Juris Hofmanis

IEKAISĪGIE UN NEIEKAISĪGIE RISKA FAKTORI IEGŪTAS AORTAS VĀRSTUĻA STENOZES GADĪJUMĀ

Promocijas darba kopsavilkums
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – internā medicīna

Rīga, 2019

RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Juris Hofmanis

PIEKAISĪGIE UN NEIEKAISĪGIE
RISKA FAKTORI IEGŪTAS AORTAS
VĀRSTUĻA STENOZES GADĪJUMĀ

Promocijas darba kopsavilkums
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – internā medicīna

Rīga, 2019

Promocijas darbs izstrādāts Rīgas Stradiņa universitātē.

Darba zinātniskie vadītāji:

Dr. med. asociētais profesors **Vitolds Mackēvičs**,

Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. biol. profesors **Pēteris Tretjakovs**

Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Oficiālie recenzenti:

Dr. med. profesors **Oskars Kalējs**,

Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. med. **Ainārs Rudzītis**,

P. Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca,

Latvijas Kardioloģijas centrs, Latvija

MD, PhD, asociētais profesors **Domenico Di Raimondo**,

Palermo Universitāte, Itālija

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2019. gada 12. septembrī plkst. 12.00
Rīgas Stradiņa universitātes Medicīnas promocijas padomes atklātā sēdē
Rīgā, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta auditorijā.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU tīmekļa vietnē:
www.rsu.lv.

Promocijas padomes sekretāre:

Dr. med. asociētā profesore **Ilze Konrāde**

SATURS

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI.....	4
IEVADS.....	6
Zinātniskā darba aktualitāte	6
Zinātniskā darba mērķis	7
Zinātniskā darba uzdevumi	7
Zinātniskā darba hipotēzes	8
Pētījuma zinātniskā novitāte	8
1. MATERIĀLS UN METODES	10
1.1. Pētījuma populācija	10
1.2. Pētījuma personu iekļaušanas un izslēgšanas kritēriji.....	11
1.3. Aortas vārstuļa stenozes diagnostika un izvērtēšana.....	13
1.4. Pētījumā izmantotais materiāls	14
1.5. Klīniski laboratorisko rādītāju noteikšana.....	14
1.6. Šūnu producēto citokīnu noteikšana	14
1.7. Pētījumā iegūto datu statistiskā analīze.....	16
2. REZULTĀTI.....	18
2.1. Pētījuma pacientu un kontroles indivīdu raksturojums.....	18
2.2. Šūnu producēto citokīnu analīžu rezultāti	20
2.2.1. Hemerīns.....	20
2.2.2. Fibroblastu augšanas faktors-21	24
2.2.3. C reaktīvais proteīns	28
2.2.4. Matrices metaloproteināzes un to audu inhibitori	29
2.2.5. Tioredoksīna reduktāze-1	38
2.2.6. Mieloperoksidāze.....	42
3. DISKUSIJA	46
4. SECINĀJUMI.....	54
5. PRAKTISKĀS REKOMENDĀCIJAS.....	56
LITERATŪRAS SAKAKSTS.....	57
PUBLICĒTIE RAKSTI, ZIŅOJUMI PAR DARBA TĒMU	59
Publikācijas recenzētos medicīniskajos izdevumos	59
Mutiskie ziņojumi kongresos un konferencēs	59
Tēzes kongresos un konferencēs	60

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

5'-NT	5'-nukleotidāze	MMP-1,2,3,7,9,11	matrices metaloproteināzes-1,2,3,7,9,11
ABI	potītes brahiālais indekss	MPO	mieloperoksidāze
ABL-H	augsta blīvuma lipoproteīnu holesterīns	MV	mitrālais vārstulis
AKE	angiotenzīna konvertējošais enzīms	NADPH oksidāze	nikotīnamīda adenīna dinukleotīda fosfāta oksidāze
ALP	sārmainā fosfatāze	NF-κβ	kodola faktors kappā β
Ang I	angiotenzīns I	NO	slāpekļa oksīds
Ang II	angiotenzīns II	NOS	slāpekļa oksīda sintāze
apoA-1	apolipoproteīns A-1	NPPI	ektonukleotīdu pirofosfatāze/ fosfodiesterāze 1
ASK1	apoptozes signālus regulējošā kināze-1	NPV	negatīvā prognostiskā vērtība
AUC	laukums zem ROC līknes	O ₂ ⁻	superoksīds
AV	aortas vārstulis	ONOO ⁻	peroksinitrīts
AVA	aortas vārstuļa atvere	ox-ABL-H	oksidētais augsta blīvuma lipoproteīnu holesterīns
AVS	aortas vārstuļa stenoze	ox-ZBL	oksidētais zema blīvuma lipoproteīns
bFGF	pamata fibroblastu augšanas faktors	PAS	perifēro artēriju slimības
BH4	tetrahidrobiopterīns	PG	spiediena gradients
BPM-2	kaulu morfogēnais proteīns	PPV	pozitīvā prognostiskā vērtība
ChemR23	hemerīna receptors 23	Pro-MMP	proenzīmi
Cl ⁻	hlora anjons	PW	pulsa viļņa doplerogrāfija
CRP	C-reaktīvais proteīns	RAA	renīna-angiotenzīna-aldostersona
DNS	dezoksiribonukleīnskābe	ROC līkne	No angļu val. <i>Receiver-Operating Characteristic Curve</i>
EF	izsviedes frakcija	ROS	reaktīvās skābekļa daļiņas
EGĀ	eritrocītu grimšanas ātrums	Se	jūtīgums

Ehokg	ehokardiogrāfija	SOD	superoksīda dismutāze
FGF-21	fibroblastu augšanas faktors-21	Sp	specifiskums
GPR1	G-proteīniem piesaistītais receptors 1	SV	izsviedes tilpums
H ₂ O ₂	ūdeņraža peroksīds	SVI	indeksētais izsviedes tilpums
HOCl	hipohlorskābe	TG	triglicerīdi
hs-CRP	augsti jutīgais C-reaktīvais proteīns	TGF	transformējošais augšanas faktors
IGF1	insulīnam līdzīgais augšanas faktors 1	TGF-1β	transformējošais augšanas faktors-1β
IL-1β	interleikīns-1β	TGF-β	transformējošais augšanas faktors-β
IL-2	interleikīns-2	TIMP	matrices metalproteināzes audu inhibitors
IL-6	interleikīns-6	TIMP-1,3	matrices metaloproteināžu audu inhibitors-1,3
IMT	intīmas un mēdijas slāņa biezums	TNF-α	tumora nekrozes faktors-α
KH	kopējais holesterīns	Trx	tioredoksīns
KK	kreisais kambaris	TrxR	tioredoksīna reduktāze
KK EDV	kreisā kambara beigu diastoles tilpums	TrxR1,2,3	tioredoksīna reduktāze-1,2,3
KK ESV	kreisā kambara beigu sistoles tilpums	VEGF	asinsvadu endotēlija augšanas faktors
ķMI	ķermeņa masas indekss	VIC	vārstuļa intersticiālās šūnas
Lp(a)	lipoproteīns a	VTI	ātruma laika integrālis
LVOT	kreisā kambara izplūdes trakts	ZBL-H	zema blīvuma lipoproteīnu holesterīns
MMP	matrices metaloproteināze		

IEVADS

Zinātniskā darba aktualitāte

Lasot pašreiz pieejamos literatūras datus par aortas vārstuļa stenozes (AVS) veidošanos un attīstību, varētu domāt, ka viss ir izzināts un skaidrs. Taču par spīti tam, ka pēdējo apmēram 10 gadu laikā veikti daudzi bioķīmiski, molekulāri un gēnu pētījumi, nav pilnībā skaidras atbildes par slimības viennozīmīgu etioloģiju un patogēnēzi. Visās publikācijās ir vārdi: “jādomā, iespējams”; daudzi pētījumi veikti, balstoties uz operācijas laikā iegūto histoloģisko materiālu. Ētisku apsvērumu dēļ ir grūti veidot kontroles grupas. Tas mudina izzināt situāciju Latvijas populācijā un veikt pētniecisku darbu, lai meklētu atšķirīgo un kopīgo AVS dažādās smaguma pakāpēs; meklētu asins plazmā un serumā biomarķierus, ar kuru palīdzību varētu prognozēt slimības attīstību.

Kalcificējoša AVS izpaužas ar aortas vārstuļa (AV) viru fibrokalcifisko remodelāciju (pārveidošanos), kas ir lēni noritošs hroniska iekaisuma un kalcifikācijas process ar pilnībā neizzinātu un neviennozīmīgu etioloģiju un patogēnēzi (*Lindman et al.*, 2016; *Pawade et al.*, 2015; *Zeng et al.*, 2017; *Kanwar et al.*, 2018). Nav medikamentozas ārstēšanas, lai apturētu vai aizkavētu slimības progresēšanu. Vienīgā pieejamā ārstēšana ir ķirurģiska AV nomaiņa vai transkatetrāla aortas vārstuļa implantācija. (*Pawade et al.*, 2015). Pieaugot cilvēku dzīvildzei, pieaug to pacientu skaits, kuriem ir klīniski nozīmīga AVS (*Bonow et al.*, 2015). Gandrīz 25% cilvēku pēc 65 gadu vecuma ehokardiogrāfiski (Ehokg) atrod AV sklerozi, un apmēram 17% no šiem cilvēkiem turpmāk attīstās AVS. Vidējais laiks no AV sklerozes diagnostikas līdz vidējas un smagas AVS attīstībai ir 6–8 gadi. AVS izplatība pieaug līdz ar

vecumu: 50–59 gadu vecumā to sastop 0,2%, 60–69 gadu vecumā – 1,3%, bet 80–89 gadu vecumā – līdz 9,8% pacientu (*Eveborn et al.*, 2013).

AVS ir visizplatītākā vārstuļu slimība ASV un Eiropā un ir otrais biežākais iemesls sirds operācijai (*Eveborn et al.*, 2013).

Zinātniskā darba mērķis

Analizēt un noskaidrot, kuras no iekaisuma un kalcifikācijas procesā iesaistītajām šūnu producētajām regulējošām molekulām (citokīniem) būtiskāk ietekmē aortas vārstuļa stenozes rašanās un attīstības procesu katrā no trim stenozes smaguma pakāpēm.

Identificēt iespējamus biomarkierus, kurus potenciāli varētu izmantot vieglas pakāpes AVS diagnostikai.

Zinātniskā darba uzdevumi

1. AVS pacientu (visu triju smaguma pakāpju) un kontroles grupas indivīdu atlase atbilstoši pētījuma nosacījumiem pēc veiktās Ehokg parametriem.
2. Laboratorisko izmeklējumu veikšana visiem pētījumā iesaistītajiem, nosakot: holesterīnu ar frakcijām, fibrinogēnu, C-reaktīvo proteīnu (CRP), augsti jutīgo C-reaktīvo proteīnu (hs-CRP), hemerīnu, fibroblastu augšanas faktoru-21 (FGF-21), matricas metaloproteināzes-1,3,9 (MMP-1,3,9), matricas metaloproteināžu audu inhibitorus-1,3 (TIMP-1,3), transformējošo augšanas faktoru (TGF), tioredoksīna reduktāzi-1 (TrxR1), mieloperoxidāzi (MPO).
3. Izvērtēt analīžu rezultātus, salīdzinot kontroles grupu un AVS grupu un visās trijās AVS smaguma pakāpēs.

4. Atrast pietiekami informatīvu un labu biomarķieri vieglas aortas vārstuļa stenozes diagnosticēšanai.
5. Izvērtēt noteikto lipīdu frakciju saistību ar AVS dažādās tās smaguma pakāpēs.
6. Izvērtēt oksidatīvā stresa jauno biomarķieru līmeni dažādās AVS smaguma pakāpēs.

Zinātniskā darba hipotēzes

1. Iekaisīgiem un neiekaisīgiem faktoriem – šūnu producētām regulējošām molekulām (citokīniem) – ir būtiska nozīme kalcificējošas AVS attīstībā un tie nosaka tās prognozi.
2. Lipīdu frakciju līmeņa izmaiņas AVS pacientiem nav viennozīmīgi vērtējamas kā absolūtais riska kritērijs.
3. Oksidatīvais stress ir saistīts ar AVS visās tās smaguma pakāpēs.

Pētījuma zinātniskā novitāte

Pētījumā pirmoreiz Latvijas populācijā ir analizēti dažāda vecuma kalcificējošas AVS pacientu asins plazmas un seruma bioķīmiskie rādītāji visās trijās AVS smaguma pakāpes grupās un iegūtie rezultāti ir izvērtēti salīdzinājumā ar kontroles indivīdiem.

Zinot jaunākos pētījumus par kalcificējošas AVS etiopatogēnēzi, šajā darbā tika izvēlēts noteikt tos iespējamos biomarķierus (hemerīns, FGF-21, tioredoksīna reduktāze-1, mieloperoksidāze), kas līdz šim AVS pacientiem nav pētīti.

Visi iegūtie pētījumā noteikto biomarķieru rezultāti tiek salīdzināti dažādās AVS smaguma pakāpēs, līdz ar to var detalizētāk spriest par katrā stenozes pakāpē dominējošiem patoģenētiskajiem procesiem.

Tika meklētas sakarības starp biomarķieriem, kā arī starp lipīdu frakcijām un biomarķieriem, un, analizējot lipīdu frakcijas, ir noteikts, ka dislipidēmija nav viennozīmīga AVS pacientiem. Tiek pamatota oksidatīvā stresa loma AVS attīstībā.

1. MATERIĀLS UN METODES

1.1. Pētījuma populācija

Klīniski analītiskais pētījums “Iekaisīgie un neiekaisīgie riska faktori iegūtas aortas vārstuļa stenozes gadījumā” ir jaukta tipa prospektīvs gadījuma–kontroles pētījums.

Pētījums veikts ar Rīgas Stradiņa universitātes Ētikas komitejas atļauju. Ētikas komitejas sēdes datums 12.09.2013. Pētījuma protokols atbilst 1975. gada Helsinku deklarācijas ētikas vadlīnijām. No 2013. gada 1. janvāra līdz 2016. gada 31. decembrim tika veikta pacientu atlase dažādās Latvijas slimnīcās un ambulatorajās iestādēs – Vidzemes slimnīcā (Valmiera), P. Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcā (Rīga) un Zemgales veselības centrā (Jelgava). 102 cilvēki tika brīvprātīgi atlasīti pēc iekļaušanas un izslēgšanas kritērijiem un iedalīti divās pamatgrupās: kontroles grupā un AV stenozes grupā; skatīt 1.1. tabulu. Kontroles grupā tika iekļauti cilvēki bez AV stenozes vecumā no 50 līdz 80 gadiem, kas atbilst AV stenozes pacientu vecumam pēc 2012. gada Eiropas Kardiologu biedrības un Eiropas Sirds un torakālo ķirurģu asociācijas darba grupas sirds vārstuļu slimību ārstēšanas vadlīnijām. (*Vahanian et al.*, 2012). Kontroles grupa tika izveidota ar mērķi noteikt citokīnu referentās vērtības un tās salīdzināt ar aortas stenozes pacientu rezultātiem. Pētījuma tika iekļauti 28 (27%) vīrieši un 74 (73%) sievietes. No katra pētījumā iekļautā cilvēka tika iegūta rakstiski apstiprināta informēta cilvēka piekrišana dalībai pētījumā.

Pētījuma personu pamatdati

		Kontrole, n = 50	AV viegla stenoze, n = 18	AV vidēja stenoze, n = 19	AV smaga stenoze, n = 15
Dzimums, (%)	Vīrieši Sievietes	11 (22,0) 39 (78,0)	2 (11,1) 16 (88,9)	8 (42,1) 11 (57,9)	7 (46,7) 8 (53,3)
Vecums, gadi	<i>Mdn</i> (<i>IQR</i>)	62 (57–75)	71 (65–75)	74 (65–79)	65 (60–74)

1.2. Pētījuma personu iekļaušanas un izslēgšanas kritēriji

Pētījuma sākumā no katras personas abās pētījuma grupās tika ievākta slimību anamnēze, veikta personu anketēšana par kardiovaskulārās sistēmas stāvokli un jautājumiem, kas saistīti ar iekļaušanas un izslēgšanas kritērijiem, lietotajiem medikamentiem un veiktajiem izmeklējumiem. Pirms iekļaušanas pētījumā tika iegūti un analizēti:

- pacienta vispārējie/demogrāfiskie dati;
- subjektīvā stāvokļa dati (kardiovaskulāro slimību anamnēze, mērķtiecīgi jautājumi kardiovaskulāro slimību izzināšanai);
- laboratoriskie dati (pilna asins aina + eritrocītu grimšanas ātrums (EGĀ), asins bioķīmiskie rādītāji);
- noteikts “potītes brahiālais” indekss (ABI);
- abpusēji mērīts intīmas un mēdijas slāņa biezums (IMT, *intima-media thickness*) kopējā miega artērijā (*arteria carotis comunis*);
- ehokardiogrāfija, kas apstiprina vai izslēdz aortas vārstuļa stenozi.

Indivīdi kontroles grupā tika iekļauti atbilstoši ehokardiogrāfiski apstiprinātam veselam aortas vārstulim. Izslēgšanas kritēriji abās grupās – kontroles un AVS grupā – bija sekojoši:

- aptaukošanās;

- saistaudu sistēmas slimības, infekcijas slimības, onkoloģiskas slimības;
- cukura diabēts;
- vairogdziedzera disfunkcija;
- smaga, vidēji smaga un nekontrolēta arteriāla hipertensija;
- akūts koronārais sindroms anamnēzē un manifesta koronārā sirds slimība;
- kreisā kambara sistoliska disfunkcija ar samazinātu EF zem 50%;
- smadzeņu infarkts un tranzitora išēmiska lēkme anamnēzē;
- ehokardiogrāfiski apstiprināta kardiomiopātija;
- vizuāla AV skleroze;
- citu vārstuļu patoloģijas;
- netiek lietota lipīdus zeminoša terapija.

Izslēgšanas kritērijs aortas vārstuļa stenozes pacientu grupā bija iedzimts (piemēram, divviru aortas vārstulis) un reimatisks aortas vārstuļa bojājums.

Visām pētījuma personām pirms iekļaušanas pētījumā tika noteikts ABI. Iegūtie rezultāti tika vērtēti atbilstoši Amerikas Sirds asociācijas rekomendācijām (*Aboyans et al.*, 2012): $\geq 1,4$ liecina par kalcificētu, nespiežamu artēriju; 1,0–1,39 – normāls ABI, ja ir mijklibošana, tad veic testu ar slodzi; ja 0,91–0,99, tad, iespējams, ka pastāv perifēro artēriju slimība; $< 0,9$ – pastāv perifēro artēriju slimība; $\leq 0,5$ – smaga išēmija un $< 0,4$ – kritiska išēmija.

Visiem pētījumā iekļautajiem indivīdiem tika noteikts IMT kopējās miega artērijās; tas tika vērtēts kā normāls, ja $< 0,9$ mm un nav vizualizējamās aterosklerotiskas pangas.

Visiem pētījumā iesaistītajiem indivīdiem ehokardiogrāfijas izmeklējuma laikā tika noteikta izsviedes frakcija (EF), izmantojot Simpsona metodi. Tika noteikts izsviedes tilpums (SV, no angļu val., *stroke volume*).

Izsviedes tilpums (norma: 55–100 ml) ir asins tilpums, ko sirds kreisais kambaris izgrūž vienas saraušanās laikā. SV nosaka, no kreisā kambara beigu diastoles tilpuma (KK EDV) atņemot kreisā kambara beigu sistoles tilpumu (KK ESV), izmantojot kreisā kambara izplūdes trakta (LVOT) metodi.

1.3. Aortas vārstuļa stenozes diagnostika un izvērtēšana

Visām personām pirms iekļaušanas pētījumā tika veikta ehokardiogrāfija ar datu saglabāšanu, izmantojot ehokardiogrāfijas iekārtas: *GE VIVID 7 Dimension* un *Philips IE 33*. Katru ehokardiogrāfijas izmeklējumu izvērtēja divi ehokardiogrāfijas speciālisti. Pacienti ar aortas vārstuļa stenozi tika iedalīti trijās apakšgrupās (viegla, vidēji smaga un smaga), atkarībā no AVS smaguma pakāpes, vadoties pēc 2012. gada Eiropas Kardiologu biedrības un Eiropas Sirds un torakālo ķirurģu asociācijas darba grupas sirds vārstuļu slimību ārstēšanas vadlīniju kritērijiem:

- aortas plūsmas ātrums – V_{maks} . (m/s);
- vidējais spiediena gradients – PG vid. (mmHg);
- aortas vārstuļa atvere – AVA (cm^2);
- indeksētā aortas vārstuļa atvere – indeksētā AVA (cm^2/m^2).

Smaga AVS: V_{maks} . > 4 m/s, PG > 40 mmHg, AVA $< 1,0$ cm^2 , indeksētā AVA $< 0,6$ cm^2/m^2 ; vidēji smaga AVS: V_{maks} . 3,0–4,0 m/s, PG 20–40 mmHg, AVA 1,0–1,5 cm^2 , indeksētā AVA 0,60–0,85 cm^2/m^2 ; viegla AVS: V_{maks} . 2,5–2,9 m/s, PG < 20 mmHg, AVA $> 1,5$ cm^2 , indeksētā AVA $> 0,85$ cm^2/m^2 .

1.4. Pētījumā izmantotais materiāls

Pētījuma analīžu veikšanai tika izmantots asins serums un plazma. Visām pētījumā iesaistītajām personām tika paņemti perifēro asiņu paraugi. Venozās asinis tika ņemtas tukšā dūšā no rīta. No asins paraugiem tika iegūta plazma un serums. Iegūto serumu un plazmu sadalīja pa koniskiem Ependorfa stobriņiem (to tilpums 1,5 ml). Katrai pētījuma personai tika sagatavoti 7 Ependorfa stobriņi pa 200 µL seruma un 5 Ependorfa stobriņi pa 200 µL plazmas. Iegūtie seruma un plazmas paraugi tika uzglabāti ledusskapī (ar temperatūras kontroli) pie $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Rīgas Stradiņa universitātes Cilvēka fizioloģijas un bioķīmijas katedras laboratorijā).

1.5. Klīniski laboratorisko rādītāju noteikšana

Visām pētījumā iesaistītajām personām VSIA “Paula Stradiņa klīniskā universitātes slimnīca” sertificētā laboratorijā tika noteikta asins aina (eritrocītu skaits, hemoglobīna līmenis, trombocītu skaits, leikocītu skaits, hematokrīts, eritrocītu grimšanas ātrums (EGĀ)) un veiktas asins bioķīmiskās analīzes (glikoze, fibrinogēns, holesterīns ar frakcijām, C-reaktīvais proteīns), pielietojot standarta laboratoriskās noteikšanas metodes.

1.6. Šūnu producēto citokīnu noteikšana

Analīzes tika noteiktas Rīgas Stradiņa universitātes Cilvēka fizioloģijas un bioķīmijas katedras laboratorijā un Rīgas Stradiņa universitātes Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūta laboratorijā. Hemerīnu (ng/ml), FGF-21 (pg/ml), MMP-1 (pg/ml), MMP-3 (ng/ml), MMP-9 (pg/ml), TIMP-1 (pg/ml), TIMP-3 (pg/ml), TGF (pg/ml) noteica pētījuma personu asins serumā un MPO (ng/ml), TrxR1 (ng/ml) noteica asins plazmā, izmantojot enzīmu

imūnsorbcijas testu (ELISA), bet hs-CRP (mg/l) noteica asins serumā, izmantojot Luminex xMAP tehnoloģiju.

MMP-1 noteikšanai asins serumā tika lietots cilvēka MMP-1 ELISA analīžu veikšanas komplekts Kat. #EHMMP1, *Pierce (Thermo Fisher Scientific)*, ASV; MMP-3 noteikšanai asins serumā tika pielietots cilvēka MMP-3 ELISA analīžu veikšanas komplekts Kat. #ELH-MMP3, *RayBiotech*, ASV; MMP-9 noteikšanai asins serumā tika pielietots cilvēka MMP-9 ELISA analīžu veikšanas komplekts Kat. #KHC3061, *Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)*, ASV; TIMP-1 noteikšanai asins serumā tika pielietots cilvēka TIMP-1 ELISA analīžu veikšanas komplekts Kat. #ab100651, *Abcam*, Apvienotā Karaliste; TIMP-3 noteikšanai asins serumā tika pielietots cilvēka TIMP-3 ELISA analīžu veikšanas komplekts Kat. #ab119608, *Abcam*, Apvienotā Karaliste; hemerīna noteikšanai asins serumā tika pielietots cilvēka hemerīna ELISA analīžu veikšanas komplekts Kat. #EZHCMRN-57 K, *Merck Millipore*, ASV; FGF-21 noteikšanai asins serumā tika pielietots cilvēka FGF-21 ELISA analīžu veikšanas komplekts Kat. #EZHFGF21-19k, *Merck Millipore*, ASV; TrxR1 noteikšanai asins plazmā tika pielietots cilvēka tioredoksīna-1 ELISA analīžu veikšanas komplekts *prod.* #RAB1756/Lot #0522F2032, *Sigma-Aldrich, Inc.*, ASV; MPO noteikšanai asins plazmā tika pielietots cilvēka mieloperoksidāzes ELISA analīžu veikšanas komplekts *Item.* No. 501410, *Cayman chemical*, ASV; hs-CRP noteikšanai asins serumā tika izmantota Luminex xMAP tehnoloģija (*Luminex TM 200; Austin, Texas*, ASV) un analīžu veikšanas komplekts, Kat # HCVD3MAG-67K, *Milliplex MAP*, ASV).

Rezultāti tika iegūti, izmantojot *Infinite 200 PRO multimode* lasītāju (*Tecan* grupa, Mannedorfa, Šveice) un *Multiskan Ascent* mikroplašu lasītāju (*Thermo Labsystems*, Helsinki, Somija). Procedūras tika veiktas saskaņā ar ELISA komplekta ražotāja protokolu.

1.7. Pētījumā iegūto datu statistiskā analīze

Visi pētījumā ietvertie grafiskie attēli, aprēķini un statistiskās analīzes tika veiktas, izmantojot *IBM SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) Statistics 23 (IBM Corp., Armonk, NY, ASV)* un *GraphPad Prism 7.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, ASV)*, kā arī *Microsoft Excel 2013 (Microsoft, Redmond, WA, ASV)* programmas.

Datu normālsadalījums tika pārbaudīts ar *Brown–Forsythe* un *Bartlett* testiem vai Kolmogorova–Smirnova vienas izlases testu. Ja datu izlases izkliede atbilda normālsadalījumam, tie tika attēloti kā vidējā vērtība (M) un standartnovirze ($\pm SD$). Pretējā gadījumā dati attēloti kā mediāna un starpkvartiļu diapazons (IQR).

Normālsadalījuma datu (parametrisko datu) statistiskā analīze:

- vidējās vērtības starp divām atsevišķām grupām tika salīdzinātas, izmantojot Stjudenta testu jeb t -testu;
- vidējās vērtības starp 3 un vairāk atsevišķām grupām tika salīdzinātas, izmantojot vienfaktora divvirzienu dispersijas analīzi (ANOVA);

Datu, kuru vērtības neatbilda normālsadalījumam (neparametriskie dati) statistiskā analīze:

- vidējās vērtības starp divām atsevišķām grupām tika salīdzinātas, izmantojot Manna–Vitnija U -testu;
- vidējās vērtības starp 3 un vairāk atsevišķām grupām tika salīdzinātas, izmantojot Kraskela–Volesa H -testu;

Visos gadījumos kā pēcanalīze (*post-hoc*) tika pielietota Bendžamina–Krīgera–Jekutieli (*Benjamin, Krieger and Yekutieli*) divpakāpju procedūra.

Rezultātu un datu uzskatāmākai atspoguļošanai, kas pēc sava sadalījumu vairāk atbilda logaritmiskajam datu sadalījumam, izmantoja ģeometrisko vidējo un ģeometrisko standarta novirzi.

P vērtība mazāka par 0,05 ($p < 0,05$) tika uzskatīta par statistiski nozīmīgu visiem pielietotajiem statistikas testiem. Kvantitatīvo mainīgo attiecību pētīšanai tika izmantota korelācijas analīzes metode. Atkarībā no datu sadalījuma un veida mēs izmantojām parametrisko Pīrsona (*Pearson*) vai neparametrisko Spīrmena (*Spearman*) korelācijas analīzi.

AV stenozes diagnostisko marķieru raksturojumam tika lietoti šādi rādītāji: ROC līkne, laukums zem ROC līknes, no tām iegūtā robežvērtība, testa jutīgums un specifiskums, pozitīvā un negatīvā prognostiskā vērtība, sasniedzot attiecīgās robežvērtības. Diagnostikas testa precizitāte tika novērtēta pēc laukuma zem ROC līknes vērtībām, atbilstoši šai klasifikācijai: 0,90–1 = lieliska; 0,80–0,90 = laba; 0,70–0,80 = apmierinoša; 0,60–0,70 = slikta; un $< 0,60$ = nav diagnostiskās vērtības.

2. REZULTĀTI

2.1. Pētījuma pacientu un kontroles indivīdu raksturojums

Pētījumā iekļauto personu pamatdati ir atspoguļoti 2.1. tabulā. Kopumā 102 cilvēki tika iekļauti pētījumā – 50 personas bez AVS kontroles grupā un 52 pacienti AVS grupā. AVS grupas pacienti tika sadalīti trijās AV stenozes smaguma grupās: 18 pacienti ar vieglu AVS, 19 ar vidēji smagu AVS un 15 pacienti ar smagu AVS. Koncentrēšanās uz stingriem klīniskajiem un ehokardiogrāfijas izslēgšanas kritērijiem ļāva mums izvēlēties vispiemērotākās pētījumu grupas. Lai gan pacientu skaits apakšgrupās bija ierobežots, datu statistiskās analīzes rezultāti atklāja nozīmīgas p vērtības robežās no $p < 0,05$ līdz $p < 0,0001$.

Vidējais pacientu vecums visās aortas stenozes pakāpēs un kontroles grupā ir līdzīgs, un vidējais ķermeņa masas indekss (KMI) starp grupām neatšķiras. Triglicerīdu un zema blīvuma lipoproteīnu holesterīna (ZBL-H) vidējās vērtības statistiski starp stenozes grupām un kontroles grupu neatšķiras. Grupas ir līdzīgas attiecībā uz izsviedes frakcijas (EF) vidējām vērtībām, kas tika noteiktas pēc Simpsona metodes un izsviedes tilpuma (SV), kas tika mērīts pēc kreisā kambara izplūdes trakta metodes, kā arī saskaņā ar iekļaušanas un izslēgšanas kritērijiem.

Kontroles grupas indivīdu un AVS grupas pacientu pamatdati

	Kontrole, n = 50	AV viegla stenoze, n = 18	AV vidēja stenoze, n = 19	AV smaga stenoze, n = 15
Dzimums, Vīrieši (%) Sievietes	11 (22,0) 39 (78,0)	2 (11,1) 16 (88,9)	8 (42,1) 11 (57,9)	7 (46,7) 8 (53,3)
Vecums, <i>Mdn</i> gadi (<i>IQR</i>)	62 (57–75)	71 (65–75)	74 (65–79)	65 (60–74)
^a ĶMI <i>M</i> ($\pm$ <i>SD</i>) <i>p</i> vērtība vs kontrole	26,04 (4,31)	27,39 (3,10) <i>p</i> = 0,399	25,81 (4,58) <i>p</i> = 0,682	27,40 (3,18) <i>p</i> = 0,869
^b ZBL-H, <i>M</i> ($\pm$ <i>SD</i>) mmol/l <i>p</i> vērtība vs kontrole	3,28 (1,18)	3,05 (0,97) <i>p</i> > 0,999	2,59 (0,92) <i>p</i> = 0,057	3,10 (1,12) <i>p</i> > 0,999
^c TG, <i>M</i> ($\pm$ <i>SD</i>) mmol/l <i>p</i> vērtība vs kontrole	1,47 (0,71)	1,64 (0,84) <i>p</i> = 0,406	1,11 (0,56) <i>p</i> = 0,178	1,27 (0,57) <i>p</i> = 0,406
^d KH, <i>M</i> ($\pm$ <i>SD</i>) mmol/l <i>p</i> vērtība vs kontrole	5,49 (1,28)	5,01 (1,34) <i>p</i> = 0,056	4,21 (1,18) <i>p</i> = 0,001	4,68 (1,08) <i>p</i> = 0,016
^e CRP, <i>Mdn</i> mg/l (<i>IQR</i>) <i>p</i> vērtība vs kontrole	0,95 (0,50–2,55)	3,00 (1,50–3,70) <i>p</i> = 0,016	1,75 (0,37–2,97) <i>p</i> = 0,37	1,2 (0,70–5,00) <i>p</i> = 0,17
^f SV, ml <i>Mdn</i> (<i>IQR</i>) <i>p</i> vērtība vs kontrole	96,5 (90,0–106,3)	100,0 (90,0–110,0) <i>p</i> = 0,716	96,0 (88,0–100,0) <i>p</i> = 0,375	90,0 (88,0–95,0) <i>p</i> = 0,103
^g EF, % <i>Mdn</i> (<i>IQR</i>) <i>p</i> vērtība vs kontrole	63,5 (57,7–68,0)	60,0 (57,5–63,5) <i>p</i> = 0,347	61,0 (58,0–66,0) <i>p</i> = 0,981	60,0 (57,0–64,0) <i>p</i> = 0,347
^h SVI, <i>Mdn</i> ml/m ² , (<i>IQR</i>) <i>p</i> vērtība vs kontrole	52,2 (46,3–59,1)	53,6 (49,6–60,2) <i>p</i> = 0,767	49,4 (47,4–52,1) <i>p</i> = 0,288	49,7 (42,9–52,7) <i>p</i> = 0,157

^a ĶMI – (ķermeņa masas indekss), rādītājs, ko izsaka kā svara un kvadrātā kāpināta auguma garuma attiecību (kg/m²);

^b ZBL-H – zema blīvuma lipoproteīnu holesterīns;

^c TG – triglicerīdi;

^d KH – kopējais holesterīns;

^e CRP – C-reaktīvais proteins;

^f SV – izsviedes tilpums, aprēķināts pēc kreisā kambara izplūdes trakta metodes;

^g EF – izsviedes frakcija, aprēķināta pēc Simsona metodes;

^h SVI – (izsviedes tilpuma indekss), rādītājs, ko izsaka kā SV un ķermeņa virsmas laukuma attiecību (ml/m²).

2.2. Šūnu producēto citokīnu analīžu rezultāti

2.2.1. Hemerīns

Cirkulējošos biomarķierus plaši izmanto, lai noteiktu daudzu slimību, tai skaitā kardiovaskulāro, risku. Ņemot vērā, ka hemerīns var ietekmēt iekaisuma un kalcifikācijas procesus, mēs pētījām tā nozīmi un potenciālo diagnostisko vērtību, salīdzinot kontroles grupas cilvēkus ar AVS dažādas smaguma pakāpes pacientiem. Salīdzinot kontroles grupas cilvēkus ar visiem AVS pacientiem, konstatē būtiski ($p < 0,0001$) augstāku hemerīna līmeni AVS pacientu grupā; skatīt 2.1. attēlu.

2.1. att. Hemerīna līmenis serumā kontroles un AVS grupā

Analizējot hemerīna līmeni pacientiem visās trijās AVS smaguma pakāpēs, iegūst statistiski nozīmīgas atšķirības salīdzinot ar kontroles grupu; skatīt 2.2. attēlu. Vieglai stenozei ir visaugstākais hemerīna līmenis ($p = 0,0001$), bet smagai stenozei – viszemākais hemerīna līmenis ($p = 0,042$), salīdzinot ar kontroles grupas indivīdiem. Hemerīna līmenis samazinās, pieaugot stenozes smaguma pakāpei un smagas stenozes pacientiem novēro zemāko hemerīna

līmeni asins serumā. Novēro būtisku atšķirību ($p < 0,05$) starp hemerīna līmeni vieglas un smagas AV stenozes pacientiem.

2.2. att. Hemerīna seruma līmenis kontrolē grupā un pacientiem visās AVS smaguma pakāpēs

2.3. att. Hemerīna seruma līmeņa regresijas līkne, saistība ar AVS smaguma pakāpēm

Veicot lineārās regresijas analīzi, vēro būtisku hemerīna līmeņa samazināšanos, pieaugot AVS smaguma pakāpei ($p = 0,047$); skatīt 2.3. attēlu. Izvērtējot hemerīna kā biomarkiera potenciālo nozīmi, tika veikta ROC līkņu (*Receiver-Operating Characteristic Curves*) analīze. No sākuma tika vērtēta seruma hemerīna diagnostiskā precizitāte visu smaguma pakāpju aortas stenozes pacientu grupā pret kontroles grupas indivīdiem; skatīt 2.2. tabulu un 2.4. attēlu.

2.2. tabula

Hemerīna (ng/ml) jutīgums un specifiskums visu smaguma pakāpju (vieglas, vidējas, smagas) aortas vārstuļa stenozes pacientiem

^a AUC (95% CI)	p vērtība	Robež vērtība	^b Sp %	^c Se %	^d NPV %	^e PPV %	Precizitāte %
0,76 (0,67–0,85)	< 0,001	38,60	55	80	72,2	63,6	67,5

^a AUC, laukums zem ROC līknes; ^b Sp, specifiskums; ^c Se, jutīgums; ^d NPV, negatīvā prognostiskā vērtība; ^e PPV, pozitīvā prognostiskā vērtība.

2.4. att. Hemerīna un FGF-21 kā diagnostisko marķieru ROC analīze AVS diagnostikā (iekļauti visu smaguma pakāpju pacienti) pret kontroles grupu

Tika izvērtēta seruma hemerīna kā iespējamā biomarkķiera prognostiskā vērtība vieglas pakāpes AVS pacientiem pret kontroles grupas indivīdiem; skatīt 2.3. tabulu un 2.5. attēlu.

2.3. tabula

Hemerīna (ng/ml) jutīgums un specifiskums vieglas pakāpes aortas vārstuļa stenozes pacientiem

^a AUC (95% CI)	p vērtība	Robež vērtība	^b Sp %	^c Se %	^d NPV %	^e PPV %	Precizitāte %
0,82 (0,70–0,95)	< 0,001	43,12	69	87	75,5	71,9	78

^a AUC, laukums zem ROC līknes; ^b Sp, specifiskums; ^c Se, jutīgums; ^d NPV, negatīvā prognostiskā vērtība; ^e PPV, pozitīvā prognostiskā vērtība.

2.5. att. Hemerīna un FGF-21 kā diagnostisko marķieru ROC analīze vieglas AVS diagnostikā pret kontroles grupu

Izvērtējot hemerīna kā biomarkķiera potenciālo nozīmi visai AVS pacientu grupai kopā (iekļaujot visas smaguma pakāpes) ieguvām rezultātus, ka hemerīns ir vidējs diagnostiskais marķieris: AUC = 0,76; 0,70–0,80 = vidējs; $p < 0,001$; Sp – 55% un Se – 80%. Tajā pašā laikā ROC analīze parādīja, ka

seruma hemerīns ir pietiekami specifisks un jutīgs biomarķieris vieglas aortas stenozes diagnostikai: AUC = 0,82; 0,80–0,90 = labs; $p < 0,001$; jutīgums ir 87% un specifiskums ir 69%.

2.2.2. Fibroblastu augšanas faktors-21

Visām pētījumā iesaistītajām personām tika noteikts FGF-21 asins serumā. Tika pētīta tā nozīme un potenciālā diagnostiskā vērtība, salīdzinot kontroles grupas cilvēkus ar AVS dažādas smaguma pakāpes pacientiem.

Pacientiem ar aortas vārstuļa stenozi ir augstāks FGF-21 līmenis nekā kontroles grupas cilvēkiem ($p = 0,011$); skatīt 2.6. attēlu.

2.6. att. FGF-21 līmenis serumā kontroles un AVS grupā

Salīdzinot FGF-21 seruma līmeni pacientiem katrā smaguma pakāpē ar kontroles grupas indivīdiem, vēro būtisku FGF-21 pieaugumu, progresējot aortas vārstuļa stenozei: vieglas pakāpes AVS ($p = 0,013$), vidēji smagas pakāpes AVS ($p = 0,015$) un smagas pakāpes AVS ($p = 0,003$); skatīt 2.7. attēlu.

2.7. att. FGF-21 seruma līmenis kontrolēs grupā un pacientiem visās AVS smaguma pakāpēs

Veicot lineārās regresijas analīzi, novēro būtisku FGF-21 seruma līmeņa pieaugumu no vieglas līdz smagai AVS pakāpei ($p = 0,0103$). FGF-21 pieaugums visās AVS pakāpēs apliecina, ka FGF-21 atspoguļo oksidatīvo stresu, audu bojājumu. Smagā AVS pakāpē, kad ir visizteiktākās vārstuļa audu pārmaiņas, atrod arī augstāko FGF-21 līmeni; skatīt 2.8. attēlu.

2.8. att. FGF-21 seruma līmeņa regresijas līkne, saistība ar AVS smaguma pakāpēm

Izvērtējot FGF-21 kā biomarkķiera patenciālo nozīmi, tika veikta ROC līkņu (*Receiver-Operating Characteristic Curves*) analīze. No sākuma tika vērtēta seruma FGF-21 diagnostiskā precizitāte visu smaguma pakāpju aortas stenozes pacientu grupā pret kontroles grupas indivīdiem; skatīt 2.4. tabulu un 2.4. attēlu.

2.4. tabula

FGF-21 (pg/ml) jutīgums un specifiskums visu smaguma pakāpju (vieglas, vidējas, smagas) AVS pacientiem

AUC ^a (95% CI)	p vērtība	Robež vērtība	Sp ^b %	Se ^c %	NPV ^d %	PPV ^e %	Precizitāte %
0,67 (0,56–0,77)	0,003	309,83	67	61,5	61,5	66,6	64,2

^a AUC, laukums zem ROC līknes; ^b Sp, specifiskums; ^c Se, jutīgums; ^d NPV, negatīvā prognostiskā vērtība; ^e PPV, pozitīvā prognostiskā vērtība.

Tika izvērtēta seruma FGF-21 kā iespējamā biomarkķiera prognostiskā vērtība vieglas pakāpes AVS pacientiem pret kontroles grupas indivīdiem; skatīt tabulu 2.5. un 2.5. attēlu.

2.5. tabula

FGF-21 (pg/ml) jutīgums un specifiskums vieglas pakāpes AVS pacientiem

AUC ^a (95% CI)	p vērtība	Robež vērtība	Sp ^b %	Se ^c %	NPV ^d %	PPV ^e %	Precizitāte %
0,66 (0,51–0,81)	0,04	283,78	61	75	64,4	65,4	68

^a AUC, laukums zem ROC līknes; ^b Sp, specifiskums; ^c Se, jutīgums; ^d NPV, negatīvā prognostiskā vērtība; ^e PPV, pozitīvā prognostiskā vērtība.

Izvērtējot FGF-21 kā biomarkiera potenciālo nozīmi visai AVS pacientu grupai kopā (iekļaujot visas smaguma pakāpes) ieguvām rezultātus, ka FGF-21 ir slikts diagnostiskais marķieris: AUC = 0,67 (0,56–0,77); $p = 0,003$; Sp – 67% un Se – 61,5%. ROC analīze arī parādīja, ka seruma FGF-21 ir slikts diagnostiskais marķieris vieglas aortas stenozes noteikšanai: AUC = 0,66 (0,51–0,81); $p = 0,04$; jutīgums ir 61%, un specifiskums ir 75%. Kopumā FGF-21 ir vērtējams kā vājš AVS biomarkieris.

2.9. att. Korelatīvā sakarība starp seruma FGF-21 un hemerīna, hemerīna un ABL-H koncentrācijām kontroles grupai (A) un AVS grupai (B)

Analizējot saistības starp hemerīnu, FGF-21 un ABL-H:

- Kontroles grupā atrod, ka augstāks FGF-21 līmenis ir saistīts ar augstāku hemerīna līmeni ($p = 0,019$; $r_p = 0,337$); nav saistības starp hemerīnu un ABL-H; skatīt 2.9.A attēlu.
- Aortas vārstuļa stenozes pacientu grupā arī atrod līdzīgu saistību, ka augstāks FGF-21 līmenis ir saistīts ar augstāku hemerīna līmeni ($p = 0,012$; $r_p = 0,348$), nav saistības starp hemerīnu un ABL-H; skatīt 2.9.B attēlu.

2.2.3. C-reaktīvais proteīns

Mūsu pētījumā, analizējot CRP vērtības starp kontroles grupu un AVS grupas visām trim smaguma pakāpēm, tika iegūta statistiski nozīmīga atšķirība starp kontroles grupu un vieglas AVS grupu ($p = 0,016$); skatīt 2.10. attēlu.

Viegla AVS grupā CRP seruma līmenis ir paaugstināts, salīdzinot ar kontroles grupu, kā arī vidēju un smagu AVS grupu. Kaut arī mūsu pētījumā, cik vien varējām, izslēdzām visus iespējamus cēloņus, kas var izraisīt paaugstinātu CRP līmeni, mēs nenovērojām CRP pieaugumu, progresējot AVS pakāpei.

2.10. att. CRP seruma līmenis kontroles grupā un pacientiem visās AVS smaguma pakāpēs

2.2.4. Matrices metaloproteināzes un to audu inhibitori

Līdz šim AVS pacientiem MMP un TIMP ir pētīts audu histoloģiskajos materiālos pēc veiktas aortas vārstuļa protezēšanas operācijas.

Mēs noteicām MMP-1, MMP-3, MMP-9 un atbilstoši TIMP-1 un TIMP-3 asins serumā. Mēs varam novērtēt ne tikai kontroles grupu pret smagu AVS, bet analizēt arī MMP un TIMP līmeni visās aortas vārstuļa stenozes pakāpēs.

Salīdzinot MMP-1 līmeni kontroles grupā un AVS grupā, konstatē būtiski augstāku ($p = 0,0043$) MMP-1 līmeni aortas vārstuļa stenozes pacientu grupā, bet vēro multimodālu iegūto rezultātu sadalījumu; skatīt 2.11. un 2.12. attēlu.

2.11. att. Seruma MMP-1 līmenis kontroles un AVS pacientu grupā, ar elipsēm iezīmēti iespējamie klasteri

2.12. att. Seruma MMP-1 līmenis kontroles grupā un AVS pacientu grupā, ar elipsēm iezīmēti iespējamie klasteri

Lai precīzāk noteiktu, kā atšķiras AVS un kontroles grupas rezultāti, tos analizēja, izmantojot datu sadalījuma histogrammas; skatīt 2.13. un 2.14. attēlu.

2.13. attēls. MMP-1 datu sadalījuma histogramma, ar riņķa līnijām apvilktas modas

2.14. att. **Salīdzinošais MMP-1 datu sadalījums starp kontroles indivīdu un AVS pacientu grupām**

Ar datu sadalījuma histogrammu palīdzību noteica, ka MMP-1 rezultātu sadalījums AVS pacientu grupā ir trimodāls, bet kontroles indivīdu grupā – monomodāls.

80% pacientu aortas vārstuļa stenozes grupā ir būtiski augstāks ($p < 0,0001$) MMP-1 līmenis nekā kontroles grupā, bet 20% pacientu ar aortas vārstuļa stenozi MMP-1 līmenis ir kontroles grupas līmenī; skatīt 2.15. attēlu.

2.15. att. **Seruma MMP-1 (augšējais klusters, kas atbilst 80% pacientu, skatīt 2.11. attēlu) līmenis kontroles un AVS pacientu grupā**

Analizējot MMP-1 līmeņa atšķirības starp kontroles grupu un trīs aortas vārstuļa stenozes smaguma pakāpēm, visaugstākais MMP-1 līmenis ir vidējas AVS pakāpē ($p < 0,0001$), zemāks MMP-1 seruma līmenis ir smagas AVS pakāpē ($p = 0,012$) un vēl zemāks līmenis ir vieglas aortas vārstuļa stenozes pakāpē ($p = 0,031$); skatīt 2.16. attēlu.

2.16. att. **MMP-1 seruma līmenis kontroles grupā un pacientiem visās AVS smaguma pakāpēs**

Pētījuma gaitā kontroles grupai un AVS grupas pacientiem asins serumā tika noteiktas un analizētas tādas matricē metaloproteināzes kā MMP-3 un MMP-9. Kā arī tika analizētas šīm matricē metaloproteināzēm atbilstošie audu inhibitori – attiecīgie TIMP-1 un TIMP-3. Analizējot MMP-3 seruma līmeni kontroles grupā un aortas vārstuļa stenozes grupā, netika atrastas būtiskas atšķirības; skatīt 2.17. attēlu.

2.17. att. **MMP-3 seruma līmenis kontroles un AVS pacientu grupā**

Tāpat netika atrastas statistiski nozīmīgas atšķirības starp kontroles grupas indivīdiem un aortas vārstuļa stenozes pacientiem, pētījumā analizējot MMP-9 rezultātus; skatīt 2.18. attēlu.

2.18. att. **MMP-9 seruma līmenis kontroles un AVS pacientu grupā**

Analizējot matricēs metaloproteināzēm atbilstošo audu inhibitoru – TIMP-1 un TIMP-3 seruma līmeņus kontroles grupā un aortas vārstuļa stenozes grupā, netika iegūtas būtiskas atšķirības starp pētījuma grupām; skatīt 2.19. un 2.20. attēlu.

2.19. att. **TIMP-1** seruma līmenis kontroles un AVS pacientu grupā

2.20. att. **TIMP-3** seruma līmenis kontroles un AVS pacientu grupā

Pētījuma gaitā tika meklētas un analizētas iespējamās saistības starp MMP-1 un TIMP-1, kā arī MMP-3, MMP-9 un TIMP-3. Lai noteiktu iespējamās saistības starp matricas metaloproteināzēm, matricas metaloproteināžu audu inhibitoriem tika veiktas korelācijas analīzes; skatīt 2.21. attēlu.

2.21. att. **Korelatīvā sakarība starp MMP-1 un MMP-9 koncentrāciju AVS pacientu grupā**

Veicot korelācijas analīzi starp MMP-1 un MMP-9, mēs ieguvām sakarību ($p = 0,017$; $r_p = 0,37$): pieaugot MMP-1 līmenim aortas vārstuļa stenozes pacientiem, paaugstinās arī MMP-9 seruma līmeņi.

Pētījuma gaitā tika analizēta sakarība starp MMP-1 un MMP-3, kā arī MMP-1 un TIMP-1. Neatrod sakarību starp MMP-1 un MMP-3, kā arī starp MMP-1 un TIMP-1; skatīt 2.22. un 2.23. attēlu.

2.22. att. **Korelatīvā sakarība starp MMP-1 un MMP-3 koncentrāciju AVS pacientu grupā**

2.23. att. **Korelatīvā sakarība starp MMP-1 un TIMP-1 koncentrāciju AVS pacientu grupā**

Mēs savā pētījumā asins serumā starp MMP-9 un TIMP-1 neieguvām sakarību; skatīt 2.24. attēlu.

2.24. att. **Korelatīvā sakarība starp TIMP-1 un MMP-9 koncentrāciju AVS pacientu grupā**

Tika veikta arī korelācijas analīze starp MMP-9, MMP-3, MMP-1 un hemerīnu; skatīt 2.25., 2.26. un 2.27. attēlu.

Ieguvām sakarību ($p = 0,0084$; $r_p = 0,362$), ka augstāks hemerīna seruma līmenis ir saistīts ar augstāku MMP-9 seruma līmeni. Tas vēl vairāk pamato MMP-9 lomu un klātbūtni aortas vārstuļa stenozes procesā.

2.25. att. **Korelatīvā sakarība starp hemerīna un MMP-9 koncentrāciju AVS pacientu grupā**

2.26. att. **Korelatīvā sakarība starp hemerīna un MMP-3 koncentrāciju AVS pacientu grupā**

2.27. att. **Korelatīvā sakarība starp hemerīna un MMP-1 koncentrāciju AVS pacientu grupā**

2.2.5. Tioredoksīna reduktāze-1

Mēs analizējām asins plazmā antioksidantu tioredoksīna reduktāzi-1 (TrxR1). Nosakot TrxR1 līmeni plazmā kontroles grupas indivīdiem un aortas vārstuļa stenozes pacientiem, mēs ieguvām statistiski ticami augstāku tā līmeni AVS grupā ($p = 0,0016$); skatīt 2.28. attēlu.

2.28. att. **TrxR1 plazmas līmenis kontroles un AVS pacientu grupā**

Analizējot TrxR1 līmeņa atšķirības starp kontroles grupu un trim aortas vārstuļa stenozes smaguma pakāpēm, iegūstam statistiski ticami ($p = 0,0001$) augstāku TrxR1 līmeni vieglas aortas stenozes pakāpē un pacientiem ar smagu aortas vārstuļa stenozī ($p = 0,039$); skatīt 2.29. attēlu.

2.29. att. **TrxR1 plazmas līmenis kontroles grupā un pacientiem visās AVS smaguma pakāpēs**

Tika veikta korelācijas analīze ar regresijas līknes izveidi, lai analizētu un meklētu iespējamās sakarības starp TrxR1 un pārējiem biomarkšieriem.

Aortas vārstuļa stenozes grupā ieguvām būtisku pozitīvu korelāciju starp TrxR1 un MMP-3 ($p = 0,013$; $r_p = 0,37$); skatīt 2.30. attēlu.

2.30. att. Korelatīvā sakarība starp TrxR1 un MMP-3 koncentrāciju kontrols grupas indivīdiem un AVS pacientiem

Turpretī tā izpalika starp TrxR1 un MMP-9, vai bija nebūtiska starp TrxR1 un MMP-9. Tomēr TrxR1 un MMP-1 gadījumā tika konstatēta būtiska atšķirība starp korelāciju raksturojošo līkņu slīpumiem ($p = 0,0216$), ja salīdzina kontroli ar AV stenozes grupu; turklāt pie AV stenozes korelācijai, salīdzinot ar kontroles grupu, kur novēro negatīvu virzienu ($r = -0,27$), ir pozitīva tendence ($r = 0,24$) un starpība starp abu grupu korelācijas koeficientiem, Δr , sasniedz 0.51 jeb $[0.24 - (-0.27)]$, t.i., paaugstinoties TrxR1 līmenim, pieaug arī MMP-1 līmenis; skatīt 3.31. attēlu.

2.31. att. Korelatīvā sakarība starp TrxR1 un MMP-1 koncentrāciju kontrols grupas indivīdiem un AVS pacientiem

Analizējot sakarību starp TrxR1 un hemerīnu (skatīt 2.32. attēlu) ar korelācijas metodes un regresijas līknes pielietošanu, tika iegūta būtiska ($p = 0,006$; $r_p = 0,32$) pozitīva saistība starp abiem faktoriem.

2.32. att. Korelatīvā sakarība starp TrxR1 un hemerīna koncentrāciju kontroles grupas indivīdiem un AVS pacientiem

Tāpat analizējām sakarību starp TrxR1 un FGF-21 un arī ieguvām būtisku ($p = 0,031$; $r_p = 0,25$) pozitīvu saistību; skatīt 2.33. attēlu.

2.33. att. Korelatīvā sakarība starp TrxR1 un FGF-21 koncentrāciju kontroles grupas indivīdiem un AVS pacientiem

2.2.6. Mieloperoksidāze

Tika noteikts MPO līmenis kontroles grupā un aortas vārstuļa stenozes pacientiem visās trīs aortas vārstuļa stenozes smaguma pakāpēs. Mēs ieguvām būtisku rezultātu, ka aortas vārstuļa stenozes pacientiem plazmas mieloperoksidāzes līmenis ir augstāks, salīdzinot ar kontroles grupu ($p < 0,00003$). Veicot izvērstu analīzi un salīdzinot mielopertoksidāzes plazmas līmeņus starp aortas vārstuļa stenozes smaguma pakāpēm, mēs ieguvām statistiski ticamas atšķirības visās smaguma pakāpēs no kontroles grupas ($p < 0,02$ viegla stenozē; $p < 0,001$ vidēji smaga stenozē; $p < 0,0007$ smaga stenozē; skat. 2.34. attēlu). Rezultāti liecina, ka mieloperoksidāzes līmenis palielinās līdz ar aortas vārstuļa stenozes smaguma pieaugumu un visaugstākais ir smagas stenozes pacientu grupā.

2.34. att. **MPO plazmas līmenis kontroles grupai un AVS pacientiem**

Ar korelācijas analīzes un regresijas līknes palīdzību mēs izskatījām sakarību starp mieloperoksidāzi (MPO) un tioredoksīna reduktāzi-1 (TrxR1); skatīt 2.35. attēlu.

2.35. att. Korelatīvā sakarība starp MPO un TrxR1 koncentrācijām kontroles grupas indivīdiem un AVS pacientiem

Ieguvām būtisku pozitīvu saistību ($p = 0,008$; $r_p = 0,304$). Pieaugot mieloperoksidāzes līmenim plazmā, palielinās tioredoksīna reduktāzes-1 līmenis.

Tāpat mēs izskatījām sakarību starp MPO un hemerīnu un ieguvām būtisku pozitīvu ($p = 0,0057$; $r_p = 0,316$) saistību. Pieaugot hemerīna līmenim serumā, palielinās mieloperoksidāzes līmenis; skatīt 2.36. attēlu.

2.36. att. Korelatīvā sakarība starp MPO un hemerīna koncentrācijām kontroles grupas indivīdiem un AVS pacientiem

Analizējot iespējamo saistību starp MPO un FGF-21, mēs neieguvām statistiski ticamas sakarības ($p < 0,05$) starp šiem biomarķieriem ne kontroles grupas indivīdiem, ne aortas vārstuļa stenozes pacientiem; skatīt 2.37. attēlu.

2.37. att. **Korelatīvā sakarība starp MPO un FGF-21 koncentrāciju kontroles grupas indivīdiem un AVS pacientiem**

Vērtējot sakarības starp mieloperoksidāzi un matricas metallo-proteināzēm, mēs ieguvām būtisku, pozitīvu ($p = 0,007$; $r_p = 0,37$) sakarību starp MPO un MMP-9; palielinoties mieloperoksidāzes plazmas līmenim aortas vārstuļa stenozes pacientiem, pieaug arī MMP-9 līmenis; skatīt 2.38. attēlu.

2.38. att. **Korelatīvā sakarība starp MPO un MMP-9 koncentrāciju kontroles grupas indivīdiem un AVS pacientiem**

Ar korelācijas analīzes un regresijas līknes palīdzību tika iegūta statistiski ticama, negatīva ($p = 0,0474$; $r_p = -0,2791$) korelācija starp MPO un ABL-H: jo augstāks ir MPO līmenis, jo zemāks ir ABL-H līmenis; skatīt 2.39. attēlu.

2.39. att. Korelatīvā sakarība starp MPO un ABL-H koncentrāciju kontrols grupas indivīdiem un AVS pacientiem

3. DISKUSIJA

Pētījuma izstrādes laikā tika pieņemtas 2017. gada Eiropas Kardiologu biedrības un Eiropas Sirds un torakālo ķirurģu asociācijas darba grupas sirds vārstuļu slimību ārstēšanas vadlīnijas (*Baumgartner et al.*, 2017). Salīdzinot ar iepriekšējām 2012. gada vadlīnijām, Ehokg joprojām ir galvenā diagnostikas metode, kas apstiprina AVS esamību, novērtē AV kalcifikācijas pakāpi, kreisā kambara funkciju un sieniņu biezumu, atklāj citu vārstuļu iespējamu pavadošu patoloģiju un aortas patoloģiju. Mūsu pētījumā iekļauti smagas pakāpes AVS pacienti bija ar augsta gradienta AVS, jo izslēgšanas kritēriji bija izmainīta kreisā kambara funkcija (gan AVS, gan kontroles grupā iekļauti indivīdi ar $EF > 50\%$ un $SVI > 35 \text{ ml/m}^2$). Pēc 2017. gada augstākminētajām vadlīnijām, izgulsnētā kalcija daudzuma (*calcium score*) noteikšana ar daudzslāņu DT palīdzību ir pirmās rindas papildizmeklējums pacientiem ar PG vid. $< 40 \text{ mm/Hg}$, $AVA \leq 1,0 \text{ cm}^2$ un $SVI \leq 35 \text{ ml/m}^2$. Mūsu pētījumā tādu pacientu nebija, tādēļ arī *calcium score* noteikšana nebija indicēta, jo jau sākotnēji tika iekļauti pacienti ar normālu kreisā kambara funkciju, lai izvairītos no izmeklējuma, kura pieejamība ir ierobežota un pacientu grupu veidošanas laikā vēl nepietiekami attīstīta precīzai izgulsnētā kalcija daudzuma noteikšanai. Kalcificējošas AVS etiopatogēnēze, salīdzinot vadlīnijas un analizējot jaunāko zinātnisko rakstu atklājumus, vēl aizvien ir līdz galam neizzināta un neatklāta.

Tas, ka seruma hemerīna līmenis, pieaugot AVS smaguma pakāpei, samazinās un ir visaugstākais vieglas AVS pacientiem, liek domāt, ka darbība vairāk notiek, hemerīnam saistoties ar Chem23 receptoru. Ja hemerīns saistītos ar GPR-1, tad tā līmenim būtu jāpieaug līdz ar AVS smaguma pakāpi un tad hemerīna līmenis serumā varētu liecināt par kalcifikācijas pakāpi; jo smagāka AVS, jo izteiktāka kalcifikācija.

Nosakot MMP-9 seruma līmeni, netika noteiktas statistiski ticamas atšķirības starp kontroles grupu un AVS grupu, bet tika konstatēta saistība starp hemerīnu un MMP-9: augstāks MMP-9 līmenis ir saistīts ar augstāku hemerīna līmeni. Ir zināms, ka hemerīns veicina MMP-2,9,7 izdali. Veiktajos eksperimentos iegūtie rezultāti vēl vairāk pamato saistību ar iekaisuma procesu AVS pacientiem un norāda uz ekstracelulārās telpas remodelāciju jau vieglā aortas vārstuļa stenozes pakāpē, kad ir visaugstākais hemerīna līmenis. Vēl šī saistība varētu norādīt, ka hemerīns darbojas kā iekaisuma veicinātājs.

Tika noteikta arī pozitīva saistība starp hemerīnu un antioksidantu tioredoksīna reduktāzi-1 (TrxR1): jo augstāks hemerīna līmenis, jo augstāks TrxR1 līmenis. TrxR1 galvenā loma ir aizsargāt no oksidatīvā stresa, tioredoksīns (Trx) tieši inhibē apoptozi veicinošās kināzes. Mūsu iegūtā saistība starp hemerīnu un TrxR1 norāda, ka jau no sākuma AVS attīstībā ir gan oksidatīvais stress, gan iekaisums.

Analizējot prooksidanta fermentu mieloperoksidāzi (MPO), tika iegūta pozitīvu korelatīva sakarība starp hemerīnu un MPO: pieaugot hemerīna līmenim, pieaug MPO līmenis. Hemerīnam un MPO ir zināma kopīga īpašība ietekmēt NO: hemerīns samazina NO izdali; MPO samazina NO biopieejamību un, piesaistot NO, veido ROS. Gan hemerīns, gan MPO veicina MMP izdali un ekstracelulārās telpas remodelāciju. Tas varētu norādīt, ka hemerīns aortas vārstuļa stenozes pacientiem ir iekaisumu veicinošs.

Hemerīns var tikt izmantots par viegla AVS labu diagnostisko marķieri. Turpmāk varētu veidot pacientu grupu ar AV sklerozi bez stenozes, lai noteiktu, vai hemerīns var prognozēt AVS attīstību.

Pēc seruma FGF-21 izmaiņām nevar viennozīmīgi spriest par šī biomarķiera lomu AVS attīstībā. FGF-21 rezultāti ļauj pieņemt, ka FGF-21 var būt sargājoša loma AVS patogēnēzē. Tas pamato oksidatīvā stresa klātbūtni visa AVS attīstības procesā. Fakti par FGF-21 lomu saistaudu veidošanās

procesā (*Schumacher et al.*, 2016) un mūsu pētījumā iegūtie dati par visaugstāko FGF-21 līmeni pacientiem ar smagu AVS var arī norādīt uz progresējošu kalcifikāciju. FGF-21 ir arī atgriezenisks efekts uz miokarda hipertrofiju, kas ir bieži sastopama AVS pacientiem. Arī šis var būt viens no izskaidrojumiem, kāpēc FGF-21 pieaug līdz ar AVS smagumu. Jāmeklē citi oksidatīvā stresa biomarkieri un jāsalīdzina rezultāti, lai precīzāk izteiktos par FGF-21 nozīmi AVS attīstībā.

FGF-21 un TrxR1 ir saistīti ar oksidatīvo stresu: uzlabo oksidatīvo kapacitāti, samazina ROS iedarbību, samazina šūnu apoptozi, piedalās audu atjaunošanā. Starp abiem faktoriem atrod pozitīvu korelatīvu saistību: jo augstāks FGF-21 līmenis, jo augstāks TrxR1 līmenis. Tas parāda abu šo faktoru mijiedarbību un oksidatīvā stresa un iekaisuma saistību. Tika atrasta arī pozitīva saistība starp FGF-21 un hemerīnu. Ņemot vērā to, ka visaugstākais FGF-21 līmenis ir smagā aortas vārstuļa stenozes pakāpē un tam ir korelatīvs ciešums gan ar TrxR1, gan ar hemerīnu, varētu pieņemt, ka hemerīns darbojas kā iekaisuma faktors, bet FGF-21 aortas vārstuļa stenozes attīstības sākumā ir saistīts ar pretiekaisuma darbību. Visaugstākais FGF-21 līmenis smagā AVS pakāpē var būt saistīts gan ar progresējošu kalcifikāciju, gan darbību, kas vērsta pret miokarda hipertrofiju.

Par FGF-21 vairāk varētu uzzināt, nosakot IL-6 un TNF- α līmeni asins serumā, jo šie biomarkieri atbild par iekaisuma procesu un ir atkarīgi no FGF-21.

C-reaktīvā proteīna statistisko datu rezultāts ļauj teikt, ka augsts CRP līmenis var liecināt par sākotnēju kalcificējošu AVS. Pēc mūsu pētījuma datiem CRP nevar izmantot, lai paredzētu AVS progresēšanas ātrumu. Mūsu dati ir līdzīgi datiem no pētījuma, kur vērtēja hs-CRP saistību ar AVS (*Cho et al.*, 2016).

Darbā analizētie MMP (MMP-3, MMP-9) un TIMP (TIMP-1, TIMP-3) līmeņi asins serumā neuzrādīja statistiski būtiskas atšķirības starp kontroles grupas indivīdiem un AVS pacientiem.

Analizējot MMP-1, tika noteikts būtiski augstāks tā līmenis AVS grupā, turklāt ar trimodālu rezultātu sadalījumu. 80% iegūto vērtību AVS grupā ir būtiski augstākas nekā kontroles grupā. Visaugstākais MMP-1 līmenis ir vidējā AVS pakāpē. Iegūtie dati par visaugstāko MMP-1 līmeni vidējā aortas vārstuļa stenozes pakāpē var norādīt uz to, ka šajā aortas vārstuļa stenozes pakāpē ir visizteiktākā ekstracelulārās telpas remodelācija ar kolagēna šķiedru degradāciju un osteoblastu diferenciāciju un kalcifikāciju.

Mūsu pētījumā 20% aortas vārstuļa stenozes pacientiem MMP-1 līmenis nepieauga un palika kontroles grupas līmenī. Analizējot šos pacientus, izrādījās, ka visiem šiem pacientiem ir viegla aortas vārstuļa stenoze. Mēs domājam, ka to var izskaidrot ar aprakstīto MMP-1 polimorfismu. 1G alēlei ir aizsargājoša darbība pret kalcija nogulsnešanos, bet 2G alēles nesējiem (gan homozigotiem, gan heterozigotiem) ir izteiktāka aortas vārstuļa kalcinoze (neatkarīgi no vecuma, dzimuma un nieru funkcijas) (*Solache-Berrocal et al.*, 2016). Būtu izzinoši turpmāk apsekot un regulāri novērot šos 20% vieglas pakāpes aortas stenozes pacientus, kam nebija paaugstināts MMP-1 līmenis, jo teorētiski šiem pacientiem varētu prognozēt lēnu aortas vārstuļa stenozes progresēšanu.

Mūsu pētījumā iegūtie dati par MMP-1 līmeņa izmaiņām dažādās aortas vārstuļa stenozes pakāpēs (zemākais MMP-1 līmenis smagas aortas vārstuļa stenozes pacientiem; skatīt 2.16. attēlu), atbilst citu pētījumu rezultātiem no operāciju laikā iegūtā histoloģiskā materiāla. Zemāks MMP-1 līmenis smagas AVS pacientiem var liecināt, ka šajā slimības pakāpē iekaisuma process ir neaktīvs vai zemas aktivitātes, un ir izveidojusies kalcinoze.

Mēs neatradām sakarību starp MMP-1 un TIMP-1 seruma līmeņiem. Tas liek domāt, ka aortas vārstuļa stenozes ekstracelulārās telpas remodelācijā iesaistītās MMP-1 līmenis un darbība netiek regulēta ar TIMP-1 palīdzību.

Mēs pētījumā neatradām statistiski ticamas atšķirības TIMP-1 seruma līmenī starp aortas vārstuļa stenozes pacientiem un kontroles grupu. Arī citos pētījumos konstatēja individuāli mainīgu, tomēr nebūtisku TIMP-1 līmeni gan stenotiskajos, gan kontroles grupas vārstuļos (*Kaden et al.*, 2005).

Veicot korelācijas analīzi starp MMP-1 un MMP-9, mēs ieguvām sakarību, ka pieaugot MMP-1 līmenim aortas vārstuļa stenozes pacientiem, pieaug arī MMP-9 seruma līmenis. Salīdzinot mūsu rezultātus ar citu pētnieku atklājumiem, var pieņemt, ka MMP-9 funkcionē lokāli šūnu līmenī.

Tā kā MMP-9 ir pierādīts kā nozīmīgs aterosklerozes biomarķieris, bet mūsu pētījumā tam nav būtiskas atšķirības no kontroles grupas, tas tikai atkārtoti apliecina, ka aortas vārstuļa stenoze ir atšķirīgs process no aterosklerozes.

Ir pētīta MMP un TIMP ekspresija nereimatiskas aortas vārstuļa stenozes gadījumā. Arī šajos histoloģiskajos pētījumos atrada disproporciju starp MMP-9 un TIMP-1. Tika novērota MMP-9 lokalizācija ap kalcifikācijas mezgliņiem.

Ieguvām sakarību, ka augstāks hemerīna seruma līmenis ir saistīts ar augstāku MMP-9 seruma līmeni. Tas vēl vairāk pamato MMP-9 lomu un klātbūtni aortas vārstuļa stenozes procesā.

Tioredoksīna reduktāzes-1 analīzes rezultāti parāda, ka oksidatīvais stress ir saistīts ar kalcificējošu aortas vārstuļa stenozi. Visaugstāks TrxR1 līmenis pacientiem ar vieglu AVS un pozitīva sakarība ar hemerīnu un FGF-21 parāda, ka TrxR1 labi atspoguļo oksidatīvā stresa augstu izteiktību vieglā aortas stenozes pakāpē.

Atšķirībā no FGF-21, kura līmenis pieaug līdz ar aortas vārstuļa stenozes smagumu, TrxR1 līmenis ir mainīgs – visaugstākais vieglas aortas vārstuļa stenozes pakāpē un zemāks smagas aortas vārstuļa stenozes pakāpē, viszemākais vidējas stenozes pakāpē. To varētu izskaidrot ar to, ka smagā AVS pakāpē ir vērojama kreisā kambara hipertrofija, ko sastop daudziem smagas aortas vārstuļa stenozes pacientiem. Ir pierādīts, ka miokarda hipertrofija veicina TrxR1 ekspresiju (*Yamamoto et al.*, 2003). Otrs iemesls varētu būt sirds mazspēja, jo ir pierādīts, ka jo izteiktāka sirds mazspēja, jo augstāks tioredoksīna līmenis (*Jekell et al.*, 2004).

Aortas vārstuļa stenozes pacientiem atradām pozitīvu saistību starp TrxR1 un MMP-1: augstāks TrxR1 līmenis ir saistīts ar augstāku MMP-1 līmeni. Tā kā MMP-1 atrod gan ekstracelulāri, gan intracelulāri, tad jādedomā, ka tas saistīts ar oksidatīvo stresu un ekstracelulārās telpas remodelāciju.

Iepriekš, pētot MMP-1, MMP-3, MMP-9, mēs neatradām korelācijas, kas pierādītu MMP-3 lomu aortas vārstuļa stenozes procesā. Tas, ka mēs atrodam AVS pacientiem būtisku pozitīvu korelāciju starp tioredoksīna reduktāzi-1 un MMP-3, ļauj teikt, ka arī MMP-3 ir nozīme aortas vārstuļa stenozes procesā.

Starp TrxR1 un MMP-9 atradām nelielu saistību, un to var izskaidrot ar jau iepriekš iegūtajiem rezultātiem un citu pētnieku publicētajiem datiem, kas parāda, ka MMP-9 vairāk lokalizēta ap kalcifikācijas zonām.

Nosakot MPO līmeni, mēs to ieguvām statistiski ticami augstāku aortas vārstuļa stenozes pacientiem, piekam, pieaugot no vieglas līdz smagai aortas vārstuļa stenozes pakāpei. MPO ir pozitīva saistība ar TrxR1, hemerīnu un MMP-9. MPO darbību vajadzētu izskaidrot dažādi:

- pozitīvo saistību ar TrxR1 un hemerīnu varētu izskaidrot ar endotēlija disfunkciju, ROS veidošanu un aktīvu līdzdalību iekaisuma un oksidatīvā stresa procesos;

- pozitīvā saistība ar MMP-9, no vienas puses, pierāda MMP-9 lomu aortas vārstuļa stenozes procesā, bet, no otras puses, zinot, ka MMP-9 pamatā atrod lokāli ap kalcifikācijas zonām, un MPO satur kalcija saistīšanās vietu, var izteikt domu, ka MPO varētu piedalīties kalcifikācijas procesā.

Tomēr to nevar viennozīmīgi apgalvot, jo MPO, iedarbojoties caur ROS un ox-ZBL, var aktivēt MMP.

Saistība starp MPO un ABL-H līmeņiem atbilst MPO nelabvēlīgajai iedarbībai, paaugstinot ox-ZBL-H līmeni, radot ABL-H disfunkciju un ox-ABL-H veidošanos, līdz ar to vēl vairāk mazinot ABL-H aizsardzību. Tas notiek arī MPO veidotās hipohlorskābes ietekmē, kura oksidē apoA-1 un samazina ABL-H aizsargājošo darbību. Tā kā augstākais MPO līmenis ir smagas aortas vārstuļa stenozes pacientiem, tad attiecīgi zemākā ABL-H aizsardzība arī ir šajā AVS pakāpē. Mums nav iespēju tieši ietekmēt MPO darbību, bet, jo augstāks būs ABL-H līmenis pacientiem, jo labāka būs ABL-H aizsargājošā loma.

Ja TrxR1 pieaugumu smagā AVS pakāpē mēs skaidrojam ar sirds mazspēju, kreisā kambara hipertrofiju, tad MPO un ABL-H saistība pamato oksidatīvo stresu smagā aortas vārstuļa stenozes pakāpē.

MPO līmenis, tāpat kā FGF-21 līmenis, pieaug, progresējot stenozē. Tas norāda uz oksidatīvā stresa esamību aortas vārstuļa stenozes attīstībā. Ne MPO, ne TrxR1, ne FGF-21 līmenis smagas aortas vārstuļa stenozes pacientiem nav zemākā līmenī kā vidēji smagas stenozes pacientiem, bet ar tendenci būt augstākam, kas liecina, ka oksidatīvais stress ir visās AVS smaguma pakāpēs. Atšķirīgi no hemerīna, kas ir labs vieglas aortas vārstuļa stenozes biomarķieris un tā līmenis samazinās, progresējot AVS, iegūtie rezultāti ar MPO un TrxR1 liek domāt, ka vidēji smagā un smagā aortas stenozes pakāpē prevalē jau minētais oksidatīvais stress un progresējoša kalcifikācija.

Analizējot oksidatīvā stresa marķieru (MPO un TrxR1) iespējamo saistību ar pārējām šūnu producētām regulējošām molekulām (citokīniem), atrodam pozitīvu sakarību starp MPO un MMP-9, kā arī MMP-3. Tas varētu norādīt, ka gan MMP-9, gan MMP-3 ir saistīti ar aortas vārstuļa stenozes attīstību un varbūt piedalās oksidatīvā stresa izraisītā ekstracelulārās telpas remodelācijā.

Tas, ka oksidatīvā stresa līmenis ir relatīvi lielāks smagā aortas stenozes pakāpē nekā vidējā, varētu tikt izskaidrots ar izmaiņām, kas radušās AVS progresēšanas rezultātā: sirds mazspēju, kreisā kambara hipertrofiju un zemu koronārās plūsmas rezervi.

4. SECINĀJUMI

1. Aortas vārstuļa stenozes grupas pacientu sadalījums trijās smaguma pakāpēs un izvērtējums attiecībā pret kontroles grupu ļauj precīzāk un pilnvērtīgāk spriest par slimības patoģenēzi.

2. Hemerīns ir labs diagnostisks biomarķieris vieglai aortas stenozes pakāpei.

3. Ekstracelulārās telpas remodelācija sākas vieglā aortas vārstuļa stenozes pakāpē un visizteiktākā ir vidējā aortas stenozes smaguma pakāpē. Noteikts būtisks MMP-1 koncentrācijas pieaugums gan vieglā AVS pakāpē, gan izteiktāk vidējā AVS pakāpē. Noteikta pozitīva saistība starp MMP-1 un MMP-9, hemerīnu un MMP-9.

4. Iegūtie rezultāti pamato iekaisuma un oksidatīvā stresa klātbūtni visās trijās AVS smaguma pakāpēs. Visaktīvākais iekaisuma process ir vieglā AVS pakāpē, kur hemerīna līmenis ir būtiski visaugstākais, bet sakarības starp biomarķieriem parāda, ka jau vieglā AVS pakāpē sākas oksidatīvais stress – visbūtiskākais TrxR1 līmeņa palielinājums ir vieglā AVS pakāpē, savukārt MPO līmenis būtiski (salīdzinot ar kontroli) pieaug līdz ar AVS smagumu, sasniedzot visaugstāko līmeni smagā AVS pakāpē. Lielāku oksidatīvā stresa līmeni smagā AVS pakāpē mēs saistām ar to, ka turpinās gan oksidatīvais stress, gan to, ka lielākajai daļai smagas pakāpes AVS pacientu ir attīstījušās komplikācijas kā kreisā kambara hipertrofija, hroniska sirds mazspēja.

5. Oksidatīvais stress un iekaisums ir savstarpēji saistīti procesi, ko pamato hemerīna pozitīvā korelatīvā sakarība ar TrxR1 un MPO.

6. Pirmās hipotēzes daļu par iekaisuma faktoru un citokīnu lomu AVS attīstībā pierāda: hemerīna, FGF-21, CRP, MMP-1, TrxR1, MPO statistiskās analīzes rezultāti; korelatīvās sakarības starp MMP-1 un MMP-9 un hemerīnu,

arī starp TrxR1 un MMP-3. To, vai šie faktori un citokīni nosaka AVS prognozi, vēl nevar spriest. Tam nepieciešami ģenētiski pētījumi.

7. Ir apstiprināta otrā hipotēze: noteikta ABL-H būtiska nozīme AVS pacientiem – konstatēta negatīva korelatīvā sakarība starp MPO un ABL-H, kur augstāks MPO līmenis ir saistīts ar zemāku ABL-H līmeni. Smagas AVS pacientiem ir augstākais MPO līmenis, ko var izskaidrot ar MPO darbību, veidojot ox-ABL-H un mazinot ABL-H aizsargājošo darbību, tādējādi, jo augstāks būs ABL-H līmenis pacientiem, jo labāka būs ABL-H aizsargājošā loma.

8. Ir noteikts, ka oksidatīvais stress ir visās AVS smaguma pakāpēs un tam ir saistība ar iekaisuma procesu, apstiprinot arī trešo hipotēzi.

5. PRAKTISKĀS REKOMENDĀCIJAS

1. Hemerīns un tā noteikšana asins serumā ir labs diagnostiskais marķieris vieglas AS pacientiem. To varētu rekomendēt noteikt pacientiem, kam izklausā sirds trokšņus līdz laikam, kamēr nav veikta ehokardiogrāfija, arī pacientiem, kuriem samazinātas kreisā kambara sistoliskās funkcijas dēļ diagnostikā ir grūti izšķirties starp vieglas un vidējas stenozes pakāpēm. Hemerīna noteikšanu asins serumā teorētiski varētu izmantot pacientiem ar vizuālu AV sklerozi un pacientiem ar paaugstinātu spiediena gradientu uz AV, bet bez AVA, indeksētā AVA samazinājuma dinamiskai novērošanai.

2. Būtu iespējams veidot vieglas AVS pacientu novērošanas un dinamiskas izmeklēšanas programmu, lai noteiktu AVS progresēšanas ātrumu un saistību ar MMP-1 1G alēli, kuras nesējiem teorētiski būtu jānovēro lēna slimības progresēšana. Tas varētu parādīt ģenētisko faktoru lomu AVS pacientiem.

3. Laboratorisko rezultātu saistība ar oksidatīvo stresu un iekaisumu un zināmais par AVS patogēnēzi liek pievērst īpašu uzmanību vieglas AVS pacientiem, jo šajā pakāpē no patogēnēzes viedokļa ir iespējams novērst vai kavēt slimības progresēšanu. Varētu veikt pētījumus ar medikamentiem, kas ietekmē iekaisuma procesu. Jau iepriekš bijuši mēģinājumi lietot citostātiskus medikamentus, bet to radītās blaknes neatsvēra klīnisko ieguvumu.

4. Lai arī lipīdiem un statīnu terapijai nav tiešas saistības ar AVS procesu, ko pamato arī mūsu veiktās analīzes, tomēr gan ox-ZBL-H, gan ABL-H ir saistīti ar AVS. Jācenšas maksimāli palielināt ABL-H līmeni visu AVS pakāpju pacientiem, lai saglabātu un uzlabotu ABL-H aizsargājošo lomu oksidatīvā stresa apstākļos. Tā kā nav sevišķu iespēju tieši ietekmēt MPO darbību, jāpievērš īpaša uzmanība ABL-H līmenim pacientu asinīs – jo tas būs augstāks, jo spēcīgāka būs tā aizsargājošā loma.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Aboyans, V., Criqui, M. H., Abraham, P., Allison, M. A., Creager, M. A., Diehm, C., Fowkes, F. G., Hiatt, W. R., Jönsson, B., Lacroix, P., Marin, B., McDermott, M. M., Norgren, L., Pande, R. L., Preux, P. M., Stoffers, H. E., Treat-Jacobson, D. 2012. American Heart Association Council on Peripheral Vascular Disease; Council on Epidemiology and Prevention; Council on Clinical Cardiology; Council on Cardiovascular Nursing; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention, and Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia. Measurement and interpretation of the ankle-brachial index: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 126 (24), 2890–909. doi: 10.1161/CIR.0b013e318276fbc6
2. Baumgartner, H., Falk, V., Bax, J. J., De Bonis, M., Hamm, C., Holm, P. J., Iung, B., Lancellotti, P., Lansac, E., Muñoz, D. R., Rosenhek, R., Sjögren, J., Mas, P. T., Vahanian, A., Walther, T., Wendler, O., Windecker, S., Zamorano, J. L. 2017. ESC Scientific Document Group, ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *European Heart Journal*. 38(36), 2739–2791. doi: 10.1093/eurheartj/ehx391
3. Bonow, R., Greenland, P. 2015. Population-Wide Trends in Aortic Stenosis Incidence and Outcomes. *Circulation*. 131(11), 969–971. doi: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.014846>
4. Cho, K. I., Cho, S. H., Her, A. Y., Singh, G. B., Shin, E. S. 2016. Prognostic Utility of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio on Adverse Clinical Outcomes in Patients with Severe Calcific Aortic Stenosis. *PLoS One*. 11(8):e0161530. doi: 10.1371/journal.pone.0161530. eCollection 2016
5. Chow, W. S., Xu, A., Woo, Y. C., Tso, A. W. K., Cheung, S. C. W., Fong, C. H. Y., Tse, H. F., Chau, M. T., Cheung, B. M. Y., Lam, K. S. L. 2013. Serum Fibroblast Growth Factor-21 Levels Are Associated With Carotid Atherosclerosis Independent of Established Cardiovascular Risk Factors. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 33, 2454–2459 doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301599
6. Eweborn G. W., Schirmer H., Heggelund G., et al. 2013. The evolving epidemiology of valvular aortic stenosis. The Tromsø study. *Heart*. 99 (6), 396–400. doi: 10.1136/heartjnl-2012-302265
7. Heistad, D. D., Wakisaka, Y., Miller, J., Chu, Y., Pena-Silva, R. 2009. Novel Aspects of Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Circ J*. 73 (2), 201–207. doi: 10.1253/circj.CJ-08-1082
8. Jekell, A., Hossain, A., Alehagen, U., Dahlström, U. and Rosén, A. 2004. Elevated circulating levels of thioredoxin and stress in chronic heart failure. *European Journal of Heart Failure*, 6, 883–890. doi:10.1016/j.ejheart.2004.03.003
9. Kaden, J. J., Dempfle, C. E., Grobholz, R. et al. 2005. Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis. *Cardiovascular Pathology*. 14 (2), 80–87. doi: 10.1016/j.carpath.2005.01.002
10. Kanwar, A., Thaden, J. J., Nkomo, V. T. 2018. Management of Patients With Aortic Valve Stenosis. *Mayo Clinic Proceedings*. 93 (4), 488–508. doi: 10.1016/j.mayocp.2018.01.020

11. Kleinauskienė, R., Jonkaitienė, R. 2018. Degenerative Aortic Stenosis, Dyslipidemia and Possibilities of Medical Treatment. *Medicina* 54(2), 24. doi: 10.3390/medicina54020024
12. Lindman, B. R., Clavel, M. A., Mathieu, P., lung, B., Lancellotti, P., Otto, C. M., Pibarot, P. 2016. Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers*. 3; 2: 16006. doi: 10.1038/nrdp.2016.6
13. Nagase, H., Visse, R., Murphy, G. 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*. 69 (3), 562–573. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.12.002
14. Oury, C., Nchimi, A., & Lancellotti, P. 2019. Editorial: From Biology to Clinical Management: An Update on Aortic Valve Disease. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 6, 4. doi:10.3389/fcvm.2019.00004
15. Pawade, T. A., Newby, D. E., Dweck, M. R. 2015. Calcification in Aortic Stenosis. The Skeleton Key. *Journal of the American College of Cardiology*. 66 (5), 561–577. doi: 10.1016/j.jacc.2015.05.066
16. Perrot, N., Boekholdt, S.M., Mathieu, P., Wareham, N.J., Khaw, K-T., Arsenault, B.J. 2018. Life's simple 7 and calcific aortic valve stenosis incidence in apparently healthy men and women et al. *International Journal of Cardiology*. 269, 226 – 228. doi: 10.1016/j.ijcard.2018.07.107
17. Schumacher, J. D., Guo, G. L. 2016. Regulation of Hepatic Stellate Cells and Fibrogenesis by Fibroblast Growth Factors. *Biomed Res Int*. 2016 (8323747). doi: 10.1155/2016/8323747
18. Solache-Berrocal, G., Barral, A., Martín, M., Román-García, P., Llosa, J.C., Naves-Díaz, M., Cannata-Andía, J.B., Rodríguez, I. 2016. The association of MMP1 1G>2G polymorphism with aortic valve. *Rev Osteoporos Metab Miner* 8 (4), 115–120. http://scielo.isciii.es/pdf/romm/v8n4/en_original2.pdf
19. Vahanian A., Alfieri O., Andreotti F., Antunes M. J., Barón-Esquivias G., Baumgartner H., Borger M. A., Carrel T.P., De Bonis M., Evangelista A., Falk V., Lung B., Lancellotti P., Pierard L., Price S., Schäfers H. J., Schuler G., Stepinska J., Swedberg K., Takkenberg J., Von Oppell U. O., Windecker S., Zamorano J. L., Zembala M. 2012. ESC Committee for Practice Guidelines (CPG); Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC); European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur J Cardiothorac Surg*. 42 (4), S1–44. doi: 10.1093/ejcts/ezs455
20. Yamamoto, M., Yang, G., Hong, C., Liu, J., Holle, E., Yu, X., Wagner, T., Vatner, S.F., Sadoshima, J. 2003. Inhibition of endogenous thioredoxin in the heart increases oxidative stress and cardiac hypertrophy. *J. Clin. Investig*. 112, 1395–1406. doi: 10.1172/JCI200317700
21. Zeng, Q., Song, R., Fullerton, D. A., Ao, L., Zhai, Y., Li, S., Ballak, D. B., Cleveland, J. C., Reece, T. B., McKinsey, T. A., Xu, D., Dinarello, C. A., Menga, X. 2017. Interleukin-37 suppresses the osteogenic responses of human aortic valve interstitial cells in vitro and alleviates valve lesions in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114 (7), 1631–1636. doi: 10.1073/pnas.1619667114

PUBLICĒTIE RAKSTI, ZIŅOJUMI PAR DARBA TĒMU

Publikācijas recenzētos medicīniskajos izdevumos

1. Hofmanis, J., Hofmane, D., Svirskis, S., Mackevics, V., Tretjakovs, P., Lejnieks, A., Signorelli, S.S. HDL-C Role in Acquired Aortic Valve Stenosis Patients and Its Relationship with Oxidative Stress. *Medicina*. 2019; 55(8), 416. doi: 10.3390/medicina55080416
2. Tretjakovs, P., Hofmanis, J., Hofmane, D., Krieviņa, G., Blumfelds, L., Mackēvičs, V., Lejnieks, A., Bahs, G. 2019. Prognostic Utility Of Novel Biomarkers In Aortic Valve Stenosis. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B: Natural, Exact, and Applied Sciences*. doi: 10.2478/prolas-2019-0016
3. Lurins, J., Lurina, D., Svirskis, S., Nora-krukle, Z., Tretjakovs, P., Mackevics, V., Lejnieks, A., Rapisarda, V., Baylon, V. Impact of several proinflammatory and cell degradation factors in patients with aortic valve stenosis. *Experimental And Therapeutic Medicine*. 2019; 17, 2433–2442. doi: 10.3892/etm.2019.7254
4. Lurins, J., Lurina, D., Tretjakovs, P., Mackevics, V., Lejnieks, A., Rapisarda, V., Baylon, V. Increased serum chemerin level to predict early onset of aortic valve stenosis. *Biomed Rep*. 2018; 8 (1), 31–36. doi: 10.3892/br.2017.1010
5. Lūriņš, J., Veinberga, L., Lūriņa, D., Tretjakovs, P., Mackēvičs, V. Augsta blīvuma lipoproteīna nozīme un saistība ar iekaisuma faktoriem un iegūtu aortas vārstuļa stenozi. *RSU Zinātniskie raksti*. Internā medicīna 2017, 16–26.
6. Lurins, J., Visocka, A., Mackevics, V., Tretjakovs, P. Kalcificējošas aortas vārstuļa stenozes biomarkieru – hemerīna un FGF-21 – diagnostiskais novērtējums. *RSU Zinātniskie raksti*. Internā medicīna 2016, 72–81.
7. Lūriņš, J., Mackēvičs, V., Tretjakovs, P., Zeidlers, I. Aortas vārstuļa stenozes saistība ar bioķīmiskiem marķieriem. *RSU Zinātniskie raksti*. Internā medicīna 2014, 47–56.

Mutiskie ziņojumi kongresos un konferencēs

1. Impact of several proinflammatory and degeneration factors in aortic valve stenosis. J. Lurins, D. Lurina, P. Tretjakovs, V. Mackevics, A. Lejnieks, V. Rapisarda, V. Baylon. *22nd World Congress on Advances in Oncology and 20th International Symposium on Molecular Medicine*. Athens, Greece, 2017, October 5–7
2. Plasma thioredoxin reductase and myeloperoxidase levels in acquired aortic valve stenosis patients. J. Lurins, D. Lurina, G. Krievina, V. Mackevics, P. Tretjakovs, A. Lejnieks, S. S. Signorelli. *23rd World Congress on Advances in Oncology and 22nd International Symposium on Molecular Medicine*. Athens, Greece, 2018, September 20–22

Tēzes kongresos un konferencēs

1. Hofmanis, J., Hofmane, D., Gersone, G., Svirskis, S., Mackevics, V., Tretjakovs, P., Lejnicks, A. The role of oxidative stress in calcific aortic valve stenosis patients. Abstract. *International conference knowledge for use in practice*. Rīga Stradiņš University, Riga, Latvia, 2019, April 1–3.
2. Lurins, J., Lurina, D., Krievina, D., Mackevics, V., Tretjakovs, P., Lejnicks, A., Signorelli, S. S. Plasma thioredoxin reductase and myeloperoxidase levels in acquired aortic valve stenosis patients. Abstract. *23rd World Congress on Advances in Oncology and 22nd International Symposium on Molecular Medicine*. Athens, Greece, 2018, September 20–22
3. Lurins, J., Lurina, D., Tretjakovs, P., Mackevics, V., Lejnicks, A., Rapisarda, V., Baylon, V. Impact of several proinflammatory and degeneration factors in aortic valve stenosis. Abstract. *22nd World Congress on Advances in Oncology and 20th International Symposium on Molecular Medicine*. Athens, Greece, 2017, October 5–7.
4. Lurins, J., Lurina, D., Tretjakovs, P., Mackevics, V. Increased serum chemerin level predicts the early onset of aortic valve stenosis. Abstract. *The 40th Scientific meeting of the ELC*. Tutzing, Germany, 2017, September 4–7.
5. Lurins, J., Visocka, A., Krievina, G., Mackevics, V., Tretjakovs, P. Serum chemerin and fibroblast growth factor-21 levels in acquired aortic valve stenosis patients. Abstract. *The 85th EAS Congress*. Prague, Czech Republic, 2017, April 23–26.
6. Lurins, J., Visocka, A., Mackevics, V., Tretjakovs, P. Aortic valve stenosis in association with inflammatory process and biochemical markers. *The 84th EAS Congress*. Innsbruck, Austria, 2016, May 29–June 1.
7. Lurins, J., Visocka, A., Mackevics, V., Tretjakovs, P. Bioķīmiskie marķieri iegūtas aortas vārstuļa stenozes patoģenēzē. *RSU zinātniskās konferences tēzes*. Rīga, 2016. gada 17.–18. marts. 45. lpp.
8. Lūriņš, J., Mackēvičs, V., Tretjakovs, P. Bioķīmisko parametru novērtējums pacientiem ar aortālā vārstuļa stenozi. *RSU zinātniskā konferences tēzes*. Rīga, 2015. gada 26. un 27. marts. 125. lpp.
9. Lurins, J., Tretjakovs, P., Mackēvičs, V. Aortic valve stenosis relation with biochemical markers. Abstract. *Atherosclerosis*. 2015, 241 (Issue 1), e142. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.04.491
10. Lūriņš, J., Mackēvičs, V., Tretjakovs, P., Zeidlers, I. Iegūta aortas vārstuļa stenoze: etiopatogēnēzes aspekti. *RSU zinātniskā konferences tēzes*. Rīga, 2014. gada 10. un 11. aprīlis. 170. lpp.