



УДК 616-77

DOI 10.17802/2306-1278-2024-13-3-73-82

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КОМПОЗИТНЫХ ПОКРЫТИЙ ТИТАНОВОГО МАТРИКСА НА ОСТЕОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ИНТЕРСТИЦИАЛЬНЫХ КЛЕТОК АОРТАЛЬНОГО КЛАПАНА ЧЕЛОВЕКА

Н.В. Боярская^{1,2}, О.С. Качанова¹, А.А. Шишкова¹, В.Е. Успенский¹, А.А. Филиппов¹,
Д.С. Толпыгин¹, А.А. Лобов^{2,3}, А.Б. Малашичева^{1,2,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Аккуратова, 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341; ² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, Тихорецкий пр., 4, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 194064; ³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 199034

Основные положения

• В работе использованы титановые подложки с различными композитными покрытиями. Задачей исследования было изучить методику и оценить влияние покрытий на индукцию остеогенной дифференцировки в интерстициальных клетках аортального клапана человека.

ORIGINAL STUDIES

Актуальность	Кальцинирующий аортальный стеноз занимает третье место среди сердечно-сосудистых заболеваний и поражает до 10% населения к 80 годам жизни. Единственным доступным лечением аортального стеноза является протезирование аортального клапана. В связи с этим крайне важным представляется разработка таких искусственных материалов для протезов аортального клапана, которые были бы максимально биосовместимы, химически инертны, не тромбогенны, не вызывали иммунных реакций и не имели проостеогенного эффекта.
Цель	Изучение влияния различных композитных покрытий на титановой основе на индукцию остеогенных процессов в интерстициальных клетках аортального клапана человека и анализ методики экспресс-диагностики искусственных материалов имплантатов.
Материалы и методы	В исследовании изучены титановые образцы с тремя различными покрытиями. Произведено культивирование интерстициальных клеток аортального клапана на изучаемых материалах; с помощью метода ПЦР в реальном времени проанализирован уровень изменения экспрессии остеогенных маркеров <i>RUNX2</i> , <i>COL1a1</i> , <i>ALP</i> под влиянием остеогенных стимулов, а также выполнены окраска ализариновым красным и спектрофотометрический анализ окраски для определения количества кальцификатов в клетках. Оценены методы получения РНК, проведен спектрофотометрический анализ образцов, культивируемых на искусственных материалах.
Результаты	Выбран оптимальный способ выделения РНК за счет использования поли-а-хвоста и отработан протокол абсорбции кальцификатов с композитных материалов. Отмечено разнонаправленное изменение экспрессии генов <i>RUNX2</i> , <i>ALP</i> , <i>COL1a1</i> в клетках, культивируемых на титановых образцах с покрытиями, по сравнению с контрольными образцами. Интенсивность экспрессии различалась в зависимости от типа покрытий, эти данные коррелировали с интенсивностью окраски ализарином. Таким образом, разные типы покрытий по-разному влияли на процессы остеогенной дифференцировки в клетках.
Заключение	Длительность экспресс диагностики составила 21 день и включала в себя исследование экспрессии генов маркеров остеодифференцировки на временной точке 96 ч и окраску ализариновым красным на 21-й день с момента запуска остеодифференцировки. Различные полимерные покрытия влияли на

Для корреспонденции: Надежда Владимировна Боярская, nad.vb@yandex.ru; адрес: ул. Аккуратова, 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341

Corresponding author: Nadezhda V. Boyarskaya, nad.vb@yandex.ru; address: 2, Akkuratova St., St. Petersburg, Russian Federation, 197341

остеогенную дифференцировку. Установлено, что все исследованные покрытия не могут быть рекомендованы для протезов клапанов, их целесообразно применять для усиления остеогенных процессов.

Ключевые слова

Кальций-фосфатные покрытия • Композиты • Искусственные аортальные клапаны • Интерстициальные клетки аортального клапана • RUNX2 • Остеогенная дифференцировка

Поступила в редакцию: 01.04.2024; поступила после доработки: 30.04.2024; принята к печати: 23.05.2024

THE EFFECT OF VARIOUS COMPOSITE COATINGS OF TITANIUM MATRIX ON OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF INTERSTITIAL CELLS OF THE HUMAN AORTIC VALVE

N.V. Boyarskaya^{1,2}, O.S. Kachanova¹, A.A. SHishkova¹, V.E. Uspenskij¹, A.A. Filippov¹, D.S. Tolpygin¹, A.A. Lobov^{2,3}, A.B. Malashicheva^{1,2,3}

¹ Federal State Budgetary Institution “V. A. Almazov National Medical Research Center” of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2, Akkuratova St., St. Petersburg, Russian Federation, 197341; ² Federal State Budgetary Institution of Science “Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences”, 4, Tikhoretsky Ave., St. Petersburg, Russian Federation, 194064; ³ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “St. Petersburg State University”, 7/9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, Russian Federation, 199034

Highlights

• The study involves experiments with titanium substrates with various composite coatings. The aim of the study was to assess different methods of diagnostics of artificial implant materials and evaluate the effect of coatings on osteogenic differentiation in interstitial cells of the human aortic valve.

Background

Currently, the only medical treatment for aortic stenosis is aortic valve replacement. At the same time, calcific aortic stenosis is the third most prevalent cardiovascular disease that affects up to 10% of the population by the age of 80. In this regard, it is important to develop materials for aortic valve prostheses that would be highly biocompatible, chemically stable, non-thrombogenic, non-immunogenic and non-osteogenic.

Aim

To assess the impact of composite coatings of titanium bases on osteogenic differentiation of valve’s interstitial cells and to analyze the methods of express diagnostics of artificial implant materials.

Methods

The study examined titanium samples with three different coatings. The interstitial cells of the aortic valve were cultured on the studied materials. Using the PCR-RT method, the level of changes in the expression of osteogenic markers *RUNX2*, *COL1a1*, *ALP* under the influence of osteogenic stimuli was analyzed. To determine the level of calcification in cells, we stained the samples with alizarin red and conducted spectrophotometric analysis. Several RNA isolation methods were evaluated.

Results

The most optimal RNA isolation method involves the use of a poly(A) tails. Moreover, we developed a protocol for the absorption of calcium from composite materials. We noted multidirectional changes in the expression of *RUNX2*, *ALP*, and *COL1A1* genes in cells cultured on coated titanium samples compared to controls. The intensity of expression differed depending on the type of coatings; these data correlated with the intensity of staining with alizarin. Thus, different types of coatings affect the processes of osteogenic differentiation in cells in different ways.

Conclusion

The duration of express diagnostics was 21 days and included the study of gene expression of osteodifferentiation markers at a time point of 96 hours and staining with alizarin red on day 21 from the start of osteodifferentiation. It has been established that polymer coatings affect osteogenic differentiation, however, all the studied coatings cannot be recommended for valve prostheses, it is advisable to use them to enhance osteogenic processes.

Keywords

Calcium phosphate coatings • Composites • Artificial aortic valves • Aortic valve interstitial cells • RUNX2 • Osteogenic differentiation

Received: 01.04.2024; received in revised form: 30.04.2024; accepted: 23.05.2024

Список сокращений

ИК – интерстициальные клетки аортального клапана человека	ЭК – эндотелиальные клетки аортального клапана человека
---	---

Введение

На сегодняшний день в мире лидирует смертность от сердечно-сосудистых заболеваний, среди которых третье место занимает кальцинированный аортальный стеноз [1]. При аортальном стенозе происходит активная кальцификация ткани аортального клапана. На текущий момент единственный способ продлить жизнь пациенту с аортальным стенозом – выполнить протезирование клапана сердца [2–5].

В норме аортальный клапан состоит из трех створок. Каждая створка включает три слоя: эндотелиальные клетки (ЭК), интерстициальные клетки (ИК) и снова ЭК. Согласно результатам исследований, что минерализации подвергаются в основном ИК аортального клапана человека [6, 7]. Однако и ЭК створок клапана принимают активное участие в минерализации [8–11].

Минерализация и прогрессирующий фиброз клапана схожи с атеросклеротическим процессом. Заболевание развивается в несколько этапов: начинается с разрушения эндотелиального слоя, реорганизации матрикса клапана, его утолщения, которое сопровождается стерильным воспалением, и завершается кальцификацией тканей и потерей эластичности, вследствие чего нарушается кровоток и образуется аортальный стеноз с клиническими проявлениями [12–16]. Молекулярные основы аортального стеноза изучают давно, при этом понимания, как именно проходит процесс патологической кальцификации, пока нет. Ранними молекулярными признаками кальцификации зачастую считаются активность алкальной фосфатазы (ALP) и активация экспрессии генов, характерных для остеобластов: *RUNX2* и *BMP2* [17–19]. Поздним маркером становится накопление кальция, которое определяют окраской специфическим красителем – ализариновым красным [20].

Первая замена клапана произведена в 1952 г. Чарльзом Хуфнагелем – им же разработанным протезом [21]. С 1960-х гг. создано до 70 моделей искусственных клапанов [22, 23]. Протезы клапанов могут иметь как искусственную, так и биологическую природу, однако в большинстве клапанов используется металлическая основа, производимая из титана и его сплавов [24]. С момента первой разработки протезы были значительно усовершенствованы, что привело к широкому распространению протезирования аортальных клапанов [25, 26]. Биопротезные и механические клапаны имеют различные ограничения (необходи-

мость антикоагулянтной терапии, гемолиз крови, небольшой срок службы биологических клапанов и прочее) [27]. Это заставляет исследователей искать возможность обхода данных ограничений и рассматривать способы улучшения протезов клапанов. Поэтому весьма важным является изучение вновь синтезированных, дополнительно обработанных искусственных материалов, которые были бы максимально биосовместимы, не тромбогенны, не имели проостеогенного эффекта в случае клапанных протезов, и, возможно, могли бы содержать в себе лекарственные препараты.

Материал протезов, помимо того что может быть каркасом для адгезии таргетных клеток, может оказывать регулирующее влияние на дифференцировку адгезированных клеток или стимулировать отложение кальциевых депозитов в клетках или в уже образованной интиме. В таком случае предварительное тестирование перспективных материалов *in vitro* с таргетными клетками (эндотелиальные, интерстициальные и т. д.) в отношении их возможной остеогенной дифференцировки и активности, а также управляемой дифференцировки на поверхности материалов представляется важной задачей для нужд тканевой инженерии и медицинского материаловедения. В данной работе изучено взаимодействие интерстициальных клеток аортального клапана с тремя типами образцов с различными покрытиями на основе фосфатов кальция.

ИК клапана культивировали на поверхности образцов в среде, содержащей индукторы дифференцировки, и в контрольной среде без факторов остеогенной дифференцировки. Экспрессия генов – проостеогенных маркеров в экспериментальных культурах – оценена методом ПЦР в реальном времени. Терминальные стадии дифференцировки (18–21 день) анализировали при помощи окраски ализариновым красным. Эта работа позволила установить влияние различных типов покрытий на способность клеток вступать в остеогенную дифференцировку, а также изучить методику проверки потенциальных остеогенных свойств композитных материалов и их покрытий. Также результаты этих экспериментов позволили ранжировать исследуемые образцы по их способности/неспособности индуцировать и поддерживать остеогенную дифференцировку интерстициальных клеток аортального клапана, что имеет прикладное значение для потенциальных разработок различных имплантатов.

Материалы и методы

Клеточные культуры

Для экспериментов использовали ИК аортально-го клапана человека, полученные из тканей створок аортального клапана, которые были предоставлены ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России. Фрагменты аортального клапана извлекали при плановых операциях по замене аортально-го клапана от пациентов с кальцифицированным аортальным стенозом, забор производил медицинский персонал ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России.

С помощью коллагеназы II типа, растворенной в среде для культивирования, происходило разрушение межклеточных связей в ткани клапана (2 мкг/мл; [28]). В раствор с коллагеназой II помещали промытую створку, инкубировали в водяной бане (37 °C в течение 15 мин), далее путем механического встряхивания отделяли ЭК клапана и после суток содержания створок клапана в инкубаторе при 37 °C при 5% CO₂ производили механическое разделение ИК, их промывку PBS и посев для дальнейшего роста на флак или чашку Петри. Среда для культивации состояла из 83% DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, США), 15% FBS – fetal bovin serum (Gibco, США), 1% пенициллин/стрептомицин (Invitrogene, США), 1% L-глутамин (Invitrogene, США). После 2–3 пассажей клетки использовали для экспериментов.

Исследуемые образцы

ИК клапана культивировали на поверхности трех различных типов образцов. Образцы представляли собой титановые диски марки BT6 (Ti6Al4V) диаметром 10 мм и толщиной 1 мм с различными покрытиями. На поверхность образцов группы № 1 методом микродугового оксидирования наносили пористое кальций-фосфатное покрытие. Формирование кальций-фосфатных покрытий проведено на установке «Комплекс микродугового оксидирования», разработанной в лаборатории плазменных гибридных систем НОЦ Б.П. Вейнберга ИЯТШ ТПУ. Перед нанесением покрытий поверхность образцов подвергалась химическому травлению в водном растворе азотной и плавиковой кислот, взятых в объемных отношениях HNO₃ : HF : H₂O = 1 : 2,5 : 2,5, при температуре 15–20 °C в течение 10–15 сек. с последующей нейтрализацией в 1% водном растворе гидроксида натрия и многократной промывкой дистиллированной водой. В качестве электролита применяли пересыщенный раствор CaO (х. ч., ООО «Компонент-Реактив», Россия) в 10% растворе H₃PO₄ с 10 г/л диспергированного гидроксиапатита (х. ч., Fluidinova, Португалия). Параметры процесса микродугового оксидирования были следующими: напряжение – 320 В, скорость нарастания напряжения – 3 В/с, частота следования

импульсов – 200 Гц, длительность импульса – 100 мкс, время формирования покрытий – 15 мин.

Поверхность образцов группы № 2 представляла собой композитное покрытие, состоящее из пористого кальций-фосфатного слоя, сформированного с помощью микродугового оксидирования, с последующей пропиткой полимерной матрицей. В качестве материала полимерной матрицы использовали поли(ε-капролактон) (Mw = 80 000 г/моль, Sigma, США) и поливинилпирролидон (K-90, BASF, Германия). В соотношении 85/15 (по массе) готовили раствор полимеров в 1,1,1,3,3,3-гексафторпропан-2-оле (99%, Sigma, США) концентрацией 1 масс. %. Раствор готовили в течение 24 ч при перемешивании. 500 мкл полученного раствора наносили на одну из сторон титанового диска с кальций-фосфатным покрытием. Образцы с нанесенным раствором хранили в парах растворителя в течение 24 ч для высушивания покрытия. Затем образцы переворачивали и нанесение покрытия повторяли со второй стороны. После 24 ч высушивания образцы помещали с вакуумный шкаф VD 115 (Binder, Германия) при комнатной температуре и давлении 0,08 МПа на 12 ч для удаления остаточного растворителя.

Поверхность образцов группы № 3 представляла собой композитное покрытие на основе кальций-фосфатного слоя с полимерной матрицей, модифицированной в TiN плазме методом магнетронного напыления на постоянном токе. Модифицирование образцов заключалось в распылении химически чистой (99,99%) мишени из титана (Ti) в атмосфере азота (N₂). Параметры модификации задавались следующими: рабочее давление в камере 0,7 Па (газ N₂ 99,99%), сила тока 0,2 А, расстояние от магнетрона до мишени 40 мм, площадь магнетрона 240 см² и время модифицирования 1 мин. Максимальная температура камеры в течение всего процесса составляла 39 °C.

Индукция остеогенной дифференцировки в клетках ИК

После культивирования достаточного количества клеток для эксперимента (около 7×10^4 клеток/см²) клетки 3–5-го пассажа подвергали остеогенной дифференцировке. Для этого в клетках, предварительно посеянных на искусственные материалы, меняли среду, содержащую факторы индуцирующие остеогенную дифференцировку: DMEM (Gibco, США) с добавлением 10% HyClone – Research Grade Fetal Bovine Serum (Cytiva, США), 2 mM L-глутамин (Invitrogene, США), 100 ед/мл пенициллина/стрептомицина (Invitrogene, США), 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты, 0,1 мкМ дексаметазона и 10 mM β-глицерофосфата (Sigma, США). Для оценки экспрессии генов длительность культивирования составляла 96 ч с момента индукции,

для окраски требовалось культивирование в течение 18–21 дня. Контрольными были клетки, в которых не запускалась остеогенная дифференцировка.

Выделение РНК и ПЦР в реальном времени

Уровень экспрессии генов, характерных для остеогенной дифференцировки, измеряли с помощью ПЦР в реальном времени. Выделение РНК производили через 96 ч после запуска остеодифференцировки, изучали экспрессию генов *RUNX2*, *GAPDH*, *COL1A1* (с помощью SiberGreen) и *ALP* (с помощью TaqMan).

Выделение РНК из клеток, которые культивировались на искусственных материалах, происходило с помощью магнитных частиц (Dynabeads mRNA DIRECT Kit, Invitrogen, США). После подготовки магнитных частиц в соответствии с протоколом производителя промытые PBS материалы с клетками переносили в новый планшет с лизирующим буфером и немного потряхивали, чтобы клетки открепились от них. Омыв материалы лизатом из лунок данный раствор переносили в новые 1,5 мл пробирки, где и производили абсорбцию магнитными частицами по протоколу производителя. Получив пробу искомой РНК, проверяли ее количество и качество на спектрофотометре Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, США) и в 1,5% агарозном геле на электрофоретическом приборе (BioRad, США) при силе тока 80 мА.

Обратную транскрипцию осуществляли с помощью набора для ревертирования («Евроген», Россия), предварительно обрабатывали образцы ДНКазой в расчете на одну реакцию: 1 мкг РНК, 1 ед.а. ДНКазы, 1 мкл 10х буфера с $MgCl_2$ и водой. После инкубации (30 мин при 37 °С) действие ДНКазы инактивировали 1 мкл ЭДТА (0,5 М, pH 8,0) (65 °С в течение 10 мин). В одной реакции обратной транскрипции задействованы следующие компоненты: выравненное по концентрации РНК до 8 мкл, 1 мкл рандомных праймеров, 4 мкл 5х буфера (First str. buffer), 2 мкл воды из набора, 2 мкл 10 мМ нуклеотидтрифосфатов dNTP, 2 мкл 20 мМ дитиотреитола (DTT) и 1 мкл M-MLV revertase (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) 100 ед.а. обратной транскриптазы. Инкубация в амплификаторе (Verity, Applied Biosystems) – 1 ч при 42 °С и 10 мин при 70 °С. Приготовленную кДНК хранили при –20 °С.

Экспрессии генов исследовали с помощью амплификатора (LightCycler® 480, Roche, Швейцария) PCR-real time для *RUNX2*, *GAPDH*, *COL1A1* с помощью красителя SYBR («Евроген», Россия) и *ALP* с помощью TaqMan («Евроген», Россия). Состав 1 пробы при использовании SYBR Green: 7 мкл воды MQ, 0,5 мкл обратного и прямого праймеров, 2,5 мкл 5х буфера с флуоресцентным красителем (qPCRmix-HS SYBR) и 2,5 мкл (разбавленной

до 100 мкл водой) кДНК матрицы. Состав 1 пробы при использовании TaqMan состоял из 7 мкл воды MQ, 0,5 мкл специфического зонда, 2,5 мкл буфера (qPCRmix-HS ROX) и 2,5 мкл (разбавленной до 100 мкл водой) кДНК матрицы. Анализ проводили в установке 7 500 Real-TimePCRSytem (Life Technologies, США) в 96-луночных оптических платах (Applied Biosystems, США) по следующему протоколу: 5 мин при 95 °С, 45 повторяющихся циклов – 15 сек. при 95 °С, 30 сек. при 60 °С и 30 сек. при 70 °С, завершался процесс этапом проверки специфичности ПЦР продукта.

Обработку данных экспрессии проводили с помощью $2^{-\Delta\Delta C_T}$ метода, в модификации «относительное количество» и относительно «гена домашнего хозяйства» *GAPDH*. Для анализа экспрессии генов в работе использовали праймеры, полученные в компании «Синтол» (Россия). Последовательности праймеров могут быть предоставлены по запросу.

Окраска ализариновым красным и спектрофотометрическая оценка

Подтверждали произошедшую остеогенную дифференцировку окрашиванием ализариновым красным – Alizarin Red (Sigma, США), который прочно связывается с кальцификатами [20]. Окраску производили на 19–21-й день остеодифференцировки. После окрашивания клеток на образцах из искусственных материалов оценку количества кальцификатов проводили с помощью спектрального сканирования с функциями спектрофотометрии на мультимодальном ридере Thermo Scientific Varioskan LUX (Финляндия, США). Для этого окрашенные кальцификаты растворяли в 10% уксусной кислоте и полученный раствор измеряли на спектрофотометре, откалиброванном на 426 нм. В качестве контроля использовали уровень абсорбции уксусной кислоты. Обработку данных производили с помощью Microsoft Excel, GraphPad Prism.

Анализ данных

Обработку данных, полученных методом ПЦР в реальном времени, производили с помощью программ Microsoft Excel (расчеты, таблицы) и GraphPad Prism (таблицы, графики). Результаты представлены в виде среднего значения биологических и технических повторов. Указаны ошибки среднего значения для каждого проанализированного образца.

Информация о соблюдении этических норм при проведении исследования

Протоколы клинических исследований утверждены комитетом по этике ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России и соответствовали принципам Хельсинкской декларации ВМА пере-

смотра 2013 г. От всех пациентов получено письменное информированное согласие на участие в генетическом исследовании и биопсию ткани.

Результаты

Исследованные образцы разнонаправленно влияют на интенсивность остеогенной дифференцировки в ИК в зависимости от типа покрытия

Для оценки влияния кальций-фосфатных покрытий на индукцию остеогенных процессов ИК культивировали на трех разных типах образцов в контрольных условиях и в условиях остеогенной дифференцировки. Образцы групп № 2 и № 3, с композитным покрытием с полимерной матрицей, показали меньшую концентрацию соединений кальция в клетках, в отличие от образцов группы № 1, в которых отмечена большая кальцификация даже в клетках, не подвергнутых остеогенной стимуляции (рис. 1). Последнее, по-видимому, обусловлено отсутствием на образцах группы № 1 верхнего

полимерного слоя, препятствующего выходу ионов кальция и фосфора из покрытия, нанесенного методом микродугового оксидирования. Эти ионы способствуют запуску процесса кальцификации.

Все исследованные образцы влияют на экспрессию генов маркеров остеогенной дифференцировки *RUNX2*, *ALP*, *COL1A1*

RUNX2 – классический общепринятый маркер остеогенной дифференцировки [14]. Его экспрессия снижена в ИК при культивировании на поверхности образцов группы № 3, другие группы образцов показали рост экспрессии по сравнению с недифференцированным контролем. *ALP* (алкальная фосфатаза) – ранний маркер кальцификации. Образцы групп № 2 и № 3 продуцировали его низкую экспрессию по сравнению с группой № 1, однако по сравнению с контрольными клетками экспрессия была выше. Повышенная экспрессия гена *COL1A1*, отвечающего за образование коллагена

1-го типа ($\alpha 1$), прослеживалась в клетках соединительной ткани, в том числе в костях, сухожилиях и т. д. Для образцов групп № 1 и № 3 наблюдалась обратная зависимость экспрессии в индуцированных и не индуцированных к остеогенной дифференцировке клетках по сравнению с контролем. Пониженные значения экспрессии имели образцы группы № 2 (рис. 2).

Обобщая полученные данные, можно сделать следующие выводы: образцы группы № 1, по сравнению с другими группами, превышали данные контрольных клеток относительно индукции остеогенной дифференцировки и экспрессии про-остеогенных генов, соответственно, этот тип образцов больше стимулировал остеогенную дифференцировку. Образцы групп № 2 и № 3 менее остеогенны. Более ровную динамику экспрессии генов показали образцы группы № 3, но наименьшее количество кальцификатов выявлено на образцах группы № 2. Несмотря на разнонаправленные изменения экспрессии генов, данные

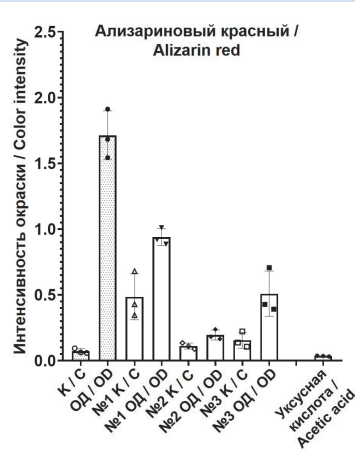


Рисунок 1. Интенсивность окраски ализариновым красным по данным спектрофотометра

Примечание: К – контрольные клетки без индукции остеогенной дифференцировки (ОД); ОД – контрольные клетки с индукцией ОД (клетки на всех материалах выращивали в среде с индукцией и без индукции ОД); № 1 К и ОД – клетки, выращенные на образцах группы № 1; № 2 К и ОД – клетки, выращенные на образцах группы № 2; № 3 К и ОД – клетки, выращенные на образцах группы № 3; укс. к-та – уксусная кислота.

Figure 1. Alizarin red color intensity, spectrophotometer data

Note: C – control cells without induction of osteogenic differentiation (OD); OD – control cells with induction of OD (cells on all materials were grown in an environment with induction and without induction of OD); No. 1 C and OD – respectively, cells grown on sample group No. 1; No. 2 C and OD – cells grown on sample group No. 2; No. 3 C and OD – cells grown on sample group No. 3.

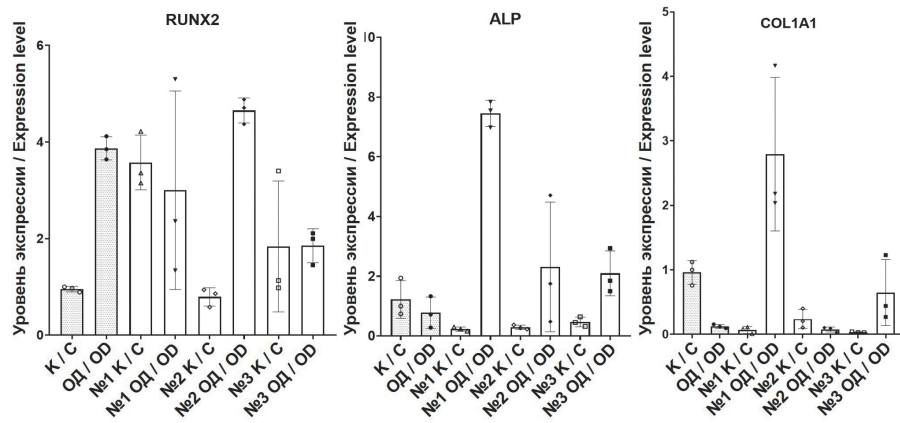


Рисунок 2. Уровень экспрессии генов маркеров остеогенной дифференцировки *RUNX2*, *ALP*, *COL1A1* по данным спектрофотометра

Примечание: К – контрольные клетки без индукции остеогенной дифференцировки (ОД); ОД – контрольные клетки с индукцией ОД (клетки на всех материалах выращивали в среде с индукцией и без индукции ОД); № 1 К и ОД – клетки, выращенные на образцах группы № 1; № 2 К и ОД – клетки, выращенные на образцах группы № 2; № 3 К и ОД – клетки, выращенные на образцах группы № 3.

Figure 2. Expression level of osteogenic differentiation markers *RUNX2*, *ALP*, *COL1A1*

Note: C – control cells without induction of osteogenic differentiation (OD); OD – control cells with induction of OD (cells on all materials were grown in an environment with induction and without induction of OD); No. 1 C and OD – respectively, cells grown on sample group No. 1; No. 2 C and OD – cells grown on sample group No. 2; No. 3 C and OD – cells grown on sample group No. 3.

коррелируют с интенсивностью окраски ализариновым красным.

Обсуждение

Результаты эксперимента показали, что исследуемые образцы запускают процесс кальцификации. В исследовании убедительно продемонстрировано, что образцы с кальций-фосфатным покрытием (группа № 1) способствуют образованию кальцификатов. Меньшая концентрация соединений кальция в клетках у образцов с дополнительной пропиткой полимерной матрицей (группа № 2) и у композитных покрытий, модифицированных в TiN плазме (группа № 3), а также снижение экспрессии RUNX2 в ИК у образцов группы № 3 свидетельствуют о влиянии полимерной матрицы, которая препятствует выходу кальция и фосфора из покрытий. При этом обработка поверхности образцов в TiN плазме (группа № 3) улучшала клеточный отклик, что, по-видимому, обусловлено изменением элементного состава приповерхностного слоя и его смачиваемости. Однако следует отметить, что эффект от плазменной обработки, который в зависимости от полимера и условий обработки длится от нескольких недель до двух месяцев, пропадает. Последнее связано с адсорбцией молекул и загрязняющих веществ, таких как вода из атмосферы. Кроме того, со временем полимерный слой растворится и процесс кальцификации также будет запущен. Таким образом, полимерная матрица может отсрочить процесс кальцификации, но не препятствует его появлению.

Информация об авторах

Боярская Надежда Владимировна, младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории заболеваний с избыточной кальцификацией федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Российская Федерация; младший научный сотрудник лаборатории регенеративной биомедицины федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-6402-770X

Качанова Ольга Сергеевна, лаборант-исследователь научно-исследовательской лаборатории заболеваний с избыточной кальцификацией федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-0214-365X

Шишкова Анастасия Алексеевна, младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории заболеваний с избыточной кальцификацией федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-0488-9172

Успенский Владимир Евгеньевич, доктор медицинских наук заведующий научно-исследовательской лабораторией заболеваний аорты и аортального клапана федерального

Заключение

На основании вышеизложенного можно сделать вывод, что все исследуемые покрытия не могут быть рекомендованы для протезов клапанов, их целесообразно применять для усиления остеогенных процессов. Однако представленный метод позволяет в 21-дневный срок определить потенцию композитного материала к индукции остеогенных свойств клеток.

Благодарности

Благодарим сотрудников Национального исследовательского Томского политехнического университета С.И. Твердохлебова, А.И. Козельскую, С.И. Горенинского за изготовление экспериментальных образцов композитных материалов.

Конфликт интересов

Н.В. Боярская заявляет об отсутствии конфликта интересов. О.С. Качанова заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.А. Шишкова заявляет об отсутствии конфликта интересов. В.Е. Успенский заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.А. Филиппов заявляет об отсутствии конфликта интересов. Д.С. Толпыгин заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.А. Лобов заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Б. Малашичева заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Работа поддержана грантом РНФ 18-14-00152.

Author Information Form

Boyarskaya Nadezhda V., Junior Researcher at the Laboratory of Diseases with Excessive Calcification, Federal State Budgetary Institution "V. A. Almazov National Medical Research Center" of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation; Junior Researcher at the Laboratory of Regenerative Biomedicine, Federal State Budgetary Institution of Science "Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences", St. Petersburg, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-6402-770X

Kachanova Olga S., Research Assistant at the Laboratory of Diseases with Excessive Calcification, Federal State Budgetary Institution "V. A. Almazov National Medical Research Center" of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-0214-365X

Shishkova Anastasia A., Junior Researcher at the Laboratory of Diseases with Excessive Calcification, Federal State Budgetary Institution "V. A. Almazov National Medical Research Center" of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-0488-9172

Uspenskij Vladimir E., PhD, Head of the Laboratory of Aortic and Aortic Valve Diseases, Federal State Budgetary Institution "V. A. Almazov National Medical Research Center"

государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-7929-0594

Филиппов Алексей Александрович, младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории заболеваний с избыточной кальцификацией федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-3338-9855

Толпыгин Дмитрий Сергеевич, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории заболеваний с избыточной кальцификацией федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Российская Федерация; **ORCID** 0009-0007-9859-4466

Лобов Арсений Андреевич, научный сотрудник регенеративной биомедицины федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Российская Федерация; младший научный сотрудник центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-0930-1171

Малашичева Анна Борисовна, доктор биологических наук заведующая научно-исследовательской лабораторией молекулярной кардиологии института молекулярной биологии и генетики федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Российская Федерация; ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией регенеративной биомедицины федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Российская Федерация; доцент кафедры эмбриологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-0820-2913

of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-7929-0594

Filippov Alexey A., Junior Researcher at the Laboratory of Diseases with Excessive Calcification, Federal State Budgetary Institution “V. A. Almazov National Medical Research Center” of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-3338-9855

Tolpygin Dmitry S., Senior Researcher at the Laboratory of Diseases with Excessive Calcification, Federal State Budgetary Institution “V. A. Almazov National Medical Research Center” of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation; **ORCID** 0009-0007-9859-4466

Lobov Arseniy A., Researcher at the Laboratory of Regenerative Biomedicine, Federal State Budgetary Institution of Science “Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences”, St. Petersburg, Russian Federation; Junior Researcher at the Center for the Development of Molecular and Cellular Technologies, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “St. Petersburg State University”, St. Petersburg, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-0930-1171

Malashicheva Anna B., PhD, Head of the Laboratory of Molecular Cardiology, Institute of Molecular Biology and Genetics, Federal State Budgetary Institution “V. A. Almazov National Medical Research Center” of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation; Senior Researcher, Head of the Laboratory of Regenerative Biomedicine, Federal State Budgetary Institution of Science “Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences”, St. Petersburg, Russian Federation; Associate Professor at the Department of Embryology, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “St. Petersburg State University”, St. Petersburg, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-0820-2913

Вклад авторов в статью

БНВ – получение данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

КОС – интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ШАА – интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

УВЕ – интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ФАА – интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

Author Contribution Statement

BNV – data collection, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

KOS – data interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

ShAA – data interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

UVE – data interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

FAA – data interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

ТДС – интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ЛАА – интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

МАБ – вклад в концепцию и дизайн исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

TDS – data interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

LAA – data interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

MAB – contribution to the concept and design of the study, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Natorska, J., Kopytek M., Undas A. Review. Aortic valvular stenosis: Novel therapeutic strategies. *Eur J Clin Invest.* 2021;51(7):e13527. doi: 10.1111/eci.13527.
2. Kraler, S., Blaser, M. S., Aikawa, E., Camici, G.G., Lüscher, T. F. Calcific aortic valve disease: from molecular and cellular mechanisms to medical therapy. *Eur Heart J.* 2022;43(7):683-697. doi:10.1093/eurheartj/ehab757
3. Moncla, L.-H. M., Briend, M., Bossé, Y., Mathieu, P. Calcific aortic valve disease: mechanisms, prevention and treatment. *Nat Rev Cardiol.* 2023; 20(8):546-559. doi:10.1038/s41569-023-00845-7
4. Nishimura, R. A., Otto, C. M., Bonow, R. O., Carabello, B. A., Erwin, J. P., Fleisher, L. A., Jneid, H., Mack, M. J., McLeod, C. J., O'Gara, P. T., Rigolin, V. H., Sundt, T. M., Thompson A. AHA/ACC Focused Update of the 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2017;70(2): 252-289. doi: 10.1016/j.jacc.2017.03.011.
5. Zigelman, C.Z., Edelstein, P.M. Aortic valve stenosis. *Anesthesiol Clin.* 2009;27(3): 519-32. doi:10.1016/j.anclin.2009.07.012
6. Rabkin-Aikawa, E., Aikawa, M., Farber, M., Kratz, J. R., Garcia-Cardena, G., Kouchoukos, N. T., Mitchell, M. B., Jonas, R. A., Schoen F. J. Clinical pulmonary autograft valves: Pathologic evidence of adaptive remodeling in the aortic site. *Surgery for Acquired Cardiovascular Disease.* 2004;128(4):552-61. doi:10.1016/j.jtcvs.2004.04.016
7. Rutkovskiy, A., Malashicheva, A., Sullivan, G., Bogdanova, M., Kostareva, A., Stensløkken, K.-O., Fiane, A., Vaage, J. Valve Interstitial Cells: The Key to Understanding the Pathophysiology of Heart Valve Calcification. *J Am Heart Assoc.* 2017;6(9):e006339. doi:10.1161/JAHA.117.006339
8. Cheng, S.-L., Shao, J.-S., Behrmann, A., Krchma, K., Towler, D. A. Dkk1 and MSX2-Wnt7b signaling reciprocally regulate the endothelial-mesenchymal transition in aortic endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2013;33(7): 1679–89. doi:10.1161/ATVBAHA.113.300647
9. Hjortnaes, J., Shapero, K., Goettsch, C., Hutcheson, J. D., Keegan, J., Kluin, J., Aikawa, E. Valvular interstitial cells suppress calcification of valvular endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2015;242(1):251–260. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.07.008
10. Summerhill, V. I., Moschetta, D., Orekhov, A. N., Poggio, P., Myasoedova, V. A. Sex-Specific Features of Calcific Aortic Valve Disease. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(16):5620. doi:10.3390/ijms21165620
11. Yao, M., Wang, X., Wang, X., Zhang, T., Chi, Y., Gao, F. The Notch pathway mediates the angiotensin II-induced synthesis of extracellular matrix components in podocytes. *Int J Mol Med.* 2015;36(1): 294-300. doi:10.3892/ijmm.2015.2193
12. Akat, K., Borggreffe, M., Kaden, J. J. Aortic valve calcification: basic science to clinical practice. *Heart.* 2009; 95 (8): 616-23. doi:10.1136/hrt.2007.134783
13. Goody, P.R., Hosen, M.R., Christmann, D., Niepmann, S.T., Zietzer, A., Adam, M., Bönner, F., Zimmer, S., Nickenig, G., Jansen, F. Aortic Valve Stenosis: From Basic Mechanisms to Novel Therapeutic Targets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020; 40(4):885-900. doi:10.1161/ATVBAHA.119.313067
14. Helske, S., Kupari, M., Lindstedt, K. A., Kovanen, P. T. Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process. *Curr Opin Lipidol.* 2007;18 (5): 483-91. doi:10.1097/MOL.0b013e3282a66099
15. Mohler, E. R. Mechanisms of aortic valve calcification. *The American Journal of Cardiology.* 2004; 94(11): 1396–1402. doi:10.1016/j.amjcard.2004.08.013
16. de Oliveira Sá, M. P.B., Cavalcanti, L. R. P., Perazzo, A. M., Gomes, R. A. F., Clavel, M.-A., Pibarot, P., Biondi-Zoccai, G., Zhigalov, K., Weymann, A., Ruhparwar, A., Lima, R.C. Calcific Aortic Valve Stenosis and Atherosclerotic Calcification. *Curr Atheroscler Rep.* 2020;7;22(2):2. doi: 10.1007/s11883-020-0821-7
17. Bogdanova, M., Zabirnyk, A., Malashicheva, A., Semenova, D., Kvitting, J.-P. E., Kaljusto, M.-L., Del Mar Perez, M., Kostareva, A., Stensløkken, K.-O., Sullivan, G. J., Rutkovskiy, A., Vaage, J. Models and Techniques to Study Aortic Valve Calcification in Vitro, ex Vivo and in Vivo. An Overview. *Front Pharmacol.* 2022;13:835825. doi:10.3389/fphar.2022.835825
18. Jian, B., Jones, P. L., Li, Q., Mohler, E. R., Schoen, F. J., Levy, R. J. Matrix metalloproteinase-2 is associated with tenascin-C in calcific aortic stenosis. *Am J Pathol.* 2001;159 (1): 321-7. doi:10.1016/S0002-9440(10)61698-7
19. Zhiduleva, E. V., Irtyuga, O. B., Shishkova, A. A., Ignat'eva, E. V., Kostina, A. S., Levchuk, K. A., Golovkin, A. S., Rylov, A. Yu., Kostareva, A. A., Moiseeva, O. M., Malashicheva, A. B., Gordeev, M. L. Cellular Mechanisms of Aortic Valve Calcification. *Bull Exp Biol Med.* 2018;164(3):371-375. doi: 10.1007/s10517-018-3992-2
20. Benton, J. A., Kern, H. B., Anseth, K. S. Substrate properties influence calcification in valvular interstitial cell culture. *J Heart Valve Dis.* 2008;17(6): 689-99.
21. Ghanbari, H., Viatge, H., Kidane, A. G., Burriesci, G., Tavakoli, M., Seifalian, A. M. Polymeric heart valves: new materials, emerging hopes. *Trends Biotechnol.* 2009;27(6):359-367. doi: 10.1016/j.tibtech.2009.03.002
22. Rajput F. A., Zeltser R. Review. Aortic Valve Replacement. StatPearls Publishing. 2020. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537136/> (accessed 23.06.2024)
23. Ueshima, D., Fovino, L.N., Brenner, S.J., Fabris, T., Scotti, A., Barioli, A., Giaccoppo, D., Pavei, A., Fraccaro, C., Napodano, M., Tarantini, G. Transcatheter aortic valve replacement for bicuspid aortic valve stenosis with first- and new-generation bioprostheses: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol.* 2020;298:76-82. doi:10.1016/j.ijcard.2019.09.003
24. Фадеев А.А. Конструктивные формы и функциональные свойства протезов клапанов сердца. *Анналы хирургии.* 2013;3: 9-18
25. Jiang, T., Hasan, S.M., Faluk, M., Patel, J. Evolution of Transcatheter Aortic Valve Replacement | Review of Literature. *Curr Probl Cardiol.* 2021;46(3):100600. doi:10.1016/j.cpcardiol.2020.100600
26. Joseph, J., Naqvi, S.Y., Giri, J., Goldberg, S. Review Aortic Stenosis: Pathophysiology, Diagnosis, and Therapy. *The American Journal of Medicine.* 2017;130 (3): 253-263. doi:10.1016/j.amjmed.2016.10.005
27. Tully A., Chowdhury Y.S. Bioprosthetic Stented Pericardial Porcine Aortic Valve Replacement. StatPearls Publishing. 2021. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563200/> (accessed 23.06.2024)
28. Bogdanova, M., Zabirnyk, A., Malashicheva, A., Zihlavnikova Enayati K., Karlsen T.A., Kaljusto M.-L., Kvitting J.-P. E., Dissen E., Sullivan G. J., Kostareva A., Stensløkken K.-O., Rutkovskiy A., Vaage J., Interstitial cells in calcified aortic valves have reduced differentiation potential and stem cell-like properties. *Scientific Reports.* 2019; 9(1):12934. doi:10.1038/s41598-019-49016-0

REFERENCES

1. Natorska, J., Kopytek M., Undas A. Review. Aortic valvular stenosis: Novel therapeutic strategies. *Eur J Clin Invest.* 2021;51(7):e13527. doi: 10.1111/eci.13527.
2. Kraler, S., Blaser, M. S., Aikawa, E., Camici, G.G., Lüscher, T. F. Calcific aortic valve disease: from molecular and cellular mechanisms to medical therapy. *Eur Heart J.* 2022;43(7):683-697. doi:10.1093/eurheartj/ehab757
3. Moncla, L.-H. M., Briend, M., Bossé, Y., Mathieu, P. Calcific aortic valve disease: mechanisms, prevention and treatment. *Nat Rev Cardiol.* 2023; 20(8):546-559. doi:10.1038/s41569-023-00845-7
4. Nishimura, R. A., Otto, C. M., Bonow, R. O., Carabello, B. A., Erwin, J. P., Fleisher, L. A., Jneid, H., Mack, M. J., McLeod, C. J., O'Gara, P. T., Rigolin, V. H., Sundt, T. M., Thompson A. AHA/ACC Focused Update of the 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2017;70(2): 252-289. doi: 10.1016/j.jacc.2017.03.011.
5. Zigelman, C. Z., Edelstein, P. M. Aortic valve stenosis. *Anesthesiol Clin.* 2009;27(3): 519-32. doi:10.1016/j.anclin.2009.07.012
6. Rabkin-Aikawa, E., Aikawa, M., Farber, M., Kratz, J. R., Garcia-Cardena, G., Kouchoukos, N. T., Mitchell, M. B., Jonas, R. A., Schoen F. J. Clinical pulmonary autograft valves: Pathologic evidence of adaptive remodeling in the aortic site. *Surgery for Acquired Cardiovascular Disease.* 2004;128(4):552-61. doi:10.1016/j.jtcvs.2004.04.016
7. Rutkovskiy, A., Malashicheva, A., Sullivan, G., Bogdanova, M., Kostareva, A., Stensløkken, K.-O., Fiane, A., Vaage, J. Valve Interstitial Cells: The Key to Understanding the Pathophysiology of Heart Valve Calcification. *J Am Heart Assoc.* 2017;6(9):e006339. doi:10.1161/JAHA.117.006339
8. Cheng, S.-L., Shao, J.-S., Behrmann, A., Krcma, K., Towler, D. A. Dkk1 and MSX2-Wnt7b signaling reciprocally regulate the endothelial-mesenchymal transition in aortic endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2013;33(7): 1679-89. doi:10.1161/ATVBAHA.113.300647
9. Hjortnaes, J., Shaper, K., Goettsch, C., Hutcheson, J. D., Keegan, J., Kluin, J., Aikawa, E. Valvular interstitial cells suppress calcification of valvular endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2015;242(1):251-260. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.07.008
10. Summerhill, V. I., Moschetta, D., Orekhov, A. N., Poggio, P., Myasoedova, V. A. Sex-Specific Features of Calcific Aortic Valve Disease. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(16):5620. doi:10.3390/ijms21165620
11. Yao, M., Wang, X., Wang, X., Zhang, T., Chi, Y., Gao, F. The Notch pathway mediates the angiotensin II-induced synthesis of extracellular matrix components in podocytes. *Int J Mol Med.* 2015;36(1): 294-300. doi:10.3892/ijmm.2015.2193
12. Akat, K., Borggreffe, M., Kaden, J. J. Aortic valve calcification: basic science to clinical practice. *Heart.* 2009; 95 (8): 616-23. doi:10.1136/hrt.2007.134783
13. Goody, P.R., Hosen, M.R., Christmann, D., Niepmann, S.T., Zietzer, A., Adam, M., Bönner, F., Zimmer, S., Nickenig, G., Jansen, F. Aortic Valve Stenosis: From Basic Mechanisms to Novel Therapeutic Targets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020; 40(4):885-900. doi:10.1161/ATVBAHA.119.313067
14. Helske, S., Kupari, M., Lindstedt, K. A., Kovanen, P. T. Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process. *Curr Opin Lipidol.* 2007;18 (5): 483-91. doi:10.1097/MOL.0b013e3282a66099
15. Mohler, E. R. Mechanisms of aortic valve calcification. *The American Journal of Cardiology.* 2004; 94(11): 1396-1402. doi:10.1016/j.amjcard.2004.08.013
16. de Oliveira Sá, M. P.B., Cavalcanti, L. R. P., Perazzo, A. M., Gomes, R. A. F., Clavel, M.-A., Pibarot, P., Biondi-Zoccai, G., Zhigalov, K., Weymann, A., Ruhparwar, A., Lima, R.C. Calcific Aortic Valve Stenosis and Atherosclerotic Calcification. *Curr Atheroscler Rep.* 2020;7;22(2):2. doi: 10.1007/s11883-020-0821-7
17. Bogdanova, M., Zabirnyk, A., Malashicheva, A., Semenova, D., Kvitting, J.-P. E., Kaljusto, M.-L., Del Mar Perez, M., Kostareva, A., Stensløkken, K.-O., Sullivan, G. J., Rutkovskiy, A., Vaage, J. Models and Techniques to Study Aortic Valve Calcification in Vitro, ex Vivo and in Vivo. An Overview. *Front Pharmacol.* 2022;13:835825. doi:10.3389/fphar.2022.835825
18. Jian, B., Jones, P. L., Li, Q., Mohler, E. R., Schoen, F. J., Levy, R. J. Matrix metalloproteinase-2 is associated with tenascin-C in calcific aortic stenosis. *Am J Pathol.* 2001;159 (1): 321-7. doi:10.1016/S0002-9440(10)61698-7
19. Zhiduleva, E. V., Irtyuga, O. B., Shishkova, A. A., Ignat'eva, E. V., Kostina, A. S., Levchuk, K. A., Golovkin, A. S., Rylov, A. Yu., Kostareva, A. A., Moiseeva, O. M., Malashicheva, A. B., Gordeev, M. L. Cellular Mechanisms of Aortic Valve Calcification. *Bull Exp Biol Med.* 2018;164(3):371-375. doi: 10.1007/s10517-018-3992-2
20. Benton, J. A., Kern, H. B., Anseth, K. S. Substrate properties influence calcification in valvular interstitial cell culture. *J Heart Valve Dis.* 2008;17(6): 689-99.
21. Ghanbari, H., Viatge, H., Kidane, A. G., Burriesci, G., Tavakoli, M., Seifalian, A. M. Polymeric heart valves: new materials, emerging hopes. *Trends Biotechnol.* 2009;27(6):359-367. doi: 10.1016/j.tibtech.2009.03.002
22. Rajput F. A., Zeltser R. Review. Aortic Valve Replacement. StatPearls Publishing. 2020. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537136/> (accessed 23.06.2024)
23. Ueshima, D., Fovino, L.N., Brener, S.J., Fabris, T., Scotti, A., Barioli, A., Giacompo, D., Pavei, A., Fraccaro, C., Napodano, M., Tarantini, G. Transcatheter aortic valve replacement for bicuspid aortic valve stenosis with first- and new-generation bioprostheses: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol.* 2020;298:76-82. doi:10.1016/j.ijcard.2019.09.003
24. Fadeev A.A. Structural forms and functional properties of heart valve prosthesis. *Russian Annals of Surgery.* 2013;3: 9-18. (In Russian)
25. Jiang, T., Hasan, S.M., Faluk, M., Patel, J. Evolution of Transcatheter Aortic Valve Replacement | Review of Literature. *Curr Probl Cardiol.* 2021;46(3):100600. doi:10.1016/j.cpcardiol.2020.100600
26. Joseph, J., Naqvi, S.Y., Giri, J., Goldberg, S. Review Aortic Stenosis: Pathophysiology, Diagnosis, and Therapy. *The American Journal of Medicine.* 2017;130 (3): 253-263. doi:10.1016/j.amjmed.2016.10.005
27. Tully A., Chowdhury Y.S. Bioprosthetic Stented Pericardial Porcine Aortic Valve Replacement. StatPearls Publishing. 2021. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563200/> (accessed 23.06.2024)
28. Bogdanova, M., Zabirnyk, A., Malashicheva, A., Zihlavnikova Enayati K., Karlsen T.A., Kaljusto M.-L., Kvitting J.-P. E., Dissen E., Sullivan G. J., Kostareva A., Stensløkken K.-O., Rutkovskiy A., Vaage J., Interstitial cells in calcified aortic valves have reduced differentiation potential and stem cell-like properties. *Scientific Reports.* 2019; 9(1):12934. doi:10.1038/s41598-019-49016-0

Для цитирования: Боярская Н.В., Качанова О.С., Шишкова А.А., Успенский В.Е., Филиппов А.А., Толтыгин Д.С., Лобов А.А., Малашичева А.Б. Влияние различных композитных покрытий титанового матрикса на остеогенную дифференцировку интерстициальных клеток аортального клапана человека. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2024;13(3): 73-82. DOI: 10.17802/2306-1278-2024-13-3-73-82

To cite: Boyarskaya N.V., Kachanova O.S., Shishkova A.A., Uspenskij V.E., Filippov A.A., Tolpygin D.S., Lobov A.A., Malashicheva A.B. The effect of various composite coatings of titanium matrix on osteogenic differentiation of interstitial cells of the human aortic valve. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2024;13(3): 73-82. DOI: 10.17802/2306-1278-2024-13-3-73-82