

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 616.71-003.84:[616.12 +611.16]

ОСОБЕННОСТИ СБОРА БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ПРИ ИЗУЧЕНИИ ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ КАЛЬЦИФИКАЦИИ СЕРДЦА И СОСУДОВ

Боярская Н. В., Шишкова А. А., Сапранков В. Л., Успенский В. Е., Малашичева А. Б.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Научный центр мирового уровня «Центр персонализированной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Боярская Надежда Владимировна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: boyarskaya_nv@almazovcentre.ru

Статья поступила в редакцию 12.04.2022
и принята к печати 25.04.2022.

РЕЗЮМЕ

Кальцификация сердца и сосудов — распространенное патологическое состояние, приводящее к многочисленным осложнениям. Одна из ее самых частых форм — кальцификация аортального клапана. На сегодня не существует лекарственной терапии, способной остановить прогрессирование кальцификации, поэтому единственным радикальным методом лечения остается хирургическое вмешательство. Для поиска антикальцифицирующей терапии необходимы фундаментальные молекулярно-биологические исследования и, соответственно, релевантная модель *in vitro*. В статье мы представляем организацию деятельности трансляционной группы из врачей-терапевтов, хирургов и молекулярных биологов, работающей с клеточными моделями кальцификации. В качестве клеточных моделей приводится описание получения линий интерстициальных и эндотелиальных клеток аортального клапана, а также гладкомышечных и эндотелиальных клеток аорты. Описаны подготовительные клинические и хирургические этапы получения биоматериала, лабораторный этап работы с материалом.

Ключевые слова: аортальный клапан, кальцификация, клеточные модели.

Для цитирования: Боярская Н.В., Шишкова А.А., Сапранков В.Л., Успенский В.Е., Малашичева А.Б. Особенности сбора биологического материала при изучении патологической кальцификации сердца и сосудов. Российский журнал персонализированной медицины. 2022;2(3):111-118. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-111-118

FEATURES OF COLLECTING BIOLOGICAL MATERIAL IN THE STUDY OF PATHOLOGICAL CALCIFICATION OF THE HEART AND BLOOD VESSELS

**Boyarskaya N. V., Shishkova A. A., Saprankov V. L., Uspensky V. E.,
Malashicheva A. B.**

Almazov National Medical Research Centre, World-Class Research Centre for Personalized
Medicine, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Boyarskaya Nadezhda V.,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.
E-mail: boyarskaya_nv@almazovcentre.ru

Received 12 April 2022; accepted 25 April
2022.

ABSTRACT

Calcification of the heart and blood vessels is a common pathological condition, leading to numerous complications. One of the most common forms of calcification is aortic valve calcification. To date, there is no drug therapy that can stop the progression of calcification, so the only radical method of treatment remains surgery. Fundamental molecular biological studies and, accordingly, a relevant in vitro model are necessary to search for an anticalcifying therapy. In the article, we present the organization of the work of a translational group, consisting of clinicians, surgeons, and molecular biologists, working with cellular models of calcification. As cell models, a description is given of obtaining cell lines of interstitial and endothelial cells of the aortic valve, as well as smooth muscle and endothelial cells of the aorta. The preparatory clinical and surgical stages of obtaining a biomaterial, and the laboratory stage of working with the material are described.

Key words: aortic valve, calcification, cell models.

For citation: Boyarskaya NV, Shishkova AA, Saprankov VL, Uspensky VE, Malashicheva AB. Features of collecting biological material in the study of pathological calcification of the heart and blood vessels. Russian Journal for Personalized Medicine. 2022;2(3):111-118. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-111-118

Список сокращений: АК — аортальный клапан, БАК — бicuspidальный аортальный клапан, ВА — восходящая аорта, ГАГ — гликозамингликаны, ОХС — общий холестерин, ТАК — трехстворчатый аортальный клапан, ТГ — триглицериды, ХС-ЛПВП — холестерин липопротеинов высокой плотности, ХС-ЛПНП — холестерин липопротеинов низкой плотности, НАЕС (human aortic endothelial cells) — эндотелиальные клетки аорты, SMC (smooth muscle cells) — гладкомышечные клетки аорты, VEC (valves endothelial cells) — эндотелиальные клетки клапана, VIC (valves interstitial cells) — интерстициальные клетки клапана.

Кальцификация сердца и сосудов — распространенное патологическое состояние, приводящее к многочисленным осложнениям. Одна из ее самых частых форм — кальцификация аортального клапана. На сегодня не существует лекарственной терапии, способной остановить прогрессирование кальцификации, поэтому единственным радикальным методом лечения остается хирургическое вмешательство. Для поиска антикальцифицирующей терапии необходимы фундаментальные молекулярно-биологические исследования и, соответственно, релевантная модель *in vitro*. В статье мы представляем организацию деятельности трансляционной группы из врачей-терапевтов, хирургов и молекулярных биологов, работающей с клеточными моделями кальцификации. В качестве клеточных моделей приводится описание получения линий интерстициальных и эндотелиальных клеток аортального клапана, а также гладкомышечных и эндотелиальных клеток аорты. Ниже приведено описание подготовительных клинических и хирургических этапов получения биоматериала, лабораторный этап работы с материалом.

Аортальный клапан является частью корня аорты. Створки аортального клапана называются в зависимости от их расположения: левая полулунная (коронарная) створка, правая полулунная (коронарная) створка и задняя (некоронарная) створка аортального клапана [1, 4]. Створки представляют собой тонкие (< 1 мм), гибкие, аваскулярные структуры, состоящие из трех слоев: желудочкового (*ventricularis*), аортального (*fibrosa*) и спонгиозного (*spongiosa*) [3]. С аортальной и желудочковой сторон створки покрыты монослоем эндотелиальных клеток. В некоторых источниках указывается 5 слоев соединительной ткани, расположенных между аортальной и желудочковой поверхностью, а именно: *lamina ventricularis*, *lamina radialis*, *lamina spongiosa*, *lamina fibrosa*, *lamina arterialis*, но все-таки общепринятым является выделение трех слоев в струк-

туре клапана [4]. Спонгиозный слой (*spongiosa*) содержит большое количество гликозамингликанов (ГАГ) и протеогликанов. Между всеми внеклеточными компонентами в трех слоях находятся интерстициальные клетки клапана.

Весь операционный материал получают в Национальном медицинском исследовательском центре им. В. А. Алмазова в ходе операции по протезированию аортального клапана. Забор операционного материала осуществляется после подписания пациентами информированного согласия.

Забор операционного материала осуществляется от больных с умеренным или тяжелым склеродегенеративным аортальным стенозом в возрасте от 50 до 70 лет. Такие возрастные ограничения связаны с тем, что операционный материал от пациентов старше 70 лет достаточно неудобен для клеточной работы. При госпитализации пациента в НМИЦ им. В. А. Алмазова для планового хирургического лечения (протезирования АК) в рамках предоперационной подготовки проводится сбор жалоб, оценка анамнеза и объективный осмотр пациента, эхокардиография по стандартному протоколу, стандартное лабораторное обследование. Материал от пациентов с инфекционным эндокардитом клапана, хронической ревматической болезнью сердца, системными заболеваниями соединительной ткани, онкологическими заболеваниями не включается в работу. Тяжесть аортального стеноза оценивается по стандартному протоколу трансторакального эхокардиографического исследования (максимальной скорости на аортальном клапане (V_{max}), среднему градиенту давления на аортальном клапане (dP_{mean}), площади аортального клапана (AVA) на аппарате Vivid 7 (GE, США), согласно Европейским и Американским рекомендациям по эхокардиографии. У ряда пациентов удается установить наличие бicuspidального аортального клапана (БАК) на дооперационном этапе. В зависимости от анатомических особенностей аортального клапана все пациенты разделяются на 2 подгруппы: первая подгруппа — пациенты с ТАК (трехстворчатым аортальным клапаном), вторая подгруппа — пациенты с БАК (бicuspidальным аортальным клапаном). При клинической характеристике пациентов важна сопутствующая кардиальная патология (ИБС, ГБ, поражение других клапанов сердца), семейный анамнез. В рамках предоперационного лабораторного обследования всем пациентам выполняется общий клинический и биохимический анализ крови, но особое внимание для последующего анализа уделяется содержанию общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП), холестерина липо-

протеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП), уровню глюкозы, СРБ.

Анестезиологическое пособие при хирургических вмешательствах на восходящей аорте (ВА) и/или аортальном клапане (АК) во всех случаях представляет собой общую комбинированную анестезию с использованием севофлурана и фентанила.

В качестве хирургического доступа чаще всего используют полную срединную стернотомию.

После пережата аорты и проведения кардиopleгии выполняется аортотомия, ревизия восходящего отдела аорты и АК, оценивается возможность выполнения клапаносберегающей реконструкции корня аорты.

При наличии изолированного гемодинамически значимого порока аортального клапана выполняется изолированное протезирование АК. Выполняется косопоперечная аортотомия, оценивается состояние аортального клапана (АК), аорты в области синусов Вальсальвы, СТС и, насколько возможно, в ее восходящем отделе. В случае принятия решения о замещении аортального клапана протезом створки АК иссекаются, при необходимости выполняется декальцинация ФК, АК и прилежащих структур. Створки аортального клапана непосредственно после иссечения разделяются на 2 части, первая из которых консервируется 10 % раствором формалина для последующего патогистологического исследования, вторая часть помещается в среду для последующего молекулярно-биологического исследования.

Молекулярно-биологическое исследование операционного материала. Подготовительный этап

Для получения операционного материала (рис. 1) к началу операции необходимо предоставить маркированную пробирку с «консервирующей средой».

В работе используются стерильные пробирки Falcon 50 мл (Corning, США), среда для сохранения ткани («консервирующая среда») готовится из стерильного PBS — фосфатно-солевого буфера (Biolot, Россия) с добавлением 1 % антибиотика пенициллина/стрептомицина (Invitrogene, США). Используется 30–40 мл среды на одну пробирку для одного забора материала. Пробирка передается в предоперационную операционным медсестрам до начала операции, по ее окончании медсестры приносят пробирку с фрагментом или фрагментами ткани в предоперационную. Далее материал забирается в стерильный бокс для выделения первичных культур — оптимально, либо помещается в холодильник на +4 °С до суток, не более (рис. 2).

Выделение первичных культур. VIC (valves interstitial cells) и VEC (valves endothelial cells)

Выделение первичных культур производится в ламинаре, в культуральном боксе — это специальное помещение, имеющее повышенные требования к стерильности. Ламинар (лабораторный прибор для работы с биологическими объектами в стерильных условиях) предварительно готовится для выделения клеток: проводится кварцевание 10–15 минут, обработка поверхностей 70 % этиловым спиртом.

Из тканей аортального клапана выделяют два типа клеток: VIC — интерстициальные клетки клапана и VEC — эндотелиальные клетки клапана. Для ослабления и разрушения межклеточных связей в полученной ткани используется коллагеназа II типа — протеолитический фермент, специфически разрушающий пептидные связи в природном коллагене. Для работы готовится раствор коллагеназы в концентрации 2 мкг на 10 мл культуральной среды для VIC, которая состоит из 83 % DMEM — Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, США), 15 % FBS — fetal bovin serum (Gibco, США), 1 % пенициллина/стрептомицина (Invitrogene, США), 1 % L-глутамин (Invitrogene, США). Кроме того, для выделения клеток будут нужны стерильные пробирки 15 мл, флaskи 25 и 75 мл, чашки Петри — 10 см (Corning, США), водяная баня, центрифуга, вортекс, культуральная среда для VIC (описание выше) и ECM — культуральная среда для VEC — готовая среда с ростовыми факторами (ScienCell, США), 0,2 % раствор желатина стерильный.

Вся работа с тканями и клетками производится в ламинаре. После подготовки ламинара и необходимых растворов, пробирку из холодильника переносят в ламинар. Фрагменты ткани переносят в стерильную чашку Петри, промывают створку/створки клапана раствором PBS. Переносят створки в пробирку-фалькон 15 мл с раствором коллагеназы и инкубируют в водяной бане при температуре 37 °С в течение 15 минут в растворе среды для культивирования VIC с коллагеназой. После инкубации отделяют эндотелиальные клетки от ткани с помощью интенсивного минутного встряхивания пробирки с клапаном на Vortex. Раствор с эндотелиальными клетками переносят в новый стерильный 15 мл фалькон, который помещают в центрифугу и откручивают 5 минут при 300g и комнатной температуре (18–22 °С). После откручивания супернатант переносят в пробирку с клапаном, а осажденные эндотелиальные клетки промывают фосфатно-солевым буфером и повторяют откручивание. Отмытые и открученные, с удаленным супернатантом, эндотелиальные

клетки переносят на флак 25 мл, который предварительно покрывают 0,2 % желатином. Помещают флак с клетками в инкубатор при 37 °С при 5 % CO₂. Смену среды производят 2–3 раза в неделю и по достижении клеток 70–80 % конфлюэнтности,

при необходимости, сортируют, затем пересеивают и банкируют либо используют в эксперименте.

Чтобы получить интерстициальные клетки аортального клапана, створки клапана с отделенными эндотелиальными клетками, после водяной

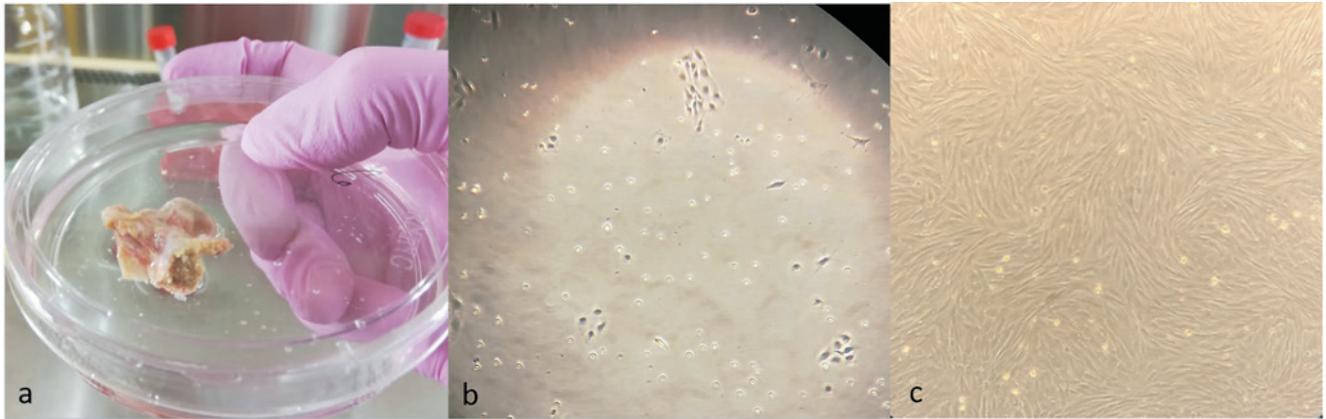


Рис. 1. Операционный материал: а — кальцинированная створка аортального клапана; б, с — клетки, получаемые из ткани створки: б — эндотелиальные клетки, с — интерстициальные клетки

Подготовительный этап

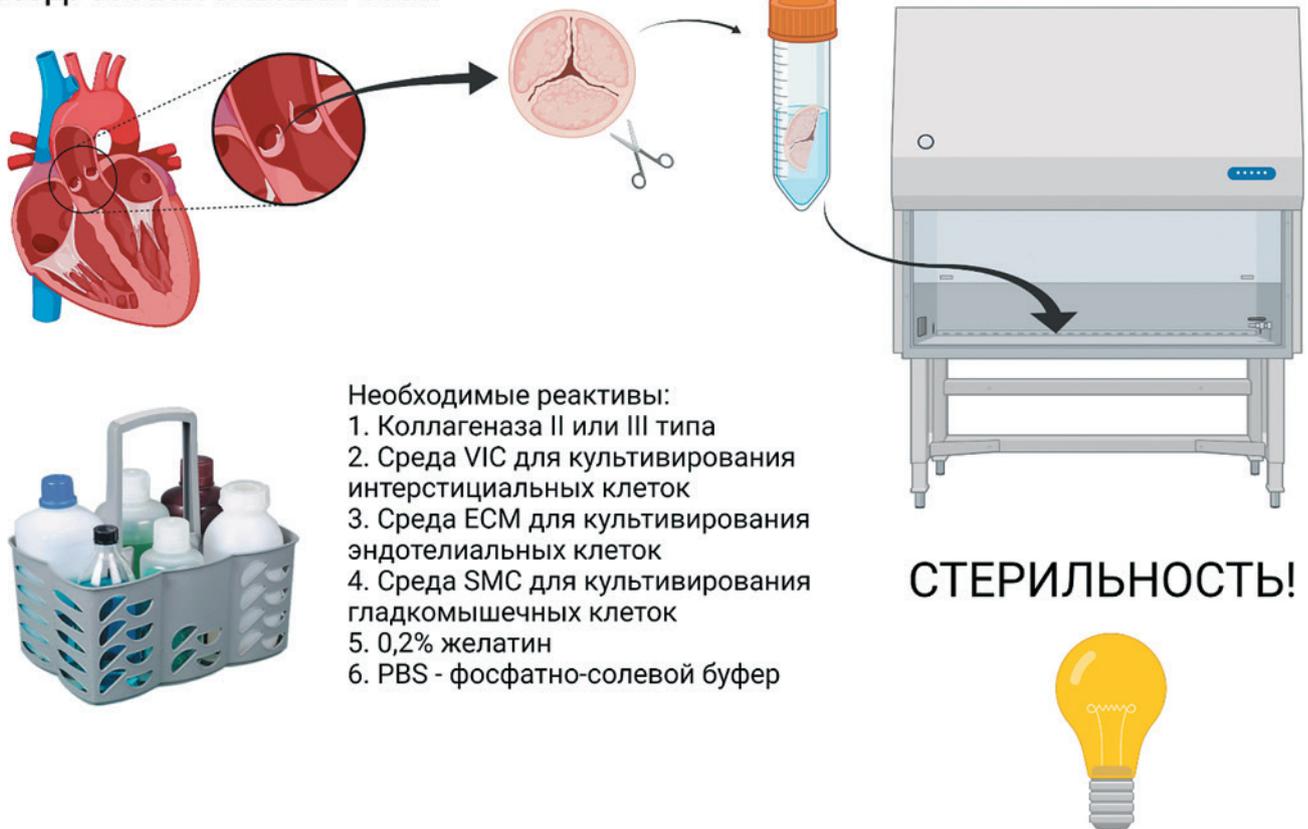


Рис. 2. Шаги подготовительного этапа для молекулярно-биологического исследования операционного материала

бани, инкубируют в растворе коллагеназы 24 часа в инкубаторе при 37 °С при 5 % CO₂. По прошествии 24 часов пробирку с растворенными створками клапана подвергают встряхиванию на Vortex в течение 1 минуты и центрифугированию в течение 5 минут на 300g при комнатной температуре, отбирают надосадочную жидкость, добавляют фосфатно-солевой буфер и процедуру повторяют. Далее удаляют супернатант, к осадку добавляют среду для культивирования, осадок ресуспендируют и переносят на фласк или чашку Петри и помещают в инкубатор при 37 °С при 5 % CO₂. Смену среды производят 2–3 раза в неделю. Пересев клеток производят по достижении клетками 90–95 % конфлюэнтности. Для пересева клетки промывают стерильным PBS, добавляют 5 % раствор трипсина, инкубируют 5 минут при 37 °С, после чего добавляют культуральную среду для ингибирования работы фермента и смывают клетки с чашки Петри. Суспензию клеток центрифугируют 5 минут при 300g. Затем отбирают надосадочную жидкость, добавляют среду для культивирования

и переносят в равных долях на 2–3 чашки Петри, покрытые 0,2 % раствором желатина. После 2–3 пассажей клетки используют для экспериментов и/или замораживают для банкирования (рис. 3).

Выделение первичных культур. SMC (smooth muscle cells) и HAEC (human aortic endothelial cells)

Из тканей аорты выделяют гладкомышечные клетки аорты (SMC) и эндотелиальные клетки аорты (HAEC) [патент RU2529947C2 «Способ получения культуры гладкомышечных клеток». Малашичева А.Б., Костарева А.А., Зверев Д.А., Костина Д.А., Успенский В.Е., Гордеев М.Л., Урусова М.Е., 2014 г.]. Для работы используют стерильный пластик и приборы, описанные выше, ECM среду для HAEC, среду для SMC (78 % DMEM — Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, США), 20 % FBS — fetal bovin serum (Gibco, США), 1 % пенициллин/стрептомицин (Invitrogene, США), 1 % L-глутамин (Invitrogene, США)). Для разрушения межклеточных взаимодействий используют

Выделение VIC и VEC

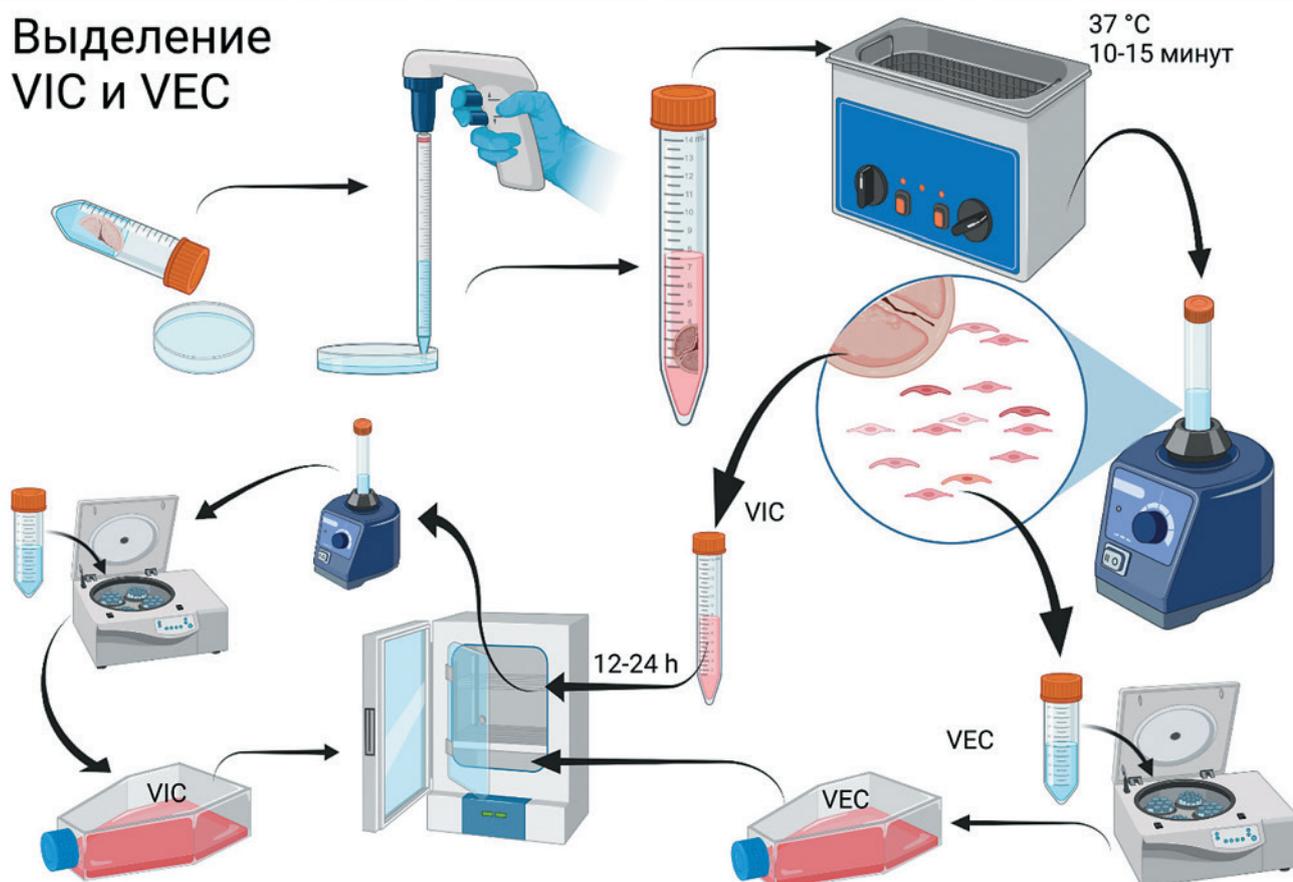


Рис. 3. Этапы выделения интерстициальных и эндотелиальных клеток аортального клапана (схематично)

раствор 1 мкг коллагеназы III в 10 мл среды для VIC (см. выше).

В стерильных условиях переносят ткань аорты на чашку Петри, промывают аорту PBS, снимают адвентицию и очищенную аорту переносят в 15 мл фалькон в раствор коллагеназы, инкубируют в водяной бане при температуре 37 °C в течение 30 минут. После инкубации переносят все содержимое фалькона в новую чашку Петри, аккуратно стерильным скальпелем счищают НАЕС с внутренней гладкой поверхности аорты, смывают оставшиеся клетки с ткани и переносят жидкость в свежий фалькон, который центрифугируют и промывают дважды на тех же условиях, что и VEC. Промытые и открученные клетки, после переноса супернатанта к аорте, ресуспензируются в среде ЕСМ и переносятся на флак 25мл, который помещают в инкубатор при 37 °C при 5 % CO₂. На следующий день клетки на флак аккучатно промываются PBS и далее культивируются в ЕСМ до достижения 70–90 % конfluenceнтности, после чего пересееваются и используются в экспериментах или банкируются.

Для получения гладкомышечных клеток аорты, очищенную от эндотелиальных клеток, помещают в раствор коллагеназы и снова инкубируют в водяной бане при температуре 37 °C в течение 30 минут. Готовят 2 флак 25 мл, наносят на дно флакоч царапины стерильным инструментом. Ткань аорты после инкубации отмывают от раствора коллагеназы с помощью PBS, разрезают на небольшие куски (~ 2 мм) и переносят на царапины флакоч. Аккучатно вносят во флакоч среду для SMC и помещают флакоч в инкубатор при 37 °C при 5 % CO₂ на 1 месяц, меняют среду 2–3 раза в неделю, по достижении 60–80 % конfluenceнтности пересеевают на чашки Петри и после 2–3 пассажей клетки используют для экспериментов и/или замораживают для банкирования.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Орловский П.И., Гриценко В.В., Юхнев А.Д., Евдокимов С.В., Гавриленков В.И. Искусственные клапаны сердца / Под ред. Ю. Л. Шевченко. — СПб: ЗАО «ОЛМА Медиа Групп». — 2007. — С. 9–21.
2. Малашичева А.Б., Костарева А.А., Зверев Д.А., Костина Д.А., Успенский В.Е., Гордеев М.Л., Урсова М.Е. Патент RU2529947C2 «Способ получения культуры гладкомышечных клеток». 2014.

3. Butcher JT, Mahler GJ, Hockaday LA. Aortic valve disease and treatment: The need for naturally engineered solutions // *Advanced Drug Delivery Reviews*. — 2011. — № 63. — P. 242–268. DOI: 10.1016/j.addr.2011.01.008.

4. Misfeld M, Sievers H-H. Heart valve macro — and microstructure // *Philosophical transactions of the royal society*. — 2007. — № 362. — P. 1421–1436. DOI: 10.1098/rtsb.2007.2125.

Информация об авторах:

Боярская Надежда Владимировна, младший научный сотрудник НИГ молекулярных механизмов кальцификации НИЛ заболеваний с избыточной кальцификацией НИЦ неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины», младший научный сотрудник лаборатории регенеративной биомедицины Института цитологии РАН;

Шишкова Анастасия Алексеевна, врач-кардиолог КДО КДЦ ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, младший научный сотрудник НИГ молекулярных механизмов кальцификации НИЛ заболеваний с избыточной кальцификацией НИЦ неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Сапранков Валерий Леонидович, аспирант по специальности «сердечно-сосудистая хирургия» ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Успенский Владимир Евгеньевич, д.м.н., заведующий НИЛ заболеваний аорты и аортального клапана, врач сердечно-сосудистый хирург отделения сердечно-сосудистой хирургии № 1 ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Малашичева Анна Борисовна, д.б.н., старший научный сотрудник НИГ молекулярных механизмов кальцификации НИЛ заболеваний с избыточной кальцификацией НИЦ неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины», заведующий лабораторией регенеративной биомедицины Института цитологии РАН.

Author information:

Boyarskaya Nadezhda V., Junior Researcher, Research Institute of Molecular Mechanisms of Calcification, Research Institute of Diseases with Excessive Calcification, Research Center for Unknown, Rare, and Genetically Caused Diseases, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Junior Researcher, Laboratory of Regenerative Biomedicine, Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences;

Shishkova Anastasia A., cardiologist, CDO CDC, Almazov National Medical Research Centre, Junior Researcher, Research Institute of Molecular Mechanisms of Calcification, Research Institute of Diseases with

Excessive Calcification, Research Center for Unknown, Rare, and Genetically Caused Diseases, World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Saprankov Valery L., post-graduate student in the specialty "cardiovascular surgery" Almazov National Medical Research Centre;

Uspensky Vladimir E., Doctor of Medical Sciences, Head of the Research Laboratory for Aortic and Aortic Valve Diseases, Cardiovascular Surgeon, Department of Cardiovascular Surgery No. 1, Almazov National Medical Research Centre;

Malashicheva Anna B., Doctor of Biological Sciences, Senior Researcher, Research Institute of Molecular Mechanisms of Calcification of the Research Institute of Diseases with Excessive Calcification, Research Center for Unknown, Rare and Genetically Caused Diseases, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Head of the Laboratory of Regenerative Biomedicine, Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences.