

## Czy stenoza aortalna ma podłoże genetyczne?

Are genetic factors involved in the aetiology of aortic stenosis?

Ewa Orłowska-Baranowska, Janina Stępińska

Klinika Wad Nabytych Serca, Instytut Kardiologii, Warszawa

Kardiologia Pol 2007; 65: 1376–1380

Nowe techniki biologii molekularnej wprowadzone w ostatnich latach pozwoliły na ocenę genetycznego uwarunkowania chorób układu sercowo-naczyniowego. Badania dotyczyły głównie choroby wieńcowej oraz nadciśnienia tętniczego. Istotne miejsce wśród tych badań zajmował śródbłonek. Na szczęście w pierwszych latach obecnego stulecia swoich badań genetycznych doczekały się również nabyte zastawkowe wady serca.

Do niedawna jedyną możliwością oceny udziału czynników genetycznych w patogenezie chorób były badania bliźniąt jedno- lub dwujajowych oraz badania rodzinnego występowania danej patologii. Obecnie badania genetyczne koncentrują się na poszukiwaniu wariantów genetycznych, które mogą zwiększać ryzyko wystąpienia określonego schorzenia i stają się poszukiwanymi markerami genetycznymi. Mają również na celu określenie udziału uwarunkowań dziedzicznych w patogenezie schorzeń (a także ich powikłań, jak np. przerostu lewej komory, zaburzeń rytmu). Polegają na porównaniu częstości występowania wariantów danego genu w badanej populacji oraz dobranej odpowiednio grupie kontrolnej. Stosuje się również badania polegające na przeszukiwaniu genomu w celu wykrycia polimorfizmów, czyli mutacji, dzięki którym powstają alternatywne formy genu – allele. Geny, których warianty polimorficzne są brane pod uwagę jako potencjalnie związane z występowaniem danej choroby, to geny kandydaci. Poznanie sekwencji i lokalizacji genów umożliwiło prowadzenie badań sprawdzających, czy występujące w nich mutacje mogą mieć znaczenie kliniczne – czy mogą być odpowiedzialne za wystąpienie chorób genetycznych.

Wady zastawkowe serca, które były dotychczas najczęściej spowodowane gorączką reumatyczną, nie zostały wyeliminowane pomimo znacznego ograniczenia za-

chorowań na reumatyczne zapalenie wsierdza. W Stanach Zjednoczonych wady zastawkowe serca są odpowiedzialne za prawie 20 tys. zgonów rocznie [1]. Co więcej, częstość rozpoznawania stenozy aortalnej z roku na rok rośnie. Jest to trzecia co do częstości choroba układu sercowo-naczyniowego. Na pewno jest to spowodowane wydłużeniem czasu przeżycia i starzeniem się populacji. Nie wszystkie wątpliwości dotyczące narastania częstości występowania stenozy aortalnej, o której zaczyna się mówić jako o pladze XXI wieku, mogą być wyjaśnione prostym zużyciem zastawki. Pojawiły się prace, które próbowały rozszerzyć wiedzę na temat patomechanizmu powstawania wad zastawkowych serca. Coraz więcej danych przemawia za tym, że u podłoża ich powstawania mogą leżeć czynniki uwarunkowane genetycznie.

### Czy stenoza aortalna ma podłoże genetyczne?

Horn i wsp. w opublikowanej w listopadzie 2005 r. w *Circulation* pracy oceniali, czy badania, które wykorzystywały informacje o przyczynach zgonów, mogą potwierdzić genetyczne uwarunkowanie występowania zastawkowych wad serca [2]. Autorzy zastosowali zaakceptowaną dla oceny czynnika dziedzicznego metodę, opartą na ocenie połączonych badań populacyjnych i genealogicznych. Pozwala to na oddzielenie czynników środowiskowych od genetycznych poprzez ocenę nie tylko krewnych pierwszego stopnia, ale i dalszych, u których prawdopodobieństwo narażenia na podobne czynniki środowiskowe jest wyeliminowane. Autorzy wykorzystali bazę danych UPDF populacji stanu Utah. Baza ta została stworzona dla oceny rodzinnego występowania choroby oraz identyfikacji osób dziedziczących dla badań genetycznych – odkrycia i mapowania genu związanego z chorobą [3]. Wykorzystanie tych metod, sprawdzone

---

#### Adres do korespondencji:

dr hab. n. med. Ewa Orłowska-Baranowska, Klinika Wad Nabytych Serca, Instytut Kardiologii, ul. Alpejska 42, 04-628 Warszawa, tel.: +48 22 343 44 77, faks: +48 22 343 45 09, e-mail: eorlowska@ikard.pl

Praca wpłynęła: 22.05.2007. Zaakceptowana do druku: 30.05.2007.

przy ocenie wpływu czynnika rodzinnego na występowanie chorób nowotworowych i tętniaków, dostarczyło dowodów na rodzinne i genetyczne zwiększenie ryzyka zgonu z powodu wad zastawkowych serca.

Baza UPDB obejmowała 250 tys. zgonów z udokumentowaną przyczyną z lat 1904–2002. Przyczyny zgonów kodowano częściowo retrospektywnie, częściowo prospektywnie wg kodów ICD-10 [2, 3]. Obiektem zainteresowania były zgony z powodu niereumatycznych wad zastawki aortalnej i mitralnej oraz reumatycznej choroby serca. Analizowano dwa parametry uznane w badaniach dziedziczności chorób. Pierwszy z nich – tradycyjny wskaźnik ryzyka (ang. *familial relative risk*, FRR) – został stworzony dla oceny rodzinnego występowania choroby, oceniał stosunek częstości występowania obserwowanej choroby pomiędzy krewnymi do wyliczonej przewidywanej częstości występowania choroby w rejestrze UPDB u osób z aktem zgonu. Drugim był wskaźnik pokrewieństwa pomiędzy osobami chorymi (ang. *genealogical index of familiarity*, GIF), który oceniał stopień pokrewieństwa wszystkich chorych osób w całej populacji. Wskaźnik ten stosowany był wcześniej w licznych opracowaniach dotyczących dziedziczenia chorób nowotworowych.

W wypadku wady zastawki mitralnej dowody na dziedziczność dotyczyły nie tylko krewnych pierwszego i drugiego stopnia, ale również dalszych członków rodziny. Wśród chorych z wadą aortalną nie wykazano tak silnego związku jak w wypadku wady mitralnej, prawdopodobnie z powodu innego sposobu dziedziczenia wady. Innym wytłumaczeniem było to, że wada aortalna ujawnia się w późniejszym wieku i być może część osób zmarła z innego powodu, zanim postawiono rozpoznanie wady zastawki aortalnej. Takie spostrzeżenie potwierdzać miała analiza przeprowadzona dla grup poniżej i powyżej 65. roku życia – wykazano silny związek również dla wady aortalnej u chorych <65. roku życia. Co więcej, GIF dla wad nabytych serca był wyższy niż dla większości nowotworów, również dla tych z potwierdzoną zależnością genetyczną. Autorzy pracy postulują, że tło genetyczne musi być bardzo poważnie brane pod uwagę u chorych z wadami serca.

### Badania polimorfizmów genetycznych

Częstość występowania wapniejącej postaci zwężenia zastawki aortalnej rośnie z wiekiem, wśród osób >65. roku życia wynosi 2–3% [4]. Pomimo tak znacznej częstości występowania wady, a także rosnącej zapadalności i śmiertelności z jej powodu, mechanizmy prowadzące do jej powstania nie są do końca poznane [5–7]. Wcześniej uważano stwardnienie zastawki za chorobę zwyrodnieniową, będącą naturalnym następstwem starzenia się, jednak patologii tej nie stwierdza się u ponad połowy osób >80. roku życia [4, 5]. Co więcej, zmiany związane z wiekiem dotyczą głównie przyrostu tkanki tłuszczowej, bez

współistniejących nacieków zapalnych. Badania ostatnich lat wskazują na podobne czynniki ryzyka i mechanizmy komórkowe odpowiedzialne za występowanie degeneracyjnej stenozy aortalnej i miażdżycy. To pozwala przypuszczać, że zwężenie zastawki aortalnej jest aktywnym procesem uwarunkowanym konkretnymi przyczynami i mechanizmami, których odkrycie pozwoli na zastosowanie terapii spowalniającej lub zapobiegającej powstawaniu zmian [6–8]. Potwierdzają to badania histologiczne, które ujawniają istnienie złożonego procesu, na który składają się: odkładanie lipoprotein, przewlekły stan zapalny i kaskada wapnienia, prowadzące do zwiększenia masy płatek i gromadzenia w nich wapnia [6–10].

Wczesne zmiany obserwowane w wypadku stwardnienia zastawki to ogniskowe odkładanie się macierzy łącznotkankowej i osoczowych lipoprotein oraz przewlekłe zmiany zapalne o niewielkim nasileniu w postaci nacieków z makrofagów i limfocytów. Lokalizują się one pod aortalną powierzchnią zastawki i obejmują górną część warstwy włóknistej. Lipoproteiny, w tym LDL i Lp(a), odkładają się w proteoglikanach produkowanych przez fibroblasty zastawki. Nie zidentyfikowano dotychczas czynników indukujących tworzenie nacieków zapalnych, ale wydaje się, że są nimi produkty utleniania lipoprotein. Wykazano, że gromadzenie w nich wapnia indukuje ekspresję czynników chemotaksji monocytów (MCP-1) w komórkach śródbłonna, czynnika stymulującego kolonie monocytów i monocytarnego czynnika wzrostu. Czynniki te i cytokiny uwalniane z limfocytów i makrofagów indukują ekspresję antygenów HLA i receptorów dla IL-2 na fibroblastach [4]. Przynajmniej jedna linia zastawkowych fibroblastów jest zdolna różnicować się w kierunku komórek odpowiedzialnych za tworzenie wapniejących guzków [10, 11]. Tworzenie ich nasilone jest przez utlenione lipidy i TGF- $\beta$ . Komórki zapalne i ich produkty nie są nawet niezbędne, aby proces wapnienia postępował. Dodatkowo makrofagi naciekające zmienione płatki wydzielają osteopontynę – czynnik uczestniczący w procesie wapnienia [12]. Rola osteopontyny nie jest do końca poznana. U myszy z nieczynnymi genami dla osteopontyny stwierdzono nasilenie zwapnienia zmian, co wskazywałoby raczej na opóźnienie wapnienia zastawki. Odkładanie się wapnia zapoczątkowane jest w warstwie włóknistej, gdzie powoduje powstawanie ognisk mineralizacji. Odkładanie produkowanych przez fibroblasty składników macierzy zewnątrzkomórkowej i wapnienie powodują turbulentny przepływ przez zastawkę. Kolejne, powtarzające się uszkodzenia zastawki, rozwój stanu zapalnego – błędne koło zmian – prowadzą do heterotopowego kościotworzenia z nowotworzeniem naczyń i powstawaniem blaszkowatej tkanki kostnej.

Badania genetyczne prowadzone w ciągu ostatnich lat dotyczyły właśnie poszczególnych etapów tworzenia zmian na zastawce.

## Gen lipoproteiny E

Istotną rolę w metabolizmie cholesterolu przenoszonego przez lipoproteiny o bardzo małej gęstości odgrywa apolipoproteina. Stąd szczególna rola tej lipoproteiny w procesach aterogenezy i pierwotnych uszkodzeń śródbłonna. Lipoproteina E (apo E) kodowana jest przez 3 rodzaje alleli – E2, E3 oraz E4, co daje 6 możliwości genotypów. U 60% populacji apo E jest kodowana przez genotyp apo E3/3. W porównaniu z apo E3, nosiciele allela apo E4 (20% populacji) mają największe stężenie cholesterolu całkowitego i frakcji LDL cholesterolu (LDL-C) i najstabiliej reagują na leczenie statynami. Badania polimorfizmu apo E sugerowały większe prawdopodobieństwo występowania miażdżycy tętnic wieńcowych i szyjnych oraz przedwczesnego rozwoju choroby niedokrwiennej serca czy udaru mózgu u nosicieli apo E4, niezależnie od poziomu krążących lipidów.

Wapniejąca postać zwężenia zastawki aortalnej i zwapnienia pierścienia mitralnego są częstą patologią zastawkową występującą w starszym wieku, związaną ze zwiększoną śmiertelnością i chorobowością. Rozwój wady związany jest z czynnikami ryzyka miażdżycy, również podwyższonym poziomem cholesterolu i lipoproteinami o bardzo niskiej gęstości LDL-C. Stąd sugestia, że wapniejąca postać stenozы aortalnej i zwapnienia pierścienia mitralnego mogą występować częściej u nosicieli allela 4 Apo E [13, 14].

Novaro i wsp. przebadali pod tym kątem 802 chorych, u których wykonano badanie echokardiograficzne i oznaczono genotyp apo E. Wykazano istotnie częściej występowanie Apo E4 u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej w porównaniu z grupą kontrolną (40 vs 27%,  $p=0,01$ ). W analizie wieloczynnikowej, uwzględniającej wiek, płeć, poziom LDL-C, chorobę wieńcową i polimorfizm apo E – wiek i apo E4 były niezależnymi czynnikami rozwoju stenozы aortalnej, a iloraz szans (OR) wynosił 1,94 (95% CI 1,01–3,71). Zależności takiej nie wykazano dla zwapnienia pierścienia mitralnego.

## Gen receptora witaminy D

W badaniach eksperymentalnych, u królików karmionych dietą wysoko cholesterolową, stenoza zastawki aortalnej występowała tylko u tych zwierząt, które otrzymywały suplementację witaminy D<sub>2</sub>. Dlatego mimo koncepcji, że stenoza aortalna związana jest z wiekiem i podwyższonym poziomem cholesterolu, wydaje się, że takie czynniki, jak zaburzenia gospodarki wapniowej, u chorych z predyspozycjami genetycznymi mogą również mieć istotne znaczenie. Interesująca pod tym względem jest obserwowana odwrotna zależność między zwyrodnieniową chorobą zastawki aortalnej a osteoporozą [15, 16].

Witamina D, obok prathormonu, jest najsilniejszym czynnikiem regulującym stężenie wapnia w surowicy krwi i metabolizm kostny. Polimorfizmy występujące w genie kodującym receptor dla witaminy D mogą prowadzić

do różnych odpowiedzi na działanie witaminy D w jelitach oraz w kościach, co wpływa na wielkość szczytowej masy kostnej i w efekcie na rozwój osteoporozy [15, 16].

Gen receptora witaminy D zlokalizowany jest na chromosomie 12 (12q13-q14). Jego długość wynosi 60–70 kilo par zasad. Gen składa się z co najmniej 9 egzonów. Najlepiej znane i opisane są trzy polimorficzne regiony – między egzonem 8 i 9 (intron H lub 8) oraz w egzonie 9. Odcinek DNA odpowiadający intronowi 8, długości 1320 par zasad, zawiera dwa polimorficzne miejsca wykrywane za pomocą endonukleaz BsmI i ApaI. Miejsca te znajdują się odpowiednio w pozycji 280 i 1280 od końca 5' intronu. Trzecie polimorficzne miejsce wykrywane za pomocą trawienia endonuklezą TaqI zidentyfikowano w egzonie 9. W egzonie 9 znaleziono jeszcze wiele innych polimorfizmów, które są jednak ściśle sprzężone z miejscami restrykcyjnymi BsmI, ApaI i TaqI. W zależności od zastosowanego enzymu restrykcyjnego, obecność lub brak miejsca restrykcyjnego są opisywane odpowiednio jako B/b, A/a oraz T/t. Badając polimorfizm BsmI, wykazano obecność genotypów homozygotycznych bb oraz BB – odpowiednio obecność lub brak miejsca restrykcyjnego oraz genotypu heterozygotycznego Bb, kiedy jeden allel zawiera miejsce restrykcyjne, a drugi nie. Potwierdzono istnienie związku pomiędzy polimorfizmem BsmI a gęstością mineralną kości i występowaniem osteoporozy. W rasie kaukaskiej polimorfizm BsmI wykazuje pozytywną korelację z poziomem osteokalcyny.

Udział receptora witaminy D w metabolizmie wapnia oceniano w ostatniej dekadzie często [15–17]. Polimorfizm tego genu wydaje się determinować gęstość i masę mineralną kości. U nosicieli allela B masa kostna jest mniejsza niż u nosicieli allela b. Tracą oni szybciej masę kostną z wiekiem, podczas gdy nosiciele allela b charakteryzują się lepszym wchłanianiem wapnia i lepszą korelacją między stężeniem witaminy D i indeksem wchłaniania wapnia.

W badaniu obejmującym osoby dorosłe poddawane cewnikowaniu serca częściej wykazywano obecność allela B (54%) receptora witaminy D u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej w porównaniu z osobami z chorobą wieńcową (40%). Autorzy przypuszczają, że allel B może być związany z pozakostnym wapnieniem poprzez mechanizmy adaptacyjne oddziałujące również niekorzystnie na gęstość kości. Innym wytłumaczeniem jest możliwość nierównowagi między allelem B a innym nierozpoznanym genem zaangażowanym w metabolizm wapnia. Obserwowana zależność pomiędzy allelem receptora witaminy D a zwapnieniem zastawki aortalnej i jej mechanizmy wymagają potwierdzenia w dodatkowych badaniach.

## Gen NOTCH1

Genetyczne podłoże zwężenia zastawki aorty oceniali również Garg i wsp. [18]. Autorzy przedstawili dowody na istnienie genetycznej przyczyny wady aortalnej, a tak-

że potencjalny mechanizm, który poprzez mutację NOTCH1 może predysponować do dysfunkcji komórek śródbłonna i procesów zapalnych leżących u podstaw chorób sercowo-naczyniowych związanych z nieprawidłowym wapnieniem. Badano rodziny dzieci, u których stwierdzono nieprawidłowo zbudowaną zastawkę aortalną. U wszystkich członków rodzin wykonywano 12-odprowadzeniowe EKG i badanie echokardiograficzne. W jednej z takich rodzin (pięciopokoleniowej), wadę serca rozpoznano u 11 osób, z czego u 9 wapniejącą postać stenozы aortalnej. Czterech członków rodzin wymagało wymiany zastawki z powodu stenozы aortalnej. Skanowanie genomu członków rodzin wykazało sprzężenie wady serca z pojedynczym locusem na chromosomie 9q34-35. Ocena 30 znanych i 57 przewidywanych genów wytypowała gen NOTCH1, który koduje przezbłonowy receptor (zbudowany z 2556 aminokwasów) związany ze szlakiem sygnałowym wpływającym na różnicowanie komórek. Bezpośrednie sekwencjonowanie NOTCH1 u osób z nieprawidłową zastawką wykazało transpozycję nukleotydu 3322C→T. Powodowało to zamiast syntezy argininy w pozycji 1108 zewnątrzkomórkowej domeny receptora syntezę stop kodonu. U wszystkich chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej wykryto mutację R1108X. Stopień dziedziczenia sugerował dziedziczenie autosomalne dominujące z kompletną penetracją. Zmutowany allel nie występował u zdrowych członków rodzin. Dodatkowa analiza 100 genów regulatorowych nie wykazała związku z ekspresją wady serca.

Sekwencjonowanie NOTCH1 w mniejszej hiszpańskiej rodzinie z wadą aortalną wykazało obecność innej mutacji NOTCH1 występującej u 3 członków rodziny, u których stwierdzono dwupłatkową zastawkę aortalną. Delecja pojedynczej pary zasad w pozycji 4515 związana z wadą nie występowała u ponad tysiąca osób z grupy kontrolnej. Delecja powodowała mutację H1505 del i syntezę zmienionego białka, zawierającego 74 aminokwasy nieprawidłowe w C-końcowym fragmencie zewnątrzkomórkowej domeny receptora, z nieprawidłowym stop kodonem.

Udział NOTCH1 w formowaniu zastawki aortalnej potwierdzono w badaniu ekspresji genu w rozwijającym się sercu myszy. Gen NOTCH1 koduje duże białko receptorowe, którego wewnętrzna domena przenosi się do jądra komórkowego, łączy z białkami wiążącymi DNA CSL i aktywuje czynniki transkrypcyjne [19]. Białko NOTCH1 pełni ważną rolę w powstawaniu zastawki aortalnej w trakcie rozwoju zarodkowego i, jak wykazali naukowcy, jednocześnie zapobiega zwapnieniu zastawki, do którego dochodzi wraz z wiekiem [20]. Wapnienie rozwija się poprzez różnicowanie komórek zastawki w komórki podobne do osteoblastów, z reekspresją genów dla osteopontyny, osteokalcyny i innych specyficznych dla osteoblastów genów. Ekspresja tych genów jest bezpośrednio regulowana przez element typu cis, który łączy się z czynnikiem transkrypcyjnym Runx2, w warunkach prawidłowych blokowanym [19–22]. Wyniki badań wskazują, że mutacja NOTCH1 wywołuje wczesny

defekt zastawki aortalnej, ale również późne odhamowanie odkładania wapnia, które powoduje postępującą wadę serca. Mutacje w genie NOTCH1 mogą być więc przyczyną rozwoju choroby, a wczesne ich wykrycie może pomóc w jej zapobieganiu. Dalsze badania szlaków przekazywania sygnałów z udziałem NOTCH1 w procesach wapnienia u dorosłych mogą prowadzić do zidentyfikowania czynników prewencyjnych i farmakologicznych, by spowolnić choroby związane z procesem starzenia się organizmu [23–28].

## Dwupłatkowa zastawka aortalna

Dwupłatkowa zastawka aortalna jest najczęstszą wadą wrodzoną serca u dorosłych. Występuje u 1–2% populacji [29]. Patogeneza wady nie jest znana [30–32]. Za obecnie przyjmowaną teorią genetyczną przemawia współistnienie z wrodzonymi nieprawidłowościami w obrębie aorty (koarktacja aorty, przetrwałym przewodem tętniczym) i bliższych odcinków unaczynienia wieńcowego. Dwupłatkowej zastawce towarzyszą poszerzenie aorty, jej tętniaki i rozwarstwienie. Duża zapadalność rodzinna może świadczyć o dziedziczeniu o charakterze dominującym autosomalnym ze zmniejszoną penetracją genu (echokardiograficzne badania przesiewowe uzasadnione są u krewnych pierwszego stopnia). Mężczyźni chorują 4-krotnie częściej niż kobiety. Stwierdzono, że chorzy z dwupłatkową zastawką mogą wykazywać niedobór białek drobnoustrojowych macierzy pozakomórkowej, które służą za rusztowanie dla komórek zarodkowych i regulują wytwarzanie tkanek w rozwijających się zastawkach aortalnych. Różnicowanie komórek mezenchymalnych poduszeczek wsierdziowych w kierunku dojrzałych komórek wiąże się z ekspresją drobnoustrojowych białek – fibryliny i fibuliny. Niewystarczająca synteza fibryliny I w czasie powstawania zastawek może zakłócić formowanie płatków aortalnych, czego wynikiem będzie dwupłatkowa zastawka i słabsza opuszka aorty.

Poznanie roli czynników genetycznych w etiopatogenezie wad zastawkowych serca, a zwłaszcza stenozы aortalnej, najczęściej spotykanej wady nabytej serca, może mieć decydujące znaczenie dla stworzenia racjonalnych podstaw profilaktyki i leczenia. Dzięki poznaniu podstaw molekularnych można będzie prawdopodobnie zidentyfikować osoby zagrożone jeszcze przed ujawnieniem się patologii i zaproponować prewencję (statyny?) lub wczesne leczenie.

## Piśmiennictwo

1. American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics – 2005 Update. *American Heart Association*, Dallas 2005.
2. Horne BD, Camp NJ, Muhlestein JB, et al. Evidence for a heritable component in death resulting from aortic and mitral valve diseases. *Circulation* 2004; 110: 3143-8.
3. Cannon-Albrigh L, Thomas A, Goldgar D, et al. Familiality of cancer in Utah. *Cancer Research* 1994; 54: 2378-85.

4. Rajamannan NM, Gersh B, Bonow RO. Calcific aortic stenosis: from bench to the bedside – emerging clinical and cellular concepts. *Heart* 2003; 89: 801-5.
5. Roberts WC. The senile cardiac calcification syndrome. *Am J Cardiol* 1986; 58: 572-4.
6. Mohler ER 3<sup>rd</sup>. Mechanisms of aortic valve calcification. *Am J Cardiol* 2004; 94: 1396-402.
7. Mitka M. Researchers probe aortic stenosis. An active, potentially treatable disease process. *JAMA* 2003; 289: 2197-8.
8. Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, et al. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29: 630-4.
9. Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, et al. Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation* 2003; 107: 2181-4.
10. Otto CM. Calcification of bicuspid aortic valves. *Heart* 2002; 88: 321-2.
11. Mohler ER 3<sup>rd</sup>, Gannon F, Reynolds C, et al. Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation* 2001; 103: 1522-8.
12. O'Brien KD, Kuusisto J, Reichenbach DD, et al. Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. *Circulation* 1995; 92: 2163-8.
13. Novaro GM, Sachar R, Pearce GL, et al. Association between apolipoprotein E alleles and calcific valvular heart disease. *Circulation* 2003; 108: 1804-8.
14. O'Brien K, Shavelle D, Caulfield M, et al. Association of angiotensin-converting enzyme with low-density lipoprotein in aortic valvular lesions and in human plasma. *Circulation* 2002; 106: 2224-30.
15. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Dańska A, et al. Polimorfizm genu kodującego receptor witaminy D w grupie kobiet w okresie postmenopauzalnym z niską gęstością mineralną kości. *Ginekol Pol* 2004; 75: 367-72.
16. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K. Genetyczne czynniki osteoporozy – polimorfizm genu receptora witaminy D. *Ginekol Pol* 2004; 75: 404-11.
17. Ortlepp JR, Hoffman R, Ohme F. The vitamin D receptor genotype predisposes to the development of calcific aortic valve stenosis. *Heart* 2001; 85: 635-8.
18. Garg V, Muth AN, Ransom JF, et al. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature* 2005; 437: 270-4.
19. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; 284: 770-6.
20. Loomes KM, Taichman DB, Glover CL, et al. Characterization of Notch receptor expression in the developing mammalian heart and liver. *Am J Med Genet* 2002; 112: 181-9.
21. Haines N, Irvine KD. Glycosylation regulates Notch signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 786-97.
22. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, et al. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res* 2001; 89: 1147-54.
23. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, et al. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997; 89: 747-54.
24. Rajamannan NM, Subramaniam M, Caira F, et al. Atorvastatin inhibits hypercholesterolemia-induced calcification in the aortic valves via the Lrp5 receptor pathway. *Circulation* 2005; 112 (9 Suppl): I229-34.
25. Timmerman LA, Grego-Bessa J, Raya A, et al. Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev* 2004; 18: 99-115.
26. Hurlstone AF, Haramis AP, Wienholds E, et al. The Wnt/beta-catenin pathway regulates cardiac valve formation. *Nature* 2003; 425: 633-7.
27. Yutzey KE, Colbert M, Robbins J. Ras-related signaling pathways in valve development: ebb and flow. *Physiology (Bethesda)* 2005; 20: 390-7.
28. Chang CP, Neilson JR, Bayle JH, et al. A field of myocardial-endothelial NFAT signaling underlies heart valve morphogenesis. *Cell* 2004; 118: 649-3.
29. Ward C. Clinical significance of the bicuspid aortic valve. *Heart* 2000; 83: 81-5.
30. Cripe L, Andelfinger G, Martin L, et al. Bicuspid aortic valve is heritable. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 138-43.
31. Fedak PW, Verma S, David TE, et al. Clinical and pathophysiological implications of a bicuspid aortic valve. *Circulation* 2002; 106: 900-4.
32. Wessels MW, Berger RM, Frohn-Mulder IM, et al. Autosomal dominant inheritance of left ventricular outflow tract obstruction. *Am J Med Genet A* 2005; 134: 171-9.