



**ACADEMIA ROMÂNĂ**  
**Școala de Studii Avansate a Academiei Române**  
**Institutul de Biologie și Patologie Celulară "Nicolae**  
**Simionescu"**

## **REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Studiul inflamației asociate patologiei valvulare în diabet *in vivo***  
**și în modele 3D de valvă aortică umană *in vitro***

**CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:**

**m.c. AR Dr. MÂNDUȚEANU ILEANA**

**DOCTORAND:**

**CIORTAN LETIȚIA CRISTINA**

**București**

**2022**

## CUPRINS

Listă abrevieri.....	9
<b>Introducere.....</b>	<b>12</b>

### PARTEA I – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

<b>I. VALVA AORTICĂ – DEZVOLTARE, STRUCTURĂ ȘI CELULE REZIDENTE.....</b>	<b>18</b>
I.1. Dezvoltarea valvei aortice.....	18
I.1.1. Etapa embrionară.....	18
I.1.2. Etapa postnatală.....	21
I.2. Structura macroscopică a valvei aortice adulte.....	23
I.3. Compoziția și rolul structural al matricei extracelulare (MEC).....	23
I.4. Celulele rezidente din valva aortică matură sănătoasă.....	25
I.4.1. Celule endoteliale valvulare (VEC).....	25
I.4.2. Celule interstițiale valvulare (VIC).....	28
I.4.3. Celule imune.....	30
<b>II. MODIFICĂRI CELULARE ȘI MOLECULARE ASOCIATE BOLII VALVEI AORTICE ÎN DIABET.....</b>	<b>32</b>
II.1. Mecanisme patologice asociate VEC în inițierea și propagarea BVA în diabet.....	34
II.1.1. Tranziția endotelial-mezenchimală (EndMT).....	35
II.1.2. Decuplarea eNOS și stresul oxidativ.....	38
II.1.3. Supraexprimarea moleculelor de adeziune și infiltrarea celulelor imune.....	39
II.1.4. Angiogeneza.....	42
II.2. Diferențierea patologică a VIC în valvulopatia diabetic.....	43
II.2.1. Tranziția qVIC în miofibroblaste (aVIC).....	44
II.2.2. Tranziția qVIC în osteoblaste (obVIC).....	47
<b>III. MODELE <i>IN VIVO</i> UTILIZATE PENTRU STUDIUL BOLII VALVEI AORTICE ÎN DIABET.....</b>	<b>49</b>
III.1 Modele de diabet <i>in vivo</i> .....	49
III.2. Modele de BVA <i>in vivo</i> .....	51
III.3. Modele de BVA în diabet <i>in vivo</i> .....	52
<b>IV. MODELE 3D <i>IN VITRO</i> UTILIZATE PENTRU STUDIUL BOLII VALVEI AORTICE ÎN DIABET.....</b>	<b>56</b>
IV.1. Componenta celulară a modelelor <i>in vitro</i> de BVA.....	56
IV.1.1. Celule de origine animală.....	57

IV.1.2. Celule umane.....	58
IV.2. Modele 3D obținute din țesuturi native.....	59
IV.2.1 Hidrogeluri obținute din țesut nativ .....	60
IV.2.1.1. Proprietățile hidrogelurilor obținute din țesut nativ .....	61
IV.2.1.2. Interacția hidrogelurilor din țesut nativ cu celulele.....	63
IV.2.1.3. Hidrogeluri obținute din țesut nativ utilizate pentru studiul BVA .....	64
IV.2.2 Structuri native decelularizate utilizate ca suport pentru recelularizare.....	65
IV.3. Modele 3D obținute din hidrogeluri pe bază de polimeri naturali .....	66
IV.4. Modele 3D pe bază de polimeri sintetici.....	67

## **PARTEA II – CONTRIBUȚII ORIGINALE**

<b>I. DIABETUL TIMPURIU INDUCE ÎN VALVA AORTICĂ MODIFICĂRI ALE MEDIATORILOR INFLAMATORII CARE SE CORELEAZĂ CU MODIFICĂRI FUNCȚIONALE ÎNTR-UN MODEL <i>IN VIVO</i> DE ȘOARECE DIABETIC, HIPERLIPEMIC.....</b>	<b>70</b>
<b>I.1. Introducere și obiective .....</b>	<b>70</b>
<b>I.2 Materiale și metode.....</b>	<b>72</b>
I.2.1. Model animal .....	72
I.2.2. Histochimie și Imunohistochimie .....	73
I.2.2.1. Histochimie .....	73
I.2.2.2. Imunohistochimie .....	74
I.2.3 Analiza rezultatelor .....	74
I.2.3.1. Analiza imaginilor de imunohistochimie .....	74
I.2.3.2. Corelații.....	75
I.2.3.3. Analiza statistică .....	75
<b>I.3. Rezultate .....</b>	<b>75</b>
I.3.1. Șoarecii menținuți pe dietă hiperlipemică dezvoltă diabet și depozite lipidice la nivelul valvei aortice .....	75
I.3.2. Mediatorii inflamatori sunt supraexprimați în celulele valvulare aortice la șoarecii diabetici menținuți pe dietă bogată în lipide .....	80
I.3.2.1. Diabetul timpuriu induce supraexprimarea moleculelor de adeziune de la nivelul endoteliului în valva aortică .....	80
I.3.2.2. Diabetul și dieta bogată în lipide modulează exprimarea markerilor de activare a VIC .....	83
I.3.3. Celulele valvulare implicate în EndMT se localizează în zona infiltratului lipidic din valvă la șoarecii diabetici .....	85
I.3.4. Mediatorii inflamației găsiți modificați în valvele murine se corelează cu markerii de remodelare și calcificare.....	86

<b>I.4. Discuții</b> .....	88
<b>I.5. Concluzii parțiale</b> .....	89
<b>II. EXPUNEREA CRONICĂ LA CONCENTRAȚII CRESCUTE DE GLUCOZĂ INDUCE MODIFICĂRI PROGRESIVE ALE FENOTIPULUI INFLAMATOR AL CELULELOR VALVULARE UMANE ÎN MODELE 3D <i>IN VITRO</i></b> .....	90
<b>Introducere și obiective</b> .....	90
<b>II.1 Izolarea și caracterizarea celulelor valvulare primare din valve aortice umane</b> .....	93
II.1.1. Materiale și metode .....	93
II.1.1.1. Izolarea celulelor valvulare umane primare.....	93
II.1.1.2. Imunocitochimie.....	94
II.1.2. Rezultate .....	94
II.1.2.1. Culturile pure de VIC și VEC primare umane au fost stabilite in vitro.....	94
II.1.2.2. VIC și VEC primare umane exprimă markeri celulari specifici în cultură.....	95
II.1.3. Discuții .....	97
II.1.4. Concluzii parțiale.....	97
<b>II.2. Model <i>in vitro</i> de cusă porcină decelularizată repopulată cu celule umane</b> .....	98
II.2.1. Materiale și metode .....	98
II.2.1.1. Linii celulare utilizate.....	98
II.2.1.2. Protocolul de decelularizare a valvelor aortice porcine.....	98
II.2.1.3. Metode utilizate pentru repopularea cu celule umane a foițelor valvulare porcine decelularizate.....	99
II.2.1.4. Histochimie.....	102
II.2.1.5. Analiza statistică.....	103
II.2.2. Rezultate .....	103
II.2.2.1. Cuspele porcine decelularizate își păstrează compoziția MEC .....	104
II.2.2.2. Evaluarea potențialului de repopulare a cuspelor cu celule umane .....	106
II.2.2.2. 1. Repopulare cu fibroblaste și CEV .....	106
II.2.2.2.2. Repopulare cu VIC .....	109
II.2.2.2.3. Repopulare cu VIC și VEC.....	112
II.2.3. Discuții .....	117
II.2.4. Concluzii parțiale.....	117
<b>II.3. Modele bioprintate bazate pe hidrogeluri comerciale</b> .....	118
II.3.1. Materiale și metode .....	118
II.3.1.1. Linii celulare utilizate.....	118
II.3.1.2. Hidrogeluri comerciale utilizate în studiu .....	118
II.3.1.3. Imunohistochimie .....	119
II.3.1.4. MTT.....	119
II.3.1.5. Analiza statistică.....	120

II.3.2. Rezultate .....	120
II.3.2.1. Hidrogel BioInk-RegenHU.....	120
II.3.2.2. Hidrogeluri CellInkRGD și Gell4Cell .....	125
II.3.3. Discuții .....	127
II.3.4. Concluzii parțiale.....	127
<b>II.4. Expunerea cronică la concentrații crescute de glucoză induce un fenotip inflamator în celulele valvulare aortice umane într-un model 3D bazat pe gelatină metacrilată (GP-1)</b>	<b>128</b>
II.4.1. Materiale și metode .....	128
II.4.1.1. Celule utilizate în studiu .....	128
II.4.1.2. Protocolul obținere hidrogel GP-1 bazat pe gelatină metacrilată, cu celule încapsulate .....	129
II.4.1.2.1. Obținerea hidrogelului GP-1.....	129
II.4.1.2.2. Obținerea modelului pe bază de GP-1 cu celule valvulare umane încapsulate .....	129
II.4.1.3 Imunohistochimie .....	130
II.4.1.4. Izolarea celulelor din construcții 3D prin digestie enzimatică .....	131
II.4.1.5. MTT.....	131
II.4.1.6. Determinarea exprimării genice prin tehnica RT-PCR.....	131
II.4.1.7. Determinarea exprimării proteice prin tehnica WB.....	132
II.4.1.8. Determinarea proteinelor secretate prin tehnica ELISA.....	132
II.4.1.9. Analiza rezultatelor.....	133
II.4.1.9.1. Analiza imaginilor de imunohistochimie – construcți 3D .....	133
II.4.1.9.2. Analiza statistică.....	133
II.4.2. Rezultate .....	133
II.4.2.1. Hidrogelul GP-1 prezintă biocompatibilitate cu celulele valvulare umane primare și favorizează fenotipul neactivat al VIC .....	134
II.4.2.1.1. Caracterizarea celulelor valvulare cultivate în hidrogel GP-1 .....	134
II.4.2.1.2. Evaluarea viabilității celulelor valvulare cultivate în hidrogel GP-1.....	137
II.4.2.1.3. Evaluarea fenotipului VIC cultivate în hidrogel GP-1 .....	137
II.4.2.2. Concentrațiile crescute de glucoză cresc exprimarea de citokine și chemokine cu efect proinflamator în VIC și VEC.....	139
II.4.2.3. Expunerea cronică la concentrații crescute de glucoză crește exprimarea genică de vWF în VEC și exprimarea genică a moleculelor de adeziune VCAM-1 și E-selectină în VEC și VIC .....	141
II.4.2.4. Concentrația crescută de glucoză activează calea de semnalizare a PKC în celulele valvulare, iar blocarea acesteia scade semnificativ nivelul de IL-1 $\beta$ secretat în mediu .....	142
II.4.3. Discuții .....	144
II.4.4. Concluzii parțiale.....	145

## **II.5. Concentrațiile crescute de glucoză induc tranziția endotelial-mezenchimală în VEC și cresc exprimarea de mediatori ai inflamației în celulele valvulare într-un model *in vitro* bazat pe hidrogel obținut în laborator din rădăcină aortică porcină decelularizată (HDRA)....** 146

II.5.1. Materiale și metode .....	146
II.5.1.1. Celule utilizate în studiu .....	146
II.5.1.2. Protocol obținere hidrogel derivat din radacina aortica porcina (HDRA), cu celule încapsulate.....	147
II.5.1.2.1. Obținerea HDRA .....	147
II.5.1.2.2. Obținerea modelului pe bază de HDRA cu celule valvulare umane încapsulate .....	147
II.5.1.3. Electroforeză pentru determinarea compoziției proteice în elemente de MEC a HDRA dezvoltat.....	148
II.5.1.4. Histochimie și Imunohistochimie .....	148
II.5.1.4.1. Histochimie.....	148
II.5.1.4.2. Imunohistochimie .....	149
II.5.1.5. Izolarea celulelor din construcții 3D prin digestie enzimatică .....	150
II.5.1.6. MTT.....	150
II.5.1.7. LDH.....	150
II.5.1.8. Determinarea exprimării genice prin tehnica Real-Time PCR.....	151
II.5.1.9. Determinarea proteinelor secretate prin tehnica ELISA.....	151
II.5.1.10. Pregătirea probelor pentru TEM.....	152
II.5.1.11. Protocol adeziune monocite în flux la construcți HDRA cu VEC.....	152
II.5.1.12. Analiza rezultatelor.....	153
II.5.1.12.1. Analiza imaginilor de imunohistochimie – construcți 3D .....	153
II.5.1.12.2. Analiza statistică.....	153
II.5.2. Rezultate .....	153
II.5.2.1. HDRA prezintă compoziție proteică similară cu cea a valvei native și biocompatibilitate ridicată cu celulele valvulare umane primare.....	154
II.5.2.1.1. Evaluarea compoziției în elemente ale MEC a HDRA.....	154
II.5.2.1.2. Evaluarea biocompatibilității HDRA cu celulele valvulare umane .....	155
II.5.2.1.3. Caracterizarea histologică și imunohistologică a modelului de co-cultură în HDRA .....	156
II.5.2.1.4. Evaluarea viabilității celulelor valvulare cultivate în HDRA.....	157
II.5.2.2. Tranziția EndMT a celulelor valvulare endoteliale aortice umane este indusă de concentrația ridicată de glucoză .....	158
II.5.2.3. Concentrația crescută de glucoză crește exprimarea de ET-1 în celulele valvulare endoteliale aortice umane.....	165

II.5.2.4. Blocarea receptorilor endotelinei ET-A și ET-B duce la scăderea concentrației de IL-1 $\beta$ și MCP-1 secretat de către celulele valvulare din construcții VIP în condiții de glucoză crescută.....	167
II.5.2.5. Concentrațiile crescute de glucoză induc disfuncția endoteliului valvular prin creșterea adeziunii monocitelor la VEC în condiții dinamice .....	168
II.5.3. Discuții .....	170
II.5.4. Concluzii parțiale.....	172
<b>Concluzii generale.....</b>	<b>173</b>
<b>Bibliografie.....</b>	<b>176</b>
<b>Rezultate program doctoral.....</b>	<b>203</b>

Cuvinte cheie: Valvă aortică, inflamație, diabet, glucoză, hidrogel

Boala valvei aortice (BVA) reprezintă o problemă de sănătate la nivel mondial și una dintre cauzele majore ale mortalității în rândul persoanelor de peste 65 de ani (Nkomo, Gardin et al. 2006, Yadgir, Johnson et al. 2020, Coffey, Roberts-Thomson et al. 2021). Pentru mult timp BVA a fost considerată un proces pasiv, degenerativ, deoarece progresia bolii se întinde pe parcursul a zeci de ani. În prezent, boala este recunoscută drept un proces activ, condus de inflamația cronică, asemănător în fazele incipiente cu ateroscleroza. Terapia cu statine s-a dovedit însă inefficientă în ameliorarea BVA, arătând astfel că mecanismele de progresie ale celor două patologii sunt diferite (Cowell, Newby et al. 2005).

Evoluția BVA cuprinde *scleroza timpurie*, caracterizată prin îngroșarea cuspelor dar fără consecințe asupra funcției, și *stenoza târzie*, când funcția valvei este compromisă din cauza depozitelor extinse de calciu. Detecția clinică a valvelor stenotice se face prin identificarea unui murmur cardiac și este confirmată ecocardiografic, bazându-se astfel pe simptomele din stadiile avansate când structura și funcția valvei sunt afectate (Lindman, Bonow et al. 2013). În prezent, nu există markeri predictivi sau terapii farmacologice pentru gestionarea BVA, iar singura opțiune de tratament pentru valvele aflate în stadii avansate de calcificare este înlocuirea chirurgicală a acestora cu proteze mecanice sau biologice, care la rândul lor se pot calcifica. Se estimează că, odată cu îmbătrânirea populației, incidența BVA o să crească semnificativ, mai ales în țările dezvoltate, devenind o importantă problemă socio-economică (Kodali, Velagapudi et al. 2018). Diabetul este unul dintre factorii de risc cunoscuți pentru dezvoltarea BVA, iar acesta a fost asociat recent cu progresia accelerată a bolii și gravitatea simptomelor la pacienții cu stenoză aortică moderată (Han, Shi et al. 2021, Manduteanu, Simionescu et al. 2021, Natorska 2021). Astfel, în diabet, valva aortică (VA) se calcifică accelerat, ceea ce duce la disfuncția valvei și a inimii prin mecanisme care sunt incomplet înțelese.

Prezenta teză a fost structurată în două părți, și anume partea I, “Stadiul actual al cunoașterii”, unde este prezentată o analiză a literaturii de specialitate necesară pentru a pune în context cercetarea și partea II, “Contribuții originale”, unde este descrisă cercetarea experimentală propriu-zisă.

Astfel, în **prima parte** sunt abordate aspecte legate de dezvoltarea valvei în stadiile embrionare și postnatale, structura și arhitectura valvei aortice, celulele rezidente și rolul lor fiziologic, mecanismele declanșate la nivel celular în patologia valvulară asociată diabetului și o trecere în revistă a modelelor *in vivo* și *in vitro* utilizate pentru studiul valvulopatiei aortice.



### ***Dezvoltarea, structura și celulele rezidente din valva aortică***

Valva aortică (VA) este una dintre cele patru valve de la nivelul inimii care asigură curgerea unidirecțională a sângelui din ventriculul stâng către aortă. **Dezvoltarea VA** are loc atât în perioada embrionară, în fazele de formare ale structurilor anatomice la nivelul inimii, cât și în perioada postnatală, când are loc stabilizarea populațiilor celulare și definitivarea arhitecturii valvei. În etapa embrionară, formarea valvelor cardiace are loc atunci când la nivelul tubului cardiac se formează pernuțele endocardice prin semnalizarea mediată de proteinele morfogenetice osoase (BMP-uri) din superfamilia factorilor de creștere transformanți  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). O sub-populație de celule endoteliale endocardice intră în tranziție endotelial-mezenchimală (EndMT) și migrează în jeleul cardiac unde proliferază și dă naștere populației de celule valvulare interstițiale (VIC) din pernuțele endocardice (O'Donnell and Yutzey 2020). În aceste valve embrionare începe un proces complex de remodelare orchestrat de către VIC, care este finalizat în perioada postnatală când valva capătă structura trilaminară caracteristică, iar populația de celule rezidente se stabilizează (Hinton, Lincoln et al. 2006, Nordquist, LaHaye et al. 2018).

Cuspele valvei mature sunt structuri avasculare, la nivelul cărora se disting trei straturi cu **organizare și compoziție** diferită în elemente de matrice extracelulară (MEC): (1) fibrosa – situat spre aortă, și care este compus în principal din fibre de colagen de tip I și III orientate circumferențial, conferind rezistență mecanică valvei; (2) ventricularis – situat spre ventricul, fiind în principal compus din fibre de elastină orientate radial care conferă elasticitate țesutului; (3) spongiosa – stratul din mijloc, compus în principal din proteoglicani (PG), glicozaminoglicani (GAG) și fibre de colagen, care absoarbe șocurile mecanice și servește drept interfață între celelalte două straturi.

Cele trei straturi ale cuspelelor VA sunt populate de **celulele rezidente valvulare**, iar studii recente au arătat ca acestea sunt în proporție de 80-85% VIC (negative pentru CD31 și CD45), 5-7% VEC și ~10% celule de origine imună (Hulin, Anstine et al. 2018, Hulin, Hortells et al. 2019).

Celulele endoteliale valvulare (VEC) sunt dispuse sub forma unui monostrat compact care căptușește la exterior cele trei cuspe ale VA și asigură interfața de comunicare dintre sânge și interstițiul valvular. Principala funcție a endoteliului este cea de barieră selectivă și neaderentă, care intermediază transportul de oxigen și nutrienți din sânge către spațiul interstițial, dar și răspunsul imun. VEC sunt o populație de celule endoteliale diferită de celulele endoteliale vasculare și prezintă heterogenitate ridicată: VEC de pe cele două

fețe ale cuspelelor sunt diferite, astfel că endoteliul de pe fața ventricularis exprimă inhibitori ai calcificării cardiovasculare iar cel de pe fața fibroasă prezintă profil puternic antioxidant și exprimare crescută a sintazei endoteliale a oxidului nitric (eNOS)(Simmons, Grant et al. 2005). În patologii, VEC sunt implicate în inițierea și progresia bolii VA prin recrutarea de celule imune, dereglarea semnalizării protective a oxidului nitric (NO) sau prin inițierea tranziției endotelial-mezenchimală (EndMT) (Ma, Zhao et al. 2020, Majumdar, Manivannan et al. 2021).

În valva adultă sănătoasă, populația de celule interstițiale constă majoritar din VIC neactivate (qVIC) distribuite în toate cele 3 straturi ale cuspelelor, responsabile de menținerea structurii trilaminare a MEC (Bogdanova, Zahirnyk et al. 2019). Celulele interstițiale formează în valvă o rețea celulară extinsă care facilitează răspunsul unitar și transmiterea rapidă de informații între membrii rețelei. Ca răspuns la stimulii mecanici sau patologici, qVIC se pot diferenția în: (1) aVIC, care exprimă metaloproteaze și sunt implicate în remodelarea matricei extracelulare, provocând scleroza timpurie sau (2) obVIC, implicate în acumularea depozitelor de calciu (Rutkovskiy, Malashicheva et al. 2017).

**Celulele imune** se stabilesc în valvă încă din fazele de dezvoltare a inimii și reprezintă a treia populație majoritară din VA. În valvele murine au fost identificate limfocite T, celule dendritice, mastocite și două subpopulații de macrofage: M $\phi$ 1 și M $\phi$ 2 (Hulin, Hortells et al. 2019). Deși rolul celulelor imune în menținerea homeostaziei VA nu a fost încă studiat și descris în detaliu, se presupune că acestea patrulează țesutul valvular, fagocitează celule apoptotice sau agenții patogeni și migrează în organele limfoide unde inițiază răspunsul imun prin prezentarea antigenului (Hajdu, Romeo et al. 2011).

#### ***Implicarea diabetului în patologia BVA***

**Diabetul** zaharat induce și accentuează răspunsul inflamator și acumularea de lipide asociate cu inițierea și progresia BVA (Manduteanu, Simionescu et al. 2021), iar studiul CANHEART a implicat diabetul ca factor semnificativ de risc în dezvoltarea stenozei aortice (Yan, Koh et al. 2017). Diabetul nu numai că predispune la BVA, dar se asociază de asemenea cu progresia accelerată a bolii și gravitatea simptomelor la pacienții cu stenoză aortică moderată (Aronow, Ahn et al. 2001). Patologia diabetului asociat cu alte boli cardiovasculare este complexă și se datorează în parte efectelor hiperglicemiei, care duce la creșterea generării speciilor reactive de oxigen (ROS) și promovarea exprimării de citokine și chemokine cu efect proinflamator (Dludla, Joubert et al. 2017, Wang, Liu et al. 2021).

Nivelul crescut al proteinei C reactive și hiperlipemia asociată diabetului favorizează inflamația cronică (Dongway, Faggad et al. 2015). Există numeroase dovezi care implică

proteine al căror nivel este crescut în diabet (TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-1 $\beta$ ) în patologia valvei aortice (Keane, Calton et al. 2017), astfel că se poate specula că **mediul inflamator** produs în diabet declanșează cel puțin în parte mecanismele responsabile pentru disfuncția celulelor valvulare. În diabetul de tip 2, hiperglicemia se asociază de asemenea cu producția crescută de ROS și adeziunea monocitelor la endoteliu prin inhibarea producției de NO și creșterea nivelului de endotelină-1, E-selectină, ICAM-1 și VCAM-1. Monocitele ajunse în spațiul subendotelial se diferențiază în macrofage care secretă citokine proinflamatorii și înglobează LDL modificat, transformându-se apoi în celule spumoase (Manduteanu, Voinea et al. 1999, Nandy, Janardhanan et al. 2011, Padilla, Carpenter et al. 2018, Meza, La Favor et al. 2019). Inflamația precede calcificarea, iar în zonele calcificate din valvă au fost identificate celulele imune infiltrate. Se cunoaște că populația de macrofage din valvele calcificate este mai numeroasă decât cea din valvele normale și exprimă atât markeri caracteristici M $\phi$ 1, cât și M $\phi$ 2 (Li, Qiao et al. 2017).

În valvele stenotice provenite de la pacienți diabetici, exprimarea NF- $\kappa$ B și a FII și FXa în fibrosa este crescută față de valvele de la pacienți fără diabet. În plus, experimentele *in vitro* au confirmat că glucoza crescută provoacă inflamația VIC primare prin intermediul semnalizării mediate de NF- $\kappa$ B, ducând la calcificarea celulară (Kopytek, Mazur et al. 2021).

În valvele calcificate a fost evidențiată exprimarea redusă a VE-caderinei în fibrosa și a fost identificată în subendoteliu o populație de celule care co-exprimă  $\alpha$ -SMA și CD31, dar nu și markerul hematopoietic CD45, sugerând ca aceste celulele provin din EndMT. Această populație celulară care prezintă și nivel crescut de NF $\kappa$ B nuclear a fost identificată doar în fibrosa, și se localizează distal față de zona calcificată (Mahler, Farrar et al. 2013). De asemenea, anterior s-a arătat că celulele endoteliale izolate din valvele calcificate sunt mai predispuse diferențierii osteogenice *in vitro* față de celulele endoteliale vasculare (Ma, Zhao et al. 2020). Se cunoaște că diabetul se asociază cu inflamația cronică, iar mediatorii pro-inflamatori TNF- $\alpha$ , IL-6, LPS, IFN- $\gamma$  și TGF- $\beta$  au fost implicați în activarea EndMT în VEC (Mahler, Farrar et al. 2013, Ma, Sanchez-Duffhues et al. 2020). *In vitro*, TNF- $\alpha$  și IL-6 au indus în celulele endoteliale valvulare aortice porcine (PAVEC) cultivate pe hidrogeluri 3D modificări asociate EndMT prin calea de semnalizare a factorului de transcripție NF $\kappa$ B: (1) scăderea exprimării CD31 și a VE-caderinei, (2) migrarea celulelor în matricea de collagen și (3) exprimarea de  $\alpha$ -SMA (Mahler, Farrar et al. 2013).

#### ***Plasticitatea VIC și implicațiile pentru studiul BVA***

MEC reglează fenotipul celulelor valvulare rezidente prin intermediul integrinelor, contribuie la menținerea tensiunii bazale celulare și oferă celulelor informații poziționale

(Santa-Cruz Mateos, Valencia-Exposito et al. 2020). De asemenea, MEC poate funcționa ca un rezervor de semnale biologice prin intermediul proteoglicanilor, care pot sechestra local molecule de semnalizare. Datorită rolului complex pe care MEC îl are în homeostazie, orice modificare la acest nivel poate conduce la patologie. *In vitro*, VIC tranziționează spontan în miofibroblaste (aVIC) și prezintă capacități ridicate de contracție, atunci când sunt cultivate pe substrat rigid sau sunt stimulate cu citokine specifice (TGF- $\beta$ ), capacități migratorii și proliferative (Liu and Gotlieb 2008, Huang, Yang et al. 2012, Ma, Killaars et al. 2017). Studiile unde celulele valvulare au fost cultivate pe matrici tridimensionale de compoziție și rigiditate diversă, au evidențiat rolul semnificativ pe care substratul îl are în modularea fenotipului celular, cu implicații în patologia valvulară (Hutson, Marohl et al. 2016, Rutkovskiy, Malashicheva et al. 2017, Bogdanova, Zahirnyk et al. 2022). Plasticitatea VIC se păstrează deci și în cultură, astfel că una dintre cele mai mari probleme în studiul patologiei valvei aortice este lipsa unui model experimental *in vitro* care să replice cât mai apropiat compoziția și arhitectura țesutului valvular nativ.

În valva sănătoasă **tranziția qVIC în aVIC** reprezintă un proces implicat în menținerea arhitecturii valvei prin secreția componentelor MEC (colagen, fibronectină, condroitin sulfat, etc.) și de enzime care degradează aceste componente (MMP-uri, catepsine). Odată terminată remodelarea MEC, aVIC sunt eliminate prin apoptoză. În patologie, această semnalizare este însă afectată și aVIC continuă sinteza elementelor de MEC, cauzând fibrozarea țesutului și calcificarea distrofică. Atunci când devin activate, celulele interstițiale prezintă fibre de stres, exprimare crescută de  $\alpha$ -SMA, miozina mușchiului neted, proteina specifică fibroblastelor (FSP-1) sau vimentină, dar și proteine ale MEC și citokine. Printre inductorii de activare a VIC se numără modificările asociate MEC, stresul mecanic sau TGF- $\beta$  (Ma, Killaars et al. 2017, Goody, Hosen et al. 2020, Di Vito, Donato et al. 2021).

**Tranziția qVIC în obVIC** are loc în prezența de factori care promovează osteogeneza sau condrogeneza. obVIC sunt implicate activ în procesul de calcificare a valvei și sunt responsabile pentru stenoza târzie. În acest stadiu, comportamentul celular este guvernat de factorul de transcripție RUNX2 și de proteinele morfogenetice osoase (BMPs), iar obVIC secretă o serie de proteine exprimate în țesutul osos, precum osteopontină, osteocalcină și fosfatază alcalină (Yip, Chen et al. 2009). Rezultatele noastre recente au arătat că hiperglicemia induce supraexprimarea moleculelor osteogene BMP-2, BMP-4 și TGF- $\beta$  în celulele valvulare aortice umane cultivate în modele 3D pe bază de gelatină metacrilată, cu efect asupra semnalizării SMAD1/5/8/9 și a exprimării factorului de

transcripție RUNX2, implicând astfel diabetul ca și contribuitor la calcificarea valvei aortice (Vadana, Cecoltan et al. 2020).

### ***Studiul BVA in vivo și in vitro***

Rolul celulelor valvulare în patologia valvei aortice în diabet încă nu este pe deplin elucidat și este studiat în prezent în mai multe tipuri de modele *in vivo* (Sider, Blaser et al. 2011, Puperi, Kishan et al. 2016, Jung, Ahmad et al. 2022) și *in vitro* (Hjortnaes, Goettsch et al. 2016, Porras, Westlund et al. 2018, Zabirnyk, Perez et al. 2020, Kruithof, van de Pol et al. 2021).

Patologia BVA în diabet este extrem de complexă, astfel că este necesar un **model in vivo** care să poată reda cât mai fidel ambele patologii. Modelele *in vivo* de diabet presupun utilizarea de animale cu predispoziție de a dezvolta diabet sau inducerea diabetului cu ajutorul agenților chimici (diabetogeni) care distrug celulele  $\beta$ -pancreatice. Cei mai utilizați agenți diabetogeni sunt streptozotocina și alloxan-ul, care sunt preluați în celulele  $\beta$ -pancreatice prin intermediul transportotului de glucoză GLUT2, unde generează ROS și radicali liberi, provocând fragmentarea ADN-ului și apoptoza celulelor.

În literatura de specialitate sunt descrise numeroase modele de diabet *in vivo*, dar pentru studiul BVA modelele curente prezintă limitări importante la nivel de recapitulare a caracteristicilor patologiei umane. De asemenea, modelele de BVA în diabet sunt și mai puține, iar fazele incipiente de apariție a leziunilor la nivelul VA au fost descrise majoritar *in vivo* la nivel ultrastructural (Filip, Nistor et al. 1987, Simionescu, Popov et al. 1996, Tucureanu, Filippi et al. 2019).

*In vivo*, s-a arătat recent într-un model de șoarece dislipidemic predispus la dezvoltarea diabetului de tip 2 ( $LDLr^{-}/ApoB^{100/100}/IGF-II$ ) că diabetul indus prin dietă provoacă mai rapid stenoza aortică (SA) și crește exprimarea la nivel de ARNm a genelor osteogenice față de șoarecii nediabetici ( $LDLr^{-}/ApoB^{100/100}$ ) (Le Quang, Bouchareb et al. 2014). Similar, șoarecii  $LDLr^{-}/ApoB^{100/100}$  menținuți pe dietă diabetogenică/procalcifică timp de 12 luni prezintă depozite de calciu la nivelul VA și incidență de două ori mai mare a stenozei aortice confirmată prin modificarea parametrilor hemodinamici (Scatena, Jackson et al. 2018). Totuși, atunci când diabetul este indus prin injectarea de streptozotocină într-un model de hamster hiperglicemic-hiperlipemic, rezultatele arată că valva aortică (VA) este primul teritoriu vascular afectat de diabet și hiperlipemie (HD), după doar 2 săptămâni de la inducerea diabetului. În valvele aortice de la hamsterii HD au fost identificate modificări ultrastructurale ale VEC (creșterea abundenței de organite biosecretorii, a microfilamentelor și microtubulilor) care s-au asociat cu hiperplazia membranei bazale la nivelul căreia au fost

identificate lipoproteine de joasă densitate (LDL) oxidate, sugerând că hiperglicemia induce în faza inițială disfuncția VEC (Simionescu, Popov et al. 1996).

*In vitro*, comportamentul celulelor interstițiale valvulare este influențat semnificativ atât de substratul pe care acestea sunt cultivate, cât și de arhitectura modelului de cultură. Culturile convenționale bi-dimensionale sunt cel mai puțin reprezentative pentru situația *in vivo*, dar sunt cel mai des utilizate pentru studiul VIC datorită ușurinței de stabilire a culturii. Studiile au arătat că, atunci când VIC sunt cultivate pe substrat rigid cum este polistirenul din plăcile de cultură, tranziționează spontan în miofibroblaste (Ma, Killaars et al. 2017). Deoarece a devenit evident rolul esențial pe care MEC îl are în reglarea funcției și disfuncției VIC (Gould, Matherly et al. 2014), un pas suplimentar față de cultura 2D a fost acoperirea suprafeței de cultură cu proteine ale MEC, iar acest tip de studii a furnizat informații importante legate de modul în care fenotipul VIC este reglat de substrat (Porras, van Engeland et al. 2017). Dintre toate elementele de matrice testate, acoperirea cu laminină a provocat agregarea VIC sub formă de noduli, iar colagenul de tip I a promovat un fenotip neactivat al VIC (Rodriguez and Masters 2009). Astfel, cercetările *in vitro* au continuat în ultimii ani cu tentative de a identifica un substrat tridimensional potrivit la nivel de compoziție sau arhitectură care să mențină fenotipul neactivat al VIC (qVIC), cu implementarea co-culturilor VIC-VEC și, nu în ultimul rând, cel mai recent, cu utilizarea de celule endoteliale valvulare umane.

**Modelele 3D *in vitro*** reprezintă o alternativă mai reprezentativă din punct de vedere al caracteristicilor structurale și funcționale ale mediului celular nativ, favorizând interacția cu celulele învecinate sau componentele MEC și ghidând comportamentul celular (Kaushik, Ponnusamy et al. 2018, Hong, Kim et al. 2019).

Modelele *in vitro* pentru studiul patologiei VA sunt realizate cu celule izolate de la pacienți sau provenite de la animale de mari dimensiuni care dezvoltă patologie similară cu cea umană, dintre care cele mai utilizate sunt cele porcine (Bowler and Merryman 2015). Deși sunt similare în multe privințe celulelor umane, celulele valvulare interstițiale porcine (PVIC) reprezintă totuși un model limitat *in vitro*, mai ales dacă sunt folosite la pasaje mari. Se cunoaște că atunci când sunt menținute în cultură pe termen lung, 20% dintre PVIC prezintă inhibiție de contact și au comportament instabil. De asemenea, potențialul de calcificare al PVIC scade după trei pasaje de la izolare (Chen, Yip et al. 2009). Pe de altă parte, utilizarea celulelor umane este limitată de disponibilitatea materialului biologic. Celulele umane sunt de cele mai multe ori extrase din probele de valve explantate de la pacienții cu stadii avansate de calcificare a valvei, iar celulele control sunt obținute doar de

la pacienții cu insuficiență aortică sau care suferă transplant de inimă (Goody, Hosen et al. 2020).

Un alt element esențial pentru replicarea condițiilor din VA *in vitro* este utilizarea unei co-culturi de VIC și VEC, pentru studiul interacției între cele 2 tipuri celulare. Numeroase studii au asociat cultivarea PVIC în prezența PVEC cu inhibarea tranziției lor în aPVIC sau obPVIC (Butcher and Nerem 2006, Kennedy, Hua et al. 2009, Richards, El-Hamamsy et al. 2013, Gould, Matherly et al. 2014). De asemenea, disfuncția sau denudarea endoteliului a fost semnalată drept eveniment de inițiere a transformării patologice a VIC (Hulin, Anstine et al. 2018, Hulin, Hego et al. 2018), făcând evident faptul că cele două populații celulare își reglează reciproc comportamentul.

### ***Modele 3D obținute din țesuturi native***

Multe dintre modelele 3D *in vitro* își au originea în ingineria tisulară, unde principalul obiectiv este acela de a dezvolta o variantă biologică de proteză a valvei. În acest scop, au fost testate din punctul de vedere al compatibilității cu celulele valvulare o varietate de metode și materiale sintetice sau naturale. Sistemele care mimează MEC nativă sunt de preferat, deoarece furnizează un mediu care replică arhitectura și condițiile din valvă (sechestrarea factorilor de creștere și a altor molecule, adeziunea celulară etc.) (Scott, Simon et al. 2021). Una dintre variantele utilizate cu succes pentru cultura tridimensională a celulelor *in vitro* sunt hidrogelurile obținute din polimeri naturali (colagen, gelatină) sau din țesuturi decelularizate. Țesuturile decelularizate pot la rândul lor să fie (1) repopulate cu celule, sau (2) procesate pentru obținerea hidrogelurilor din MEC nativă.

Hidrogelurile reprezintă rețele polimerice puternic hidratate care își păstrează integritatea structurală atunci când lanțurile polimerice, care pot fi de natură sintetică sau naturală, sunt polimerizate prin metode fizice sau chimice. Hidrogelurile sunt considerate analogul MEC native datorită proprietăților de a reține volume mari de fluide la interior, al elasticității, dar și a faptului că interfața dintre hidrogel și fluide se aseamănă cu cea observată în majoritatea țesuturilor moi (Geckil, Xu et al. 2010). Avantajele modelelor de cultură 3D au devenit evidente în ultimii ani, astfel că în prezent se încearcă dezvoltarea de hidrogeluri compatibile pentru cultura celulelor valvulare umane. În trecut, diferite proteine sau amestecuri proteice (Matrigel) prezente în matricea valvulară au fost utilizate pentru cultura celulelor valvulare, rezultatele fiind promițătoare. În prezent, utilizarea hidrogelurilor obținute din MEC nativă pentru studiul *in vitro* al BVA este încă foarte limitată. Rezultate promițătoare au fost obținute în cazul unui hidrogel produs din valve aortice ovine decelularizate, care păstrează o componență proteică similară cu cea din valva

nativă (colagen și laminină), dar un conținut relativ scăzut de GAG. Acest hidrogel a prezentat biocompatibilitate similară cu suporturile pe bază de colagen I la nivel de proliferare celulară și nu a avut efect citotoxic asupra VIC (Nehrenheim, Raschke et al. 2019).

Polimerii naturali precum agaroză, alginatul, colagenul, fibrina, gelatina, chitosan-ul sau acidul hialuronic pot fi de asemenea utilizați pentru obținerea de hidrogeluri și generarea de suporturi biologice. Datorită faptului că reprezintă componenta majoritară a MEC din valvă, colagenul de tip I a fost printre primele materiale utilizate pentru cultura tridimensională *in vitro* a celulelor valvulare, iar VIC crescute în geluri de colagen 2% au prezentat un fenotip mai puțin activat (Cushing, Mariner et al. 2008). În ciuda avantajelor de natură biologică ale colagenului, acest material prezintă și o serie de limitări, precum faptul că VIC contractă aceste matrici. Din aceste motive, gelatina modificată reprezintă o alternativă a utilizării colagenului. Gelatină metacrilată (GelMA) permite obținerea de hidrogeluri cu rigiditate ușor de ajustat, care favorizează adeziunea celulară și pot fi combinate ușor cu alte tipuri de materiale. Hidrogelurile de GelMA au fost utilizate cu succes pentru cultura de PVIC sau co-cultura VIC-VEC porcine în sisteme de tipul ”organ-on-a-chip” (Chen, Sriganapalan et al. 2013). Pentru obținerea de modele mai complexe, se utilizează frecvent combinația GelMA cu alte proteine ale MEC specifice VA, precum acidul hialuronic (AH).

La nivel internațional, cercetarea din domeniu se concentrează în principal pe: (1) îmbunătățirea înțelegerii proceselor biologice de bază asociate patologiei valvei aortice, inclusiv căile de semnalizare implicate și rolul inflamației în inițierea și propagarea bolii; (2) determinarea contribuțiilor unice asociate comorbidităților în BVA (3) dezvoltarea unor metode de imagistică pentru identificarea manifestărilor subclinice asociate BVA și (4) investigarea fezabilității unei intervenții farmacologice în stadiile inițiale ale BVA (Rajamannan, Evans et al. 2011).

Analiza prezentată în Partea I ”Stadiul actual al cunoașterii” scoate în evidență trei probleme deosebit de importante, și anume: (1) BVA este accelerată în diabet prin mecanisme care nu au fost încă descrise, (2) modificările moleculare din stadiile inițiale ale BVA în diabet nu au fost abordate în modelele *in vivo* și (3) modelele 3D *in vitro* existente nu includ celule valvulare umane și comunicarea dintre ele, esențiale pentru reproducerea mediului din VA nativă.

În acest context, **ipoteza** de la care a plecat prezenta această cercetare este că hiperglicemia asociată diabetului induce modificări specifice în procesul inflamator din



valva aortică, contribuind la inițierea și progresia accelerată a BVA. Astfel, obiectivul principal al studiului a fost investigarea mecanismelor prin care hiperglicemia induce și propagă inflamația celulelor valvulare aortice.

În acest sens, au fost stabilite următoarele **obiective științifice**:

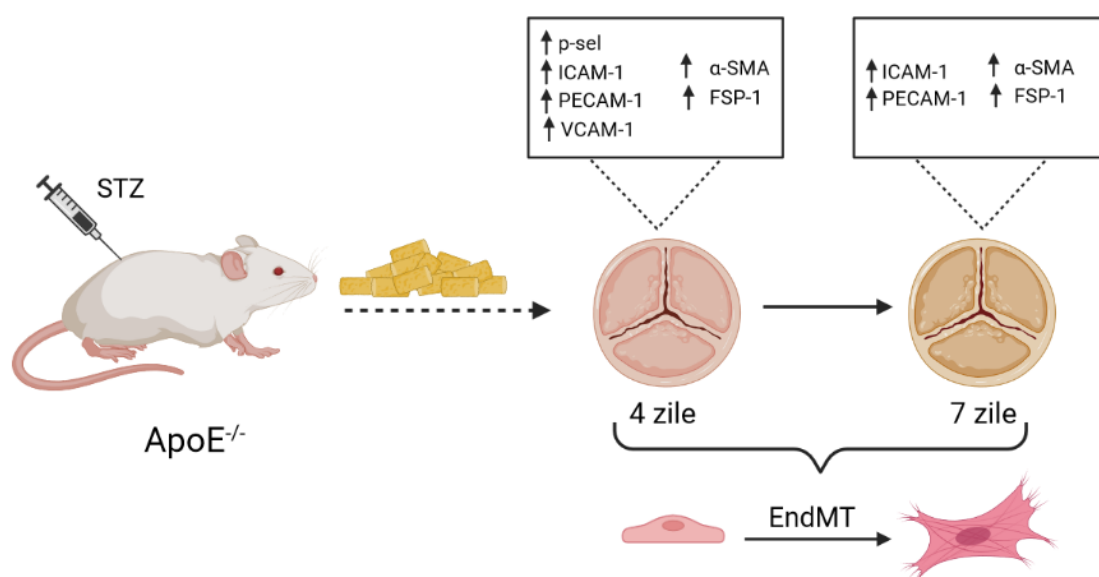
1. Caracterizarea procesului inflamator în valva aortică asociat diabetului timpuriu într-un model *in vivo* de soarece diabetic, hiperlipemic;
2. Dezvoltarea de modele 3D *in vitro* populate cu celule valvulare umane și utilizarea lor pentru investigarea mecanismelor implicate în inflamația celulelor valvulare în condiții de expunere la concentrații crescute de glucoză..

Astfel, **a doua parte a tezei** constă în Contribuțiile originale aduse în vederea îndeplinirii acestor obiective, și este împărțită în două capitole.

**Capitolul I** a avut ca obiectiv principal investigarea mediatorilor inflamației în diabetul timpuriu în valva aortică într-un model *in vivo* de soarece diabetic, hiperlipemic. În acest scop, au fost utilizați șoareci C57BL/6J masculi, ApoE<sup>-/-</sup>, cărora le-a fost indus diabet de tip I prin injectarea de streptozotocină (STZ), și șoareci control (C), injectați doar cu soluție vehicul de tampon citrat. Încă din ziua 4, la nivelul VA murine au fost evidențiate leziuni cu infiltrate lipidice caracteristice etapelor timpurii ale bolii valvulare, prin colorații histologice ale lipidelor, colagenului și GAG. Analiza de imunofluorescență a arătat o creștere foarte rapidă, din ziua a 4-a, a exprimării moleculelor de adeziune P-selectină, VCAM-1, ICAM-1 și PECAM-1 la șoarecii din grupa STZ4, care s-au păstrat cel puțin la fel de ridicate în ziua 7 de la inducerea diabetului în grupa STZ7. De asemenea, markerii mezenchimali,  $\alpha$ -SMA și FSP-1, au crescut semnificativ la șoarecii STZ4 și STZ7 față de controalele C4 și C7, sugerând rolul diabetului în activarea celulelor valvulare. Vimentina, un alt marker al celulelor mezenchimale a fost identificată ca fiind crescută semnificativ la grupele experimentale de 7 zile (C7 și STZ7) față de 4 zile, implicând dieta bogată în lipide în tranziția celulelor valvulare către fenotipuri mezenchimale.

La nivelul valvelor provenite de la șoarecii diabetici au fost identificate prin imunohistochimie celule implicate în EndMT în zona leziunilor bogate în lipide, sugerând că diabetul este implicat în supraexprimarea markerilor de disfuncție ai celulelor valvulare aortice. Mediatorii inflamatori modificați în diabet au fost utilizați pentru generarea unei matrici de corelații împreună cu proteinele implicate în remodelarea și calcificarea valvei în diabet identificate, dar și cu parametrii plasmatici și funcționali asociați stării diabetice (Tucureanu, Filippi et al. 2019, Vadana, Cecoltan et al. 2020). Corelații semnificative au fost identificate între mediatorii inflamatori, osteogeni și de remodelare și parametrii plasmatici,

sugerând asociații moleculare specifice care pot contribui la disfuncția timpurie a valvei, detectată în modelul de șoarece diabetic hiperlipemic.



**Figura 1. Schematizarea concluziilor studiului in vivo.** Șoarecii *ApoE<sup>-/-</sup>* injectați cu STZ și hrăniți cu dietă bogată în lipide prezintă supraexprimarea markerilor de activare a VEC (*P-selectina*, *VCAM-1*, *ICAM-1* și *PECAM-1*) și de activare a VIC (*α-SMA* și *FSP-1*) la 4 și 7 zile și celule implicate în *EndMT*.

La nivelul valvelor provenite de la șoarecii diabetici au fost identificate prin imunohistochimie celule implicate în *EndMT* în zona leziunilor bogate în lipide, sugerând că diabetul este implicat în supraexprimarea markerilor de disfuncție ai celulelor valvulare aortice. Mediatorii inflamatori modificați în diabet au fost utilizați pentru generarea unei matrici de corelații împreună cu proteinele implicate în remodelarea și calcificarea valvei în diabet identificate, dar și cu parametrii plasmatici și funcționali asociați stării diabetice (Tucureanu, Filippi et al. 2019, Vadana, Cecoltan et al. 2020). Corelații semnificative au fost identificate între mediatorii inflamatori, osteogeni și de remodelare și parametrii plasmatici, sugerând asociații moleculare specifice care pot contribui la disfuncția timpurie a valvei, detectată în modelul de șoarece diabetic hiperlipemic.

Cercetarea din **Capitolul II** a vizat investigarea *in vitro* a mecanismelor implicate în inflamația celulelor valvulare în condiții de expunere cronică la concentrații crescute de glucoză, și a avut **trei obiective specifice**: (1) izolarea și caracterizarea de celule valvulare aortice umane primare (2) dezvoltarea de modele 3D *in vitro* populate cu celule valvulare

umane și (3) descrierea mecanismelor implicate în inflamația celulelor valvulare în condiții de expunere cronică la concentrații crescute de glucoză în modelele 3D dezvoltate.

Pentru îndeplinirea **obiectivului specific (1)**, celulele valvulare umane au fost izolate prin digestie enzimatică din valve aortice umane obținute de la Spitalul Militar Central (București) în urma operațiilor de înlocuire a valvei. Culturile pure de celule valvulare endoteliale și interstiale primare au fost stabilite prin separarea cu sfere magnetice CD31+, iar markerii specifici VIC și VEC au fost puși în evidență prin imunohistochimie.

În cadrul **obiectivului (2)** au fost investigate mai multe variante de modele *in vitro*: cusă porcină decelularizată repopulată cu celule umane (subcapitolul II.1.2.), model bioprintat pe bază de hidrogeluri comerciale (subcapitolul II.1.3.) și modele pe bază de hidrogeluri dezvoltate în cadrul laboratorului nostru din gelatină metacrilată (subcapitolul II.1.4.) și din rădăcină aortică porcină decelularizată (subcapitolul II.1.5.).

Modelul de cusă porcină decelularizată și repopulată cu celule umane (subcapitolul II.1.2.) a presupus 2 etape: (1) decelularizarea țesutului nativ și (2) repopularea matricei obținute cu celule umane. Pentru prima etapă, decelularizarea a fost confirmată prin cuantificarea ADN-ului din matricea rezultată și colorații histologice pentru evidențierea celulelor și a proteinelor de MEC. Pentru a doua parte, au fost testate multiple tehnici pentru repopularea matricei cu celule umane. La exterior s-a reușit obținerea unui monostrat uniform de celule endoteliale, dar randamentul de repopulare a matricei la interior cu fibroblaste/VIC nu a fost suficient de ridicat pentru realizarea unui model *in vitro* pentru investigarea patologiei valvei aortice.

Dintre formulele de hidrogeluri comerciale testate pentru obținerea unui model bioprintat *in vitro* (subcapitolul II.1.3.), hidrogelurile pe bază de gelatină au prezentat compatibilitate cu celulele confirmată prin teste de viabilitate și microscopie. VIC încapsulate în hidrogelurile BioInk și Gel4Cell au prezentat viabilitate ridicată și au format o rețea tridimensională la interiorul construcțiilor 3D. Pe de altă parte, VEC nu sunt compatibile cu tipul de cultură încapsulată, dar atunci când sunt cultivate deasupra hidrogelurilor pe bază de gelatină proliferază și formează monostrat caracteristic. Dintre cele 3 formule testate, hidrogelurile pe bază de gelatină care au prezentat cea mai ridicată biocompatibilitate, au fost și cel mai greu de bioprintat datorită proprietăților variabile și a instabilității în cultură la 37°C. Formula CellinkRGDa fost cea mai compatibilă cu protocolul de bioprintare, dar nu și cu celulele valvulare umane.

Plecând de la rezultatele promițătoare de biocompatibilitate cu celulele valvulare ale hidrogelurilor comerciale pe bază de gelatină și a informațiilor din literatura de specialitate,

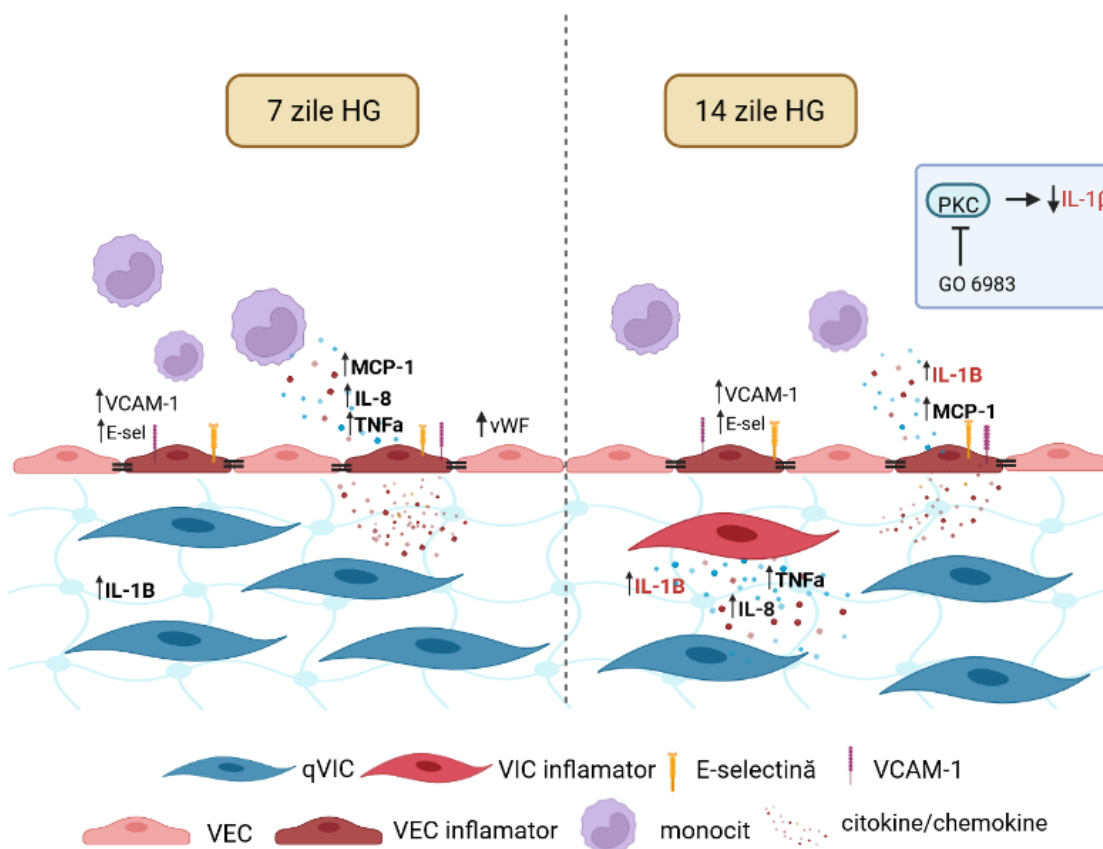
în umătoarea parte a cercetării (subcapitolul II.1.4.) am dezvoltat în cadrul laboratorului nostru o formulă de hidrogel pe bază de gelatină metacrilată (GP-1). Rezultatele de biocompatibilitate și caracterizare fenotipică au arătat că hidrogelul GP-1 dezvoltat în laborator nu este citotoxic, permite proliferarea celulară, iar celulele valvulare încapsulate în hidrogel sau cultivate la suprafața lui își păstrează markerii caracteristici. De asemenea, exprimarea genică la nivel de ARNm determinată prin RT-PCR și proteică determinată prin Western Blot a  $\alpha$ -SMA, marker de activare a VIC, scade atunci când celulele sunt cultivate în hidrogelul GP-1 față de cultura 2D clasică, replicând fenotipul VIC caracteristic valvei native. Exprimarea genică crescută la nivel de ARNm a  $\alpha$ -SMA din prima săptămână este comparativă cu cea din cultura 2D, și se asociază cu exprimarea crescută a MMP-urilor și a unor elemente de MEC (colagen I, colagen III, elastină și laminină), sugerând un proces inițial de remodelare și adaptare a celulelor în noua matrice (Ciortan, Macarie et al. 2020).

Pentru obținerea unui model cu structură proteică mai apropiată de cea a MEC din VA nativă, am dezvoltat o a doua formulă de hidrogel din matrice extracelulară nativă porcină (HDRA). La fel ca și în cazul primelor studii, hidrogelul a fost evaluat din punct de vedere al compoziției proteice, prin colorații histologice și SDS-PAGE. Astfel, s-a arătat că principala componentă din HDRA este colagenuul de tip I și/sau III, asemănătoare stratului fibros din valvă. Analiza histologică a arătat că structura construcțiilor pe bază de HDRA este foarte similară din punct de vedere al densității și porozității cu cea a țesutului valvular nativ decelularizat. Din analiza de biocompatibilitate cu celulele valvulare umane realizată prin imunohistochimie și determinarea viabilității, a rezultat că VEC formează un monostrat continuu la suprafața construcțiilor HDRA, exprimă markerul endotelial CD31 și proliferază în cultură, iar VIC se distribuie uniform în interiorul hidrogelului unde formează o rețea complexă.

Pentru îndeplinirea **obiectivului (3)** modelele *in vitro* pe bază de hidrogel din gelatină metacrilată (GP-1) și hidrogel din rădăcină aortică porcină decelularizată (HDRA) dezvoltate în cadrul laboratorului nostru au fost utilizate pentru a investiga inflamația celulelor valvulare aortice umane în condiții de expunere la cronică la concentrații crescute de glucoză.

În **modelul *in vitro* bazat pe hidrogel GP-1** și populat cu celule valvulare umane în co-cultură, rezultatele de RT-PCR au arătat că, atunci când sunt expuse la concentrații crescute de glucoză (HG), VEC devin disfuncționale prin supraexprimarea la nivel de ARNm de citokine și chemokine cu efect pro-inflamator (MCP-1, TNF- $\alpha$  și IL-8 la 7 zile și MCP-1 și IL-1 $\beta$  la 14 zile de HG) și molecule de adeziune (VCAM-1 și E-selectină la 7 și

14 zile de HG). În contrast, expunerea la HG până la 14 zile nu modifică exprimarea  $\alpha$ -SMA în VIC, sugerând că glucoza nu este implicată în tranziția VIC către un fenotip activat de tip miofibroblast. VIC răspund însă la concentrația crescută de glucoză prin asumarea unui fenotip inflamator, caracterizat prin creșterea exprimării de citokine și chemokine cu efect pro-inflamator, la 7 (IL-1 $\beta$ ) și 14 zile (TNF- $\alpha$ , IL-8 și IL-1 $\beta$ ) de expunere la HG. Activarea VEC are deci loc în principal în ziua 7 de expunere la HG, după care este posibil să se propage la VIC în ziua 14. Expresia proteică a mediatorilor inflamatori IL-1 $\beta$  și MCP-1 secretați în mediu de celulele valvulare cultivate în HG determinată prin ELISA crește semnificativ doar în ziua 14, confirmând astfel că inflamația celulelor valvulare este mai pronunțată la un timp experimental mai lung..



**Figura 2. Schematizarea concluziilor studiului pe modelul in vitro GP-1.** Expunerea cronică la HG induce un răspuns inflamator secvențial al celulelor valvulare: la 7 zile răspunsul inflamator al VEC este cel dominant, și se caracterizează prin supraexprimarea vWF, MCP-1, IL-1 $\beta$ , VCAM-1 și E-selectină. La 14 zile VIC tranziționează către un fenotip inflamator puternic (supraxexprimarea IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8), sugerând că inflamația cronică a VIC se poate datora în parte VEC, instalându-se deci mai târziu în timpul progresiei BVA;

*Un potențial mecanism implicat în exprimarea și eliberarea IL-1 $\beta$  în condiții de expunere cronică la concentrații crescute de glucoză este mediat de calea PKC.*

La nivel molecular, utilizând modelul de co-cultură în hidrogel GP-1, am identificat un potențial mecanism de exprimare a IL-1 $\beta$  în condiții de expunere cronică la glucoză crescută, intermediat de pPKC. Astfel, am observat că exprimarea pPKC crește semnificativ în VEC la 7 zile și în VIC la 14 zile în condiții de HG, iar inhibarea ei reduce semnificativ concentrația de IL-1 $\beta$  secretat în mediu în condiții de HG. Astfel, rezultatele obținute în modelul GP-1 sugerează că, în condiții de HG, procesul inflamator la nivelul valvei este declanșat întâi de VEC, după care se propagă la VIC, unde inflamația se cronicizează și poate favoriza calcificarea valvei.

În **modelul *in vivo* bazat pe hidrogel HDRA** au fost investigate în principal modificările fenotipice ale VEC cu implicații în patologia valvulară. Rezultatele de exprimare genică și imunohistochimie au arătat că, atunci când construcții HDRA populați cu celule valvulare umane sunt expuși unor concentrații patologice de glucoză, are loc declanșarea EndMT, observată și în modelul *in vivo*, caracterizată prin supraexprimarea markerilor mezenchimali ( $\alpha$ -SMA și vimentină), scăderea exprimării markerilor endoteliali (CD31 și VE-caderină) și creșterea co-localizării  $\alpha$ -SMA și CD31 în celulele valvulare. Se poate concluziona astfel că o concentrație patologică de glucoză, similară celei din diabet, favorizează EndMT, posibil prin crearea unui mediu pro-inflamator în valvă, așa cum am arătat că se întâmplă în construcții GP-1. Anterior, Mahler și colab. (2013) au demonstrat că citokinele inflamatorii (TNF $\alpha$  și IL-6) induc EndMT în celulele endoteliale valvulare ovine, proces prin care sunt generate miofibroblaste implicate în remodelarea patologică a valvei (Mahler, Farrar et al. 2013).

O altă moleculă a cărei exprimare crescută se asociază cu disfuncția VEC și care a fost identificată drept agent proinflamator în diabetul timpuriu este ET-1 (Iglarz and Clozel 2007, Saleh, Boesen et al. 2011). Importanța ET-1 în diabet a fost evidențiată prin studii care au arătat că HG crește exprimarea ET-1 în celulele primare și liniile de celule endoteliale aortice și că dereglarea sistemului ET-1 joacă un rol important în instalarea și progresia patologiei macro- și microvasculaturii în diabet (Pernow, Shemyakin et al. 2012, Manea, Todirita et al. 2013). A fost arătat că ET-1 și receptorii săi sunt supraexprimați în stenoza aortică, sugerând că o serie de modificări patologice asociate leziunilor aterosclerotice și calcificării valvei pot fi o consecință a semnalizării ET-1 (Peltonen, Taskinen et al. 2009). Din aceste motive, am investigat efectul HG asupra exprimării ET-1 în VEC cultivate în

HDRA. Rezultatele de RT-PCR au arătat că exprimarea ET-1 și a receptorilor săi (ET-A și ET-B) este crescută în VEC din construcții HDRA expuși 7 zile la HG față de martorul de glucoză normală (NG). În plus, rezultatele ELISA arată că nivelul de IL-1 $\beta$  și MCP-1 din mediul de cultură al construcțiilor expuși la HG este redus semnificativ atunci când construcțiile sunt expuși la HG în prezența de antagoniști ai receptorilor ET-1. Antagonistul receptorului de tip B reduce secreția de citokine și chemokine pro-inflamatorii aproape de nivelul observat la martorul NG, demonstrând astfel implicarea semnalizării ET-1 în inflamația VEC inițiată de HG. Deoarece se cunoaște că IL-1 $\beta$  este implicată în tranziția fenotipică a celulelor endoteliale vasculare din cadrul EndMT, se poate presupune că IL-1 $\beta$  ar putea fi implicat în EndMT în celulele endoteliale valvulare. A fost demonstrat anterior că atât ET-1 cât și IL-1 $\beta$  sunt implicate în inducerea EndMT în celulele endoteliale din alte paturi vasculare (Chaudhuri, Zhou et al. 2007, Widyantoro, Emoto et al. 2010). Rolul ET-1 în EndMT a fost studiat *in vivo* în șoareci diabetici deficienți pentru gena care codifică proteina ET-1, unde s-a arătat că ET-1 promovează dezvoltarea fibrozei cardiace (Cho, Lee et al. 2018).

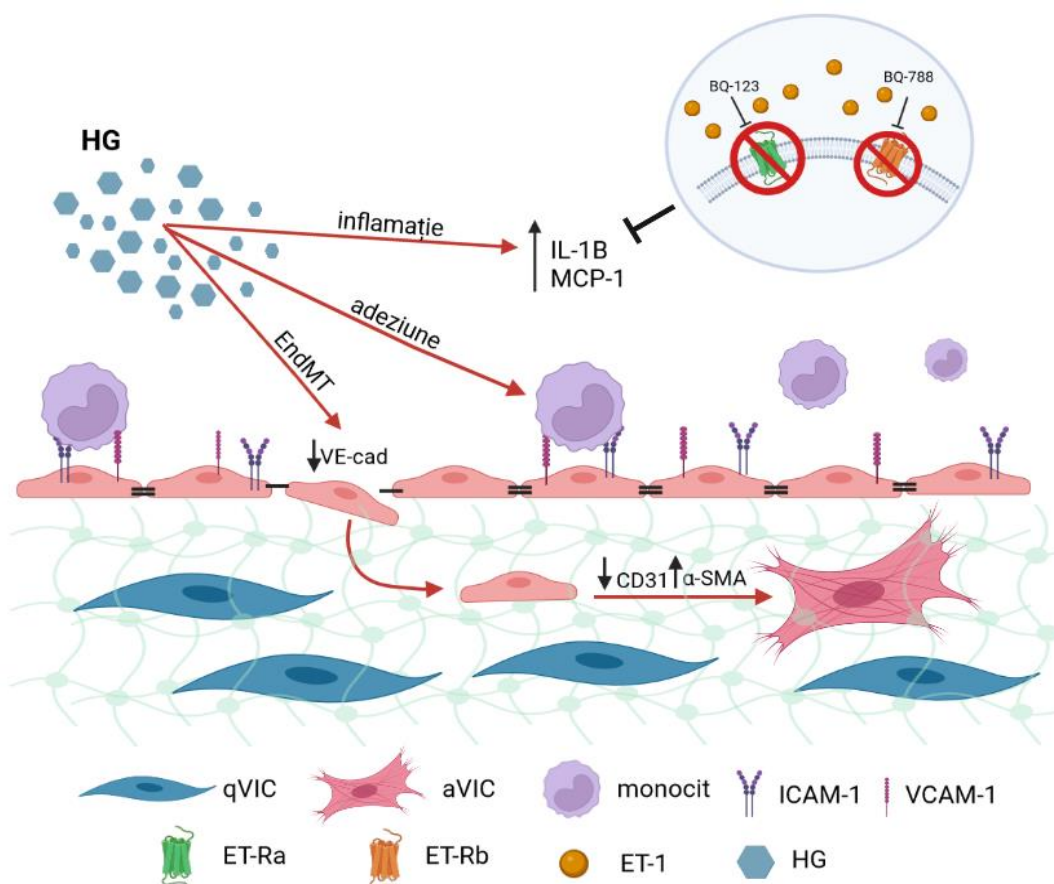
Expunerea VEC cultivate pe HDRA la glucoză crescută a dus de asemenea la supraexprimarea moleculelor de adeziune ICAM-1 și VCAM-1 implicate în recrutarea de monocite în spațiul subendotelial.

Datele obținute pe modelul HDRA sugerează că glucoza crescută promovează EndMT a VEC, posibil prin semnalizarea ET-1 și secreția de IL-1 $\beta$ . De asemenea, mediul inflamator creat poate contribui la creșterea aderenței endoteliului pentru celule imune și propagarea inflamației în valvă.

Studiile prezentate în cadrul tezei referitoare la procesul inflamator în condiții de diabet, împreună cu cele realizate în cadrul grupului nostru de cercetare (Tucureanu, Filippi et al. 2019) referitoare la markerii de calcificare, au arătat că procesul inflamator și tranziția osteogenică a celulelor interstițiale valvulare au loc concomitent în diabetul timpuriu, cu implicații asupra disfuncției valvei. Până în prezent, efectul hiperglicemiei asupra celulelor valvulare umane cultivate în modele 3D *in vitro* nu a fost investigat de niciun alt grup, astfel că rezultatele obținute în această cercetare sunt originale.

Obținerea acestor rezultate a fost posibilă prin utilizarea tehnicilor de lucru cu animale pentru stabilirea modelului *in vivo*, decelularizarea țesuturilor și dezvoltarea de hidrogeluri pentru obținerea modelelor *in vitro*, utilizarea tehnicilor de biologie moleculară, imunohistochimie sau adeziune în flux, ceea ce subliniază caracterul interdisciplinar și complexitatea cercetării prezentate.

Una dintre limitările acestei cercetări constă din utilizarea unui model murin de diabet, care nu replică foarte exact patologia umană. Deși există avantaje experimentale certe și se pot obține date importante despre patofiziologia diabetului, se cunoaște că diabetul dezvoltat în modelele animale nu este echivalent cu diabetul uman, astfel că este necesară precauție în interpretarea rezultatelor și extrapolarea lor la patologia umană. În cazul modelelor *in vitro*, o limitare constă din lipsa caracterizării hidrogelurilor dezvoltate în cadrul laboratorului nostru din punct de vedere al proprietăților fizice relevante pentru cultura de celule *in vitro* (rigiditate, viteză de degradare, vâscozitate), datorată lipsei unei infrastructuri adecvate pentru o astfel de analiză. Din acest motiv, în vederea îmbunătățirii formulelor de hidrogel GP-1 și HDRA pentru extinderea studiilor prezentate în această cercetare, îmi propun să colaborez pe viitor cu o unitate de cercetare care să realizeze astfel de analize.



**Figura 3. Schematizarea concluziilor studiului pe modelul *in vitro* HDRA.** Expunerea cronică la concentrație crescută de glucoză favorizează (1) inițierea procesului de EndMT, caracterizată prin scăderea exprimării markerilor endoteliali (CD31 și VE-caderină), supraexprimarea markerilor mezenchimali ( $\alpha$ -SMA și vimentină) și creșterea co-localizării



*$\alpha$ -SMA și CD31 în celulele valvulare; (2) recrutarea monocitelor prin supraexprimarea moleculelor de adeziune VCAM-1 și ICAM-1 la nivelul VEC și (3) exprimarea și eliberarea de citokine și chemokine pro-inflamatorii IL-1 $\beta$  și MCP-1, prin mecanisme mediate în parte de ET-1 și receptorii săi ET-Ra și ET-Rb.*

Complexitatea și dezvoltarea lentă a BVA în timp pot fi considerate o oportunitate în ceea ce privește posibilitatea de a planifica intervenții terapeutice înainte ca intervenția chirurgicală să devină inevitabilă. Astfel, identificarea principalelor molecule asociate procesului inflamator indus de diabet celulelor valvulare și descrise în acest studiu are ca perspective în primul rând definirea unor abordări terapeutice țintite, specifice, care în prezent nu sunt disponibile. De altfel, molecula de adeziune VCAM-1, găsită ca fiind supraexprimată de endoteliul valvular în studiile din teza de față, a fost deja utilizată cu succes drept țintă pentru oprirea tranziției osteogene a VIC. Astfel, țintirea cu Runx2-shRNA *in vitro* a redus nivelul de Runx2, OSP, BSP, BMP-2 (Voicu, Rebleanu et al. 2022), iar rezultatele preliminare *in vivo* sunt promițătoare. Mai mult, hidrogelurile și modelele 3D dezvoltate în acest studiu pot reprezenta un punct de plecare pentru dezvoltarea unui model bio-printat de foiță valvulară populată cu celule umane, care să reprezinte o platformă de testare a terapiilor farmacologice pentru tratamentul BVA.

## Bibliografie

1. Aronow, W. S., C. Ahn, I. Kronzon and M. E. Goldman (2001). "Association of coronary risk factors and use of statins with progression of mild valvular aortic stenosis in older persons." Am J Cardiol **88**(6): 693-695.
2. Bogdanova, M., A. Zahirnyk, A. Malashicheva, K. Z. Enayati, T. A. Karlsen, M. L. Kaljusto, J. P. Kvitting, E. Dissen, G. J. Sullivan, A. Kostareva, K. O. Stenslokken, A. Rutkovskiy and J. Vaage (2019). "Interstitial cells in calcified aortic valves have reduced differentiation potential and stem cell-like properties." Sci Rep **9**(1): 12934.
3. Bogdanova, M., A. Zahirnyk, A. Malashicheva, D. Semenova, J. E. Kvitting, M. L. Kaljusto, M. D. M. Perez, A. Kostareva, K. O. Stenslokken, G. J. Sullivan, A. Rutkovskiy and J. Vaage (2022). "Models and Techniques to Study Aortic Valve Calcification in Vitro, ex Vivo and in Vivo. An Overview." Front Pharmacol **13**: 835825.
4. Bowler, M. A. and W. D. Merryman (2015). "In vitro models of aortic valve calcification: solidifying a system." Cardiovasc Pathol **24**(1): 1-10.
5. Butcher, J. T. and R. M. Nerem (2006). "Valvular endothelial cells regulate the phenotype of interstitial cells in co-culture: effects of steady shear stress." Tissue Eng **12**(4): 905-915.
6. Chaudhuri, V., L. Zhou and M. Karasek (2007). "Inflammatory cytokines induce the transformation of human dermal microvascular endothelial cells into myofibroblasts: a potential role in skin fibrogenesis." J Cutan Pathol **34**(2): 146-153.
7. Chen, J. H., C. Y. Yip, E. D. Sone and C. A. Simmons (2009). "Identification and characterization of aortic valve mesenchymal progenitor cells with robust osteogenic calcification potential." Am J Pathol **174**(3): 1109-1119.
8. Chen, M. B., S. Srigunapalan, A. R. Wheeler and C. A. Simmons (2013). "A 3D microfluidic platform incorporating methacrylated gelatin hydrogels to study physiological cardiovascular cell-cell interactions." Lab Chip **13**(13): 2591-2598.
9. Cho, J. G., A. Lee, W. Chang, M. S. Lee and J. Kim (2018). "Endothelial to Mesenchymal Transition Represents a Key Link in the Interaction between Inflammation and Endothelial Dysfunction." Front Immunol **9**: 294.
10. Ciortan, L., R. D. Macarie, S. Cecoltan, M. Vadana, M. M. Tucureanu, A. C. Mihaila, I. Droc, E. Butoi and I. Manduteanu (2020). "Chronic High Glucose Concentration

- Induces Inflammatory and Remodeling Changes in Valvular Endothelial Cells and Valvular Interstitial Cells in a Gelatin Methacrylate 3D Model of the Human Aortic Valve." Polymers (Basel) **12**(12).
11. Coffey, S., R. Roberts-Thomson, A. Brown, J. Carapetis, M. Chen, M. Enriquez-Sarano, L. Zuhlke and B. D. Prendergast (2021). "Global epidemiology of valvular heart disease." Nat Rev Cardiol **18**(12): 853-864.
  12. Cowell, S. J., D. E. Newby, R. J. Prescott, P. Bloomfield, J. Reid, D. B. Northridge, N. A. Boon, S. Scottish Aortic and I. o. R. I. Lipid Lowering Trial (2005). "A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis." N Engl J Med **352**(23): 2389-2397.
  13. Cushing, M. C., P. D. Mariner, J. T. Liao, E. A. Sims and K. S. Anseth (2008). "Fibroblast growth factor represses Smad-mediated myofibroblast activation in aortic valvular interstitial cells." FASEB J **22**(6): 1769-1777.
  14. Di Vito, A., A. Donato, I. Presta, T. Mancuso, F. S. Brunetti, P. Mastroberto, A. Amorosi, N. Malara and G. Donato (2021). "Extracellular Matrix in Calcific Aortic Valve Disease: Architecture, Dynamic and Perspectives." Int J Mol Sci **22**(2).
  15. Dlodla, P. V., E. Joubert, C. J. F. Muller, J. Louw and R. Johnson (2017). "Hyperglycemia-induced oxidative stress and heart disease-cardioprotective effects of rooibos flavonoids and phenylpyruvic acid-2-O-beta-D-glucoside." Nutr Metab (Lond) **14**: 45.
  16. Dongway, A. C., A. S. Faggad, H. Y. Zaki and B. E. Abdalla (2015). "C-reactive protein is associated with low-density lipoprotein cholesterol and obesity in type 2 diabetic Sudanese." Diabetes Metab Syndr Obes **8**: 427-435.
  17. Filip, D. A., A. Nistor, A. Bulla, A. Radu, F. Lupu and M. Simionescu (1987). "Cellular events in the development of valvular atherosclerotic lesions induced by experimental hypercholesterolemia." Atherosclerosis **67**(2-3): 199-214.
  18. Geckil, H., F. Xu, X. Zhang, S. Moon and U. Demirci (2010). "Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics." Nanomedicine (Lond) **5**(3): 469-484.
  19. Goody, P. R., M. R. Hosen, D. Christmann, S. T. Niepmann, A. Zietzer, M. Adam, F. Bonner, S. Zimmer, G. Nickenig and F. Jansen (2020). "Aortic Valve Stenosis: From Basic Mechanisms to Novel Therapeutic Targets." Arterioscler Thromb Vasc Biol **40**(4): 885-900.

20. Gould, S. T., E. E. Matherly, J. N. Smith, D. D. Heistad and K. S. Anseth (2014). "The role of valvular endothelial cell paracrine signaling and matrix elasticity on valvular interstitial cell activation." Biomaterials **35**(11): 3596-3606.
21. Hajdu, Z., S. J. Romeo, P. A. Fleming, R. R. Markwald, R. P. Visconti and C. J. Drake (2011). "Recruitment of bone marrow-derived valve interstitial cells is a normal homeostatic process." J Mol Cell Cardiol **51**(6): 955-965.
22. Han, K., D. Shi, L. Yang, M. Xie, R. Zhong, Z. Wang, F. Gao, X. Ma and Y. Zhou (2021). "Diabetes Is Associated With Rapid Progression of Aortic Stenosis: A Single-Center Retrospective Cohort Study." Front Cardiovasc Med **8**: 812692.
23. Hinton, R. B., Jr., J. Lincoln, G. H. Deutsch, H. Osinska, P. B. Manning, D. W. Benson and K. E. Yutzey (2006). "Extracellular matrix remodeling and organization in developing and diseased aortic valves." Circ Res **98**(11): 1431-1438.
24. Hjortnaes, J., C. Goettsch, J. D. Hutcheson, G. Camci-Unal, L. Lax, K. Scherer, S. Body, F. J. Schoen, J. Kluin, A. Khademhosseini and E. Aikawa (2016). "Simulation of early calcific aortic valve disease in a 3D platform: A role for myofibroblast differentiation." J Mol Cell Cardiol **94**: 13-20.
25. Hong, S., J. S. Kim, B. Jung, C. Won and C. Hwang (2019). "Coaxial bioprinting of cell-laden vascular constructs using a gelatin-tyramine bioink." Biomater Sci **7**(11): 4578-4587.
26. Huang, X., N. Yang, V. F. Fiore, T. H. Barker, Y. Sun, S. W. Morris, Q. Ding, V. J. Thannickal and Y. Zhou (2012). "Matrix stiffness-induced myofibroblast differentiation is mediated by intrinsic mechanotransduction." Am J Respir Cell Mol Biol **47**(3): 340-348.
27. Hulin, A., L. J. Anstine, A. J. Kim, S. J. Potter, T. DeFalco, J. Lincoln and K. E. Yutzey (2018). "Macrophage Transitions in Heart Valve Development and Myxomatous Valve Disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **38**(3): 636-644.
28. Hulin, A., A. Hego, P. Lancellotti and C. Oury (2018). "Advances in Pathophysiology of Calcific Aortic Valve Disease Propose Novel Molecular Therapeutic Targets." Front Cardiovasc Med **5**: 21.
29. Hulin, A., L. Hortells, M. V. Gomez-Stallons, A. O'Donnell, K. Chetal, M. Adam, P. Lancellotti, C. Oury, S. S. Potter, N. Salomonis and K. E. Yutzey (2019). "Maturation of heart valve cell populations during postnatal remodeling." Development **146**(12).

30. Hutson, H. N., T. Marohl, M. Anderson, K. Eliceiri, P. Campagnola and K. S. Masters (2016). "Calcific Aortic Valve Disease Is Associated with Layer-Specific Alterations in Collagen Architecture." PLoS One **11**(9): e0163858.
31. Iglarz, M. and M. Clozel (2007). "Mechanisms of ET-1-induced endothelial dysfunction." J Cardiovasc Pharmacol **50**(6): 621-628.
32. Jung, J. J., A. A. Ahmad, S. Rajendran, L. Wei, J. Zhang, J. Toczek, L. Nie, G. Kukreja, M. Salarian, K. Gona, M. Ghim, R. Chakraborty, K. A. Martin, G. Tellides, D. Heistad and M. M. Sadeghi (2022). "Differential BMP Signaling Mediates the Interplay Between Genetics and Leaflet Numbers in Aortic Valve Calcification." JACC Basic Transl Sci **7**(4): 333-345.
33. Kaushik, G., M. P. Ponnusamy and S. K. Batra (2018). "Concise Review: Current Status of Three-Dimensional Organoids as Preclinical Models." Stem Cells **36**(9): 1329-1340.
34. Keane, K. N., E. K. Calton, R. Carlessi, P. H. Hart and P. Newsholme (2017). "The bioenergetics of inflammation: insights into obesity and type 2 diabetes." Eur J Clin Nutr **71**(7): 904-912.
35. Kennedy, J. A., X. Hua, K. Mishra, G. A. Murphy, A. C. Rosenkranz and J. D. Horowitz (2009). "Inhibition of calcifying nodule formation in cultured porcine aortic valve cells by nitric oxide donors." Eur J Pharmacol **602**(1): 28-35.
36. Kodali, S. K., P. Velagapudi, R. T. Hahn, D. Abbott and M. B. Leon (2018). "Valvular Heart Disease in Patients  $\geq$ 80 Years of Age." J Am Coll Cardiol **71**(18): 2058-2072.
37. Kopytek, M., P. Mazur, M. Zabczyk, A. Undas and J. Natorska (2021). "Diabetes concomitant to aortic stenosis is associated with increased expression of NF-kappaB and more pronounced valve calcification." Diabetologia **64**(11): 2562-2574.
38. Kruithof, B. P. T., V. van de Pol, T. Los, K. Lodder, B. M. Gourabi, M. C. DeRuiter, M. J. Goumans and N. Ajmone Marsan (2021). "New calcification model for intact murine aortic valves." J Mol Cell Cardiol **156**: 95-104.
39. Le Quang, K., R. Bouchareb, D. Lachance, M. A. Laplante, D. El Hussein, M. C. Boulanger, D. Fournier, X. P. Fang, R. K. Avramoglu, P. Pibarot, Y. Deshaies, G. Sweeney, P. Mathieu and A. Marette (2014). "Early development of calcific aortic valve disease and left ventricular hypertrophy in a mouse model of combined dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus." Arterioscler Thromb Vasc Biol **34**(10): 2283-2291.

40. Li, G., W. Qiao, W. Zhang, F. Li, J. Shi and N. Dong (2017). "The shift of macrophages toward M1 phenotype promotes aortic valvular calcification." J Thorac Cardiovasc Surg **153**(6): 1318-1327 e1311.
41. Lindman, B. R., R. O. Bonow and C. M. Otto (2013). "Current management of calcific aortic stenosis." Circ Res **113**(2): 223-237.
42. Liu, A. C. and A. I. Gotlieb (2008). "Transforming growth factor-beta regulates in vitro heart valve repair by activated valve interstitial cells." Am J Pathol **173**(5): 1275-1285.
43. Ma, H., A. R. Killaars, F. W. DelRio, C. Yang and K. S. Anseth (2017). "Myofibroblastic activation of valvular interstitial cells is modulated by spatial variations in matrix elasticity and its organization." Biomaterials **131**: 131-144.
44. Ma, J., G. Sanchez-Duffhues, M. J. Goumans and P. Ten Dijke (2020). "TGF-beta-Induced Endothelial to Mesenchymal Transition in Disease and Tissue Engineering." Front Cell Dev Biol **8**: 260.
45. Ma, X., D. Zhao, P. Yuan, J. Li, Y. Yun, Y. Cui, T. Zhang, J. Ma, L. Sun, H. Ma, Y. Zhang, H. Zhang, W. Zhang, J. Huang, C. Zou and Z. Wang (2020). "Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Calcific Aortic Valve Disease." Acta Cardiol Sin **36**(3): 183-194.
46. Mahler, G. J., E. J. Farrar and J. T. Butcher (2013). "Inflammatory cytokines promote mesenchymal transformation in embryonic and adult valve endothelial cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **33**(1): 121-130.
47. Majumdar, U., S. Manivannan, M. Basu, Y. Ueyama, M. C. Blaser, E. Cameron, M. R. McDermott, J. Lincoln, S. E. Cole, S. Wood, E. Aikawa, B. Lilly and V. Garg (2021). "Nitric oxide prevents aortic valve calcification by S-nitrosylation of USP9X to activate NOTCH signaling." Sci Adv **7**(6).
48. Manduteanu, I., D. Simionescu, A. Simionescu and M. Simionescu (2021). "Aortic valve disease in diabetes: Molecular mechanisms and novel therapies." J Cell Mol Med **25**(20): 9483-9495.
49. Manduteanu, I., M. Voinea, G. Serban and M. Simionescu (1999). "High glucose induces enhanced monocyte adhesion to valvular endothelial cells via a mechanism involving ICAM-1, VCAM-1 and CD18." Endothelium **6**(4): 315-324.
50. Manea, S. A., A. Todirita and A. Manea (2013). "High glucose-induced increased expression of endothelin-1 in human endothelial cells is mediated by activated CCAAT/enhancer-binding proteins." PLoS One **8**(12): e84170.

51. Meza, C. A., J. D. La Favor, D.-H. Kim and R. C. Hickner (2019). "Endothelial Dysfunction: Is There a Hyperglycemia-Induced Imbalance of NOX and NOS?" International Journal of Molecular Sciences **20**(15): 3775.
52. Nandy, D., R. Janardhanan, D. Mukhopadhyay and A. Basu (2011). "Effect of hyperglycemia on human monocyte activation." J Investig Med **59**(4): 661-667.
53. Natorska, J. (2021). "Diabetes mellitus as a risk factor for aortic stenosis: from new mechanisms to clinical implications." Kardiol Pol **79**(10): 1060-1067.
54. Nehrenheim, L., S. Raschke, A. Stefanski, M. Barth, J. Isabel Selig, A. Barbian, A. Fernandez-Colino, K. Stuhler, P. Mela, A. Albert, A. Lichtenberg and P. Akhyari (2019). "Native aortic valve derived extracellular matrix hydrogel for three dimensional culture analyses with improved biomimetic properties." Biomed Mater **14**(3): 035014.
55. Nkomo, V. T., J. M. Gardin, T. N. Skelton, J. S. Gottdiener, C. G. Scott and M. Enriquez-Sarano (2006). "Burden of valvular heart diseases: a population-based study." Lancet **368**(9540): 1005-1011.
56. Nordquist, E., S. LaHaye, C. Nagel and J. Lincoln (2018). "Postnatal and Adult Aortic Heart Valves Have Distinctive Transcriptional Profiles Associated With Valve Tissue Growth and Maintenance Respectively." Front Cardiovasc Med **5**: 30.
57. O'Donnell, A. and K. E. Yutzey (2020). "Mechanisms of heart valve development and disease." Development **147**(13).
58. Padilla, J., A. J. Carpenter, N. A. Das, H. K. Kandikattu, S. Lopez-Ongil, L. A. Martinez-Lemus, U. Siebenlist, V. G. DeMarco and B. Chandrasekar (2018). "TRAF3IP2 mediates high glucose-induced endothelin-1 production as well as endothelin-1-induced inflammation in endothelial cells." Am J Physiol Heart Circ Physiol **314**(1): H52-H64.
59. Peltonen, T., P. Taskinen, J. Napankangas, H. Leskinen, P. Ohtonen, Y. Soini, T. Juvonen, J. Satta, O. Vuolteenaho and H. Ruskoaho (2009). "Increase in tissue endothelin-1 and ETA receptor levels in human aortic valve stenosis." Eur Heart J **30**(2): 242-249.
60. Pernow, J., A. Shemyakin and F. Bohm (2012). "New perspectives on endothelin-1 in atherosclerosis and diabetes mellitus." Life Sci **91**(13-14): 507-516.
61. Porras, A. M., N. C. van Engeland, E. Marchbanks, A. McCormack, C. V. Bouten, M. H. Yacoub, N. Latif and K. S. Masters (2017). "Robust Generation of Quiescent Porcine Valvular Interstitial Cell Cultures." J Am Heart Assoc **6**(3).

62. Porras, A. M., J. A. Westlund, A. D. Evans and K. S. Masters (2018). "Creation of disease-inspired biomaterial environments to mimic pathological events in early calcific aortic valve disease." Proc Natl Acad Sci U S A **115**(3): E363-E371.
63. Puperi, D. S., A. Kishan, Z. E. Punske, Y. Wu, E. Cosgriff-Hernandez, J. L. West and K. J. Grande-Allen (2016). "Electrospun Polyurethane and Hydrogel Composite Scaffolds as Biomechanical Mimics for Aortic Valve Tissue Engineering." ACS Biomater Sci Eng **2**(9): 1546-1558.
64. Rajamannan, N. M., F. J. Evans, E. Aikawa, K. J. Grande-Allen, L. L. Demer, D. D. Heistad, C. A. Simmons, K. S. Masters, P. Mathieu, K. D. O'Brien, F. J. Schoen, D. A. Towler, A. P. Yoganathan and C. M. Otto (2011). "Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update." Circulation **124**(16): 1783-1791.
65. Richards, J., I. El-Hamamsy, S. Chen, Z. Sarang, P. Sarathchandra, M. H. Yacoub, A. H. Chester and J. T. Butcher (2013). "Side-specific endothelial-dependent regulation of aortic valve calcification: interplay of hemodynamics and nitric oxide signaling." Am J Pathol **182**(5): 1922-1931.
66. Rodriguez, K. J. and K. S. Masters (2009). "Regulation of valvular interstitial cell calcification by components of the extracellular matrix." J Biomed Mater Res A **90**(4): 1043-1053.
67. Rutkovskiy, A., A. Malashicheva, G. Sullivan, M. Bogdanova, A. Kostareva, K. O. Stenslokken, A. Fiane and J. Vaage (2017). "Valve Interstitial Cells: The Key to Understanding the Pathophysiology of Heart Valve Calcification." J Am Heart Assoc **6**(9).
68. Saleh, M. A., E. I. Boesen, J. S. Pollock, V. J. Savin and D. M. Pollock (2011). "Endothelin receptor A-specific stimulation of glomerular inflammation and injury in a streptozotocin-induced rat model of diabetes." Diabetologia **54**(4): 979-988.
69. Santa-Cruz Mateos, C., A. Valencia-Exposito, I. M. Palacios and M. D. Martin-Bermudo (2020). "Integrins regulate epithelial cell shape by controlling the architecture and mechanical properties of basal actomyosin networks." PLoS Genet **16**(6): e1008717.
70. Scatena, M., M. F. Jackson, M. Y. Speer, E. M. Leaf, M. C. Wallingford and C. M. Giachelli (2018). "Increased Calcific Aortic Valve Disease in response to a



- diabetogenic, procalcific diet in the LDLr(-/-)ApoB(100/100) mouse model." Cardiovasc Pathol **34**: 28-37.
71. Scott, A. J., L. R. Simon, H. N. Hutson, A. M. Porras and K. S. Masters (2021). "Engineering the aortic valve extracellular matrix through stages of development, aging, and disease." J Mol Cell Cardiol **161**: 1-8.
  72. Sider, K. L., M. C. Blaser and C. A. Simmons (2011). "Animal models of calcific aortic valve disease." Int J Inflamm **2011**: 364310.
  73. Simionescu, M., D. Popov, A. Sima, M. Hasu, G. Costache, S. Faitar, A. Vulpanovici, C. Stancu, D. Stern and N. Simionescu (1996). "Pathobiochemistry of combined diabetes and atherosclerosis studied on a novel animal model. The hyperlipemic-hyperglycemic hamster." Am J Pathol **148**(3): 997-1014.
  74. Simmons, C. A., G. R. Grant, E. Manduchi and P. F. Davies (2005). "Spatial heterogeneity of endothelial phenotypes correlates with side-specific vulnerability to calcification in normal porcine aortic valves." Circ Res **96**(7): 792-799.
  75. Tucureanu, M. M., A. Filippi, N. Alexandru, C. Ana Constantinescu, L. Ciortan, R. Macarie, M. Vadana, G. Voicu, S. Frunza, D. Nistor, A. Simionescu, D. T. Simionescu, A. Georgescu and I. Manduteanu (2019). "Diabetes-induced early molecular and functional changes in aortic heart valves in a murine model of atherosclerosis." Diab Vasc Dis Res **16**(6): 562-576.
  76. Vadana, M., S. Cecoltan, L. Ciortan, R. D. Macarie, M. M. Tucureanu, A. C. Mihaila, I. Droc, E. Butoi and I. Manduteanu (2020). "Molecular mechanisms involved in high glucose-induced valve calcification in a 3D valve model with human valvular cells." J Cell Mol Med **24**(11): 6350-6361.
  77. Voicu, G., D. Rebleanu, C. A. Mocanu, G. Tanko, I. Droc, C. M. Uritu, M. Pinteala, I. Manduteanu, M. Simionescu and M. Calin (2022). "VCAM-1 Targeted Lipopolyplexes as Vehicles for Efficient Delivery of shRNA-Runx2 to Osteoblast-Differentiated Valvular Interstitial Cells; Implications in Calcific Valve Disease Treatment." Int J Mol Sci **23**(7).
  78. Wang, M., Y. Liu, Y. Liang, K. Naruse and K. Takahashi (2021). "Systematic Understanding of Pathophysiological Mechanisms of Oxidative Stress-Related Conditions-Diabetes Mellitus, Cardiovascular Diseases, and Ischemia-Reperfusion Injury." Front Cardiovasc Med **8**: 649785.
  79. Widyantoro, B., N. Emoto, K. Nakayama, D. W. Anggrahini, S. Adiarto, N. Iwasa, K. Yagi, K. Miyagawa, Y. Rikitake, T. Suzuki, Y. Y. Kisanuki, M. Yanagisawa and

- K. Hirata (2010). "Endothelial cell-derived endothelin-1 promotes cardiac fibrosis in diabetic hearts through stimulation of endothelial-to-mesenchymal transition." Circulation **121**(22): 2407-2418.
80. Yadgir, S., C. O. Johnson, V. Aboyans, O. M. Adebayo, R. A. Adedoyin, M. Afarideh, F. Alahdab, A. Alashi, V. Alipour, J. Arabloo, S. Azari, C. M. Barthelemy, C. P. Benziger, A. E. Berman, A. Bijani, J. J. Carrero, F. Carvalho, A. Daryani, A. R. Duraes, A. Esteghamati, T. A. Farid, F. Farzadfar, E. Fernandes, I. Filip, M. M. Gad, S. Hamidi, S. I. Hay, O. S. Ilesanmi, S. S. Naghibi Irvani, M. Jurisson, A. Kasaeian, A. P. Kengne, A. R. Khan, A. Kisa, S. Kisa, D. Kolte, N. Manafi, A. Manafi, G. A. Mensah, E. M. Mirrakhimov, Y. Mohammad, A. H. Mokdad, R. I. Negoi, H. L. Thi Nguyen, T. H. Nguyen, M. R. Nixon, C. M. Otto, S. Patel, T. Pilgrim, A. Radfar, D. L. Rawaf, S. Rawaf, W. F. Rawasia, A. Rezapour, L. Roever, A. M. Saad, S. Saadatagah, S. Senthilkumaran, K. Sliwa, B. E. Tesfay, B. X. Tran, I. Ullah, M. Vaduganathan, T. J. Vasankari, C. D. A. Wolfe, N. Yonemoto, G. A. Roth and C. Global Burden of Disease Study Nonrheumatic Valve Disease (2020). "Global, Regional, and National Burden of Calcific Aortic Valve and Degenerative Mitral Valve Diseases, 1990-2017." Circulation **141**(21): 1670-1680.
81. Yan, A. T., M. Koh, K. K. Chan, H. Guo, D. A. Alter, P. C. Austin, J. V. Tu, H. C. Wijeyesundera and D. T. Ko (2017). "Association Between Cardiovascular Risk Factors and Aortic Stenosis: The CANHEART Aortic Stenosis Study." J Am Coll Cardiol **69**(12): 1523-1532.
82. Yip, C. Y., J. H. Chen, R. Zhao and C. A. Simmons (2009). "Calcification by valve interstitial cells is regulated by the stiffness of the extracellular matrix." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(6): 936-942.
83. Zahirnyk, A., M. D. M. Perez, M. Blasco, K. O. Stenslokken, M. D. Ferrer, C. Salcedo and J. Vaage (2020). "A Novel Ex Vivo Model of Aortic Valve Calcification. A Preliminary Report." Front Pharmacol **11**: 568764.