyny: 0,1 μM i 1 μM, obniżyło ekspresję genu *F3* odpowiednio o 28% ($p < 0{,}01$) i 93% ($p < 0{,}001$).

Dodanie mewalonianiu w stężeniu 10 μM wraz z atorwastatyną lub rozuwastatyną zniosło hamujący wpływ statyn na poziom ekspresji mRNA dla *F3* niezależnie od dawki statyn (Rycina 21).



Rycina 21. Wykres ekspresji mRNA genu *F3* (czynnik tkankowy) w hodowli VICs pod wpływem stymulacji TNF-α 10 ng/ml oraz preinkubacji z atorwastatyną (A) w stężeniu 1µM lub rozuwastatyną (R) w stężeniu 1µM z dodatkiem lub bez mewalonianu (M) 10µM. *p <0,05; **p <0,01, #p <0,001 (* wskazuje na różnice w stosunku do grupy po stymulacji TNF-α; # wskazuje na różnice w stosunku do hodowli kontrolnej - CTR)

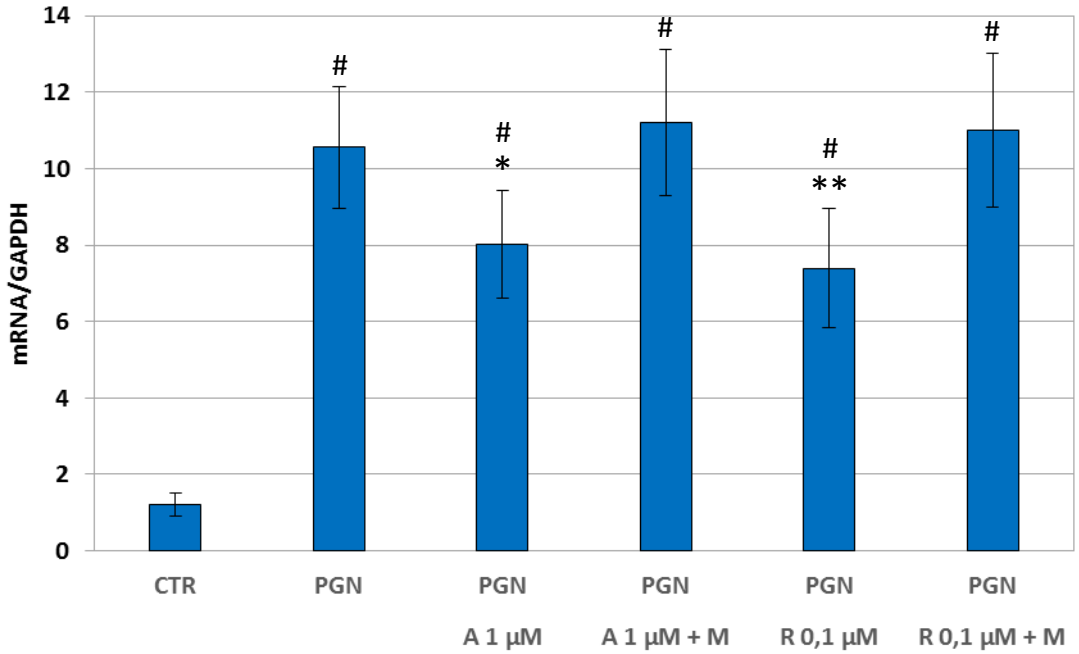
Stymulacja PGN

Stymulacja VICs przy użyciu PGN w stężeniu 10 µg/ml spowodowała 8,8-krotny wzrost ekspresji mRNA dla genu *F3* w stosunku do grupy kontrolnej (p <0,001), ale nie zmieniła poziomu ekspresji pozostałych badanych genów (*FX, F2R, F2RL1).*

Preinkubacja z atorwastatyną w stężeniu 0,1 µM oraz rozuwastatyną w stężeniu 0,01 µM nie wpłynęła na ekspresję mRNA genu *F3*.

Wyższe stężenia atorwastatyny 1 µM oraz 10 µM zahamowały ekspresję mRNA genu *F3* odpowiednio o 24% (p <0,05) i 89% (p <0,001). Zastosowanie rozuwastatyny w stężeniach 0,1 µM i 1 µM obniżyło ekspresję *F3* odpowiednio o 30% (p <0,01) i 89% (p <0,01 dla wszystkich porównań).

Dodanie mewalonianiu w stężeniu 10 µM wraz z atorwastatyną lub rozuwastatyną zniosło hamujący wpływ statyn na poziom ekspresji mRNA genu *F3*, która nie różniła się od poziomu w grupie po stymulacji PGN (Rycina 22).



Rycina 22. Wykres ekspresji mRNA genu F3 (czynnik tkankowy) w hodowli VICs pod wpływem stymulacji PGN 10 µg/ml oraz preinkubacji z atorwastatyną (A) w stężeniu 1µM lub rozuwastatyną (R) w stężeniu 1µM z dodatkiem lub bez mewalonianu (M) 10µM. *p <0,05; **p <0,01, #p <0,001 (* wskazuje na różnice w stosunku do grupy po stymulacji TNF-α; # wskazuje na różnice w stosunku do hodowli kontrolnej - CTR)

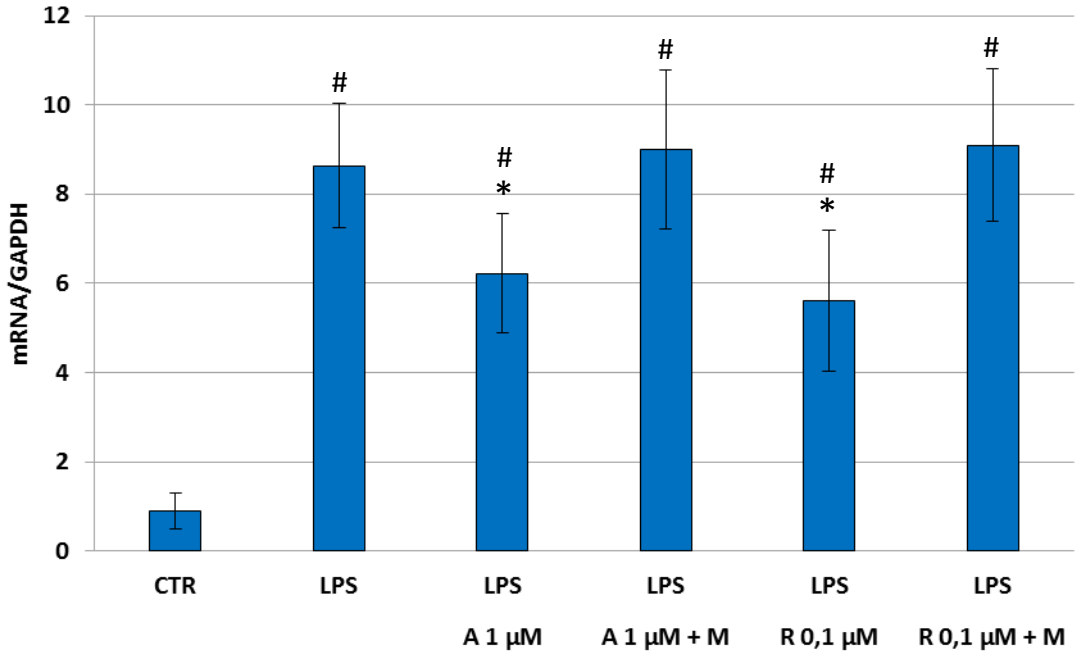
Stymulacja LPS

Stymulacja VICs przy użyciu LPS w stężeniu 200 ng/ml spowodowała 9,6-krotny wzrost ekspresji mRNA genu *F3 (*p <0,001), natomiast nie odnotowano zmiany poziomu ekspresji genów *F10, F2R* oraz *F2RL1*.

Najmniejsze stosowane stężenia atorwastatyny (0,1µM) oraz rozuwastatyny (0,01µM) nie wpłynęły na ekspresję mRNA genu *F3*.

Zastosowanie większych dawek atorwastatyny, odpowiednio 1 µM i 10 µM zahamowało ekspresję mRNA genu *F3* odpowiednio o 28% oraz o 72% (p <0,001 dla wszystkich porównań). Zastosowanie rozuwastatyny w stężeniach 0,1 µM i 1 µM zahamowało ekspresję mRNA genu *F3* odpowiednio o 35% i 91% (p <0,001 dla wszystkich porównań). Dodanie mewalonianu (10 µM) wraz z atorwastatyną lub rozuwastaty-

ną zniosło hamującego wpływ statyn na poziom ekspresji mRNA genu *F3* niezależnie od dawki statyn. (Rycina 23).



Rycina 23. Wykres ekspresji mRNA genu F3 (czynnik tkankowy) w hodowli VICs pod wpływem stymulacji LPS 200 ng/ml oraz preinkubacji z atorwastatyną (A) w stężeniu 1µM lub rozuwastatyną (R) w stężeniu 1µM z dodatkiem lub bez mewalonianu (M) 10µM. *p <0,001, #p <0,001 (* wskazuje na różnice w stosunku do grupy po stymulacji LPS; # wskazuje na różnice w stosunku do hodowli kontrolnej)

Podsumowując, najsilniejszy wzrost ekspresji mRNA genu *F3* zaobserwowano w przypadku stymulacji hodowli TNF-α w dawce 10 ng/ml w porównaniu do LPS 200 ng/ml i PGN 10 µg/ml (p=0,01). Najmniejsze zastosowane dawki statyn nie wpłynęły na poziom ekspresji mRNA genu *F3*. Atorwastatyna w stężeniu 1 µM oraz rozuwastatyna 0,1 µM zahamowały ekspresję mRNA genu *F3* średnio o ok. 30%. Dziesięciokrotnie wyższe stężenia statyn zahamowały ekspresję mRNA *F3* średnio o 88% w hodowli VICs.

4.3.3.2 Ang I i AngII

Stymulacja hodowli VICs zarówno Ang I jak i Ang II we wszystkich badanych dawkach nie miała wpływu na poziom ekspresji mRNA genów *F3, F10, F2R, F2RL1*.

4.3.4 Neowaskularyzacja

Stymulacja TNF-α, PGN oraz LPS

Stymulacja VICs przy użyciu TNF-α, PGN oraz LPS oraz Ang I jak i Ang II we wszystkich badanych dawkach nie wpłynęła na poziom ekspresji mRNA genu *VEGF*.

5. Dyskusja

Niniejsza praca podejmuje próbę oceny wpływu statyn, inhibitorów konwertazy angiotensyny (ACEI) i antagonistów receptora angiotensyny II, typu 1 (ARB) na zapalenie, kalcyfikację, ekspresję czynników krzepnięcia i neowaskularyzację przez VICs. Komórki te są w głównej mierze odpowiedzialne za zwapnienia w obrębie płatków zastawki aortalnej. Jednym z głównych czynników predysponujących do AS jest podwyższony poziom cholesterolu we krwi [5]. Uwzględniając podobne mechanizmy biorące udział w rozwoju miażdżycy tętnic wieńcowych i AS przypuszczano, że statyny, leki stosowane obecnie w leczeniu choroby wieńcowej mogą się okazać skuteczne również w hamowaniu progresji AS, jednak nie zostało to potwierdzone w badaniach klinicznych [117-119, 205]. Kolejnym czynnikiem istotnym w rozwoju AS jest podwyższone ciśnienie krwi, które prowadzi do wzrostu gradientów przezzastawkowych, zwiększenia sił ścinających, uszkodzenia śródbłonka i nasilenia kalcyfikacji w obrębie zastawki aortalnej [2, 3]. Stwierdzono większą ekspresję konwertazy angiotensyny (ACE) oraz angiotensyny II (AngII) w płatkach zwapniałych zastawek aortalnych w porównaniu z zastawkami niezwapniałymi sugerując, że ACEI oraz ARB mogą znaleźć zastosowanie w hamowaniu progresji AS [206]. Jednak wpływ w/w klas leków na założone mechanizmy leżące u podstaw AS nie był badany dotąd z równoczesnym uwzględnieniem kilku procesów o kluczowych znaczeniach.

5.1 Statyny

Zastosowane w niniejszej pracy stężenia TNF-α 10 ng/ml, PGN 10 µg/ml lub LPS 200 ng/ml indukowały odpowiedź prozapalną, wyrażoną jako ekspresja mRNA *IL-1β* i *IL-6*, kalcyfikację oraz ekspresję TF zarówno na poziomie mRNA (*F3*) jak i antygenu. Takie samo stężenie TNF-α zastosowali w swoich doświadczeniach Ding i wsp. [198], którzy zaobserwowali wzrost aktywności ALP oraz mineralizacji w hodowli ludzkich macierzystych komórek mezenchymalnych. Z kolei PGN w stężeniu 10 µg/ml oraz LPS 200 ng/ml były stosowane przez Meng'a i wsp. [199] oraz Yang'a i wsp. [200], którzy zaobserwowali wzrost czynników prozapalnych IL-6, IL-8 oraz ICAM-1, czynników biorących udział w osteoblastycznej transformacji BMP-2 i Runx2/Cfba1, oraz zwiększenie ilości jader kalcyfikacji i aktywności ALP w stymulowanych hodowlach ludzkich VICs. Zastosowane przez nas niższe stężenia TNF-α 1 ng/ml, PGN 1 µg/ml

i 5 μg/ml oraz LPS 100 ng/ml nie zmieniły ekspresji *IL-1β* i *IL-6* oraz kalcyfikacji w porównaniu z komórkami nie stymulowanymi.

W celu określenia wpływu statyn na zahamowanie odpowiedzi prozapalnej indukowanej TNF, PGN oraz LPS wykorzystano atorwastatynę oraz rozuwastatynę o odmiennych właściwościach farmakodynamicznych i kinetycznych, w trzech różnych stężeniach (odpowiednio 0,1; 1; 10 μM atorwastatyny i 0,01; 0,1; 1 μM rozuwastatyny), dobranych na podstawie danych literaturowych [203, 207, 208]. Przeprowadzone doświadczenia farmakokinetyczne pokazują, że fizjologiczne stężenie atorwastatyny w osoczu u pacjenta przyjmującego dawkę 40 mg/dzień (mg/d) wynosi średnio 0,13 μM, a zwiększenie dawki do 80 mg/d, odpowiednio zwiększa stężenie atorwastatyny do 0,33 μM [209]. W przypadku rozuwastatyny, która ma silniejsze działanie hipolipemizujące [210], maksymalna dawka wynosi 40 mg/d, co odpowiada stężeniu ok. 0,08 μM w surowicy pacjenta [211, 212].

Najniższe stosowane w niniejszej pracy stężenie leku, tj. 0,1 μM atorwastatyny oraz 0,01 μM rozuwastatyny nie zahamowały odpowiedzi prozapalnej po stymulacji TNF-α, PGN oraz LPS. Dodatek do hodowli statyn w stężeniu zbliżonym do stężenia w osoczu krwi u ludzi (1 μM atorwastatyny i 0,1 μM rozuwastatyny) zahamował ekspresję mRNA *IL-1β* oraz *IL-6* o ok. 50%. Dziesięciokrotne zwiększenie stężenia atorwastatyny, do 10 μM i rozuwastatyny do 1 μM zahamowało *IL-1β*, *IL-6* i TF o ok. 80%.

Na podstawie otrzymanych wyników można przypuszczać, że statyny są w stanie przynajmniej częściowo zahamować odpowiedź prozapalną, kalcyfikację i ekspresję TF stymulowanych komórek VICs w stężeniu porównywalnym do poziomu leku we krwi pacjentów przyjmujących statyny. Przy zastosowaniu wyższych stężeń leków zaobserwowano większe zahamowanie badanych procesów związanych z zapaleniem, kalcyfikacją i układem krzepnięcia, jednak nie jest możliwe zastosowanie tak wysokich dawek u pacjentów ze względu na zwiększenie ryzyka wystąpienia działań niepożądanych. Nie jest jasne, dlaczego statyny pomimo swoich właściwości przeciwzapalnych [115-131] nie hamują progresji AS w przeprowadzonych badaniach klinicznych, nawet w przypadku stosowania rozuwastatyny w dawce 40 mg/d. Można przypuszczać, że zapalenie w obrębie zastawek w dużym stopniu jest odporne na działanie przeciwzapalne statyn, a progresja choroby może zależeć od innych czynników, które nie są modyfikowane przez działanie tych leków, np. uszkodzenie śródbłonka poprzez zwiększenie sił ścinających i gradientów przezzastawkowych.

W pracy na dostępnych danych udokumentowano ekspresję TF w ludzkich VICs, co wcześniej nie było udokumentowane w pełnotekstowych doniesieniach. Zjawisko to obserwowano we wszystkich wyizolowanych zastawkach i przygotowanych z nich komórkach. VICs są zatem dodatkowych źródłem TF (obok makrofagów) w zastawkach w AS.

Zainicjowane przez TF powstanie trombiny *in loco* w stenotycznych zastawkach może w dwojaki sposób stymulować progresję AS. Po pierwsze powstanie depozytów fibryny prowadzi do pogorszenia hemodynamicznych parametrów pracy zastawki, ale działa również jako silnie prozapalny czynnik, który nasila naciek makrofagów w zastawce aortalnej [40]. Próby wyjaśnienia wpływu ekspresji TF na proces kalcyfikacji zastawki podjęli Breyne i wsp. [39] wykazując, że trombina produkowana *in loco* w stenotycznych zastawkach aortalnych prowadzi do aktywacji osteopontyny i generacji jej N-terminalnego odcinka o właściwościach prozapalnych. Zaobserwowane w naszej pracy zależne od dawki zahamowanie ekspresji TF sugeruje, że stosowanie statyn może zmniejszyć ilość powstającej trombiny, tym samym zmniejszając nie tylko ilość fibryny w obrębie zwapniałych zastawek aortalnych, ale również prozapalną odpowiedź indukowaną N-terminalnym fragmentem osteopontyny [39].
Co ciekawe, podobny efekt hamujący proces zapalny, kalcyfikację i ekspresję TF zaobserwowano w przypadku 0,1 μM rozuwastatyny i 1 μM atorwastatyny. Można przypuszczać, że rozuwastatyna, która jest hydrofilową statyna lepiej hamuje kalcyfikację VICs, niż statyny lipofilowe (atorwastatyna).

Przedstawione dane *in vitro* wskazują, że statyny mogą spowolnić proces wapnienia zastawki na wczesnym etapie rozwoju AS, częściowo poprzez osłabienie zapalenia i ekspresji TF. Znaczenie tych badań *in vivo* nie jest jednak poznane.

W przeprowadzonych doświadczeniach w celu sprawdzenia, czy efekt zahamowania ekspresji *IL-1β* i *IL-6*, ekspresji TF, FX oraz receptorów PAR jest wynikiem działania statyn, stosowano dodatek mewalonianu w stężeniu 10 μM. Wraz z dodaniem mewalonianiu zaobserwowano zahamowanie efektu działania statyn. Efekt ten jest zgodny z przypuszczeniami, ponieważ statyny blokują syntezę mewalonianu, uniemożliwiając produkcję pirofosforanów. Aby lepiej poznać działanie statyn na VICs i kalcyfikację oraz szlak mediowania kalcyfikacji w VICs, należałoby wykonać doświadczenia z FPP oraz GGPP, w celu określenia, czy efekt ten zależy głównie od białek z grupy Ras czy Rho. Analogicznie zamiast FPP oraz GGPP można zastosować inhibitory farnezylotransferazy lub geranylogeranylotransferazy.

5.2 ACEI oraz antagoniści receptora angiotensyny AT_1

Biorąc pod uwagę obecność zarówno ACE, jak i AngII w zastawce aortalnej u pacjentów z AS, postanowiono sprawdzić, w jaki sposób AngI i AngII wpływają na zdolność VICs do ekspresji czynników prozapalnych i czynników krzepnięcia, kalcyfikację oraz neowaskularyzację. Według dostępnych badań wpływ AngI oraz AngII na komórki VICs nie był badany. Stężenia AngI i AngII do przeprowadzenia prezentowanych doświadczeń dobrano na podstawie badań Gao i wsp. [202], na fibroblastach serca. Zastosowane przez Gao i wsp. [202] stężenie AngII stymulowały fibroblasty do produkcji kolagenu. Zastosowane w tej pracy stężenia AngI oraz AngII spowodowały wzrost ekspresji cytokin prozapalnych oraz zwiększenie kalcyfikacji. Niższe stężenie 0,1 μM AngI lub AngII nie spowodowały wzrostu ekspresji mRNA genów *IL-1β*, *IL-6* oraz kalcyfikacji w hodowli VICs.

Podobne stężenia ACEI stosowali w pracy Mahadevan i wsp. badający wpływ enalaprilu i ramiprilu na migrację komórek śródbłonka naczyniowego [213]. Stosowane stężenie antagonisty receptora AT_1 było takie same jak w artykule Benicky'ego i wsp. [214], którzy badali wpływy AngII na ekspresję cytokin prozapalnych w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych.

U chorych przyjmujących typową dawkę enalaprilu i ramiprilu maksymalne stężenie w osoczu wynosi 100 ± 50 ng/ml, co odpowiada 0,28 ± 0,14 μM [215].

W przeprowadzonej pracy po raz pierwszy pokazano, że AngI oraz AngII inicjują proces kalcyfikacji VICs. ACEI w stężeniu 1 μM i 10 μM hamują kalcyfikację komórek, ale tylko po stymulacji AngI. Zastosowanie ACEI przy stymulacji AngII nie powodowało zahamowania ekspresji cytokin prozapalnych (*IL-1β* i *IL-6*) oraz kalcyfikacji wyrażonej aktywnością ALP i ilością czerwieni alizarynowej związanej z jonami wapnia. Interesujące wydaje się, że kandesartan będący antagonistą receptora AT_1 hamował kalcyfikację zarówno w przypadku stymulacji AngI, jak i AngII, co sugeruje, że kalcyfikacja może być indukowana poprzez stymulację receptora AT_1. Na podstawie przedstawionych wyników można przypuszczać, że AngI oraz AngII przyczyniają się do kalcyfikacji zastawki aortalnej. Podobne doświadczenie przeprowadzone na VSMC pokazuje, że AngII może za pośrednictwem receptora AT_1 indukować proliferację oraz kalcyfikację poprzez zwiększenie ekspresji NF-κB i Runx2, jak również zwiększenie ekspresji cytokin prozapalnych IL6, IL8 i MCP-1 [216, 217]. Biorąc po uwagę powyższe doniesienia można przypuszczać, że podwyższony poziom AngII w zastawce aortalnej

może stymulować VICs do osteoblastycznej transformacji i powstania zwapnień. Obecność w zastawce mastocytów [90], które produkują chymazę, dodatkowo sprzyja zwiększonej produkcji AngII w zwapniałej zastawce, dlatego antagoniści receptora AT_1 wydają się być bardziej obiecującą grupą leków, która może zmniejszać progresję AS. Jednak badania u ludzi są konieczne do weryfikacji tej hipotezy.

W przeprowadzonych doświadczeniach zarówno AngI, jak i AngII w stężeniu 1 μM nie spowodowały wzrostu ekspresji czynników krzepnięcia i receptorów PAR. W badaniach He i wsp. [218] AngII w stężeniu od 0,1 μM do 10 μM zwiększała ekspresję TF na poziomie mRNA i białka w monocytach. Podobny wzrost ekspresji TF przedstawili Sugano i wsp. [219] w przypadku szczurzych komórek śródbłonka naczyniowego. Można przypuszczać, że monocyty, które posiadają konstytutywną ekspresję TF, są bardziej wrażliwe na angiotensynę.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń sugerują, że kandesartan w przeciwieństwie do ACEI jest w stanie zahamować kalcyfikację i ekspresję cytokin prozapalnych przez VICs. Na podstawie otrzymanych wyników moża wnioskować udział receptora AT_1 w kalcyfikacji VICs, co sugeruje przeprowadzenie dalszych badań w kierunku przyszłego zastosowania antagonistów receptora AT_1. W badaniach tych należy zastosować różne stężenia antagonistów receptora AT_1, w zakresie terapeutycznym. Również interesujące wydaje się przeprowadzenie kokultur monocytów i VICs.

5.3 FX, FVII, FXI i receptory PAR

W przeprowadzonej pracy wykazano, że ludzkie komórki VICs mają stałą ekspresję FX, co jest orginalnym spostrzeżeniem, FX jest więcej niż TF w tym samym modelu ekspresji. Ponadto VICs wykazują ekspresję receptorów PAR: PAR1 i PAR2; PAR1 było o połowę mniej niż PAR2. Ta obserwacja jest także orginalna. PAR1 i PAR2 są receptorami aktywowanymi m.in. przez białka krzepnięcia. Obecność tych dwóch receptorów sugeruje możliwy wpływ trombiny oraz FXa bezpośrednio na komórki VICs. Z badań przeprowadzonych przez Blanc-Brude i wsp. [220] wynika, że FXa może aktywować fibroblasty zarówno poprzez PAR1 jak i PAR2, jednak to aktywacja PAR1 jest w głównej mierze odpowiedzialna za wzrost produkcji ECM oraz proliferację komórek. Borensztajna i wsp. [221] wykazali, że FXa nasila proliferację, migrację i różnicowanie fibroblastów w miofibroblasty (z ekspresją α-aktyny i desminy), jak również zwiększa ekspresję MCP-1, IL-6, TGF-β oraz fibronektyny, głównie przez aktywację

PAR2. Podobne zjawisko zaobserwowano w przypadku progresji AS, gdzie występuje nasilona proliferacja VICs oraz zwiększona produkcja ECM. Pobudzenie PAR1 przez trombinę może skutkować wzrostem ekspresji CCL2, który jest chemoatraktantem dla monocytów i mastocytów [222], przez co zwiększać naciek komórek zapalnych do zwapniałych płatków zastawki aortalnej. Ponadto, Moore i wsp. [223] pokazali, że zwiększona ekspresja CCL2 może skutkować zwiększonym odkładaniem się kolagenu i wzrostem proliferacji fibroblastów oraz miofibroblastów. Jednak ta koncepcja wymaga dalszych badań.

W przeprowadzonych doświadczeniach nie zaobserwowano ekspresji FVII oraz FXI w hodowlach komórek VICs. Można przypuszczać, że tych czynników krzepnięcia nie ma w zwapniałej zastawce aortalnej u ludzi.

5.4 Ograniczenia badania

Istnieje wiele ograniczeń przeprowadzonych badań. Badania przeprowadzono na hodowlach VICs *in vitro*, przez co określano bezpośredni wpływ czynników stymulujących na mierzone parametry. Jest to układ prosty bez dodatkowych czynników, które występują w modelu *in vivo*, m.in. hemodynamika pracy zastawki, napływ makrofagów lub innych komórek zapalnych, czy wpływ czynników układu krzepnięcia.

U osób z AS stwierdzono ok. 3-krotny wzrost poziomu TNF-α w surowicy w porównaniu z osobami zdrowymi, do ok. 0,0021 ng/ml [224], jest to jednak ok. 5000 razy mniejsze stężenie, niż stosowane w prezentowanej hodowli VICs oraz przez Ding i wsp. [198]. Biorąc pod uwagę komórek VICs do produkcji TNF-α [225], jak również obecnych na zastawce aortalnej makrofagów [2] można by przypuszczać, że stężenia TNF-α w stenotycznych zastawkach mogą być wyższe, niż te obserwowane w osoczu krwi.

Podobnie do TNF-α użyte stężenia PGN i LPS są wyższe, niż te obserwowane podczas zakażeń bakteryjnych, takich jak posocznica, gdzie stężenie PGN wynosi ok. 0,028 μg/ml [226] i LPS ok 0,3 ng/ml [227]. Do hodowli *in vitro* stosuje się wyższe stężenia stymulantów ze względu na fakt, że jest to układ izolowany, w którym brak jest dodatkowych czynników biorących udział w rozwoju zapalenia takich jak makrofagi i wielu czynników zapalnych produkowanych przez te komórki, których efekt jest synergistyczny. Należałoby przeprowadzić kokulturę VICs z monocytami w celu określenia wpływu czynników prozapalnych, aby ocenić interakcje między komórkami. Dodatkowe pobudzenie makrofagów do wydzielania cytokin prozapalnych może spowo-

dować, że VICs zostaną zastymulowane do kalcyfikacji w niższych stężeniach, niż w niniejszej pracy.

Podobnie jak w przypadku czynników prozapalnych stosowane w pracy stężenie AngI i AngII jest wyższe niż stężenia fizjologiczne. Stężenie AngI w osoczu waha się u osób zdrowych od 20 do 200 ng/l [228], co odpowiada $2*10^{-5}$ – $2*10^{-4}$ μM, natomiast stężenie AngII jest mniejsze i wynosi $1,8*10^{-5}$ μM średnio u osób zdrowych [228]. W niektórych jednostkach chorobowych np. w nadciśnieniu tętniczym poziom AngII w osoczu może dochodzić do $6,4*10^{-5}$ μM [228]. Stężenie AngII w tkankach może być nawet 100-krotnie większe w porównaniu do osocza [229]. Jednak makrofagi i mastocyty obecne w stenotycznej zastawce [90, 230] poprzez ekspresję odpowiednio ACE oraz chymazy mogą zwiększać stężenie *in loco* AngII w zastawce stenotycznej.

Przeprowadzone badania *in vitro* pokazują jaki jest wpływ statyn na osteoblastyczną transformację VICs oraz formowanie się zwapnień *de novo*. Natomiast w badaniach oceniano chorych ze stwierdzoną AS w stopniu co najmniej umiarkowanym, co już sugeruje większy wpływ hemodynamiki i uszkodzenia śródbłonka przez zwiększone siły ścinania. Nie wiadomo, czy VICs z zastawek o niewielkim zwężeniu ujścia zachowują się podobnie do tych analizowanych w tej pracy.

Istotnym ograniczeniem przeprowadzonych badań jest metoda oceny kalcyfikacji, którą opisali Osman i wsp. [231]. Pożywka hodowlana zawierała β-glicerofosforan, witaminę C oraz jony Ca^{2+}. Taka pożywka inicjuje transformacje i pozwala na zaobserwowanie w stosunkowo krótkim okresie czasu kalcyfikacji komórek. Istnieją również inne składy pożywki, zawierające m.in. witaminę D_3 [200]. Niestety trudno jest określić w jakiej części proces kalcyfikacji obecny *in vitro* odpowiada temu obserwowanemu *in vivo* w zastawce aortalnej.

Nie jest też jasne, czy obserwowane działanie to efekt klasy. Należałoby przeprowadzić podobne doświadczenia z innymi lekami z badanych dotąd klas.

Aby potwierdzić działanie statyn na w/w zjawiska przeprowadzono doświadczenia z mewalonianem, który znosił efekty rozuwastatyną i atorwastatyną. Wadą pracy jest nieprzeprowadzenie badań z FPP i GGPP lub inhibitorami transferazy farnezylowej, bądź geranylogeranylowej.

5.5 Podsumowanie

Ekspresja FX oraz receptorów PAR przedstawiona w niniejszej pracy oraz wyniki odnośnie FX, trombiny oraz receptorów PAR sugerują, że jest to kolejny potencjalny szlak mogący brać udział w rozwoju AS. W celu potwierdzenia należałoby określić, czy i w jakim stopniu aktywacja receptora PAR1, a w jakim PAR2 wpływa na proliferację, ekspresję ECM i cytokin prozapalnych oraz kalcyfikację VICs.

Przeprowadzone badania poszerzają wiedzę na temat wpływu statyn, ACEI oraz ARB na ekspresję cytokin prozapalnych, kalcyfikację i ekspresję białek układu krzepnięcia w AS. Na podstawie otrzymanych wyników można przypuszczać, że statyny w dawkach leczniczych mogą częściowo zahamować kalcyfikację i ekspresję TF, jednak nie zostało to potwierdzone w badaniach klinicznych. Szczególne znaczenie maja doświadczenia z AngI i AngII, które stymulują VICs do ekspresji cytokin prozapalnych oraz kalcyfikacji. Na podstawie otrzymanych wyników można przypuszczać, że stosowanie ACEI lub ARB może mieć zastosowanie w zahamowaniu progresji AS. Ponadto przedstawiona ekspresja FX oraz receptorów PAR1 i PAR2 sugeruje, że trombina oraz FX mogą bezpośrednio wywierać wpływ na VICs, jednak dokładny wpływ aktywacji tych receptorów na progresję AS wymaga dalszych badań. Znaczenie kliniczne przedstawionych danych wymaga dalszych badań.

6. Wnioski

1. Wykazano ekspresję TF, czynnika X oraz receptorów PAR: PAR1 i PAR2, na poziomie mRNA i białka, przez ludzkie komórki VICs.
2. Stymulacja komórek VICs uzyskanych ze stenotycznych zastawek ludzkich przy użyciu 10 ng/µl TNF-α, 10 µg/ml PGN lub 200 ng/ml LPS zwiększa ekspresję cytokin prozapalnych, kalcyfikację i ekspresję TF w hodowli *in vitro*. Mniejsze stężenia substancji stymulujących nie wpływają na w/w zjawiska.
3. Stężenia statyn, tj. 1 µM atorwastatyny oraz 0,1 µM rozuwastatyny zbliżone do stężeń osiąganych we krwi u ludzi, częściowo hamują ekspresję cytokin prozapalnych, kalcyfikację oraz ekspresję TF na poziomie mRNA i białka. Dziesięciokrotne zwiększenie stężenia obu statyn hamuje o ok. 80% w/w procesy.
4. Stymulacja hodowli VICs przy użyciu angiotensyny I lub angiotensyny II zwiększa ekspresję cytokin prozapalnych i kalcyfikację komórek, ale nie wpływa na ekspresję TF.
5. Stężenia inhibitorów konwertazy angiotensyny, tj. 1 µM enalaprilu i ramiprilu, zbliżone do stężeń osiąganych we krwi u ludzi, częściowo hamują ekspresję cytokin prozapalnych i kalcyfikację VICs stymulowaną angiotensyną I. Oba leki nie zmieniają ekspresji TF.
6. Kandesartan w stężeniu 10 µM dodany do hodowli VICs hamuje ekspresję cytokin prozapalnych oraz kalcyfikację indukowaną przez angiotensynę II i nie zmienia ekspresji TF.
7. Zarówno statyny jak i inhibitory konwertazy angiotensyny nie zmieniają ekspresji czynnika X oraz ekspresji receptorów PAR1 i PAR2 w hodowli VICs. W hodowli VICs nie stwierdzono ekspresji czynnika VII i XI.

7. Streszczenie

Obecnie uważa się, że procesy zachodzące w obrębie zwężonej zastawki aortalnej przypominają wczesne etapy miażdżycy. W AS wyrazem zaawansowania choroby jest nasilona fibrokalcyfikacja płatków zastawki. Tendencja do nasilenia kalcyfikacji zastawki aortalnej wynika najprawdopodobniej z obecności komórek interstycjalnych (VICs), które pod wpływem przewlekłego zapalenia ulegają osteoblastycznej transformacji. Wykazano ekspresję czynnika tkankowego (TF) w makrofagach oraz akumulację fibryny w obrębie płatków zastawki aortalnej. Biorąc pod uwagę podobieństwa między miażdżycą i AS przypuszczano, że dwie grupy leków tj. statyny i inhibitory konwertazy angiotensyny I (ACEI) mogą być skuteczne w hamowaniu progresji AS, czego dotąd nie potwierdzono w badaniach klinicznych.

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu statyn, inhibitorów konwertazy angiotensyny I (ACEI) oraz antagonisty receptora angiotensyny II, typu 1 (ARB) na ekspresję białek związanych z zapaleniem, procesem kalcyfikacji oraz białek układu krzepnięcia w hodowli komórek VICs izolowanych ze stenotycznych płatków zastawki aortalnej. Do badania włączono 61 pacjentów z AS po izolowanej operacji wymiany zastawki aortalnej. Płatki zwapniałej zastawki posłużyły do wykonania 1) analizy immunofluore-scencyjnej, w celu oceny ekspresji białek układu krzepnięcia: TF, FX , FVII i FXI oraz receptorów PAR1 i PAR2; 2) analizie ekspresji mRNA genów związanych z zapale-niem (*NF-κB, RANKL* i *IL-6)*, kalcyfikacją i osteoblastyczną transforamcją (*SPP1, IBSP, BMP2* i *Runx2/Cfb1*) oraz genów białek układu krzepnięcia (*F3, F10),* recepto-rów PAR *(F2R* i *F2RL1*) i markera neowaskularyzacji - *VEGF* (czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego) metodą Real-time PCR w trzech obszarach zastawki (nie-zmienionym, zgrubiałym i zwapniałym). Dodatkowo z płatków zastawki aortalnej zał-żono hodowlę VICs, która została poddana stymulacji przez TNF-α, PGN i LPS oraz angiotensynę I i II (AngI i AngII). Odpowiedź prozapalną w stymulowanych hodowlach mierzono na poziomie ekspresji mRNA genów cytokin *IL-1β* i *IL-6*. Kalcyfikację komórek mierzono ilością jonów Ca^{2+} związanych z czerwienią alizarynową i aktywnością alkalicznej fosfatazy. Dodatkowo w hodowli *in vitro* wykonano analizy ekspresji genów związanych z układem krzepnięcia *F3, F10* oraz receptorów *F2R* i *F2RL1*, jak również analizę ekspresji w/w białek metodą immunofluorescencyjną (jakościową) i Western blot (ilościową).

W celu określenia wpływu statyn na ekspresję cytokin prozapalnych, kalcyfikację i ekspresję czynników układu krzepnięcia, hodowle preinkubowano z atorwastatyną w końcowych stężeniach 0,1 μM, 1 μM i 10 μM oraz rozuwastatyną w końcowych stężeniach 0,01 μM, 0,1 μM i 1 μM. Potwierdzenia działania statyn na badane procesy dokonano poprzez dodanie mewalonianu w stężeniu 10 μM do komórek VICs.

Określenia wpływu ACEI na badane procesy dokonano preinkubując hodowlę stymulowaną AngI z jej inhibitorami: enalaprilem i ramiprilem w końcowych stężeniach 0,1 μM, 1 μM i 10 μM. Wpływ aktywacji receptora angiotensyny II na badane procesy badano poprzez preinkubację VICs z antagonistą receptora angiotensyny II typu 1, kandesartanem w końcowym stężeniu 10 μM.

W analizowanych metodą Real-time PCR zgrubiałych i zwapniałych fragmentach zastawki, w porównaniu do obszarów niezmienionych chorobowo, stwierdzono wzrost ekspresji genów związanych z: zapaleniem (*RANKL, NF-κB* i *IL-6*), kalcyfikacją (*SPP1, IBSP, BMP2*), osteoblastyczną transformacją (*Runx2/Cfba1*) oraz układem krzepnięcia (*F3*). W analizowanych fragmentach zaobserwowano zmniejszenie ekspresji mRNA genu *F10,* natomiast ekspresja mRNA genów *F2R* i *F2RL1* nie uległa zmianie.

W badaniach immunohistochemicznych zwapniałych płatków po raz pierwszy wykazano ekspresją FX, PAR1 i PAR2, które obecne były w obrębie całego skrawka zastawki aortalnej. Nie zaobserwowano natomiast ekspresji FVII i FXI w badanych fragmentach zastawki. W hodowli VICs wykazano obecność antygenów TF, FX, PAR1 i PAR2, natomiast podobnie jak w przypadku analiz *in loco* nie stwierdzono ekspresji FVII i FXI.

Stymulowane przez TNF-α, PGN lub LPS komórki VICs, wykazywały zwiększoną ekspresję mRNA genów cytokin prozapalnych, kalcyfikację i ekspresję czynników układu krzepnięcia. Preinkubacja hodowli VICs z atorwastatyną i rozuwastatyną, w końcowych stężeniach odpowiednio 0,1 μM i 0,01 μM nie wpłynęła na ekspresję mRNA genów *IL-1β* i *IL-6*. Dziesięciokrotne zwiększenie stężenia leków zmniejszyło ekspresję *IL-1β* i *IL-6* o ok. 55%, a stężenia 10 μM atorwastatyny i 1 μM rozuwastatyny nasiliło zahamowanie ekspresji tych genów do ok. 75% w porównaniu do grupy po stymulacji. Dodanie mewalonianiu w końcowym stężeniu 10 μM do hodowli VICs całkowicie zniosło hamujący wpływ statyn na ekspresję genów *IL-1β* oraz *IL-6,* bez względu na stężenie stosowanej statyny.

Stężenia statyn, odpowiednio 1 μM atorwastatyny oraz 0,1 μM rozuwastatyny zahamowały kalcyfikację komórek o ok. 35%, natomiast 10-krotne zwiększenie stężeń zahamowało kalcyfikację średnio do 80%. Dodanie mewalonianiu do hodowli VICs zniosło ten efekt. Atorwastatyna w stężeniu 1 μM oraz rozuwastatyna 0,1 μM zahamowały ekspresję mRNA genu *F3* średnio o ok. 30%. Dziesięciokrotnie wyższe stężenia statyn zahamowały ekspresję mRNA *F3* średnio o 88% w hodowli VICs, natomiast dodatek mewalonianu (10 μM) wraz statynami zniósł hamujący wpływ statyn na poziom ekspresji mRNA genu *F3* niezależnie od dawki statyn.

Analiza metodą Western-blot wykazała wzrost ekspresji TF o ok. 50% po stymulacji TNF-α w stosunku do kontroli. Dodanie atorwastatyny lub rozuwastatyny spowodowało dawko-zależne obniżenie ekspresji TF odpowiednio o ok. 50% dla niższych dawek statyn i o ok. 70% dla wyższych zastosowanych dawek statyn.

Po stymulacji VICs przez 1 μM AngI oraz AngII silniejszą odpowiedź prozapalną zaobserwowano w przypadku AngII. Leki z grupy ACEI (enalapril oraz ramipril) w stężeniu 0,1 μM nie zmniejszyły ekspresji mRNA genów *IL-1β* oraz *IL-6*, ale stężenia 1 μM zahamowały ekspresję tych genów o ok. 45%, a stężenia 10 μM o ok. 65%.

Zablokowanie receptora angiotensyny II kandesartanem całkowicie zahamowało ekspresję mRNA genów *IL-1β* i *IL-6* po stymulacji AngII. Silniejszy wpływ na kalcyfikację obserwowano w hodowli VICs stymulowanej AngII w porównaniu z AngI. Enalapril i ramipril w stężeniu 0,1 μM nie wpłynęły na kalcyfikację, natomiast wyższe stężenia ACEI, 1 μM i 10 μM, zahamowały kalcyfikację odpowiednio o 30% i 50%. Zastosowanie kandesartanu w stężeniu 10 μM całkowicie zahamowało kalcyfikację hodowli VICs.

Zastosowane stężenia AngI i AngII, jak również ACEI i ARB nie spowodowały zmiany w ekspresji mRNA genów *F3, F10, F2R, F2RL1* oraz *VEGF*.

Przeprowadzone badania poszerzają wiedzę na temat wpływu statyn, ACEI oraz ARB na ekspresję cytokin prozapalnych, kalcyfikację i ekspresję białek układu krzepnięcia w AS. Można przypuszczać, że statyny, ACEI i ARB mogą częściowo zahamować zapalenie wewnątrz zwężonej zastawki aortalnej i jej kalcyfikację. Po raz pierwszy pokazano ekspresję FX oraz receptorów PAR1 i PAR2 w zastawkach i w hodowli VICs. Dodatkowo wykazano hamowanie ekspresji TF, ale nie FX w VICs pod wpływem statyn, ale nie innych badanych leków. Znaczenie kliniczne przedstawionych danych wymaga dalszych badań.

8. Summary

It is believed that processes within stenotic aortic valve are similar to the early stages of atherosclerosis. Abundant fibrocalcification within aortic leaflets increases disease progression. Tendency for increased calcification within aortic valve is probably due to the presence of interstitial cells (VICs) which undergo osteoblastic transformation in chronic inflammation. The expression of tissue factor (TF) in macrophages and accumulation of fibrin within the aortic valve leaflets has been demonstrated.

The purpose of this study was to investigate the effect of statins, angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEIs) and angiotensin II receptor blocker (ARB) on the expression of proteins associated with inflammation, calcification and coagulation cascade *in vitro* in VICs cultures.

The study included 61 patients with AS after isolated aortic valve replacement. Aortic leaflets were used to determine: 1) immunofluorescence analysis of the coagulation system proteins: tissue factor (TF), factor (F)X, FVII and FXI, as well as receptors PAR1 and PAR2 expression, 2) mRNA analysis of the gene expression associated with inflammation (*NF-kB*, *RANKL* and *IL-6*), calcification and osteoblastic transformation (*SPP1, IBSP, BMP2* and *Runx2/Cfba1*), coagulation proteins (*F3* and *F10*), PAR receptors (*F2R* and *F2RL1*) and a neovascularization marker: *VEGF* (vascular endothelial growth factor) using Real-time PCR in three different aortic valve areas (unaltered, thickened and calcified). VICs culture was established from the obtained fragments of the calcified aortic valves to investigate the effect of TNF-α, PGN, LPS, angiotensin I and II (AngI and AngII) on cultured VICs. Inflammatory response in stimulated culture was determined by mRNA expression of *IL-1β* and *IL-6* genes. Calcification was measured by determining the concentration of the Alizarin red S connected with calcium ions and alkaline phosphatase activity in stimulated VICs. In addition, coagulation proteins (TF and FX) and PAR receptors (PAR1 and PAR2) expression was also measured on mRNA and protein level, using immunofluorescence (qualitative) and Western blot (quantitative) techniques.

To determine the statin's effect on proinflammatory cytokine expression, calcification and coagulation proteins expression, stimulated VICs were preincubated with atorvastatin (final concentration 0.1 μM, 1μM and 10 μM), or rosuvastatin, (0.01 μM, 0.1μM and 1 μM). To determine whether statins modulate the mevalonic acid pathway, VICs were treated with 10 μM mevalonic acid.

To explore the effect of ACEIs on the tested processes, VICs cultures treated with AngI were preincubated with enalapril and ramipril (0.1 μM, 1 μM and 10 μM). The impact of the angiotensin II receptor activation was determined by addition of 10 μM candesartan, angiotensin II receptor blocker (ARB).

Determined by Real-time PCR analysis of genes expression associated with proinflamatory response (*RANKL, NF-kB* and *IL-6*), calcification (*SPP1, IBSP, BMP2*) and osteoblastic calcification (*Runx2/Cfba1*) were found to be higher in thickened and calcified fragments of stenotic leaflets, compared to unaltered fragments. Furthermore, higher expression of *F3* and lower of *F10* were observed in thickened and calcified fragments. There was no change in the expression of *F2R, F2RL1*.

The expression of FX, PAR1 and PAR2 in the stenotic leaflets was demonstrated for the first time in the immunofluorescence analysis. There was no expression of FVII and FXI.

Immunofluorescence analysis showed that VICs have the expression of TF, FX, PAR1 and PAR2. There was no evidence that VICs expresses FVII and FXI.

The VICs cultured stimulated with TNF-α, PGN or LPS increased mRNA expression of the genes involved in proinflammatory response, calcification and coagulation. Preincubation of the stimulated VICs with atorvastatin and rosuvastatin (final concentrations 0.1 μM and 0.01 μM, respectively) did not affect the processes. Ten times higher concentrations of atorvastatin and rosuvastatin (1 μM and 0.1μM, respectively) reduced proinflammatory expression of *IL-1β* and *IL-6* by 55%. High concentrations of statins (10 μM atorvastatin and 1 μM rosuvastatin) lowered *IL-1β* and *IL-6* expression by 75%, compared to non-stimulated VICs. Addition of 10 μM mevalonic acid suppressed the influence of statins in all concentrations.

Atorvastatin (1 μM) and rosuvastatin (0,1 μM) inhibited VICs calcification by 35%, whereas increasing statin concentration to 10 μM of atorvastatin and 1 μM of rosuvastatin reduced calcification by 80%. Addition of 10 μM mevalonic acid inhibited statin-mediated impairment of calcification. Atorvastatin and rosuvastatin (1 μM and 0,1μM, respectively) reduced the expression of *F3* mRNA by 30%. Ten times higher concentration of atorvastatin reduced *F3* expression by 88%. Incubation with mevalonic acid (10 μM) restored *F3* expression to the pretreatment level.

Western-blot analysis of TNF-α stimulated VICs showed that after proinflammatory stimulation TF expression increases. Addition of atorvastatin and rosuvastatin dimin-

ished that effect by 51.5% and 73.1%, for 1 μM and 10 μM of atorvastatin, respectively, and by 54.8% and 69.2% for 0,1 μM and 1 μM of rosuvastatin, respectively.

After stimulation with 1 μM of AngI and AngII, enhanced proinflammatory response was observed in AngII stimulated cultures. Enalapril and ramipril both at a concentration of 0.1 μM did not change *IL-1β* and *IL-6* expression, but these drugs at concentrations of 1 μM reduced expression of proinflammatory cytokines by 45%, and 10 μM by 65%.

Addition of ARB, candesartan, reduced mRNA expression of *IL-1β* and *IL-6* after stimulation with AngII. Stronger effect on calcification was observed in AngII than in VICs stimulated with AngI.

Enalapril and ramipril at 0.1 μM concentrations did not change VICs calcification. Higher concentrations of ACEIs, 1 μM and 10 μM, reduced measured VICs calcification by 30% and 50%, respectively. Candesartan at a concentration of 10 μM totally abolished VICs calcification.

Both AngI and AngII, as well as ACEI and ARB did not change the expression of TF, FX, PAR1, PAR2 and VEGF.

This *in vitro* study increases knowledge about the effect of statins, ACEIs and ARB on proinflammatory response, calcification and expression of coagulation protein in AS. It can be speculated that statins, ACEI and ARB may partially inhibit inflammation and calcification inside stenotic aortic valves. Moreover, this study for the first time shows the TF, FX, PAR1 and PAR2 expression in VICs.

Inhibition of TF expression, but not FX in stimulated VICs preincubated with statins, but not other tested drugs. The clinical relevance of the presented data requires further investigation.

9. Piśmiennictwo

1. Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, Gottdiener JS, Scott CG, Enriquez-Sarano M. Burden of valvular heart diseases: a population-based study. Lancet 2006; 368: 1005–1011.
2. Yetkin EJ. Molecular and cellular mechanisms of aortic stenosis. Int J Cardiol 2009; 135: 4-13.
3. Pate GE, Association between aortic stenosis and hypertension. J Heart Valve Dis 2002; 11: 612-614.
4. Ngo MV, Gottdiener JS, Fletcher RD, Fernicola DJ, Gersh BJ. Smoking and obesity are associated with progression of aortic stenosis. Am J Geriatr Cardiol 2001; 10: 86-90.
5. Mohty D, Pibarot P, Côté C, Arsenault B, Cartier A, Cosnay P, Couture C, Mathieu P. Associations between plasma LDL particle size, valvular accumulation of oxidized LDL, and inflammation in patients with aortic stenosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008; 28: 187-193.
6. Martinsson A, Ostling G, Persson M, Sundquist K, Andersson C, Melander O, Engström G, Hedblad B, Smith JG. Carotid plaque, intima-media thickness, and incident aortic stenosis: a prospective cohort study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2014; 34: 2343-2348.
7. Montagnana M, Danese E, Lippi G. Genetic risk factors of atherothrombosis. Pol Arch Med Wewn 2014; 124: 474-482.
8. Orłowska-Baranowska E, Stępińska J. Czy stenoza aortalna ma podłoże genetyczne? Kardiol Pol. 2007; 65: 1376-1380.
9. Novaro GM, Sachar R, Pearce GL, Sprecher DL, Griffin BP. Association between apolipoprotein E alleles and calcific valvular heart disease. Circulation. 2003; 108: 1804-1808.
10. Saravanan P, Kadir I. Apolipoprotein E alleles and bicuspid aortic valve stenosis inmonozygotic twins. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2009; 8: 687-688.
11. Goel SS, Ige M, Tuzcu EM, Ellis SG, Stewart WJ, Svensson LG, Lytle BW, Kapadia SR. Severe aortic stenosis and coronary artery disease-implications for management in the transcatheter aortic valve replacement era: a comprehensive review. J Am Coll Cardiol 2013; 62: 1-10.

12. Freeman RV, Otto CM. Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. Circulation 2005; 111: 3316-3326.
13. Warren BA, Yong JL. Calcification of the aortic valve: its progression and grading. Pathology 1997; 29: 360-368.
14. Mulholland DL, Gotlieb AI. Cell biology of valvular interstitial cells. Can J Cardiol 1996; 12: 231-236.
15. Natorska J, Marek G, Hlawaty M, Sobczyk D, Sadowski J, Tracz W, Undas A. Evidence for tissue factor expression in aortic valves in patients with aortic stenosis. Pol Arch Med Wew 2009; 119: 636-642.
16. Schoen FJ. Aortic valve structure-function correlations: role of elastic fibers no longer a stretch of the imagination. J Heart Valve Dis 1997; 6: 1-6.
17. Dreger SA, Taylor PM, Allen SP, Yacoub MH. Profile and localization of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in human heart valves. J Heart Valve Dis 2002; 11: 875-880.
18. Desmoulière A, Gabbiani G. Myofibroblast differentiation during fibrosis. Exp Nephrol 1995; 3: 134-139.
19. Mohler ER III. Are atherosclerotic processes involved in aortic-valve calcification? Lancet 2000; 356: 524–525.
20. Akerström F, Barderas MG, Rodríguez-Padial L. Aortic stenosis: a general overview of clinical, pathophysiological and therapeutic aspects. Expert Rev Cardiovasc Ther 2013; 11: 239-250.
21. Otto CM, Lind BK, Kitzman DW, Gersh BJ, Siscovick DS. Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly. N Engl J Med 1999; 341: 142-147.
22. Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. Am J Pathol. 2007; 171: 1407-1418.
23. Ngo DT, Sverdlov AL, Horowitz JD. Prevention of aortic valve stenosis: a realistic therapeutic target? Pharmacol Ther 2012; 135: 78-93.
24. Miller JD, Weiss RM, Heistad DD. Calcific aortic valve stenosis: methods, models and mechanisms. Circ Res. 2011; 108: 1392-1412.
25. Miller JD, Chu Y, Brooks RM, Richenbacher WE, Pena-Silva R, Heistad DD. Dysregulation of antioxidant mechanisms contributes to increased oxidative stress in calcific aortic valvular stenosis in humans. J Am Coll Cardiol. 2008; 52: 843-850.

26. Fantus D, Awan Z, Seidah NG, Genest J. Aortic calcification: novel insight from familial hypercholesterolemia and potential role for the low-density lipoprotein receptor. Atherosclerosis 2013; 226: 9-15.
27. Leopold JA. Cellular mechanism of aortic calcification. Circ Cardiovasc Interv 2012; 4: 605-614.
28. O'Brien KD. Phatogenesis of calcific aortic valve disease: a disease process comes of age (and a good deal more). Atheroscler Thromb Vasc Biol 2006; 8: 1721-1728.
29. Maher ER, Young G, Smyth-Walsh B, Pugh S, Curtis JR. Aortic and mitral valve calcification in patients with end-stage renal disease. Lancet 1987; 2: 875-877.
30. Natorska J, Wypasek E, Grudzień G, Sobczyk D, Marek G, Filip G, Sadowski J, Undas A. Does diabetes accelerate the progression of aortic stenosis through enhanced inflammatory response within aortic valves? Inflammation 2012; 35: 834-840.
31. Linhartova K, Veselka J, Sterbakova G, Racek J, Topolcan O, Cerbak R. Parathyroid hormone and vitamin D levels are independently associated with calcific aortic stenosis. Circ J. 2008; 72: 245-250.
32. Persy V, D'Haese P. Vascular calcification and bone disease: the calcification paradox. Thrends Mol Med 2009; 15: 405-416.
33. Borissoff JI, Spronk HM, ten Cate H. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. N Engl J Med 2011; 364: 1746-1760.
34. Loeffen R, Spronk HM, ten Cate H. The impact of blood coagulability on atherosclerosis and cardiovascular disease. J Thromb Haemos. 2012; 10: 1207-1216.
35. Kleinegris MC, Ten Cate-Hoek AJ, Ten Cate H. Coagulation and the vessel wall in thrombosis and atherosclerosis. Pol Arch Med Wewn 2012; 122: 557-566.
36. Borissoff JI, Heeneman S, Kilinç E, Kassák P, Van Oerle R, Winckers K, Govers-Riemslag JW, Hamulyák K, Hackeng TM, Daemen MJ, ten Cate H, Spronk HM. Early atherosclerosis exhibits an enhanced procoagulant state. Circulation 2010; 122: 821-830.
37. Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, Gown AM, O'Brien KD. Characterization of the early lesion of "degenerative" valvular aortic stenosis: histological and immunohistochemical studies. Circulation 1994; 90: 844-853.
38. Marechaux S, Corseaux D, Vincentelli A, Richardson M, Ung A, Susen S, Zawadzki C, Beregi JP, Ezekowitz MD, Jude B, Le Tourneau T. Identification of

tissue factor in experimental aortic valve sclerosis. Cardiovasc Path 2009; 18: 67-76.

39. Breyne J, Juthier F, Corseaux D, Marechaux S, Zawadzki C, Jeanpierre E, Ung A, Ennezat PV, Susen S, Van Belle E, Le Marec H, Vincentelli A, Le Tourneau T, Jude B. Atherosclerotic-like process in aortic stenosis: activation of the tissue factor-thrombin pathway and potential role through osteopontin alteration. Atherosclerosis 2010; 213: 369-376.
40. Natorska J, Marek G, Hlawaty M, Sadowski J, Tracz W, Undas A. Fibrin presence within aortic valves in patients with aortic stenosis: association with in vivo thrombin generation and fibrin clot properties. Thromb Haemost 2011; 105: 254-260.
41. Kapusta P, Wypasek E, Natorska J, Grudzien G, Sobczyk D, Sadowski J, Undas A. Factor XIII expression within aortic valves and its plasma activity in patients with aortic stenosis: association with severity of disease. Thromb Haemost 2012; 108: 1172-1179.
42. Balaoing LR, Post AD, Liu H, Minn KT, Grande-Allen KJ. Age-related changes in aortic valve hemostatic protein regulation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2014; 34: 72-80.
43. Kochtebane N, Alzahrani AM, Bartegi A. Expression of uPA, tPA, and PAI-1 in Calcified Aortic Valves. Biochem Res Int 2014; 2014: 658643.
44. Levi M, van der Poll T, Büller HR. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. Circulation 2004; 109: 2698-2704.
45. Chu A. J. Tissue factor mediates inflammation. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2005; 440: 123–132.
46. Petersen L, Valentin CS, Hedner U. Regulation of the extrinsic pathway system in health and disease: the role of factor VIIa and tissue factor pathway inhibitor. Thrombosis Research 1995; 79: 1–47.
47. Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M, Nemerson Y. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. Nat Med, 2003; 9: 458–462.
48. Butenas S, Orfeo T, Mann KG. Tissue factor in coagulation: Which? Where? When? Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009; 29: 1989-1996.
49. Mackman N. The many faces of tissue factor. J Thromb Haemost 2009; 7: 136-139.

50. Schecter AD, Spirn B, Rossikhina M, Giesen PL, Bogdanov V, Fallon JT, Fisher EA, Schnapp LM, Nemerson Y, Taubman MB. Release of active tissue factor by human arterial smooth muscle cells. Circ Res 2000; 87: 126-132.
51. Jude B, Zawadzki C, Susen S, Corseaux D. Relevance of tissue factor in cardiovascular disease. Arch Mal Coeur Vaiss 2005; 98: 667-671.
52. Szotowski B, Antoniak S, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U. Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. Circ Res 2005; 96: 1233-1239.
53. Østerud B. Tissue factor expression in blood cells. Thromb Res 2010; 125: 31-34.
54. Breimo ES, Østerud B. Generation of tissue factor-rich microparticles in an ex vivo whole blood model. Blood Coagul Fibrinolysis 2005; 16: 399-405.
55. Østerud B, Bjørklid E. Sources of tissue factor. Semin Thromb Hemost 2006; 32: 11-23.
56. Mann KG, Brummel-Ziedins K, Orfeo T, Butenas S. Models of blood coagulation. Blood Cells Mol Dis 2006; 36: 108-117.
57. Rabkin E, Aikawa M, Stone JR, Fukumoto Y, Libby P, Schoen FJ. Activated interstitial myofibroblasts express catabolic enzymes and mediate matrix remodeling in myxomatous heart valves. Circulation 2001; 104: 2525-2532.
58. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. Bone Miner 1991; 14: 27–40.
59. Scatena M, Liaw L, Giachelli CM. Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007; 27: 2302–2309.
60. Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan J, Springett M, Orszulak T, Fullerton DA, Tajik AJ, Bonow RO, Spelsberg T. Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. Circulation 2003; 107: 2181–2184.
61. Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Van Vlaenderen I, Demunck H, Kasper M, Breier G, Evrard P, Müller M, Risau W, Edgington T, Collen D. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. Nature 1996; 383: 73–75.
62. Natorska J, Wypasek E, Grudzień G, Sobczyk D, Marek G, Filip G, Sadowski J, Undas A. Does diabetes accelerate the progression of aortic stenosis through en-

hanced inflammatory response within aortic valves? Inflammation 2012; 35: 834-840.

63. Łuszczak J, Undas A, Gissel M, Olszowska M, Butenas S. Activated factor XI and tissue factor in aortic stenosis: links with thrombin generation. Blood Coagul Fibrinolysis 2011; 22: 473-479.
64. Brummel-Ziedins K, Undas A, Orfeo T, Gissel M, Butenas S, Zmudka K, Mann KG. Thrombin generation in acute coronary syndrome and stable coronary artery disease: dependence on plasma factor composition. J Thromb Haemost 2008; 6: 4-10.
65. Esmon CT. The interactions between inflammation and coagulation. Br J Haematol 2005; 131: 417-430.
66. Borissoff JI, Spronk HM, Heeneman S, ten Cate H. Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze? Cardiovasc Res 2009; 82: 392-403.
67. Esmon CT. Inflammation and the activated protein C anticoagulant pathway. Semin Thromb Hemost 2006; 32: 49-60.
68. Rabiet MJ, Plantier JL, Rival Y, Genoux Y, Lampugnani MG, Dejana E. Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996; 16: 488–496.
69. Colotta F, Sciacca FL, Sironi M, Luini W, Rabiet MJ, Mantovani A. Expression of monocyte chemotactic protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed to thrombin. Am J Pathol 1994; 144: 975–985.
70. Tsopanoglou NE, Andriopoulou P, Maragoudakis ME. On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis: involvement of alphavbeta3-integrin. Am J Physiol Cell Physiol 2002; 283: 1501–1510.
71. Al-Jallad HF, Nakano Y, Chen JL, McMillan E, Lefebvre C, Kaartinen MT. Transglutaminase activity regulates osteoblast differentiation and matrix mineralization in MC3T3-E1 osteoblast cultures. Matrix Biol 2006; 25: 135–148.
72. Petkow-Dimitrow P, Undas A. Coagulation abnormalities in valvular and subvalvular aortic stenosis – clinical implication. Kardiol Pol 2008; 66: 569–573.
73. Tsurupa G, Hantgan RR, Burton RA, Pechik I, Tjandra N, Medved L. Structure, stability, and interaction of the fibrin(ogen) alphaC-domains. Biochemistry 2009; 48: 12191–12201.

74. Bini A, Fenoglio JJ Jr, Mesa-Tejada R, Kudryk B, Kaplan KL. Identification and distribution of fibrinogen, fibrin, and fibrin(ogen) degradation products in atherosclerosis. Use of monoclonal antibodies. Arteriosclerosis 1989; 9: 109-121.
75. Sato Y, Hatakeyama K, Yamashita A, Marutsuka K, Sumiyoshi A, Asada Y. Proportion of fibrin and platelets differs in thrombi on ruptured and eroded coronary atherosclerotic plaques in humans. Heart 2005; 91: 526-530.
76. Undas A, Celinska-Löwenhoff M, Löwenhoff T, Szczeklik A. Statins, fenofibrate, and quinapril increase clot permeability and enhance fibrinolysis in patients with coronary artery disease. J Thromb Haemost 2006; 4: 1029-1036.
77. Undas A, Szułdrzynski K, Stepien E, Zalewski J, Godlewski J, Tracz W, Pasowicz M, Zmudka K.Reduced clot permeability and susceptibility to lysis in patients with acute coronary syndrome: effects of inflammation and oxidative stress. Atherosclerosis 2007; 196: 551-558.
78. Undas A. Fibrin clot properties and their modulation in thrombotic disorders. Thromb Haemost 2014; 112: 32-42.
79. Wolberg AS, Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M. Elevated prothrombin results in clots with altered fiber structure: a possible mechanism of the increased trombotic risk. Blood 2003; 101: 3008-3013.
80. Collet JP, Moen JL, Veklich YI, Gorkun OV, Lord ST, Montalescot G, Weisel JW. The alphaC domains of fibrinogen affect the structure of the fibrin clot, its physical properties, and its susceptibility to fibrinolysis. Blood 2005; 106: 3824-3830.
81. Komáromi I, Bagoly Z, Muszbek L. Factor XIII: novel structural and functional aspects. J Thromb Haemost. 2011; 9: 9-20.
82. Ariens RA, Lai TS, Weisel JW, Greenberg CS, Grant PJ. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. Blood 2002; 100: 743–754.
83. Fraser SR, Booth NA, Mutch NJ. The antifibrinolytic function of factor XIII is exclusively expressed through α-antiplasmin cross-linking. Blood 2011; 117: 6371-6374.
84. Muszbek L, Bereczky Z, Bagoly Z, Komáromi I, Katona É. Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. Physiol Rev 2011; 91: 931-972.

85. Piercy-Kotb SA, Mousa A, Al-Jallad HF, Myneni VD, Chicatun F, Nazhat SN, Kaartinen MT. Factor XIIIA transglutaminase expression and secretion by osteoblasts is regulated by extracellular matrix collagen and the MAP kinase signaling pathway. J Cell Physiol 2012; 227: 2936–2946.
86. Binder BR, Christ G, Gruber F, Grubic N, Hufnagl P, Krebs M, Mihaly J, Prager GW. Plasminogen activator inhibitor 1: physiological and pathophysiological roles. News Physiol Sci 2002; 17: 56-61.
87. Blasi F, Vassalli JD, Dano K. Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor, and inhibitors. Journal of Cell Biology, 1987; 104: 801–804.
88. Nordt TK, Peter K, Ruef J, Kübler W, Bode C. Plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) and its role in cardiovascular disease. Thromb Haemost 1999; 82: 14-18.
89. Natorska J, Wypasek E, Grudzień G, Sadowski J, Undas A. Impaired fibrinolysis is associated with the severity of aortic stenosis in humans. J Thromb Haemost 2013; 11: 733-740.
90. Wypasek E, Natorska J, Grudzień G, Filip G, Sadowski J, Undas A. Mast cells in human stenotic aortic valves are associated with the severity of stenosis. Inflammation 2013; 36: 449-456.
91. Wojta J, Huber K, Valent P. New aspects in thrombotic research: complement induced switch in mast cells from a profibrinolytic to a prothrombotic phenotype. Pathophysiol Haemost Thromb 2004; 33: 438–441.
92. Dong JF, Nolasco L, Bernardo A, Arceneaux W, Shrimpton CN, Schade AJ, McIntire LV, Fujikawa K, López JA. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. Blood 2002; 100: 4033-4039.
93. Schick PK, Walker J, Profeta B, Denisowa L, Bennett V. Synthesis and secretion of von Willebrand factor and fibronectin in megakaryocytes at different phases of maturation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997; 4: 797-801.
94. Ledford-Kraemer MR. Analysis of von Willebrand factor structure by multimer analysis. Am J Hematol 2010; 85: 510-514.
95. Stockschlaeder M, Schneppenheim R, Budde U. Update on von Willebrand factor multimers: focus on high-molecular-weight multimers and their role in hemostasis. Blood Coagul Fibrinolysis 2014; 25: 206-216

96. Vincentelli A, Susen S, Le Tourneau T, Six I, Fabre O, Juthier F, Bauters A, Decoene C, Goudemand J, Prat A, Jude B. Acquired von Willebrand syndrome in aortic stenosis. N Engl J Med 2003; 349: 343-349.
97. Warkentin TE, Moore JC, Anand SS, Lonn EM, Morgan DG. Gastrointestinal bleeding, angiodysplasia, cardiovascular disease, and acquired von Willebrand syndrome. Transfus Med Rev 2003; 17: 272-286.
98. Pareti FI, Lattuada A, Bressi C, Zanobini M, Sala A, Steffan A, Ruggeri ZM. Proteolysis of von Willebrand factor and shear stress-induced platelet aggregation in patients with aortic valve stenosis. Circulation 2000; 102: 1290-1295.
99. Undas A, Windyga J, Bykowska K, Dimitrow PP, Stepien E, Sadowski J. Heyde's syndrome without a decrease in large von Willebrand factor multimers: a case of intestinal bleedings reversed by valve replacement in a patient with aortic stenosis. Thromb Haemost 2009; 101: 773-774.
100. Natorska J, Bykowska K, Hlawaty M, Marek G, Sadowski J, Undas A. Increased thrombin generation and platelet activation are associated with deficiency in high molecular weight multimers of von Willebrand factor in patients with moderate-to-severe aortic stenosis. Heart 2011; 97: 2023-2028.
101. Alberts A.W.: Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. Am. J. Cardiol. 1988; 62: 10J–15J.
102. Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. New inhibitors of cholesterogenesis produced by Penicillium citrinum. J Antibot. 1976; 29: 1346-1348.
103. Larose E, Ganz P. Statins and endothelial dysfunction. Semin Vasc Med. 2004; 4: 333-346.
104. Libby P, Aikawa M. Mechanisms of plaque stabilization with statins. Am J Cardiol. 2003; 91: 4B-8B.
105. Rosenson RS, Tangney CC. Antiatherothrombotic properties of statins. Implications for cardiovascular event reduction. JAMA. 1998; 279: 1643–1650.
106. Undas A, Celinska-Loewenhoff M, Kaczor M, Musial J. New nonlipid effects of statins and their clinical relevance in cardiovascular disease. Thromb Haemost. 2004; 91: 1065–1077.
107. Krysiak R, Okopien´ B, Herman ZS. Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on coagulation and fibrinolysis processes. Drugs. 2003; 63: 1821–1854.
108. Koh KK. Effects of HMG-CoA reductase inhibitor on hemostasis. Int J Cardiol. 2000; 76: 23–32.

109. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001; 21: 1712–1719.
110. Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. Nat Med. 2000; 6: 1399-1402.
111. Bellosta S, Arnaboldi L, Gerosa L, Canavesi M, Parente R, Baetta R, Paoletti R, Corsini A. Statins effect on smooth muscle cell proliferation. Semin Vasc Med. 2004; 4: 347-356.
112. Nakagami H, Jensen KS, Liao JK. A novel pleiotropic effect of statins: prevention of cardiac hypertrophy by cholesterol-independent mechanisms. Ann Med 2003; 35: 398-403.
113. Zhou Q, Liao JK. Statins and cardiovascular disease: from cholesterol lowering to pleiotropy. Curr Pharm Des 2009; 15: 467-478.
114. Werner N, Nickenig G, Laufs U. Pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. Basic Res Cardiol 2002; 97:105-116.
115. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. Immunol. Today. 1994; 15: 74–80.
116. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks F, Braunwald E. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. Circulation 1999; 100: 230-235.
117. Albert MA, Staggers J, Chew P, Ridker PM. The pravastatin inflammation CRP evaluation (PRINCE): rationale and design. Am. Heart J. 2001; 141: 893–898.
118. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM Jr, Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ; JUPITER Study Group. N Engl J Med. 2008; 20: 2195-2207.
119. Park OY,Kim SH, Ahn YK, Yun NS, Kim JH, Sim DS, Yoon HJ, Kim KH, Park HW, Hong YJ, Jeong MH, Cho JG, Park JC. Statin Reduces C-Reactive Protein and Interleukin-6 in Normocholesterolemic Patients with Acute Coronary Syndrome. Chonnam Medical Journal 2008. 4: 13-16.
120. Arnaud C, Burger F, Steffens S, Veillard NR, Nguyen TH, Trono D, Mach F. Statins reduce interleukin-6-induced C-reactive protein in human hepatocytes: new evidence for direct antiinflammatory effects of statins. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005; 25: 1231-1236.

121. Loppnow H, Zhang L, Buerke M, Lautenschläger M, Chen L, Frister A, Schlitt A, Luther T, Song N, Hofmann B, Rose-John S, Silber RE, Müller-Werdan U, Werdan K. Statins potently reduce the cytokine-mediated IL-6 release in SMC/MNC cocultures. J Cell Mol Med. 2011; 15: 994-1004.
122. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. Nature 1990; 347: 645-650.
123. Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, Flier JS. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. J Clin Invest 1997; 99: 2416-2422.
124. Cunard R, Eto Y, Muljadi JT, Glass CK, Kelly CJ, Ricote M. Repression of IFN-gamma expression by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. J Immunol 2004; 172: 7530-7536.
125. Yano M, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Murata Y, Taketa K, Motoshima H, Taguchi T, Sonoda K, Kukidome D, Takuwa Y, Kawada T, Brownlee M, Nishikawa T, Araki E. Statins activate peroxisome proliferator-activated receptor gamma through extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent cyclooxygenase-2 expression in macrophages. Circ Res 2007; 100: 1442-1451.
126. Zelvyte I, Dominaitiene R, Crisby M, Janciauskiene S. Modulation of inflammatory mediators and PPARgamma and NFkappaB expression by pravastatin in response to lipoproteins in human monocytes in vitro. Pharmacol Res 2002; 45: 147-154.
127. Paumelle R, Blanquart C, Briand O, Barbier O, Duhem C, Woerly G, Percevault F, Fruchart JC, Dombrowicz D, Glineur C, Staels B. Acute antiinflammatory properties of statins involve peroxisome proliferator-activated receptor-alpha via inhibition of the protein kinase C signaling pathway. Circ Res 2006; 98: 361-369.
128. Egashira K, Ni W, Inoue S, Kataoka C, Kitamoto S, Koyanagi M, Takeshita A. Pravastatin attenuates cardiovascular inflammatory and proliferative changes in a rat model of chronic inhibition of nitric oxide synthesis by its cholesterol-lowering independent actions. Hypertens Res 2000; 23: 353–358.
129. Pruefer D, Scalia R, Lefer AM. Simvastatin inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against inflammatory processes in normocholesterolemic rats. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 2894–2900.

130. Weber C, Erl W, Weber KS, Weber PC. HMG-CoA reductase inhibitorsdecrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. J Am Coll Cardiol 1997; 30: 1212–1217.
131. Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, et al. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. Nat Med 2001; 7: 687-692.
132. Colli S, Eligini S, Lalli M. Vastatins inhibit tissue factor in cultured human macrophages. A novel mechanism of protection against atherothrombosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17: 265-272.
133. Nagata K, Ishibashi T, Sakamoto T. Rho/Rho-kinase is involved in the synthesis of tissue factor in human monocytes. Atherosclerosis 2002; 163: 39-47.
134. Eto M, Kozai T, Cosentino F, Joch H, Luscher TF. Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways. Circulation 2002; 105: 1756-1759.
135. Eto M, Luscher TF. Modulation of coagulation and fibrinolytic pathways by statins. Endothelium 2003; 10: 35-41.
136. Banfi C, Brioschi M, Lento S, Pirillo A, Galli S, Cosentino S, Tremoli E, Mussoni L. Statins prevent tissue factor induction by protease-activated receptors 1 and 2 in human umbilical vein endothelial cells in vitro. J Thromb Haemost. 2011; 9: 1608-1619.
137. Coughlin SR. Protease-activated receptors in vascular biology. Thrombosis Haemost. 2001; 86: 298-307.
138. Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. Proteinase-activated receptors.Pharmacol. Rev. 2001; 53: 245–282.
139. Schmidlin F, Bunnett NW. Protease-activated receptors: how proteases signal to cells. Curr. Opin. Pharmacol. 2001; 1: 575–582.
140. Trejo J. Protease-activated receptors: new concepts in regulation of G protein-coupled receptor signaling and trafficking. J. Pharmacol. Exp. Ther 2003; 307, 437–442.
141. Monetti M, Canavesi M, Camera M, Parente R, Paoletti R, Tremoli E, Corsini A, Bellaosta S. Rosuvastatin displays anti-atherothrombotic and anti-inflammatory properties in apoE-deficient mice. Pharmacol Res. 2007; 5: 441-9.

142. Bea F, Blessing E, Shelley MI, Shultz JM, Rosenfeld ME. Simvastatin inhibits expression of tissue factor in advanced atherosclerotic lesions of apolipoprotein E deficient mice independently of lipid lowering: potential role of simvastatin-mediated inhibition of Egr-1 expression and activation. Atherosclerosis 2003; 2: 187-194.
143. Cortellaro M, Cofrancesco E, Arbustini E, Rossi F, Negri A, Tremoli E, Gabrielli L, Camera M. Atorvastatin and thrombogenicity of the carotid atherosclerotic plaque: the ATROCAP study. Thromb Haemost 2002; 88: 41-47.
144. Andrié RP, Bauriedel G, Braun P, Hopp HW, Nickenig G, Skowasch D. Increased expression of C-reactive protein and tissue factor in acute coronary syndrome lesions: Correlation with serum C-reactive protein, angioscopic findings, and modification by statins. Atherosclerosis 2009; 202: 135-143.
145. Tehrani S, Mobarrez F, Antovic A, Santesson P, Lins PE, Adamson U, Henriksson P, Wallen NH, Jorneskog G. Atorvastatin has antithrombotic effects in patients with type 1 diabetes and dyslipidemia. Thromb Res 2010; 126: 225-231.
146. Rosenson RS, Tangney CC. Antiatherothrombotic properties of statins: implications for cardiovascular event reduction. JAMA 1998; 279: 1643-1650.
147. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001; 21: 1712-1719.
148. Undas A, Brummel-Ziedins KE, Mann KG. Statins and blood coagulation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005; 25: 287-294.
149. Undas A, Celinska-Lowenhoff M, Brummel-Ziedins KE, Brozek J, Szczeklik A, Mann KG. Simvastatin given for 3 days can inhibit thrombin generation and activation of factor V and enhance factor Va inactivation in hypercholesterolemic patients. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005; 25: 1524-1525.
150. Undas A, Celinska-Lowenhoff M, Domagala TB, et al. Early antithrombotic and anti-inflammatory effects of simvastatin versus fenofibrate in patients with hypercholesterolemia. Thromb Haemost 2005; 94: 193-199.
151. Undas A, Brummel KE, Musial J, Mann KG, Szczeklik A. Simvastatin depresses blood clotting by inhibiting activation of prothrombin, factor V, and factor XIII and by enhancing factor Va inactivation. Circulation 2001; 103: 2248-2253.
152. Undas A, Brummel-Ziedins KE, Potaczek DP, Stobierska-Dzierzek B, Bryniarski L, Szczeklik A, Mann KG. Atorvastatin and quinapril inhibit blood coagulation in

patients with coronary artery disease following 28 days of therapy. J Thromb Haemost. 2006; 4: 2397-2404.

153. Sanguignu V, Pignatelli P, Lenti L, Ferro D, Bellia A, Carnevale R, Tesauro M, Sorge R, Lauro R, Violi F. Short-term treatment with atorvastatin reduces platelet CD40 ligand and thrombin generation in hypercholesterolemic patients. Circulation 2005; 111: 412-419.
154. Mok CC, Wong CK, TO CH, Lai JP, Lam CS. Effects of rosuvastatin on vascular biomarkers and carotid atherosclerosis in lupus: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Arthritis Care Res (Hoboken). 2011; 63: 875-883.
155. Masamura K, Oida K, Kanehara H, Suzuki J, Horie S, Ishii H, Miyamori I. Pitavastatin-induced thrombomodulin expression by endothelial cells acts via inhibition of small G proteins of the Rho family. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23: 512-517.
156. Lin Z, Kumar A, SenBanerjee S, Staniszewski K, Parmar K, Vaughan DE, Gimbrone MA, Balasubramanian V, Garcia-Cardena G, Jain MK. Kruppel-like factor 2 (KLF2) regulates endothelial thrombotic function. Circ Res 2005; 96: 48-57.
157. Esmon CT. The protein C pathway. Chest 2003; 124: 26S-32S.
158. Fu Q, Wang J, Boerma M, Berbee M, Qiu X, Fink LM, Hauer-Jensen M. Involvement of heat shock factor 1 in statin-induced transcriptional upregulation of endothelial thrombomodulin. Circ Res 2008; 103: 369-377.
159. Shi J, Wang J, Zheng H, Ling W, Joseph J, Li D, Metha JL, Ponnappan U, Lin P, Fink LM, Hauer-Jensen M. Statins increase thrombomodulin expression and function in human endothelial cells by a nitric oxide-dependent mechanism and counteract tumor necrosis factor alpha-induced thrombomodulin downregulation. Blood Coagul Fibrinolysis 2003; 14: 575-585.
160. Fabris B, Chen BZ, Pupic V, Perich R, Johnston CI. Inhibition of angiotensin-converting enzyme (ACE) in plasma and tissue. J Cardiovasc Pharmacol 1990; 15: 6-13.
161. Fabris B, Yamada H, Cubela R, Jackson B, Mendelsohn FA, Johnston CI. Characterization of cardiac angiotensin converting enzyme (ACE) and in vivo inhibition following oral quinapril to rats.Br J Pharmacol 1990; 100: 651-655.
162. Cushman DW, Cheung HS. Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. Biochim Biophys Acta 1971; 250: 261-265.

163. Dzau VJ. Implications of local angiotensin production in cardiovascular physiology and pharmacology. Am J Cardiol 1987; 59: 59A-65A.
164. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. Circ Res 2000; 87: 840-844.
165. Linz W, Itter G, Dobrucki LW, Malinski T, Wiemer G. Ramipril improves nitric oxide availability in hypertensive rats with failing hearts after myocardial infarction. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst 2003; 4: 180-185.
166. Pretorius M, Rosenbaum D, Vaughan DE, Brown NJ. Angiotenisn-converting enzyme inhibition increases human vascular tissue-type plasminogen activator release through endogenous bradykinin. Circulation. 2003; 107: 579-585.
167. Pals DT, Masucci FD, Sipos F, Denning GS. A specific competitive antagonist of the vascular action of angiotensin.II. Circ Res. 1971; 29: 664–672.
168. Te Riet L, van Esch JH, Roks AJ, van den Meiracker AH, Danser AH2. Hypertension: Renin-Angiotensin-aldosterone system alterations. Circ Res. 2015; 116: 960-975.
169. Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeiffer CA, Hagl S, Libby P, Kubler W. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 1623–1629.
170. Han Y, Runge MS, Brasier AR. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. Circ Res 1999; 84: 695–703.
171. Hernandez-Presa M, Bustos C, Ortego M, Tunon J, Renedo G, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. Circulation 1997; 95: 1532–1541.
172. Kortekaas KE, Meijer CA, Hinnen JW, Dalman RL, Xu B, Hamming JF, Lindeman JH. ACEI inhibitors potently reduce vascular inflammation, results of an open proof-of-concept study in the abdominal aortic aneurysm. PLoS One. 2014; 9: e111952.
173. Brull DJ, Sanders J, Rumley A, Lowe GD, Humphries SE, Montgomery HE. Impact of angiotensin converting enzyme inhibition on post-coronary artery bypass interleukin 6 release. Heart. 2002; 87: 252-255.

174. Trevelyan J, Brull DJ, Needham EW, Montgomery HE, Morris A, Mattu RK. Effect of enalapril and losartan on cytokines in patients with stable angina pectoris awaiting coronary artery bypass grafting and their interaction with polymorphisms in the interleukin-6 gene. Am J Cardiol. 2004; 94: 564-569.
175. Soejima H, Ogawa H, Yasue H, Kaikita K, Takazoe K, Nishiyama K, Misumi K, Miyamoto S, Yoshimura M, Kugiyama K, Nakamura S, Tsuji I. Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces monocyte chemoattractant protein-1 and tissue factor levels in patients with myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 1999; 34: 983-988.
176. Napoleone E, Di Santo A, Camera M, Tremoli E, Lorenzet R. Angiotensin-converting enzyme inhibitors downregulate tissue factor synthesis in monocytes. Circ Res. 2000; 86 :139-143.
177. He M, He X, Xie Q, Chen F, He S. Angiotensin II induces the expression of tissue factor and its mechanism in human monocytes. Thromb Res. 2006; 117: 579-590.
178. Napoleone E, Di Santo A, Camera M, Tremoli E, Larenzet R. Angiotensin-converting enzyme inhibitors downregulate tissue factor synthesis in monocytes. Circ Res 2000; 86: 139-143.
179. Lindmark E, Siegbahn A. Tissue factor regulation and cytokine expression in monocyte-endothelial cell co-cultures: effects of a statin, an ACE-inhibitor and a low-molecular-weight heparin. Thromb Res. 2002; 108: 77-84.
180. Ekholm M, Wallen NH, Johnsson H, Eliasson K, Kahan T. Long-term angiotensin-converting enzyme inhibition with ramipril reduces thrombin generation in human hypertension. Clin Sci (Lond) 2002; 103: 151-155.
181. Perez-Ruiz A, Montes R, Velasco F, Lopez-Pedrera C, Antonio-Paramo J, Orbe J, Hermida J, Rocha E. Regulation by nitric oxide of endotoxin-induced tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 in endothelial cells. Thromb Haemost 2002; 88: 1060-1065.
182. Sakamoto T, Kudoh T, Sakamoto K, Kunihiko Matsui K, Hisao Ogawa H. Antithrombotic effects of losartan in patients with hypertension complicated by atrial fibrillation: 4A (Angiotensin II Antagonist of platelet Aggregation in patients with Atrial fibrillation), a pilot study. Hypertension Research 2014; 37: 513-518.
183. Malyszko J, Tymcio J. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and other hemostatic parameters in patients with essential arterial hypertension. Pol Arch Med Wewn. 2008; 118: 36-41.

184. Kothari SA, Le MK, Gandhi PJ. Effects of angiotensin converting enzyme inhibitors on thrombotic mediators: potential clinical implications. J Thromb Thrombolysis 2003; 15: 217-225.
185. Brown NJ, Nadeau JH, Vaughan DE. Selective stimulation of tissue-type plasminogen activator (t-PA) in vivo by infusion of bradykinin. Thromb Haemost 1997; 77: 522-525.
186. Wojewódzka-Zelezniakowicz M1, Chabielska E, Mogielnicki A, Kramkowski K, Karp A, Opadczuk A, Domaniewski T, Malinowska-Zaprzałka M, Buczko W. Antithrombotic effect of tissue and plasma type angiotensin converting enzyme inhibitors in experimental thrombosis in rats. J Cardiovasc Pharmacol 2006; 57: 231-245.
187. Kramkowski K, Mogielnicki A, Chabielska E, Cylwik D, Buczko W. The effect of tissue and plasma angiotensin converting enzyme inhibitors on overall haemostatic potentials in rats. Thromb Res 2006; 117: 557-561.
188. Oikawa T, Freeman M, Lo W, Vaughan DE, Fogo A. Modulation of plasminogen activator inhibitor-1 in vivo: a new mechanism for the anti-fibrotic effect of renin-angiotensin inhibition. Kidney Int. 1997; 51: 164-172.
189. Katoh M, Egashira K, Mitsui T, Chishima S, Takeshita A, Narita H. Angiotensin-converting enzyme inhibitor prevents plasminogen activator inhibitor-1 expression in a rat model with cardiovascular remodeling induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. J Mol Cell Cardiol. 2000; 32: 73-83.
190. Tsikouris JP, Suarez JA, Meyerrose GE, Ziska M, Fike D, Smith J. Questioning a class effect: does ACE inhibitor tissue penetration influence the degree of fibrinolytic balance alteration following an acute myocardial infarction? J Clin Pharmacol 2004; 44: 150-157.
191. Soejima H, Ogawa H, Suefuji H, Kaikita K, Takazoe K, Miyamoto S, Kajiwara I, Shimomura H, Sakamoto T, Yoshimura M, Nakamura S. Effects of imidapril therapy on endogenous fibrinolysis in patients with recent myocardial infarction. Clin Cardiol 1997; 20: 441-445.
192. Vahanian A, Alfieri O, Andreotti F, Antunes MJ, Barón−Esquivias G, Baumgartner H, Borger MA, Carrel TP,De Bonis M, Evangelista A, Falk V, Iung B, Lancellotti P, Pierard L, Price S, Schäfers HJ, Schuler G, Stępińska J,Swedberg K, Takkenberg J, Von Oppell UO, Windecker S, Zamorano JL, Zembala M.

Wytyczne dotyczące postępowania w zastawkowych wadach serca na 2012 rok. Kardiologia Polska 2012; 70: 319–372.

193. Lamprecht MR, Sabatini DM, Carpenter AE. CellProfiler: free, versalite software for auto mated biological image analysis. Biotechniques. 2007; 42: 71‑75.
194. Clark-Greuel JN, Connolly JM, Sorichillo E, Narula NR, Rapoport HS, Mohler ER 3rd, Gorman JH 3rd, Gorman RC, Levy RJ. Transforming growth factor-beta1 mechanisms in aortic valve calcification: increased alkaline phosphatase and related events. Ann Thorac Surg. 2007; 83: 946-953.
195. Tyburski J, Studźińska A, Daca P, Treryn A. PCR w czasie rzeczywistym. Metody analizy danych. Biotechnologia 2008; 1: 86-96.
196. Miller JD, Chu Y, Brooks RM, Richenbacher WE, Peña-Silva R, Heistad DD. Dysregulation of antioxidant mechanisms contributes to increased oxidative stress in calcific aortic valvular stenosis in humans. J Am Coll Cardiol. 2008; 2: 843-850.
197. Nagy E, Andersson DC, Caidahl K, Eriksson MJ, Eriksson P, Franco-Cereceda A, Hansson GK, Bäck M. Upregulation of the 5-lipoxygenase pathway in human aortic valves correlates with severity of stenosis and leads to leukotriene-induced effects on valvular myofibroblasts. Circulation. 2011; 29: 1316-1325.
198. Ding J, Ghali O, Lencel P, Broux O, Chauveau C, Devedjian JC, Hardouin P, Magne D. TNF-alpha and IL-1beta inhibit RUNX2 and collagen expression but increase alkaline phosphatase activity and mineralization in human mesenchymal stem cells. Life Sci. 2009: 10: 499-504.
199. Meng X, Ao L, Song Y, Babu A, Yang X, Wang M, Weyant MJ, Dinarello CA, Cleveland JC Jr, Fullerton DA. Expression of functional Toll-like receptors 2 and 4 in human aortic valve interstitial cells: potential roles in aortic valve inflammation and stenosis. Am J Physiol Cell Physiol. 2008; 294: 29-35.
200. Yang X, Fullerton DA, Su X, Ao L, Cleveland JC Jr, Meng X. Pro-osteogenic phenotype of human aortic valve interstitial cells is associated with higher levels of Toll-like receptors 2 and 4 and enhanced expression of bone morphogenetic protein 2. J Am Coll Cardiol. 2009; 53: 491-500.
201. Nataraj C, Oliverio MI, Mannon RB, Mannon PJ, Audoly LP, Amuchastegui CS, Ruiz P, Smithies O, Coffman TM. Angiotensin II regulates cellular immune responses through a calcineurin-dependent pathway. J Clin Invest. 1999; 104: 1693-1701.

202. Gao X, He X, Luo B, Peng L, Lin J, Zuo Z. Angiotensin II increases collagen I expression via transforming growth factor-beta1 and extracellular signal-regulated kinase in cardiac fibroblasts. Eur J Pharmacol. 2009; 606: 115-120.
203. Martin J, Denver R, Bailey M, Krum H. In vitro inhibitory effects of atorvastatin on cardiac fibroblasts: implications for ventricular remodelling. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2005; 32: 697-701.
204. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. Anal Biochem. 2004; 329: 77-84.
205. Hermans H, Herijgers P, Holvoet P, Verbeken E, Meuris B, Flameng W, Herregods MC. Statins for calcific aortic valve stenosis: into oblivion after SALTIRE and SEAS? An extensive review from bench to bedside. Curr Probl Cardiol. 2010; 35: 284-306.
206. O'Brien KD, Shavelle DM, Caulfield MT, McDonald TO, Olin-Lewis K, Otto CM, Probstfield JL. Association of angiotensin-converting enzyme with low-density lipoprotein in aortic valvular lesions and in human plasma. Circulation. 2002; 106: 2224-2230.
207. Kamio K, Liu XD, Sugiura H, Togo S, Kawasaki S, Wang X, Ahn Y, Hogaboam C, Rennard SI. Statins inhibit matrix metalloproteinase release from human lung fibroblasts. Eur Respir J. 2010; 35: 637-646.
208. Kiyan J, Kusch A, Tkachuk S, Krämer J, Haller H, Dietz R, Smith G, Dumler I. Rosuvastatin regulates vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in vascular remodeling: role for the urokinase receptor. Atherosclerosis. 2007; 195: 254-261.
209. Lins RL, Matthys KE, Verpooten GA, Peeters PC, Dratwa M, Stolear JC, Lameire NH. Pharmacokinetics of atorvastatin and its metabolites after single and multiple dosing in hypercholesterolaemic haemodialysis patients. Nephrol Dial Transplant. 2003; 18: 967-976.
210. McKenney JM, Jones PH, Adamczyk MA, Cain VA, Bryzinski BS, Blasetto JW; STELLAR Study Group. Comparison of the efficacy of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin, and pravastatin in achieving lipid goals: results from the STELLAR trial. Curr Med Res Opin. 2003; 19: 689-698.
211. Martin P. Mitchell PD, Schneck DW. Pharmacodynamic effects and pharmacokinetics of a new HMG-CoA reductase inhibitor, rosuvastatin, after morning or

evening administration in healthy volunteers. Br J Clin Pharmacol. 2002; 54: 472-477.

212. Gajula R, Pilli NR, Ravi VB, Maddela R, Inamadugu JK, Polagani SR, Busa S. Simultaneous Determination of Atorvastatin and Aspirin in Human Plasma by LC-MS/MS: Its Pharmacokinetic Application. Sci Pharm. 2012; 80: 923-940.
213. Mahadevan VS, Campbell M, McKeown PP, Bayraktutan U. Internal mammary artery smooth muscle cells resist migration and possess high antioxidant capacity. Cardiovasc Res. 2006; 72: 60-68.
214. Benicky J, Sánchez-Lemus E, Honda M, Pang T, Orecna M, Wang J, Leng Y, Chuang DM, Saavedra JM. Angiotensin II AT1 receptor blockade ameliorates brain inflammation. Neuropsychopharmacology. 2011; 36: 857-870.
215. Lee J, Son J, Lee M, Lee KT, Kim DH. Simultaneous quantitation of enalapril and enalaprilat in human plasma by 96-well solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2003; 17: 1157-1162.
216. Yu M, Zheng Y, Sun HX, Yu DJ. Inhibitory effects of enalaprilat on rat cardiac fibroblast proliferation via ROS/P38MAPK/TGF-β1 signaling pathway. Molecules. 2012; 17: 2738-2751.
217. Jia G, Stormont RM, Gangahar DM, Agrawal DK. Role of matrix Gla protein in angiotensin II-induced exacerbation of vascular calcification. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2012; 303: 523-532.
218. He MX, He XF, Xie QZ, Chen FP, He SL. Effect of angiotensin II on tissue factor expression in human peripheral blood monocytes and its mechanisms. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi. 2003; 24: 470-473.
219. Sugano T, Tsuji H, Masuda H, Nishimura H, Yoshizumi M, Kawano H, Kimura S, Ukimura N, Yano S, Kunieda Y, Nakagawa K, Nakagawa M. Adrenomedullin inhibits angiotensin II-induced expression of tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 in cultured rat aortic endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001; 21: 1078-1083.
220. Blanc-Brude OP, Archer F, Leoni P, Derian C, Bolsover S, Laurent GJ, Chambers RC. Factor Xa stimulates fibroblast procollagen production, proliferation, and calcium signaling via PAR1 activation. Exp Cell Res. 2005; 304 : 16-27.

221. Borensztajn K, Stiekema J, Nijmeijer S, Reitsma PH, Peppelenbosch MP, Spek CA. Factor Xa stimulates proinflammatory and profibrotic responses in fibroblasts via protease-activated receptor-2 activation. Am J Pathol. 2008; 172: 309-320.
222. Deng X, Mercer PF, Scotton CJ, Gilchrist A, Chambers RC. Thrombin induces fibroblast CCL2/JE production and release via coupling of PAR1 to Galphaq and cooperation between ERK1/2 and Rho kinase signaling pathways. Mol Biol Cell. 2008; 19: 2520-2533.
223. Moore BB, Kolodsick JE, Thannickal VJ, Cooke K, Moore TA, Hogaboam C, Wilke CA, Toews GB. CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury. Am J Pathol. 2005; 166: 675-684.
224. Toli K, Paraskevas KI, Poulakou MV, Agrogiannis G, Kavantzas N, Xanthopoulos V, Iliopoulos DG, Mantas I, Papachristodoulou A, Patsouris E, Mikhailidis DP, Perrea DN. Association between plasma levels and immunolocalization of cytokines in heart valve lesions: a possible target for treatment? Expert Opin Ther Targets. 2008; 12: 1209-1215.
225. Lim JJ, Li X, Lu J, Pedego TM, Demer L, Tintut Y. Protective Role of Smad6 in Inflammation-Induced Valvular Cell Calcification. J Cell Biochem. 2015 [w druku].
226. Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, White M, Carroll SF, Palardy JE, Parejo NA, Pribble JP, Lemke JH. Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. J Infect Dis. 1999; 180: 1584-1589.
227. Shimizu T, Tani T, Endo Y, Hanasawa K, Tsuchiya M, Kodama M. Elevation of plasma peptidoglycan and peripheral blood neutrophil activation during hemorrhagic shock: plasma peptidoglycan reflects bacterial translocation and may affect neutrophil activation. Crit Care Med. 2002; 30: 77-82.
228. Matsui T, Tamaya K, Matsumoto K, Osajima Y, Uezono K, Kawasaki T. Plasma concentrations of angiotensin metabolites in young male normotensive and mild hypertensive subjects. Hypertens Res. 1999; 22: 273-277.
229. Junot C, Nicolet L, Ezan E, Gonzales MF, Menard J, Azizi M. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on plasma, urine, and tissue concentrations of hemoregulatory peptide acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro in rats. J Pharmacol Exp Ther. 1999; 291: 982-987.

230. Helske S, Lindstedt KA, Laine M, Mäyränpää M, Werkkala K, Lommi J, Turto H, Kupari M, Kovanen PT. Induction of local angiotensin II-producing systems in stenotic aortic valves. J Am Coll Cardiol. 2004; 44: 1859-1866.
231. Osman L, Yacoub MH, Latif N, Amrani M, Chester AH. Role of human valve interstitial cells in valve calcification and their response to atorvastatin. Circulation. 2006; 114: 547-552.