

**Санкт-Петербургский политехнический университет
Петра Великого
Институт биомедицинских систем и технологий**

На правах рукописи

Костина Дарья Алексеевна

**Изучение механизмов участия гладкомышечных клеток в патогенезе
аневризмы грудной аорты у человека**

Направление подготовки 06.06.01 Биологические науки

Код и наименование

Направленность 06.06.01_12 Биофизика

Код и наименование

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

об основных результатах научно-квалификационной работы (диссертации)

Автор работы: Костина Дарья
Алексеевна

Научный руководитель: профессор,
д.б.н., Воробьев Константин
Владимирович

Санкт Петербург – 2019

Научно-квалификационная работа выполнена на кафедре «Медицинская физика» Института биомедицинских систем и технологий федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Зав.каф.
Директор института
ИБСиТ СПбПУ:

*Власова Ольга Леонардовна
д.ф.-м.н., профессор кафедры
Медицинская физика*

Научный руководитель:

*Воробьев Константин
Владимирович, д.б.н., профессор
кафедры Медицинская физика*

Рецензент:

*– Фрейлихман Ольга
Александровна, к.б.н.,
заведующий лабораторией
молекулярно-биологических
технологий, ФБУН НИИЭМ
имени Пастера*

С научным докладом можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» и на сайте Электронной библиотеки СПбПУ по адресу: <http://elib.spbstu.ru>

Содержание

Содержание	5
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.....	6
Актуальность работы.....	6
Цель и задачи исследования	8
Научная новизна.....	9
Теоретическая и практическая значимость	10
Апробация работы.....	11
Представление научного доклада: основные положения	11
СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.....	13
Объекты и методы исследования	14
Методы исследования:	15
Результаты и их обсуждение.....	16
Заключение	30
Публикации.....	30
Список литературных источников	33

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Изучение клеточных механизмов патогенеза аневризмы аорты является актуальной и практически значимой задачей, поскольку на сегодняшний день отсутствует консервативная терапия для пациентов, страдающих этим заболеванием. Гладкомышечные клетки ответственны за поддержание механических свойств аорты и поддержание ее структурной целостности, так как обладают синтетической и сократительной функциями. Аневризма аорты- это патологическое расширение диаметра сосуда более чем на 50%, что ведет к потере прочности и эластичности аорты и риску возникновения разрыва аорты. Это смертельно опасное заболевание, поскольку аорта является магистральным сосудом. Весь объем крови, поступающий из левого желудочка сердца в большой круг кровообращения, попадает в грудную аорту. Ткань стенки аорты при аневризме деструктурирована, нарушена организация внеклеточного матрикса, часто имеет место воспалительный процесс и некроз. Все это нарушает способность сосуда противостоять постоянному гемодинамическому стрессу. Аорта перестает выдерживать напор кровяного давления, постепенно истончается, и, в конечном итоге, происходит её разрыв. В случае разрыва аорты у пациента кровопотери не совместимы с жизнью. Единственным эффективным методом лечения аневризм является хирургическая операция (Davis, Rateri, and Daugherty 2014). Понимание биологических процессов, происходящих на клеточном уровне и лежащих в основе патогенеза заболевания необходимо для поиска новых терапевтических подходов. Еще одной проблемой, с которой сталкивается современная медицина- это своевременная диагностика аневризмы аорты. Как уже отмечалось выше, заболевание, как правило, протекает бессимптомно вплоть до самой последней стадии. Для того чтобы сделать

возможным поиск ранних диагностических маркеров аневризмы, необходимо проведение фундаментальных исследований, которые позволят понять механизм развития заболевания.

Настоящее исследование посвящено изучению роли гладкомышечных клеток (ГМК) в патогенезе аневризмы грудной аорты (АГА). ГМК считают основным структурным и функциональным элементом стенки аорты. Поэтому есть основания полагать, что им принадлежит ведущая роль в развитии заболевания, так как к их функциям относится синтез внеклеточного матрикса (эластина, коллагена), формирующего структуру аорты и придающего ей эластичность (Curci 2009). Гладкомышечные клетки играют центральную роль во взаимодействии между ферментами, вызывающими деградацию матрикса и воспалительными процессами. Имеются работы, посвященные роли внеклеточного матрикса и уровню продукции гладкомышечными клетками ферментов, разрушающих этот матрикс, в формировании аневризмы аорты (Nataatmadja et al. 2003). В данной работе сделано предположение, что фундаментальная причина развития аневризмы аорты кроется в неправильной работе сосудистых гладкомышечных клеток.

В целом же роль ГМК в патогенезе аневризмы аорты изучена слабо. Поэтому сравнение свойств ГМК из стенки аорты с аневризмой и из стенки здоровой аорты является актуальной научной задачей.

Аневризма грудной аорты (АГА) может быть различной этиологии. Около 20% пациентов, страдающих АГА, имеют отягощенную семейную историю (Luuskx and Loeys 2015). К генетическим факторам, приводящим к АГА относят мутации в генах-компонентах сигнального пути Notch. (Mckellar et al. 2007)(Garg et al. 2005)(Mcbride et al. 2008)(Mohamed et al. 2006). Сигнальный путь Notch вовлечен в процесс дифференцировки ГМК (Doi et al. 2006) и, более того, является важнейшим регулятором ГМК (Boucher, Gridley, and Liaw 2012). Сигнальный путь Notch не только влияет на выбор направления дифференцировки клеток в

процессе эмбриогенеза и играет ключевую роль в развитии сердечно-сосудистой системы, но так же определяет дифференцировочные решения ГМК и ЭК во взрослом организме. Зрелые ГМК экспрессируют рецепторы Notch1,2,3 и лиганды Dll1, Jag1. Среди всех Notch рецепторов и лигандов важнейшими для ГМК являются Notch2 и Notch3, так как они влияют и на фенотип, и на функцию ГМК (Baeten and Lilly 2015). Активация рецепторов Notch1 и Notch3 одновременно стимулирует пролиферацию и подавляет апоптоз и миграцию ГМК (Sweeney et al. 2004). Notch усиливает экспрессию SMA в ГМК, маркерного белка ГМК, ответственного за приобретение клетками сократительного фенотипа (Nosedá et al. 2006). Однако, по данным некоторых исследований, Notch подавляет дифференцировку ГМК и снижает выраженность сократительного фенотипа (Cummins et al. 2005) (Proweller, Pear, and Parmacek 2005). Таким образом, данные исследований противоречивы, и в настоящее время остается неизвестным как и в каком направлении Notch направляет дифференцировочные процессы.

Данные об участии Notch в процессах остеодифференцировки так же противоречивы: имеются данные как о том, что Notch усиливает экспрессию остеогенов, так и о том, что он ее подавляет (Theodoris et al. 2015).

Таким образом, изучение роли сигнального пути Notch в остеодифференцировке ГМК и в нарушении свойств ГМК при аневризме является актуальной научной задачей.

Цель и задачи исследования

Прояснить механизмы, которые приводят к ослаблению способности гладкомышечных клеток обеспечивать структурную целостность и прочность стенки аорты при аневризме грудной аорты у человека и выявить возможные различия в этих механизмах между гладкомышечными клетками пациентов, имеющих аномалию развития- бicuspidальный аортальный клапан (БАК), и клетками от пациентов с изолированной формой заболевания.

Для достижения указанной цели были сформулированы следующие экспериментальные задачи:

1. Выявить нарушения функциональных свойств ГМК при аневризме, проявляемых в клеточных культурах.

1.1. Охарактеризовать пролиферативные свойства, способность к миграции и способность ГМК вступать в апоптоз при аневризме аорты и в норме.

1.2. Провести сравнение содержания ряда структурных, а так же функционально важных белков гладкомышечных клеток в стенке аорты, в гладкомышечных клетках здоровых доноров и пациентов с аневризмой.

2. Разработать методику получения здоровых гладкомышечных клеток человека, пригодных для исследований *in vitro* из альтернативного донорскому материалу источника.

3. Изучение роли сигнального пути Notch в нарушении тех свойств ГМК, которые могут приводить к потере механических способностей аорты при аневризме.

3.1. Изучение способности ГМК вступать в остеодифференцировку при активации сигнального пути Notch.

3.2. Сравнение способности ГМК вступать в остеодифференцировку при аневризме грудной аорты и в норме.

Научная новизна

Научная новизна выпускной квалификационной работы аспиранта определяется тем, что для исследований был использован уникальный материал- первичные культуры гладкомышечных клеток стенки грудной аорты пациентов, которым проводилась операция по коррекции аневризмы аорты и гладкомышечные клетки здоровых доноров. Исследование роли дифференцировочных процессов на клеточном уровне в нарушении структурной и функциональной целостности аорты и потере ею механических характеристик является современным

подходом к изучению заболевания. В ходе работы была создана большая коллекция клеточных культур- порядка ста образцов, которые использовались на различных этапах исследования. В работе впервые было проведено сравнение таких базовых характеристик клеточных культур ГМК пациентов и здоровых доноров, как способность к пролиферации, способность к миграции, способность вступать в апоптоз и базовый уровень апоптоза в клеточных культурах, синтетические способности ГМК пациентов. Выявленные различия в важнейших характеристиках клеточных культур пациентов и здоровых доноров позволяют говорить о значительной роли ГМК в патогенезе заболевания. Исследование роли сигнального пути Notch в процессах сосудистой кальцификации так же ранее не проводилось на культурах ГМК человека, роль процессов Notch-зависимой кальцификации в патогенезе аневризмы грудной аорты была исследована впервые в ходе проведения данной работы. Кроме того, в предоставляемом исследовании впервые были получены ГМК из фрагментов стенки здоровой аорты, удаленных в ходе аорто-коронарного шунтирования. Такие клеточные культуры могут быть использованы для исследований, как альтернатива труднодоступному донорскому материалу.

Теоретическая и практическая значимость

В ходе выполнения работы были выявлены различия в свойствах гладкомышечных клеток от двух групп пациентов: пациентов, у которых имеется аномалия развития аортального клапана (БАК) и пациентов, страдающих изолированной формой аневризмы аорты, без патологии аортального клапана. Эти результаты находятся в соответствии с современным представлением о различных механизмах формирования аневризм при БАК и ТАК (Folkersen et al., n.d.)(Kjellqvist et al., n.d.)(Phillippi et al. 2009). Различия были выявлены как в фенотипических свойствах ГМК на уровне клеточных культур, так и в дифференцировочном статусе ГМК, профиле экспрессии генов, относящихся к сигнальному пути Notch, сократительных и остео- генов. Эти результаты говорят о том, что пациенты с БАК и с ТАК должны рассматриваться как две независимые группы и при поиске новых терапевтических стратегий в ведении

таких пациентов обязательно нужно учитывать, что этиология развития заболевания у пациентов с БАК и с ТАК различна.

В ходе выполнения работы был впервые предложен и апробирован альтернативный источник материала для получения культур нормальных, здоровых ГМК человека без использования трупного материала. В качестве такого источника были предложены фрагменты аорты, удаляемые в ходе операции аортокоронарного шунтирования (АКШ). Согласно исследованию, ГМК АКШ пригодны для использования в качестве модельного объекта в научных исследованиях и при проведении доклинических испытаний.

Апробация работы

Результаты исследования были представлены на нижеперечисленных конференциях:

1. Всероссийская 17 Зимняя молодежная школа ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии с 29 февраля по 5 марта 2016 года со стендовым докладом “Роль гладкомышечных клеток в формировании аневризмы грудной аорты у человека”
2. Международная конференция Symposium of the International Atherosclerosis Society – “Anitschkow Days” 2-4 июня 2016 года с устным докладом “Notch signaling is differently altered in smooth muscle and endothelial cells of thoracic aortic aneurysm patients”
3. Международная конференция Frontiers in Cardio Vascular Biology 8-10 июля 2016 со стендовым докладом “Notch signaling is differently altered in endothelial and smooth muscle cells from patients with ascending aortic aneurysm”

Представление научного доклада: основные положения

По результатам научно-исследовательской работы были сформулированы следующие основные положения:

1 Гладкомышечные клетки из обеих экспериментальных групп пациентов отличаются по своим фенотипическим свойствам от клеток здоровых доноров. Согласно полученным результатам, ГМК БАК и ГМК ТАК имеют более низкую скорость пролиферации и более высокий уровень апоптоза.

2 Гладкомышечные клетки пациентов, страдающих аневризмой и имеющих бicuspidальный аортальный клапан, отличаются по ряду свойств от клеток пациентов, страдающих изолированной формой заболевания и имеющих нормальный трехстворчатый аортальный клапан. Были обнаружены следующие различия в свойствах ГМК БАК и ГМК ТАК: только ГМК ТАК (но не БАК) обладали повышенной способностью к миграции по сравнению с ГМК Д.

3 При аневризме было обнаружено снижение сократительных белков в ГМК, что говорит о дедифференцированности клеток пациентов и объясняет их неспособность к поддержанию нормального диаметра просвета сосуда.

4 При аневризме было обнаружено изменение способности ГМК синтезировать белки внеклеточного матрикса, которые выполняют роль каркаса аорты и ответственны за ее упругость и прочность, матриксные металлопротеиназы, белки цитоскелета самих ГМК.

5 Фрагменты аорты, получаемые с операций аорто-коронарного шунтирования, пригодны для получения культур ГМК. Такие ГМК по своим культуральным свойствам не отличаются от клеток здоровых доноров.

6 Активация сигнального пути Notch и факторы остеогенной дифференцировки (дексаметазон, β -глицерофосфат и аскорбиновая кислота) выступают как синергисты в процессах остеодифференцировки ГМК.

7 Процессы Notch-зависимой дифференцировки нарушены в ГМК пациентов: ГМК БАК более чувствительны к остеогенной и миогенной дифференцировке при активации сигнального пути Notch, чем ГМК Д и ГМК ТАК.

8 Сокультивирование ГМК с эндотелиальными клетками усиливает способность ГМК к остеодифференцировке.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Научно- квалификационная работа посвящена изучению заболевания-аневризма грудной аорты. В настоящее время причины и патогенез заболевания остаются слабо изученными, основным способом лечения остается хирургическая коррекция аневризмы на терминальной стадии заболевания, когда аорта растягивается и теряет свою прочность настолько, что возникает риск разрыва сосуда. Для поиска консервативных методов лечения необходимо понимание клеточных механизмов формирования аневризмы. Объектом исследования были выбраны гладкомышечные клетки, которые составляют основную клеточную массу стенки аорты, синтезируют белки внеклеточного матрикса, отвечают за поддержание нормальной эластичности и прочности аорты. В ходе исследования было выявлено, что сигнальный путь Notch дезрегулирован у пациентов с аневризмой грудной аорты. Дифференцировочный статус гладкомышечных клеток изменен: содержание сократительных белков понижено, имеется сдвиг в направлении остеодифференцировки. В исследовании сделан акцент на поиск различий между двумя группами пациентов: аневризмы, ассоциированные с пороком аортального клапана- бicuspidальным аортальным клапаном и аневризмы, при которых клапан нормальный, трехстворчатый. Между гладкомышечными клетками двух групп пациентов были обнаружены различия в миграционных способностях, в способности к остеодифференцировке, а так же продукции некоторых белков и транскрипции генов-компонентов сигнального пути Notch. В этом исследовании показано, что патогенез аневризмы, ассоциированной с бicuspidальным аортальным клапаном отличается от патогенеза аневризмы, не ассоциированной с врожденным дефектом клапана. Эти данные согласуются с данными других исследователей. Нарушение функционирования гладкомышечных клеток стенки аорты приводят к потере

аортой механических свойств, что приводит к растяжению сосуда и, в конечном итоге, к разрыву аневризмы.

Список сокращений

АГА- аневризма грудной аорты

АКШ- аорто-коронарное шунтирование

БАК- бicuspidальный аортальный клапан

ГМК- гладкомышечные клетки

ГМ-актин- гладкомышечный актин, маркерный белок гладкомышечных клеток, входящий в цитоскелет.

Д- доноры

ТАК- трикуспидальный аортальный клапан

ЭК- эндотелиальные клетки

Объекты и методы исследования

Объект исследования: Исследование проводилось на культурах гладкомышечных клеток, полученных из стенки грудной аорты от пациентов с аневризмой грудной аорты. В качестве контроля были использованы аортальные гладкомышечные клетки здоровых доноров. Материал пациентов был получен из фрагментов аорты, удаленных в ходе хирургической коррекции аневризмы аорты и с операции аорто-коронарного шунтирования, выполняемой в Национальном Медицинском Исследовательском Центре Алмазова. Контрольные клетки были получены из аорт здоровых доноров в ходе мультиорганных заборов для трансплантации. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом Национального Медицинского Исследовательского Центра Алмазова и соответствует принципам Хельсинской декларации. Для исследования использовалось более чем по 10 культур ГМК от каждой группы пациентов (БАК, ТАК, Д, АКШ)

Методы исследования:

Получение первичных клеточных культур: первичные клеточные культуры были получены методом выделения из фрагментов ткани, обработанной коллагенозой 3.

Оценка пролиферации и миграции: Для оценки пролиферации использовали метод построения кривых роста. Для оценки миграционных способностей- тест с заращением царапины на монослое клеток. (Malashicheva et al. 2016)

Оценка содержания белков ГМК, белков внеклеточного матрикса и синтетических способностей ГМК: Оценку уровня содержания белков в ГМК и в стенке аорты, а так же оценку синтетических способностей ГМК проводили с помощью белкового электрофореза в полиакриламидном геле и окраски с помощью антител. Количество белка оценивали с помощью денситометрии. Для исследования использовали культуры ГМК и фрагменты стенки аорты, а для оценки синтетических способностей ГМК использовали культуральную среду после культивирования в ней клеток.

Активность матриксных металлопротеаз MMP2, MMP9 оценивалась методом зимографии в желатине. (Malashicheva et al. 2016)

Исследование базового уровня апоптоза и способности противостоять окислительному стрессу: Исследование базового уровня апоптоза и способности противостоять окислительному стрессу проводили на культурах ГМК. Клетки окрашивали аннексином V, который специфически связывается с клетками, вступившими в апоптоз. В качестве агента, вызывающего окислительный стресс использовали перекись водорода. Количественную оценку проводили методом проточной цитометрии. (Malashicheva et al. 2016)

Сравнение уровня экспрессии генов в ГМК: Уровень экспрессии генов оценивали с помощью метода ПЦР в реальном времени. Анализ уровня

экспрессии генов проводили методом дискриминантного анализа уровня экспрессии генов.

Исследование влияния сигнального пути Notch на дифференцировку ГМК:

Для активации сигнального пути Notch использовали вирусную трансдукцию. Внутриклеточный домен гена *Notch1*, NICD, вносили с помощью лентивирусной конструкции. Для наработки вирусных частиц, несущих ген NICD использовали метод кальций- фосфатной трансфекции. Для контроля эффективности трансфекции использовали вирус, несущий ген GFP (A. S. Kostina et al. 2016).

Сравнение способности ГМК к остеодифференцировке:

Для стимуляции остеодифференцировки ГМК культивировали в дифференцировочной среде, содержащей стандартный набор остеофакторов. Для оценки уровня остеодифференцировки использовали окраску на щелочную фосфатазу и оценивали уровень продукции остеогенов методом ПЦР в реальном времени. Подробно методика изложена в статье (Elena Ignatieva et al. 2017).

Статистическая обработка данных:

Для построения графиков использовалась программа GraphPad. Для оценки уровня значимости различий использовался t-Test Стьюдента и критерий Манн-Витни. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

При построении кривых роста было показано, что скорость пролиферации ГМК АГА БАК и ТАК более низкая по сравнению с ГМК Д. Количество ГМК Д за 10 дней возросло в среднем в 2,7 раза, тогда как количество клеток пациентов в среднем возросло в 1,5 раза. ($p_{\text{БАК}}=0,0002$; $p_{\text{ТАК}}=0,0005$). (Рисунок 1). Согласно полученным результатам, базовый уровень апоптоза в культурах клеток пациентов повышен. При исследовании способности ГМК пациентов вступать в апоптоз под действием окислительного стресса, была обнаружена устойчивость к выбранному индуктору (перекись водорода) по сравнению с клетками здоровых доноров. (Malashicheva et al. 2016) (рисунок 2). При аневризме стенка

аорты деструктурирована и имеет пониженное содержание клеток (Milewicz et al. 2008).

Исследование пролиферации ГМК

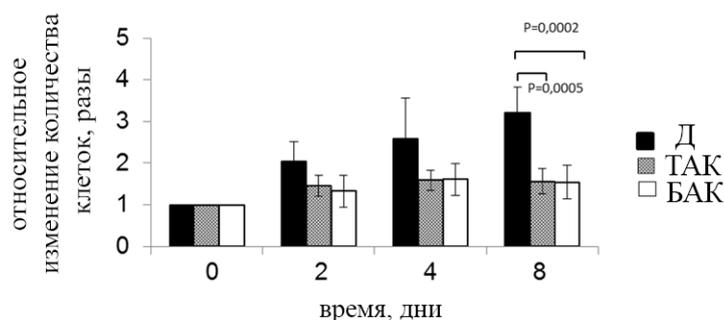


Рисунок 1. Исследование пролиферативных способностей ГМК методом построения кривой роста. Пролиферативные способности оценивались путем подсчета количества клеток на 2, 4, 8 день культивирования. ГМК АГА БАК и ГМК АГА ТАК обладают пониженной способностью к пролиферации.

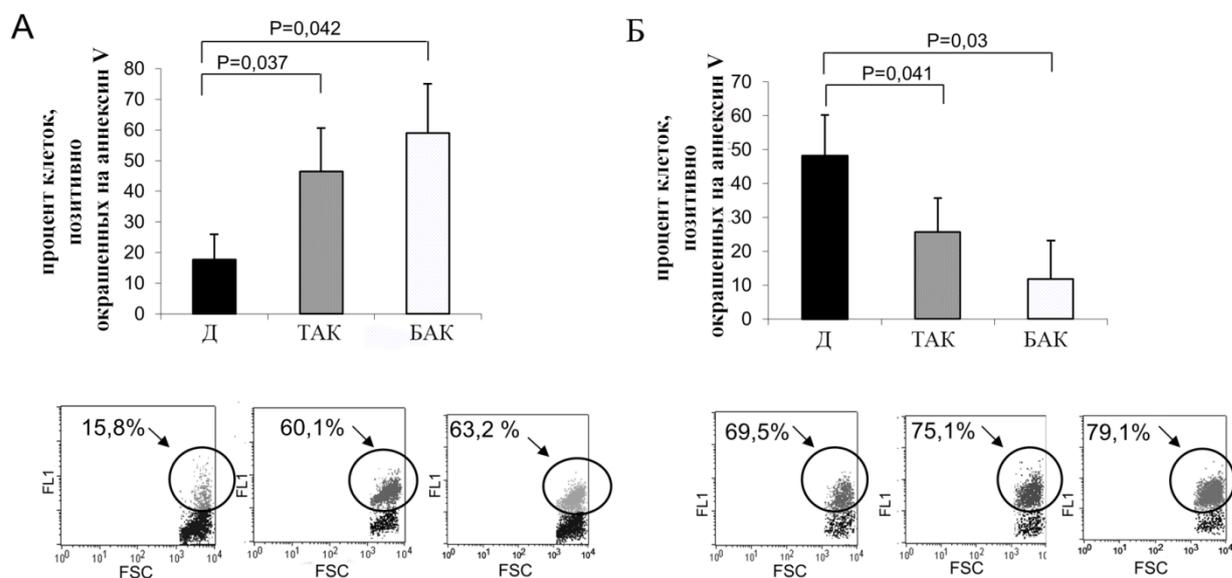


Рисунок 2. А: Исследование базового уровня апоптоза в культурах ГМК методом проточной цитометрии. Базовый уровень апоптоза повышен в ГМК пациентов. **Б: Исследование уровня апоптоза под действием индуктора окислительного стресса- перекиси водорода.** ГМК Д сильнее повышали уровень апоптоза в ответ на окислительный стресс, тогда как ГМК БАК и ГМК ТАК проявляли устойчивость к окислительному стрессу.

Повышенный уровень апоптоза и пониженная способность клеток к размножению, которую мы наблюдали в культурах ГМК пациентов, по-

видимому, является причиной более низкой плотности клеток в аневризменной аорте. Таким образом, мы показали, что деградация сосудистой стенки при аневризме не является пассивным процессом, который происходит под действием механической нагрузки, оказываемой гемодинамическим давлением. Нарушение организации клеточных слоев и волокон внеклеточного матрикса происходит в том числе за счет нарушений клеточных свойств ГМК. Безусловно, нельзя пренебрегать механическими факторами, которые также влияют на развитие заболевания. Однако, мы наблюдали тенденцию к снижению клеточной массы у пациентов на клеточных культурах, в условиях, где фактор гемодинамической нагрузки отсутствует. Из этого можно сделать вывод, что неспособность справляться с механической нагрузкой вызвана именно функциональными изменениями клеток. Интересно, что ГМК пациентов в нашем эксперименте показали лучшую способность противостоять оксидативному стрессу чем контрольные культуры. Таким образом, при общем снижении параметров выживаемости, к специфическому стрессовому фактору ГМК АГА БАК и ТАК имели повышенную устойчивость. Этот факт стоит учитывать при попытке поиска агентов, которые могли бы стимулировать выживаемость ГМК с целью сохранения структурной целостности аорты.

Исследование способности ГМК к миграции при АГА БАК, АГА ТАК и в норме: В ходе выполнения научно-квалификационной работы так же удалось обнаружить различие в функциональных свойствах ГМК от разных групп пациентов: способности к миграции были достоверно выше только у пациентов с ТАК ($p=0,0032$), тогда как у пациентов с БАК не были изменены (Malashicheva et al. 2016) (Рисунок 3). Это подтверждает гипотезу о том, что БАК и ТАК ассоциированные аневризмы- различные заболевания и пути терапии этих пациентов будут различаться. Какой вклад повышенная миграция ГМК вносит в формирование аневризмы при ТАК остается неясным.

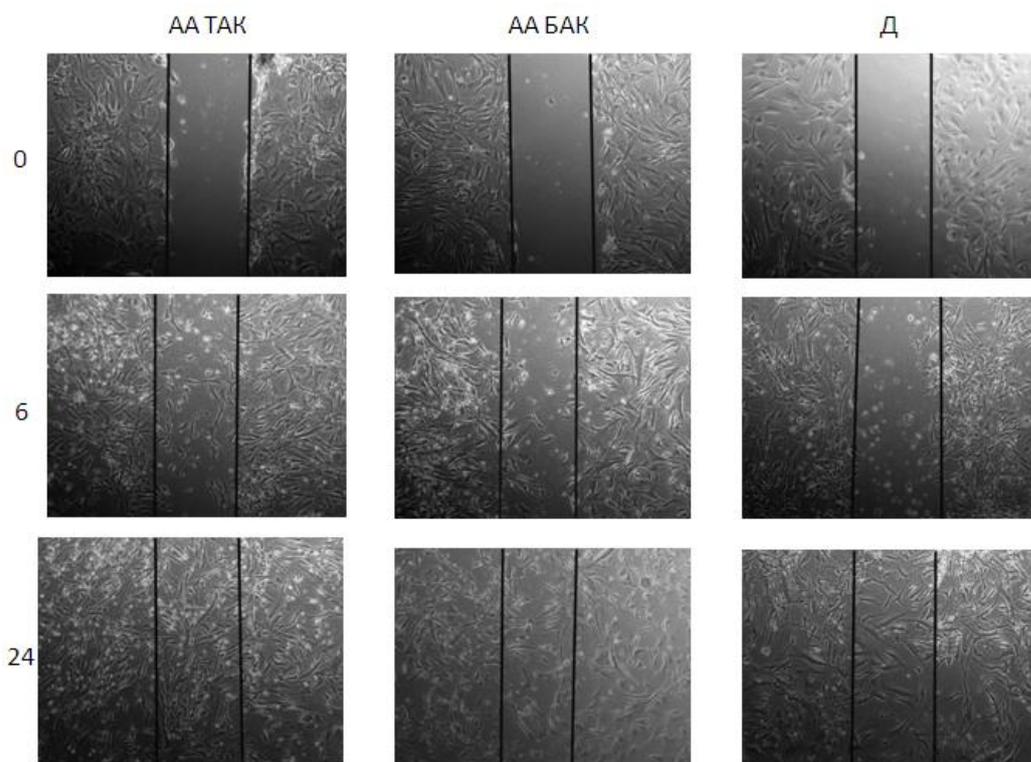


Рисунок 3. Исследование миграционных способностей ГМК путем нанесения царапины на монослой клеток и последующего подсчета количества клеток в зоне царапины на микрофотографиях. Миграционные способности ГМК ТАК повышены по сравнению с ГМК Д, тогда как миграционные способности ГМК БАК не изменены.

Дифференцировочный статус ГМК у пациентов отличается от ГМК Д: В нашем исследовании мы обнаружили пониженное содержание маркерных белков ГМК в клетках пациентов, что говорит об их дедифференцированности. Синтетические способности ГМК, согласно результатам исследования, так же были нарушены (Malashicheva et al. 2016). Были обнаружены изменения в качестве и количестве коллагена- важнейшего с точки зрения механических функций белка (Рисунок 4) и изменение в количестве матриксных металлопротеаз у пациентов (Рисунок 5). Изменение количества MMP2 и MMP9 в экстрагируемом ГМК пациентов секрете позволяет предположить, что именно изменение секреторных свойств ГМК приводит к структурным изменениям в аорте за счет протеолитических свойств металлопротеаз.

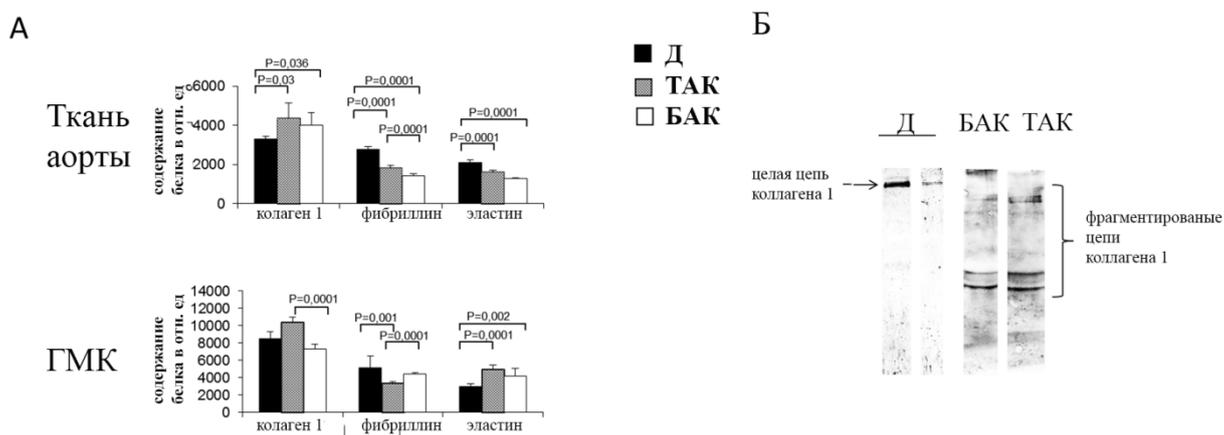


Рисунок 4. Исследование содержания белков в ГМК и стенке аорты методом электрофореза и иммуноблоттинга с последующей денситометрией(А). Б: репрезентативная картина иммуноблота.

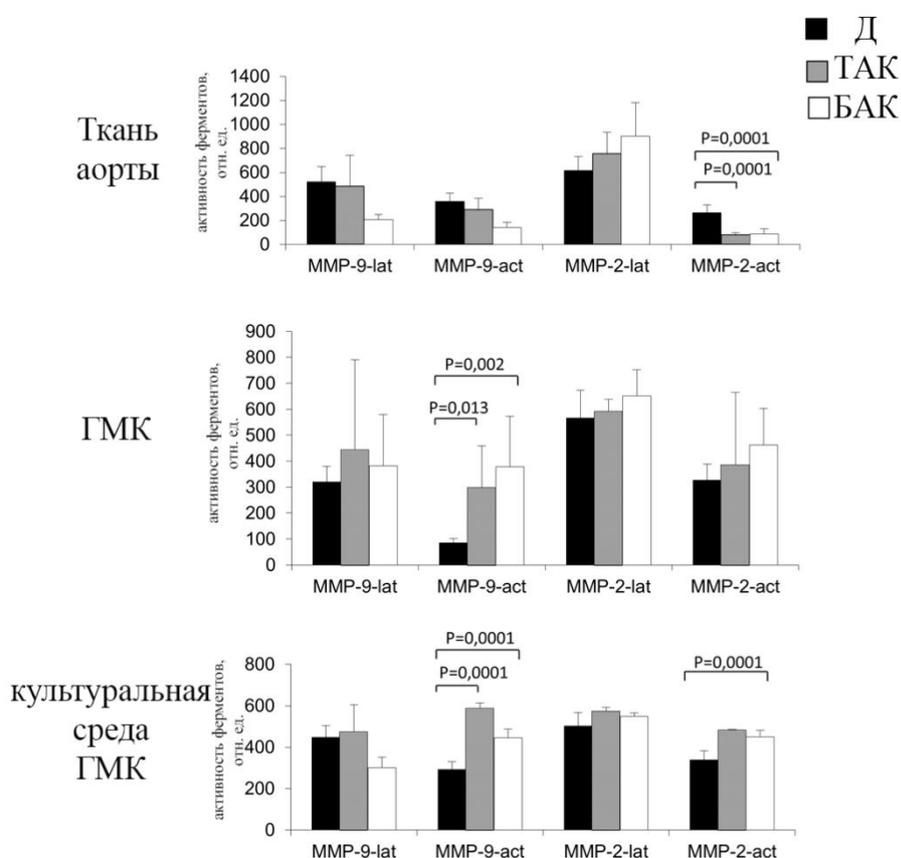


Рисунок 5. Исследование активности Металлопротеаз 2 и 9 методом измерения активности в желатине. Активность металлопротеаз при аневризме изменена: в стенке аорты наблюдалась пониженная активность MMP2 активной формы, в клетках ГМК MMP9 активной формы. А в культуральной среде, в которой культивировали ГМК и MMP2, и MMP9 активных форм.

Альтернативный источник здоровых ГМК для *in vitro* исследований-материал с операций аорто-коронарного шунтирования

В работе предложена методика получения здоровых гладкомышечных клеток из альтернативного донорскому материалу источника- с операций аортокоронарного шунтирования. Для того, чтобы оценить пригодность ГМК, получаемых из фрагментов здоровой аорты пациентов, которым выполняется операция аорто-коронарного шунтирования для исследований *in vitro*, эти ГМК были охарактеризованы с помощью описанных выше методов в сравнении с клетками ГМК Д. С помощью иммуноцитохимии было показано, что клетки, полученные из аорты пациентов с операций АКШ экспрессируют маркеры гладкомышечных клеток так же, как и ГМК Д и не отличаются от ГМК Д по своей морфологии (Рисунок 6). Следовательно, полученные клетки действительно являются ГМК.

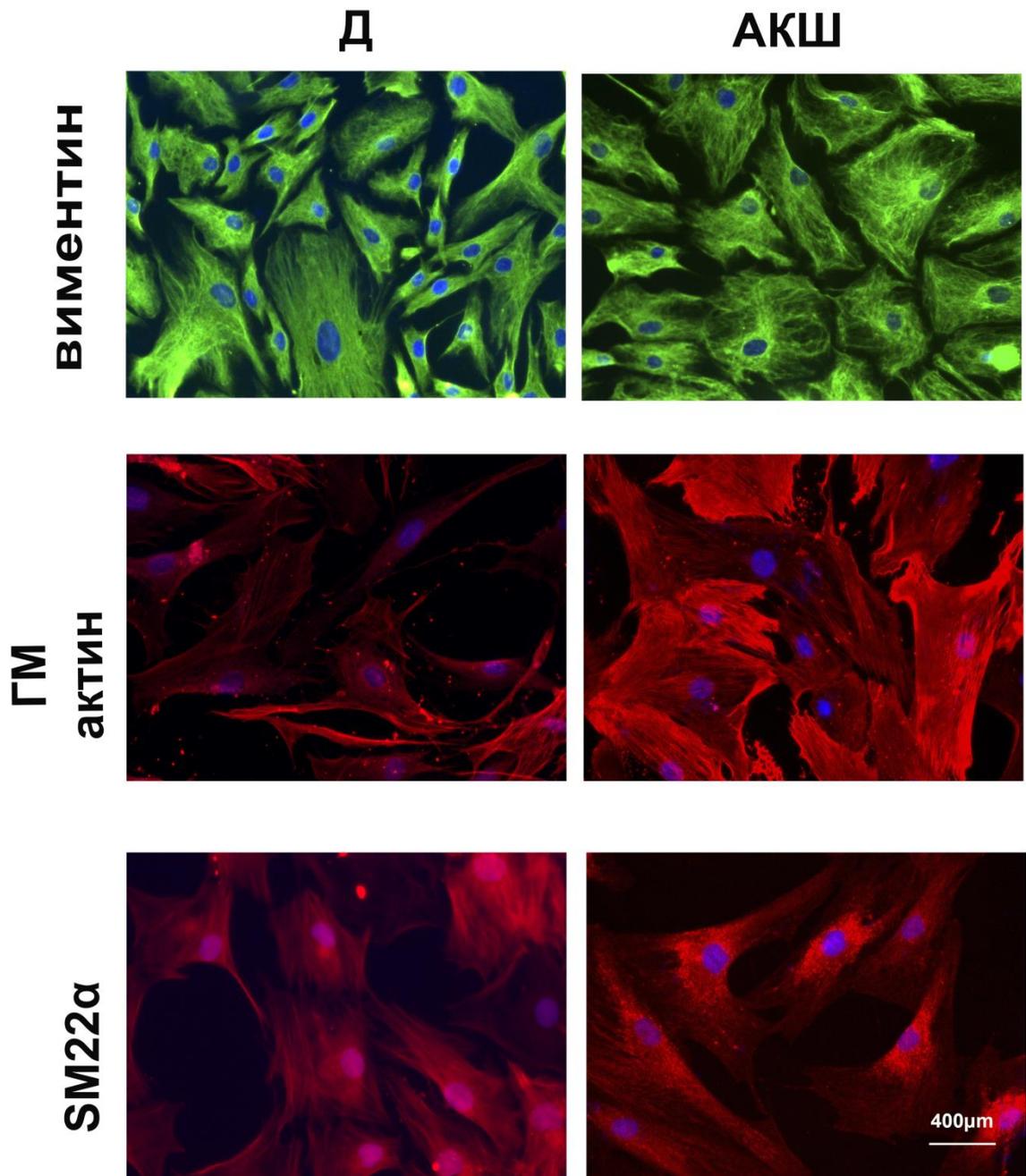


Рисунок 6. Иммуноцитохимическое окрашивание ГМК АКШ на маркерные гладкомышечных клеток подтверждает, что полученные клетки являются ГМК и не отличаются по уровню содержания сократительных белков и по своей морфологии от клеток здоровых доноров.

Пролиферативные (Рисунок 7) и миграционные (Рисунок 8) способности ГМК АКШ так же не были изменены по сравнению с ГМК Д.

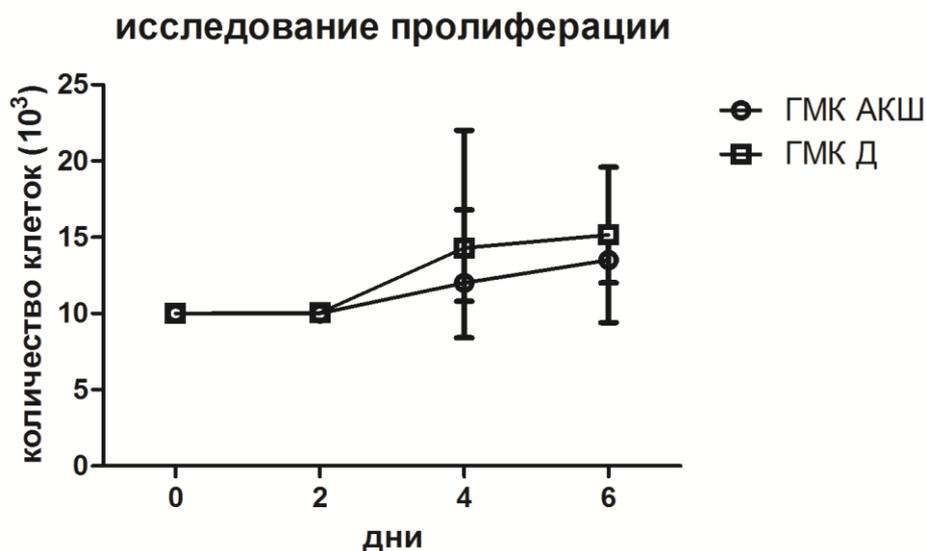


Рисунок 7. Исследование пролиферации ГМК АКШ.

Пролиферативные способности ГМК АКШ не отличаются от пролиферативных способностей ГМК Д. Исследование проводилось на клеточных культурах методом построения кривых роста

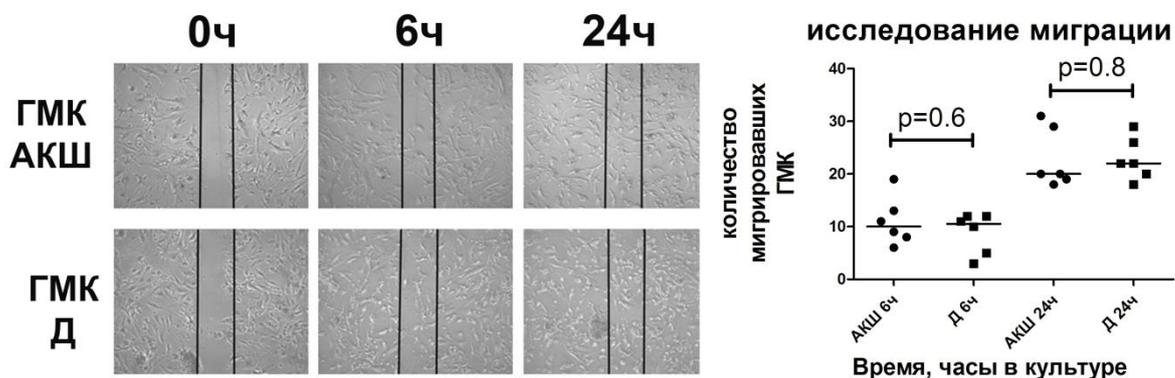


Рисунок 8. Исследование миграционных способностей ГМК АКШ

проводилось методом нанесения царапины на монослой клеток. По микрофотографиям оценивалась скорость зарастания клетками царапины через 0, 6, 24 часа. В качестве контроля использовались ГМК Д. Миграционные способности ГМК АКШ не изменены в сравнении с ГМК Д.

Возможность получения клеток с помощью предложенной методики позволяет решить актуальную задачу, возникающую при планировании биологического исследования, объектом которого являются гладкомышечные клетки аорты

человека- проблему труднодоступности материала, источником которого являются жизненно важные органы человека (D. Kostina et al., n.d.)

Исследование роли сигнального пути Notch в изменении дифференцировочного статуса ГМК при аневризме

Сигнальный путь Notch имеет большое влияние на формирование аорты в процессе эмбриогенеза и так же участвует в регуляции ГМК во взрослом организме (Boucher, Gridley, and Liaw 2012). В нашем исследовании мы обнаружили что уровень транскрипции генов компонентов сигнального пути Notch изменен у пациентов (Elena Ignatieva et al. 2017). При чем отклонения для разных генов имели разнонаправленный характер. Уровень продукции остеогенов так же был изменен у пациентов. По результатам нашего исследования, уровень продукции остеогенов в ГМК БАК ослаблен (Elena Ignatieva et al. 2017).

Чтобы проверить формируют ли ГМК Д, ГМК БАК и ГМК ТАК кластеры по экспрессии генов, мы использовали мультивариантный дискриминантный функциональный анализ. В анализ включены данные по уровню экспрессии сократительных генов: *MYOCD*, *ACTA2*, *CNN*, *TAGLN*, *VIM*; генов-компонентов сигнального пути Notch, которые экспрессируются в ГМК: *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *JAG1*, *HES1*, *HEY1*, *SNAIL* и *SLUG* и проостеогенных генов, про которые известно, что они принимают участие в кальцификации: *BMP2*, *RUNX2*, *POSTN*, *CTNNB1*, *SOX9*, *OPN* и *OPG* (Rutkovskiy, Stensl kken, and Vaage 2016). В ходе дискриминантного анализа мы обнаружили 11 генов с высоким прогностическим и дискриминантным значением (таблица 1). Эти гены были использованы в анализе, чтобы посмотреть будут ли ГМК Д, ГМК БАК и ГМК ТАК формировать независимые кластеры. Для коррекции недостающих значений использован режим *meansubstitution*. Пошаговый переход в режиме *forward stepwise*. Графические результаты, основанные на данных дискриминантного анализа (Рисунок 3), показывают, что ГМК Д формируют

кластер, отдельный и от ГМК БАК, и от ГМК ТАК по уровню экспрессии генов семейства Notch и остеогенов (Рисунок 9). ГМК БАК и ГМК ТАК так же формируют отчетливые кластеры, которые частично пересекаются. Суммарная ламбда Уилкса 0,23116. $F(22,50) = 2,4544$, $p < 0,0044$. (E. Ignatieva et al. 2017)

	Ламбда Уилкса	Частичная ламбда	F-remove (2,71)	Уровень p
VIM	0,293439	0,787751	3,367953	0,050683
BMP2	0,258843	0,893039	1,497141	0,243155
SNAIL	0,308272	0,749846	4,170081	0,027362
NOTCH1	0,231626	0,997973	0,025387	0,974958
HEY1	0,238413	0,969564	0,392391	0,679527
TGLN	0,258818	0,893125	1,495798	0,243447
ACTA2	0,374827	0,616702	7,769094	0,002377
CNN1	0,376774	0,613516	7,874362	0,002228
MYOCD	0,284798	0,811652	2,900690	0,073642
SLUG	0,271318	0,851977	2,171758	0,135005
OPG	0,270577	0,854312	2,131650	0,139704

Таблица 1

Гены, которые были выявлены в ходе дискриминантного анализа, как имеющие высокое прогностическое и дискриминантное значение. Эти 11 генов были использованы чтобы посмотреть будут ли ГМК Д, ГМК БАК и ГМК ТАК формировать независимые кластеры по уровню их экспрессии.

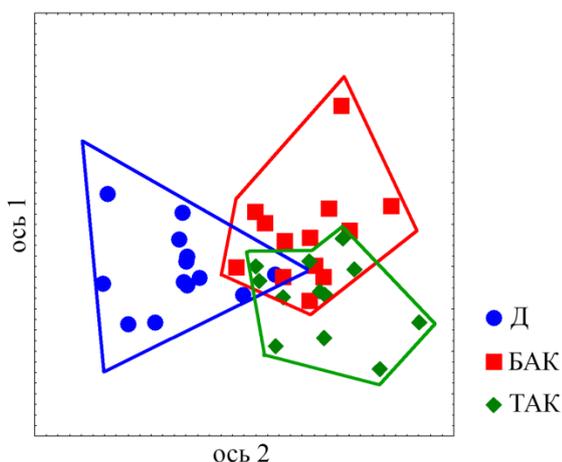


Рисунок 9. Разделение экспериментальных групп ГМК на графические кластеры на основе данных дискриминантного анализа уровня экспрессии генов, перечисленных в таблице 1.

Исследование роли сигнального пути Notch в дифференцировке ГМК

Данные исследователей об участии сигнального пути Notch в остеогенной дифференцировке противоречивы (Rusanescu, Weissleder, and Aikawa 2008) (Zeng et al. 2013) (SWEENEY et al. 2004) (Theodoris et al. 2015). Тем не менее, мы индуцировали остеогенную дифференцировку ГМК при активации сигнального пути Notch с помощью лентивирусной трансдукции и внесения в ГМК NICD. (Рисунок 6). Окраска на щелочную фосфатазу на 14 день культивирования ГМК в среде, содержащей факторы остеогенной дифференцировки показывает, что при активации сигнального пути Notch активность щелочной фосфатазы в ГМК выше, чем при культивировании ГМК в остеогенной среде без NICD (Рисунок 9). Транскрипция генов *RUNX2* и *HEY1* возрастала в ГМК при трансдукции NICD как при обычном культивировании, так и при добавлении остеофакторов. Транскрипция *ACTA2* возрастала в ответ на активацию Notch только при использовании остеоидифференцировочной среды (Рисунок 10). Таким образом, Notch и проостеогенные факторы выступают в качестве синергистов в процессе остеоидифференцировки ГМК и совместно вызывают усиленную транскрипцию *ACTA2* в ГМК. (E. Ignatieva et al. 2017)

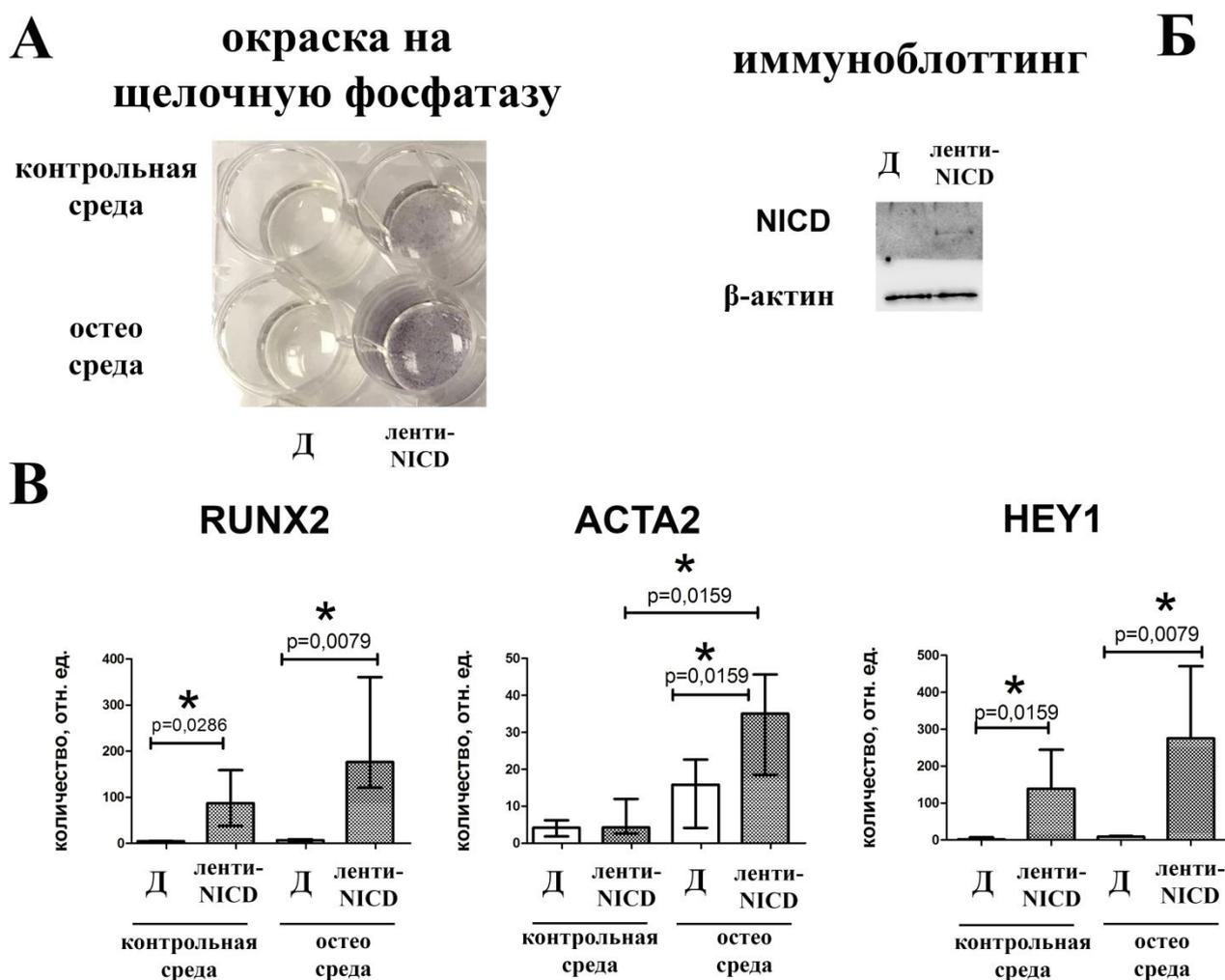


Рисунок 10. Остеогенная среда и активация сигнального пути Notch выступают как синергисты и вместе обладают проостеогенным действием на ГМК

ГМК Д культивировали в стандартных условиях (контрольная среда), либо с добавлением факторов остеогенной дифференцировки: 10мМ β -глицерофосфат; 200 μ М L-аскорбиновой кислоты и 100нМ дексаметазона (остео среда).

Сигнальный путь Notch активировали путем вирусной трансдукции лентивирусными частицами, несущими NICD, внутриклеточный домен рецептора Notch-1.

А: Окраска клеточных культур ГМК на щелочную фосфатазу проводилась на 14 день культивирования. Внесение ленти-NICD усиливало активность щелочной фосфатазы в ГМК. **Б:** Наличие ленти-NICD в ГМК подтверждается методом Вестерн-Блоттинга. **В:** на 5й день культивирования в экспериментальных либо контрольных условиях, из ГМК экстрагировали ГМК. Исследование уровня транскрипции генов проводили методом обратной ПЦР в реальном времени. Внесение ленти-NICD усиливает транскрипцию *RUNX2* и

HEY1 как в обычных условиях культивирования, так и в остеосреде. Усиленная транскрипция гладкомышечными клетками *ACTA2* в ответ на внесение ленти-NICD наблюдалась только при культивировании в среде, содержащей остеофакторы.

Сравнение способности ГМК вступать в остеодифференцировку при аневризме и в норме

Изменение уровня экспрессии сократительных генов в ответ на остеоиндукцию значительно отличается в ГМК АГА от ГМК Д. Изменение уровня экспрессии *RUNX2* в ответ на остеодифференцировку повышается только у ГМК АГА БАК. При добавлении остеофакторов уровень содержания белка гладкомышечного актина и *SM22 α* возрастал во всех трех экспериментальных группах, что было показано методом электрофореза ПААГ и вестерн-блоттинга (Рисунок 10Б). Более точная оценка уровня транскрипции генов *ACTA2* и *TAGLN* показала статистически значимые различия в обеих группах пациентов (ГМК БАК и ГМК ТАК), но не в контрольной группе (ГМК Д) ($p < 0,05$) (Рисунок 10В). Уровень экспрессии остеогена *RUNX2* сильнее возрастал в ответ на культивирование в проостеогенных условиях только в ГМК БАК ($p < 0,05$). Чтобы убедиться, что остеогенная среда действительно изменяет фенотип ГМК, мы культивировали клетки в присутствии остеофакторов в течение 14 дней и провели окраску на щелочную фосфатазу. Окраска клеточных культур ГМК на щелочную фосфатазу подтверждает, что фенотип ГМК АГА БАК сдвинут в направлении остеодифференцировки (Рисунок 11 А). При культивировании в среде, содержащей факторы остеогенной дифференцировки, нам удалось различными методами показать, что ГМК АГА БАК имеют большую склонность приобретать остео фенотип, чем ГМК Д или ГМК ТАК. (E. Ignatieva et al. 2017)

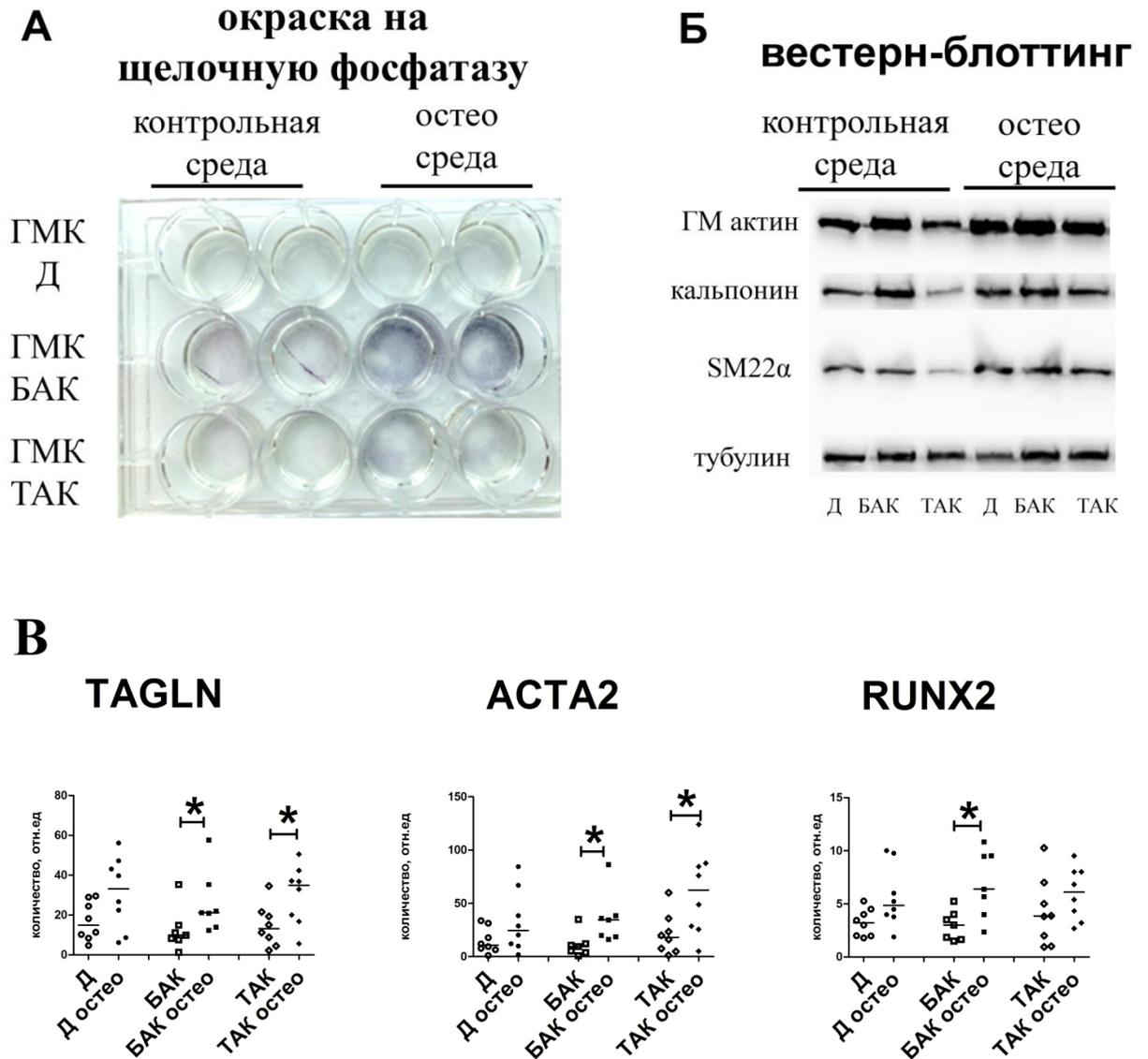


Рисунок 11. Гладкомышечные клетки (ГМК) от пациентов с бicuspidальным и трикуспидальным аортальным клапаном различаются по своей способности к дифференцировке при культивировании в присутствии остеогенных факторов.

А: Окраска клеточных культур ГМК на щелочную фосфатазу. **Б, В:** Исследование способности ГМК изменять свои синтетические способности в ответ на остеоиндукцию изменена при аневризме.

Заключение

Аневризма аорты является гетерогенным заболеванием. Справедливо будет даже назвать АГА симптомом, который может сопровождать целую группу различных заболеваний. Различия между свойствами ГМК БАК и ГМК ТАК, обнаруженные в ходе исследования, говорят о том, что пути терапии для этих двух групп пациентов будут различаться. Поиск путей консервативной терапии для пациентов с АГА является актуальной и не решенной на сегодняшний день задачей. В этом исследовании мы показали, что дифференцировочный статус ГМК нарушен при аневризме, сигнальный путь Notch дезрегулирован, нарушены процессы остеодифференцировки, а так же ГМК обладают пониженной способностью к пролиферации и более высоким уровнем апоптоза. Нарушение свойств ГМК может лежать в основе патогенеза заболевания. Потеря клеточной массы в результате низкой скорости пролиферации и высокого уровня апоптоза при аневризме несомненно влияет на прочность аорты и способность организма изменять просвет сосуда при необходимости варьировать скорость кровотока. Кроме того, нарушение синтетических способностей ГМК так же влияет на прочность и упругость сосуда, так как синтез и ферментативная деградация волокон внеклеточного матрикса совершается за счет ГМК. Сдвиг дифференцировочного статуса ГМК в остеонаправлении так же влияет на упругость и прочность аорты. Следовательно, ГМК потенциально могут стать мишенью для медикаментозной терапии с целью сохранения нормальных механических характеристик аорты и предотвращения ее разрыва при лечении аневризмы аорты.

Публикации

Список работ, опубликованных по теме научно-квалификационной работы (диссертации)

По теме выпускной квалификационной работы было опубликовано 7 статей

Публикации в изданиях, рецензируемых ВАК

1. ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК ПРИ АНЕВРИЗМЕ АОРТЫ. Костина Д.А., Воронкина И.В., Смагина Л.В., Гаврилюк Н.Д., Моисеева О.М., Иртюга О.Б., Успенский В.Е., Костарева А.А., Малашичева А.Б. Цитология. 2013. Т. 55. № 10. С. 725-731.
2. АНЕВРИЗМА ВОСХОДЯЩЕГО ОТДЕЛА АОРТЫ: ОТ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ПАТОГЕНЕЗА ДО ВЫБОРА МЕТОДА ЛЕЧЕНИЯ. Гаврилюк Н.Д., Успенский В.Е., Малашичева А.Б., Иртюга О.Б., Дружкова Т.А., Костина Д.А., Воронкина И.В., Жлоба А.А., Жуков В.А., Жернаков А.И., Ибрагимов А.Н., Моисеева О.М., Гордеев М.Л. В сборнике: Трансляционная медицина Санкт-Петербург, 2015. С. 53-74
3. TGF-ВЕТА В ПАТОГЕНЕЗЕ АНЕВРИЗМЫ ГРУДНОЙ АОРТЫ. Малашичева А.Б., Моисеева О.М., Успенский В.Е., Фрейлихман О.А., Костина Д.А., Гаврилюк Н.Д., Хромова Н.В., Пономарева Г.М., Стариков А.С., Берникова О.Г., Костарева А.А. Трансляционная медицина. 2013. № 4 (21). С. 19-23.

Публикации в изданиях, рецензируемых Scopus, Web of Science:

1. Aortic Graft at Coronary Artery Bypass Surgery as a Source of Human Aortic Smooth Muscle Cells. Kostina D, Zverev D, Grebennik V, Gordeev M, Ignatieva E, Voronkina I, Kostareva A, Malashicheva A. Cell Transplant. 2017 Oct;26(10):1663-1668. doi: 10.1177/0963689717721226.
2. Mechanisms of Smooth Muscle Cell Differentiation Are Distinctly Altered in Thoracic Aortic Aneurysms Associated with Bicuspid or Tricuspid Aortic Valves. Ignatieva E, Kostina D, Irtyuga O, Uspensky V, Golovkin A, Gavriliuk

- N, Moiseeva O, Kostareva A, Malashicheva A. *Front Physiol.* 2017 Jul 25;8:536. doi: 10.3389/fphys.2017.00536. eCollection 2017.
3. Phenotypic and Functional Changes of Endothelial and Smooth Muscle Cells in Thoracic Aortic Aneurysms. Malashicheva A, Kostina D, Kostina A, Irtyuga O, Voronkina I, Smagina L, Ignatieva E, Gavriliuk N, Uspensky V, Moiseeva O, Vaage J, Kostareva A. *Int J Vasc Med.* 2016; 2016:3107879. doi: 10.1155/2016/3107879. Epub 2016 Jan 19.
4. Kostina, Aleksandra, Daria Semenova, Daria Kostina, Vladimir Uspensky, Anna Kostareva, and Anna Malashicheva. 2019. "Human Aortic Endothelial Cells Have Osteogenic Notch-Dependent Properties in Co-Culture with Aortic Smooth Muscle Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 514 (2). Elsevier Ltd:462–68. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.177>

Аспирант _____ ФИО

Список литературных источников

- Baeten, Jeremy T., and Brenda Lilly. 2015. "Differential Regulation of NOTCH2 and NOTCH3 Contribute to Their Unique Functions in Vascular Smooth Muscle Cells." *Journal of Biological Chemistry* 290 (26):16226–37.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.655548>.
- Boucher, Joshua, Thomas Gridley, and Lucy Liaw. 2012. "Molecular Pathways of Notch Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells." *Frontiers in Physiology* 3 APR (April):1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00081>.
- Cummins, Philip M., Ronan Murphy, Catherine Sweeney, Paul A. Cahill, Agnieszka Scheller, David Morrow, Shaunta Guha, Dermot Walls, Eileen M. Redmond, and Yvonne A. Birney. 2005. "Notch-Mediated CBF-1/RBP-Jк-Dependent Regulation of Human Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype in Vitro." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 289 (5):C1188–96.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00198.2005>.
- Curci, John A. 2009. "Digging in the "Soil" of the Aorta to Understand the Growth of Abdominal Aortic Aneurysms" 17:21–29.
<https://doi.org/10.2310/6670.2008.00085>.
- Davis, Frank M, Debra L Rateri, and Alan Daugherty. 2014. "Mechanisms of Aortic Aneurysm Formation: Translating Preclinical Studies into Clinical Therapies." *Heart*. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2014-305648>.
- Doi, Hiroshi, Tatsuya Iso, Hiroko Sato, Miki Yamazaki, Hiroki Matsui, Toru Tanaka, Ichiro Manabe, Masashi Arai, Ryozo Nagai, and Masahiko Kurabayashi. 2006. "Jagged1-Selective Notch Signaling Induces Smooth Muscle Differentiation via a RBP-Jк-Dependent Pathway." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (39):28555–64. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602749200>.
- Folkersen, Lasse, Dick Wågsäter, Valentina Paloschi, Veronica Jackson, Johan Petrini, Sanela Kurtovic, Shohreh Maleki, et al. n.d. "Unraveling Divergent Gene Expression Profiles in Bicuspid and Tricuspid Aortic Valve Patients with Thoracic Aortic Dilatation : The ASAP Study" 17:1365–73.
<https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00286>.
- Garg, Vidu, Alecia N Muth, Joshua F Ransom, Marie K Schluterman, Robert Barnes, Isabelle N King, Paul D Grossfeld, and Deepak Srivastava. 2005. "Mutations in NOTCH1 Cause Aortic Valve Disease" 437 (September):1–5.
<https://doi.org/10.1038/nature03940>.
- Ignatieva, E., D. Kostina, O. Irtyuga, V. Uspensky, A. Golovkin, N. Gavriliuk, O. Moiseeva, A. Kostareva, and A. Malashicheva. 2017. "Mechanisms of Smooth Muscle Cell Differentiation Are Distinctly Altered in Thoracic Aortic Aneurysms Associated with Bicuspid or Tricuspid Aortic Valves." *Frontiers in Physiology* 8

(JUL). <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00536>.

- Ignatieva, Elena, Daria Kostina, Olga Irtyuga, Vladimir Uspensky, Alexey Golovkin, Natalia Gavriiliuk, Olga Moiseeva, Anna Kostareva, and Anna Malashicheva. 2017. “Mechanisms of Smooth Muscle Cell Differentiation Are Distinctly Altered in Thoracic Aortic Aneurysms Associated with Bicuspid or Tricuspid Aortic Valves.” *Frontiers in Physiology* 8:1–12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00536>.
- Kjellqvist, Sanela, Shohreh Maleki, Therese Olsson, Maggy Chwastyniak, Rui Miguel, Mamede Branca, Janne Lehtio, Florence Pinet, Anders Franco-cereceda, and Per Eriksson. n.d. “A Combined Proteomic and Transcriptomic Approach Shows Diverging Molecular Mechanisms in Thoracic Aortic Aneurysm Development in Patients with Tricuspid- And Bicuspid Aortic Valve * □,” 407–25. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.021873>.
- Kostina, Aleksandra S., Vladimir E. Uspensky, Olga B. Irtyuga, Elena V. Ignatieva, Olga Freylikhman, Natalia D. Gavriiliuk, Olga M. Moiseeva, et al. 2016. “Notch-Dependent EMT Is Attenuated in Patients with Aortic Aneurysm and Bicuspid Aortic Valve.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1862 (4):733–40. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.02.006>.
- Kostina, Daria, Dmitry Zverev, Vadim Grebennik, Mikhail Gordeev, Elena Ignatieva, Irina Voronkina, Anna Kostareva, and Anna Malashicheva. n.d. “Aortic Graft at Coronary Artery Bypass Surgery as a Source of Human Aortic Smooth Muscle Cells” 26 (10):1663–68. <https://doi.org/10.1177/0963689717721226>.
- Luyckx, Ilse, and Bart L Loeys. 2015. “The Genetic Architecture of Non-Syndromic Thoracic Aortic Aneurysm.” *Heart*, no. table 1:1678–1684. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2014-306381>.
- Malashicheva, A., D. Kostina, A. Kostina, O. Irtyuga, I. Voronkina, L. Smagina, E. Ignatieva, et al. 2016. “Phenotypic and Functional Changes of Endothelial and Smooth Muscle Cells in Thoracic Aortic Aneurysms.” *International Journal of Vascular Medicine* 2016:1--11. <https://doi.org/10.1155/2016/3107879>.
- Mcbride, Kim L, Maurisa F Riley, Gloria A Zender, Sara M Fitzgerald-butt, Jeffrey A Towbin, John W Belmont, and Susan E Cole. 2008. “NOTCH1 Mutations in Individuals with Left Ventricular Outflow Tract Malformations Reduce Ligand-Induced Signaling” 17 (18):2886–93. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn187>.
- Mckellar, Stephen H, David J Tester, Marineh Yagubyan, and Ramanath Majumdar. 2007. “Novel NOTCH1 Mutations in Patients with Bicuspid Aortic Valve Disease and Thoracic Aortic Aneurysms,” no. August. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2007.02.041>.
- Milewicz, Dianna M, Dong-chuan Guo, Andrea L Lafont, Christina L Papke, Sakiko Inamoto, Carrie S Kwartler, and Hariyadarshi Pannu. 2008. “Genetic Basis of

Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections : Focus on Smooth Muscle Cell Contractile Dysfunction.”

<https://doi.org/10.1146/annurev.genom.8.080706.092303>.

Mohamed, Salah A, Zouhair Aherrahrou, Henrike Liptau, Armin W Erasmi, Carolin Hagemann, Sandra Wrobel, Katja Borzym, Heribert Schunkert, Hans H Sievers, and Jeanette Erdmann. 2006. “Novel Missense Mutations (p.T596M and p.P1797H) in NOTCH1 in Patients with Bicuspid Aortic Valve” 345:1460–65. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.046>.

Nataatmadja, Maria, Malcolm West, Jenny West, Kim Summers, Philip Walker, Michio Nagata, and Teruo Watanabe. 2003. “Abnormal Extracellular Matrix Protein Transport Associated With Increased Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells in Marfan Syndrome and Bicuspid Aortic Valve Thoracic Aortic Aneurysm.” <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000087660.82721.15>.

Noseda, Michela, YangXin Fu, Kyle Niessen, Fred Wong, Linda Chang, Graeme McLean, and Aly Karsan. 2006. “Smooth Muscle Alpha-Actin Is a Direct Target of Notch/CSL.” *Circulation Research* 98 (12):1468–70. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000229683.81357.26>.

Phillippi, Julie A, Ekaterina A Klyachko, John P Kenny Iv, Michael A Eskay, Robert C Gorman, and Thomas G Gleason. 2009. “Basal and Oxidative Stress – Induced Expression of Metallothionein Is Decreased in Ascending Aortic Aneurysms of Bicuspid Aortic Valve Patients,” 2498–2507. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.770776>.

Proweller, Aaron, Warren S. Pear, and Michael S. Parmacek. 2005. “Notch Signaling Represses Myocardin-Induced Smooth Muscle Cell Differentiation.” *Journal of Biological Chemistry* 280 (10):8994–9004. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413316200>.

Rusanescu, Gabriel, Ralph Weissleder, and Elena Aikawa. 2008. “Notch Signaling in Cardiovascular Disease and Calcification.” *Current Cardiology Reviews* 4 (3). Bentham Science Publishers:148–56. <https://doi.org/10.2174/157340308785160552>.

Rutkovskiy, Arkady, Kåre-Olav Stensløkken, and Ingvar Jarle Vaage. 2016. “Osteoblast Differentiation at a Glance.” *Medical Science Monitor Basic Research* 22:95–106. <https://doi.org/10.12659/MSMBR.901142>.

SWEENEY, CATHERINE, DAVID MORROW, YVONNE A. BIRNEY, SEAMUS COYLE, COLM HENNESSY, AGNIESZKA SCHELLER, PHILIP M. CUMMINS, DERMOT WALLS, EILEEN M. REDMOND, and PAUL A. CAHILL. 2004. “Notch 1 and 3 Receptor Signaling Modulates Vascular Smooth Muscle Cell Growth, Apoptosis, and Migration via a CBF-1/RBP-Jk Dependent Pathway.” *The FASEB Journal* 18 (12). Federation of American Societies for

Experimental Biology:1421–23. <https://doi.org/10.1096/fj.04-1700fje>.

- Sweeney, Catherine, David Morrow, Yvonne A Birney, Seamus Coyle, Colm Hennessy, Agnieszka Scheller, Philip M Cummins, Dermot Walls, Eileen M Redmond, and Paul A Cahill. 2004. “Notch 1 and 3 Receptor Signaling Modulates Vascular Smooth Muscle Cell Growth, Apoptosis, and Migration via a CBF-1/RBP-Jk Dependent Pathway.” *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (12):1421–23. <https://doi.org/10.1096/fj.04-1700fje>.
- Theodoris, Christina V, Molong Li, Mark P White, Lei Liu, Daniel He, Katherine S Pollard, Benoit G Bruneau, and Deepak Srivastava. 2015. “Human Disease Modeling Reveals Integrated Transcriptional and Epigenetic Mechanisms of NOTCH1 Haploinsufficiency.” *Cell* 160 (6):1072–86. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.035>.
- Zeng, Qingchun, Rui Song, Lihua Ao, Michael J. Weyant, Joon Lee, Dingli Xu, David A. Fullerton, and Xianzhong Meng. 2013. “Notch1 Promotes the pro-Osteogenic Response of Human Aortic Valve Interstitial Cells via Modulation of ERK1/2 and NF- κ B Activation.” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33 (7). NIH Public Access:1580. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300912>.