



УДК 57.086.82

DOI 10.17802/2306-1278-2020-9-2-114-122

ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ АРТЕРИЙ ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

Д.В. Шарыш ✉, А.В. Марков, М.С. Назаренко

Научно-исследовательский институт медицинской генетики федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Набережная реки Ушайки, 10, Томск, Российская Федерация, 634050

Основные положения

- Проанализированы и систематизированы имеющиеся в литературе подходы к получению отдельных клеток методом дезагрегации артерий животных и человека, в том числе при их поражении атеросклерозом.
- Рассмотрены основы и предложен алгоритм оптимизации данного метода.

Резюме

Ключевым этапом в исследованиях, направленных на изучение роли отдельных типов клеток в функционировании артерий человека *in vivo* как в норме, так и при поражении атеросклерозом, является получение суспензии клеток из стенки кровеносного сосуда. К настоящему времени разработан ряд подходов к дезагрегации артерий. В обзоре систематизированы опубликованные ранее данные и методики, представлен алгоритм оптимизации процедуры дезагрегации артерий, а также описаны возникающие проблемы и способы их решения.

Ключевые слова

Атеросклероз • Дезагрегация тканей • Единичные клетки • Клеточные суспензии • Артерии • Атеросклеротические бляшки

Поступила в редакцию: 13.04.2020; поступила после доработки: 27.04.2020; принята к печати: 10.05.2020

PREPARATION OF CELL SUSPENSIONS FROM ARTERIES AFFECTED WITH ATHEROSCLEROSIS

D.V. Sharysh ✉, A.V. Markov, M.S. Nazarenko

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, 10, Ushayka embankment, Tomsk, Russian Federation, 634050

Highlights

- Available approaches for isolating individual cells by disaggregation of animal and human arteries, including those affected with atherosclerosis, have been described.
- Basic issues are reported along with a novel optimization algorithm.

Abstract

Preparation of cell suspension from arterial walls is a key issue in planning the research aimed at studying the role of individual cell types in human arteries *in vivo*, both normal and affected with atherosclerosis. To date, there is a range of approaches for disaggregating arterial tissues. In this review, we report previously published data and techniques for disaggregating arterial tissues. In addition, an algorithm able optimizing the disaggregation of arteries is proposed taking into account emerging problems and probable solutions.

Keywords

Atherosclerosis • Tissue disaggregation • Single cells • Cell suspension • Arteries • Atherosclerotic plaques

Received: 13.04.2020; received in revised form: 27.04.2020; accepted: 10.05.2020

Список сокращений

АБ – атеросклеротическая бляшка ЭК – эндотелиальная клетка
ГМК – гладкомышечная клетка

Для корреспонденции: Диана Владимировна Шарыш, sharysh.diana@gmail.com; адрес: Набережная реки Ушайки, 10, Томск, Россия, 634050

Corresponding author: Diana V. Sharysh, sharysh.diana@gmail.com; address: 10, Ushayka embankment, Tomsk, 634050, Russian Federation

Введение

Атеросклероз представляет собой хронический воспалительный процесс артерий среднего и крупного размера, который характеризуется образованием бляшек, состоящих из различных клеток: пенных, иммунных, эндотелиальных и гладкомышечных, тромбоцитов, – а также внеклеточного матрикса и богатого липидами ядра с обширным некрозом и фиброзом окружающих ядро тканей сосудистой стенки [1].

Данные о клеточных и молекулярных механизмах атерогенеза получены в основном с использованием цельных образцов атеросклеротической бляшки (АБ) либо клеточных культур. Известно, что с изменением напряжения сдвига эндотелиальные клетки (ЭК) приобретают проатеросклеротический фенотип, что делает их более проницаемыми для липидов. Далее накопленные в интиме липиды активируют в ЭК синтез провоспалительных цитокинов, происходит запуск воспаления, а значит, рекрутирование иммунокомпетентных клеток. Каждый из отдельных типов клеток воспаления способствует атерогенезу. За представление атерогенных антигенов Т-клеткам отвечают дендритные клетки, которым, в свою очередь, их презентируют макрофаги. Последние, наравне с гладкомышечными клетками (ГМК), поглощают липиды, превращаясь в пенные клетки. Перечисленные типы клеток активно секретируют провоспалительные цитокины. Однако на воспаление реагируют и резидентные клетки стенки артерии: ГМК активно пролиферируют и мигрируют из меди в интиму, участвуя в образовании покрышки АБ. Таким образом, определены роль и функциональные изменения клеток артерии при развитии атеросклероза, однако детальные молекулярные механизмы, лежащие в основе таких изменений, всецело не описаны и остаются предметом активного изучения.

Необходимо понимать, что эти знания получены при моделировании отдельных звеньев атерогенеза на клеточных культурах либо при изучении цельных АБ человека и модельных животных с превращением их в гомогенат или секционированием для гистологии и иммунофенотипирования. В настоящее время мы находимся на этапе перехода к изучению функционирования отдельных типов клеток или даже единичных клеток, непосредственно участвующих в развитии атеросклеротической бляшки *in vivo*. Это связано, прежде всего, с поиском фармакологических мишеней, участвующих в клеточно-специфичных молекулярно-биологических путях. Воздействуя на целевые клетки, например только на макрофаги, а не подавляя воспаление в целом, можно избежать множества побочных эффектов. Ранее были обозначены несколько перспективных в отношении фармакологического воздействия зве-

ньев атерогенеза: молекулярные механизмы дисфункции и повреждения ЭК [2]; несовершенный эффероцитоз в макрофагах и роль отдельных субпопуляций данного типа клеток [1]; переключение фенотипа, миграция и пролиферация ГМК [3].

Таким образом, изучение отдельных клеток, принимающих непосредственное участие в атеросклерозе, является следующим этапом исследований в сосудистой биологии, который достигается методически через преобразование цельного кровеносного сосуда в клеточную суспензию (деагрегацию артерий на клетки). Выделение популяций отдельных типов клеток из органов/тканей человека и модельных животных остается проблемой в клеточной биологии. Тем не менее в последнее время достигнут значительный прогресс в получении отдельных типов клеток из твердых или высокоплотных по структуре тканей благодаря использованию различных методов, таких как ферментативное расщепление и механическая деагрегация.

Однако общего источника сведений об этих способах нет – традиционно исследователи используют тот метод, который апробирован в их лаборатории, не применяя доказательную базу. Обзор посвящен обобщению имеющихся в литературе данных по деагрегации кровеносных сосудов с описанием ключевых этапов данной процедуры, а также оптимизации методики деагрегации клеток в лаборатории.

Основные подходы к деагрегации клеток артерий

Для изоляции отдельных клеток (или отдельных типов клеток) из плотных тканей разработаны различные подходы, основанные на их физических или биологических свойствах. На схеме (рис. 1) представлены наиболее часто применяемые методы анализа клеточного состава артерий или других плотных тканей.

Для изоляции отдельных популяций клеток наиболее часто используют поверхностные маркерные

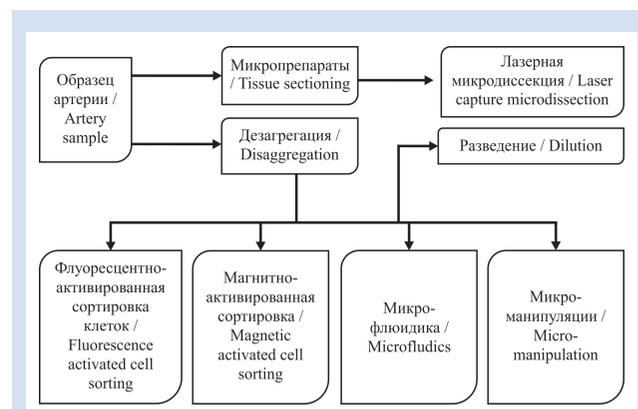


Рисунок 1. Методы получения различных клеточных типов или единичных клеток из цельных образцов тканей

Figure 1. Methods of isolation of various cell types or single cells from bulk tissue

белки и реакцию «антиген – антитело». Данный принцип лежит в основе методов иммуногистохимии (иммунофлуоресценции) и последующей лазерной микродиссекции отдельных областей с клетками в срезе ткани, а также методов флуоресцентно- и магнитно-активированной сортировки клеток и некоторых методов с использованием микрофлюидных систем (cell-affinity chromatography based microfluidic). Если необходимо получить информацию о расположении клеток в исследуемом образце ткани, то рекомендуется использовать гистологические техники, иммуногистохимию (иммунофлуоресценцию) и изолировать часть микропрепарата, содержащую целевые клетки, посредством лазерной микродиссекции. Этот метод имеет ряд ограничений в отношении исследования клеток атеросклеротической бляшки из-за кальцинации стенок артерии, часто сопровождающей атерогенез.

В случае когда нужно изолировать клетки из образца ткани без одновременного изучения его гистологического строения, можно воспользоваться широким спектром методов, включающим предварительный этап дезагрегации ткани. Данный набор методов является наиболее распространенным, так как обеспечивает наибольший выход клеток. Самый распространенный метод флуоресцентно-активированной сортировки клеток заключается в предварительном связывании маркерных молекул клеток антителами, конъюгированными с флуоресцентной меткой, которая распознается детекторами специального прибора – клеточного сортера. Наиболее простым методом является магнитно-активированная сортировка клеток, в которой антитела конъюгированы с магнитными частицами, а целевые клетки выделяются из клеточной суспензии под действием магнитного поля. В последнее время активно развиваются методы с использованием микрофлюидных систем, основанные на пропускании клеточной суспензии через систему микроканалцев, позволяющих разделить клетки и с использованием различных принципов выделить нужный тип клеток. Микроманипуляции и разведение клеток – редко применяемые методы ввиду их трудоемкости и низкой эффективности [4, 5].

Таким образом, наиболее распространенные методы получения единичных клеток из плотных тканей требуют предварительного этапа дезагрегации. Кроме того, клеточная дезагрегация приобретает особую актуальность в активно развивающемся направлении мультиомного изучения единичных клеток (с использованием технологий single-cell). Методика дезагрегации представляет собой процесс разрушения межклеточного матрикса с высвобождением клеток, а цель оптимизации процесса – максимально полно изолировать клетки из нативной структуры ткани или органа с сохранением их функциональных свойств и жизнеспособности [6]. Существуют два подхода к этому этапу: механический и ферментативный.

На сегодняшний день в литературе не описаны методы применения механической дезагрегации артерий до клеток, вероятно, из-за высокой плотности самой ткани и прочности структуры внеклеточных волокон, которые не удается разрушить растяжением (с помощью гомогенизатора Даунса) или протиранием через металлическое сито с заостренными краями ячеек (например, с помощью прибора Medimachine System, Becton Dickinson, США).

Ферментативный способ дезагрегации заключается в обработке цельного образца ткани различными протеазами, разрушающими белки-компоненты межклеточного матрикса (коллагены, эластин, протеогликаны и так далее). При проведении дезагрегации необходимо учитывать многие параметры: 1) тип исследуемого кровеносного сосуда; 2) источник материала (человек, мышь и так далее); 3) возможные генетические модификации объекта исследования; 4) среда для дезагрегации; 5) используемые ферменты, примеси в неочищенном ферментном препарате; 6) концентрации используемых ферментов; 7) температура инкубации с ферментативным коктейлем; 8) время инкубации; 9) особенности проведения дезагрегации (помешивание, пипетирование, центрифугирование). При известном дизайне эксперимента первые три пункта, как правило, неизменны, однако их надо учитывать при подборе условий. Эффективная дезагрегация ткани достигается варьированием оставшихся параметров.

Методика ферментативной дезагрегации

В общем виде схема методики ферментативной дезагрегации выглядит следующим образом: к измельченному образцу добавляют протеазы и, возможно, другие ферменты, инкубируют образец с ферментной смесью в течение установленного времени для лизирования межклеточного матрикса, после чего фильтруют полученную суспензию через клеточный фильтр и центрифугируют для осаждения изолированных клеток.

Каждый шаг данной схемы требует подбора условий. Подбор состава ферментной смеси – ключевой этап успешной дезагрегации. Ферментная смесь состоит из протеолитических и добавочных ферментов и среды, а также иногда добавляются дополнительные вещества. Следует учитывать особенности строения используемого биологического материала – артерий и АБ человека или животных. Известно, что артерии по строению делятся на эластический, мышечно-эластический (смешанный) и мышечный типы. Соответственно, первые два типа артерий требуют введения дополнительного фермента при дезагрегации – эластазы.

Основные ферментные препараты

Обычно используют неочищенные ферментные смеси, такие как коллагеназа, либеразы и диспаза.

Они содержат несколько протеаз (коллагеназу, клострипаин, казеиназу, трипсиноподобные ферменты) в различных концентрациях, а также различные полисахаридазы, нуклеазы и липазы, однако известны только приблизительные количество и активность этих ферментов [6].

Коллагеназы (collagenases). Коллагеназы являются самым часто используемым ферментом для дезагрегации как артерий, так и других тканей [7, 8]. Они представляют собой эндопептидазы, которые переваривают нативный коллаген в области тройной спирали. Коллагены являются основным волокнистым компонентом внеклеточной соединительной ткани животных. Бактериальные коллагеназы наиболее подходят для дезагрегации, так как они проявляют более широкую субстратную специфичность [6]. Наиболее активной коллагеназой является неочищенная, секретируемая анаэробными бактериями *Clostridium histolyticum*. Способность клостридиальных коллагеназ переваривать нативные, тройно-спиральные коллагены типов I, II и III до небольших пептидов является их основным преимуществом. Это достигается путем множественных разрывов в тройной спирали. У каждой фирмы-производителя (основные – Sigma-Aldrich / Merck, Worthington Biochemical Corp., в России – «ПанЭко») имеется свой набор коллагеназ и ферментных смесей, но в целом их можно разделить на четыре основных типа (табл. 1). Помимо основных типов ферментных препаратов в каталоге Sigma-Aldrich имеются коллагеназы V, VIII и XI типов, последняя из которых указана как обладающая наибольшей коллагеназной активностью, однако исследователи обнаружили потерю (от 40 до 90%) поверхностных маркеров клеток при ее использовании [9].

Чаще всего коллагеназы поставляются в лиофилизированном виде. Наиболее подходящим буфером для разведения лиофилизата является раствор Кребса – Рингера, но допустимо использование других буферов (например, раствора Хэнкса). Обязательными для функционирования коллагеназы являются присутствие ионов кальция и оптимальный pH (обычно приводятся в рекомендациях производителя ферментного препарата). Желательно готовить раствор *ex tempore*, однако допускается его аликвотирование и хранение при -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание коллагеназы может привести к значительной потере активности фермента.

Либеразы (Liberase). Коммерческая смесь высокоочищенных коллагеназ I и II типов, почти лишенная клострипаиновой и трипсиновой активностей, но с повышенной коллагеназной активностью [10, 11]. Однако сравнение либеразы и коллагеназы XI типа не показало значимых различий в эффективности дезагрегации клеток поджелудочной железы [12]. Отмечено, что либеразы DL (Sigma-Aldrich / Merck) вызывает потерю CD4 с поверхности клеток [9].

Диспаза (Dispase). Нейтральная протеаза, расщепляющая фибронектин и коллаген IV типа. Используется как альтернатива более агрессивному трипсину в культуральных методах и при дезагрегации клеток мыши [13, 14].

Трипсин (Trypsin). Трипсин представляет собой сериновую протеазу, продуцируемую и секретируемую в виде неактивного трипсиногена в поджелудочной железе. Он неспецифично расщепляет адгезивные белки [15] и поэтому является стандартным ферментом для отделения адгезированных клеток от подложки (трипсинизации) при культивировании. В современных исследованиях с применением методов

Таблица 1. Основные типы ферментных препаратов, представленных на рынке под названием «коллагеназа»
Table 1. Main types of commercially available collagenases

Тип коллагеназы / Type of collagenase	Особенности / Brief description	Рекомендуемые для обработки типы тканей / Recommended types of tissue
Тип I / Type I	Наиболее часто применяемый тип коллагеназы; содержит умеренное количество пептидаз (коллагеназу, казеиназу, клострипаин и трипсиноподобные ферменты) / The most commonly used type of collagenase; it contains moderate amounts of peptidases (collagenase, caseinase, clostripain and trypsin-like enzymes)	Жировая ткань, надпочечники и печень, сосуды, опухолевые ткани / Adipose tissue, adrenal glands and liver, blood vessels, tumor tissue
Тип II / Type II	Имеет большую (по сравнению с коллагеназой I типа) активность клострипана / It has a greater (compared with type I collagenase) clostripain activity	Сердце, кости, мышечная ткань, щитовидная железа, хрящи, печень, кровеносные сосуды / Heart, bones, muscle tissue, thyroid gland, cartilage, liver, blood vessels
Тип III / Type III	Используется достаточно редко; содержит низкую протеолитическую активность / It is rarely used; possesses low proteolytic activity	Молочная железа, ткани плода, слизистые ткани / Breast, fetal tissues, mucous tissues
Тип IV / Type IV	Имеет низкую трипсиноподобную активность / It has a low trypsin-like activity	Островки Лангерганса и случаи, когда необходимо максимально сохранить поверхностные маркеры интактными [7] / Langerhans islands and cases when it is necessary to keep surface markers as intact as possible [7]

дезагрегации тканей трипсин практически не используют изолированно ввиду его слабой эффективности при расщеплении внеклеточных волокон, но его можно встретить в ферментных смесях – с коллагеназой и диспазой [14]. Кроме того, трипсин способен достаточно активно разрушать клеточные маркеры [16].

Дополнительные ферментные препараты

Эластаза. Данный компонент необходимо добавлять в ферментную смесь для повышения эффективности дезагрегации артерий, если артериальная стенка богата эластином (аорта, общая сонная артерия).

ДНКаза. При измельчении биологического образца перед инкубацией, как и во время инкубации измельченной ткани в ферментной смеси, из разрушенных клеток в культуральную среду поступает внеклеточная ДНК. Она адгезируется на поверхности клеток и вызывает их слипание. Для более эффективной дезагрегации ткани и получения синглетных клеток для дальнейшего анализа (например, проточной цитометрии или сортирования) в ферментную смесь необходимо добавлять ДНКазу [6].

Гиалуронидаза. Гиалуроновая кислота и хондроитинсульфат обильно представлены в составе межклеточного матрикса соединительных тканей и кровеносных сосудов. В связи с этим исследователи добавляют этот фермент в состав смеси для дезагрегации тканей [7, 10].

Другие реагенты

Трипсиновый ингибитор. Трипсиновый ингибитор, полученный из сои, нередко вводится в состав смесей для дезагрегации [8, 17, 18]. Это связано, вероятно, с повреждающим действием трипсина, находящегося в составе неочищенной коллагеназы, на поверхностные маркеры клеток. При использовании неочищенных ферментных препаратов следует это учитывать и добавлять трипсиновый ингибитор.

Среда для дезагрегации

Для поддержания жизнеспособности клеток и активности ферментов в течение инкубации ферменты и образец должны находиться в подходящих по физико-химическим и биологическим параметрам условиях. В первую очередь, среда должна быть буферным раствором с нейтральным pH, желательным с присутствием ионов кальция, так как он является кофактором многих протеаз. В опубликованных протоколах используются в основном фосфатно-солевой буферный раствор Дульбекко (DPBS) с кальцием и 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислотой (HEPES) либо различные питательные среды (DMEM, RPMI и др.) в зависимости от типа клеток и цели последующего использования полученной клеточной суспензии.

Условия инкубации

Критически важными параметрами дезагрегации являются температура и длительность культивирования образца ткани с ферментной смесью. Ферменты для дезагрегации наиболее активны при 37 °С. Время инкубации – второй по значимости параметр после состава ферментной смеси. Для его определения следует понимать, что ферменты работают на поверхности образца. Соответственно, чем больше площадь поверхности, тем быстрее клетки высвобождаются из структуры ткани. С другой стороны, ферменты воздействуют на клетки и могут активировать апоптоз. В литературе параметр времени варьирует от 30 мин до 8 ч (инкубация на ночь). Время инкубации образца с ферментной смесью определяется задачами эксперимента. Короткого промежутка времени хватит, чтобы отделить эндотелиоциты при залипании ферментной смеси в клипированный кровеносный сосуд [19]. В большинстве случаев для высвобождения клеток артерий в достаточном количестве (несколько миллионов) достаточно 1 ч [7]. Чтобы наиболее эффективно освободить клетки из ткани, но при этом не уменьшить долю жизнеспособных клеток, можно несколько раз проводить процедуру с одним и тем же образцом, заменяя ферментную смесь с клетками через 1–2 ч [20]. При недостаточном высвобождении клеток или их низкой жизнеспособности необходима коррекция параметров дезагрегации.

Контроль результатов дезагрегации

Проверка результата дезагрегации заключается в оценке полноты лизирования ткани, а также количества, жизнеспособности и функционального состояния полученных клеток. После получения клеточного осадка и его ресуспендирования обзор осадка можно провести в камере Горяева или с помощью автоматического счетчика клеток с окраской витальными красителями (например, трипановым синим). Производится подсчет жизнеспособных и мертвых клеток, оценивается чистота суспензии по наличию нерасщепленных клеточных конгломератов, волокон, кристаллов или иных нежелательных контаминантов.

Оценка функционального состояния клеток заключается в проверке действия ферментативного коктейля на изучаемые свойства. Например, коллагеназа I типа активна в отношении некоторых поверхностных маркеров лейкоцитов [9]. Для проверки действия ферментной смеси на клетки возможно использовать в качестве контроля изначально жидкую ткань, например кровь. Анализ клеток крови до и после дезагрегации позволяет оценить повреждающее действие планируемых к использованию ферментов.

Оценка полноты лизирования ткани особенно важна, если необходимо получить репрезентативный набор тех же типов клеток, которые составляли

исследуемый образец ткани. Для этого гистологическими методами можно проанализировать у оставшихся «непереваренных» фрагментов образца наличие, количество и тип остаточных клеток [21].

Разработанные протоколы дезагрегации клеток артерий и атеросклеротических бляшек

Как отмечено ранее, обычно исследователи используют те протоколы, которые оптимизированы и апробированы непосредственно в их лаборатории. К настоящему времени накоплено достаточно данных по дезагрегации клеток артерий и АБ. Вместо того чтобы самостоятельно разрабатывать протокол клеточной дезагрегации с нуля, рекомендуется взять за основу уже опубликованный протокол и оптимизировать его под конкретный набор ферментов, сред и других компонентов ферментной смеси, а также спектр оборудования и расходных материалов, которым располагает лаборатория. В табл. 2 представлены опубликованные ранее протоколы по дезагрегации клеток артерий и атеросклеротических бляшек.

Алгоритм оптимизации дезагрегации образцов артерий, в том числе при их атеросклеротическом поражении

Подбор оптимальной концентрации ферментов

Даже при использовании существующих рекомендаций о составе ферментной смеси из конкретного источника литературы непосредственно для каждого эксперимента требуется определить концентрации ферментов, так как их активность варьирует между партиями ферментного препарата одного и того же производителя.

В случае использования одного фермента в смеси для дезагрегации следует сначала проверить действие фермента в меньших концентрациях с определенным шагом приращения: например, 25, 50, 75 и 100% референсных значений концентрации, взятых из источника литературы.

При использовании нескольких ферментов в смеси сначала следует оптимизировать концентрацию основного фермента (количество которого должно быть наибольшим) согласно вышеописанной стратегии, после чего ввести в смесь оставшиеся ферменты, оптимизируя их концентрации одну за другой (рис. 2) [6].

Трудности при дезагрегации артерий и способы их решения

Результаты дезагрегации артерий, видимые в микроскоп, можно разделить на оценку выделения клеток (их количество и жизнеспособность) и нежелательных примесей, которые могут присутствовать из-за некротического дебриса АБ, недостаточной дезагрегации или образования конгломератов вследствие выхода ДНК из разрушенных клеток.

Эффективность дезагрегации тканей, в том числе

артерий, определяется получением большого количества жизнеспособных клеток. Однако в результате оптимизации может возникнуть три проблемных ситуации: клеток мало (менее 1 млн), но они жизнеспособны (>50–70% в зависимости от дальнейших этапов); клеток мало (менее 1 млн) и они не жизнеспособны (<50%); клеток достаточно много (более 1 млн) при их низкой жизнеспособности (рис. 2) [6]. Возможные пути решения проблем, возникающих при дезагрегации артерий, рассмотрены далее.

Низкий выход, но большинство клеток жизнеспособны – повысить время инкубации и/или концентрацию коллагеназы (или другого фермента, дезагрегирующего клетки), добавить дополнительный дезагрегирующий фермент. Возможно, что низкая клеточность обусловлена слипанием клеток – в таком случае необходимо добавить ДНКазу.

Высокий выход, мало жизнеспособных клеток – понизить концентрацию коллагеназы и/или время инкубации, добавить в смесь для дезагрегации бычий сывороточный альбумин (BSA), эмбриональную телячью сыворотку (FBS) или трипсиновый ингибитор, уменьшить количество оборотов при перемешивании суспензии.

Низкий выход, мало жизнеспособных клеток – возможно, что низкий выход клеток обусловлен их разрушением чрезмерно активной коллагеназой: следует снизить концентрацию коллагеназы. Если добиться увеличения выхода клеток не удастся, то нужно сменить тип коллагеназы на более щадящий (например, тип IV).

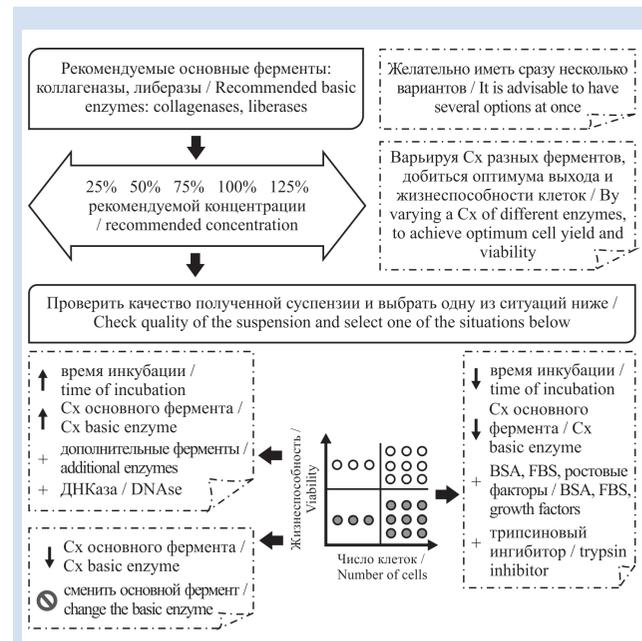


Рисунок 2. Алгоритм оптимизации дезагрегации артерий и атеросклеротических бляшек

Примечание: ДНКаза – дезоксирибонуклеаза; Cx – концентрация; BSA – бычий сывороточный альбумин; FBS – эмбриональная телячья сыворотка.

Figure 2. Optimization of artery and atherosclerotic plaque disaggregation

Note: BSA – bovine serum albumin; Cx – concentration; DNase – deoxyribonuclease; FBS – fetal bovine serum.

Таблица 2. Основные условия ферментативной дезагрегации артерий животных и человека
Table 2. General conditions for enzyme disaggregation of animal and human arteries

Образец / Sample	Состав ферментной смеси / Composition of enzyme mixture	Время инкубации / Time of incubation	Источник литературы / Reference
Атеросклеротические бляшки кролика / RAP	450 Ед/мл коллагеназы I типа, 4,7 Ед/мл эластазы, 1,0 мг/мл трипсिनного ингибитора в HBSS / 450 U/ml collagenase I, 4,7 U/ml elastase, 1,0 mg/ml trypsin inhibitor in HBSS	4 раза по 1 ч / 4 times for 1 h	Galis Z.S., 1995 [22]
Атеросклеротические бляшки человека / HAP	1–1,25 мг/мл коллагеназы IV типа с 0,2 мг/мл ДНКазы в среде RPMI / 1 – 1,25 mg/ml collagenase IV, 0,2 mg/ml DNase in RPMI	1 ч / 1 h	Grivel J.-Ch., 2011 [9]
	450 Ед/мл коллагеназы IV типа, 500 Ед/мл ДНКазы, 1 мг/мл трипсिनного ингибитора в HBSS с 4,8 мг/мл HEPES / 450 U/ml collagenase IV, 500 U/ml DNase, 1,0 mg/ml trypsin inhibitor in HBSS with 4,8 mg/ml HEPES	30–60 мин / 30–60 min	Patino W.D., 2006 [18]
	1 мг/мл коллагеназы IV типа, 0,3 мг/мл ДНКазы, гиалуронидазы, коллагеназы II, XI типов в DMEM с 10% FBS / 1 mg/ml collagenase IV, 0,3 mg/ml DNase, hyaluronidase, collagenases II, XI each, in DMEM with 10% FBS	1 ч / 1 h	Fernandez D.M., 2019 [23]
Аорта человека / HAO	1 мг/мл коллагеназы II типа в среде M213 / 1 mg/ml collagenase II in M213	3 ч / 3 h	Meekel J.P., 2018 [24]
	450 Ед/мл коллагеназы IV типа с 1 мг/мл трипсिनного ингибитора в 4,8 мг/мл HEPES в HBSS / 450 U/ml collagenase IV, 1,0 mg/ml trypsin inhibitor in HBSS with 4,8 mg/ml HEPES	По 15 мин в течение 3 ч / Every 15 min during 3 h	Mattsson L., 1991 [17]
Артерии человека / HA	2 мг/мл коллагеназы I типа в HBSS / 2 mg/ml collagenase I in HBSS	15 мин (ЭК), 30 мин (ГМК) / 15 min (ECs), 30 min (SMCs)	Moss S.C., 2007 [25]
Аорта мыши / MAO	1 мг/мл коллагеназы I типа, 0,1875 мг/мл эластазы, 0,25 мг/мл трипсिनного ингибитора в среде для роста ГМК / 1 mg/ml collagenase I, 0,1875 mg/ml elastase, 0,25 mg/ml trypsin inhibitor in medium containing SMCs growth factors	3–4 ч / 3–4 h	Kwartler C.S., 2016 [8]
	1 мг/мл коллагеназы IV типа, 1 Ед/мл свиной эластазы в DMEM / 1 mg/ml collagenase IV, 1 U/ml porcine elastase in DMEM	1–2 ч / 1–2 h	Dobnikar L. 2018 [26]
	2 мг/мл коллагеназы II типа в DMEM / 2 mg/ml collagenase II in DMEM	45 мин (ЭК), 2 ч (ГМК) / 45 min (ECs), 2 h (SMCs)	Kobayashi M., 2005 [19]
	450 Ед/мл коллагеназы I типа, 125 Ед/мл коллагеназы XI типа, 60 Ед/мл гиалуронидазы в RPMI / 450 U/ml collagenase I, 125 U/ml collagenase XI, 60 U/ml hyaluronidase in RPMI	40 мин / 40 min	Cochain C., 2018 [27]
	1,4 мг/мл коллагеназы II типа в среде для культивирования ГМК / 1,4 mg/ml collagenase II in medium for SMCs	4–6 ч / 4–6 h	Metz R.P., 2012 [28]
	450 Ед/мл коллагеназы I типа, 125 Ед/мл коллагеназы XI типа, 60 Ед/мл гиалуронидазы, 60 Ед/мл ДНКазы I типа в PBS с 20 ммоль/л HEPES / 450 U/ml collagenase I, 125 U/ml collagenase XI, 60 U/ml hyaluronidase, 60 U/ml DNase I in PBS with 20 mM HEPES	1 ч / 1 h	Galkina E., 2006 [7]
Атеросклеротические бляшки мыши / MAP	4 Ед/мл либеразы TH, 60 Ед/мл гиалуронидазы, 0,1 мг/мл ДНКазы в DPBS / 1,25 mg/ml Liberase TM in medium with thermolysin	1 ч / 1 h	Tang J., 2015 [10]
Фетальный артериальный проток крысы / Rat FDA	1 мг/мл коллагеназы II типа, 0,2 мг/мл эластазы, 0,5 мг/мл трипсिनного ингибитора, 0,1 мг/мл ДНКазы типа I, 2 мг/мл БСА в среде для культивирования ГМК / 1 mg/ml collagenase II, 0,2 mg/ml elastase, 0,5 mg/ml trypsin inhibitor, 0,1 mg/ml DNase I, 2 mg/ml BSA in medium for SMCs	На ночь / Overnight	Weber S.C., 2011 [29]
Артерии крысы / RA	1,25 мг/мл либеразы TM в среде с термолизином / 1,25 mg/ml liberase TM in medium with thermolysin	1,5 ч / 1,5 h	Radziwon-Balicka A., 2017 [30]
Аорта свиньи / PAO	ЭК: 25 Ед/мл диспазы в DMEM, 1% пенициллин; ГМК: 0,2% (в/о) коллагеназы I типа в первые 1,5 ч, потом 0,1% (в/о) коллагеназы I типа, DMEM / ECs: 25 U/ml dispase in DMEM with 1% penicillium SMCs: 0,2% (w/v) collagenase I in first 1,5 h, then 0,1% mix	8–10 мин (ЭК) 1,5 ч, потом 10 ч (ГМК) / 8–10 min (ECs), 10 h (SMCs)	Beigi F., 2017 [20]

Примечание: БСА – бычий сывороточный альбумин; ГМК – гладкомышечные клетки; ДНКазы – дезоксирибонуклеаза; ЭК – эндотелиальные клетки; DMEM – модифицированная по способу Дюльбекко среда Игла; DPBS – фосфатно-солевой буферный раствор Дюльбекко; HBSS – сбалансированный солевой раствор Хэнкса; HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота; PBS – фосфатно-солевой буферный раствор; RPMI – среда, разработанная Roswell Park Memorial Institute medium.
Note: BSA – bovine serum albumin; DNase – deoxyribonuclease; ECs – endothelial cells; FDA – rat fetal ductus arteriosus; HA – human arteries; HAO – human aorta; HAP – human atherosclerotic plaques; MAO – murine aorta; MAP – murine atherosclerotic plaques; PAO – porcine aorta; RA – rat arteries; RAP – rabbit atherosclerotic plaques; SMCs – smooth muscle cells.

Присутствие нежелательных примесей

1. Бесструктурные конгломераты клеток – это следствие выхода ДНК из разрушенных клеток, вызывающее их слипание. Решение – введение ДНКазы в ферментативный коктейль. Также следует уменьшить механическое повреждение тканей при измельчении.

2. Непереваренные участки ткани – для устранения данной проблемы необходимо увеличить время инкубации и/или концентрацию фермента. Если недорасщепленные участки остаются, ввести дополнительные ферменты: гиалуронидазу или коллагеназу другого типа.

3. Некротический дебрис. Проблема присутствия дебриса в суспензиях, полученных из атеросклеротических бляшек, стоит достаточно остро, так как он обладает аутофлуоресценцией [21]. Возможно ручное отделение дебриса и кальциатов от мягких тканей кровеносного сосуда при его секции и тщательном препарировании, а также использование неокрашенного контроля при проточной цитофлуориметрии для детекции аутофлуоресценции.

Заключение

Дезагрегация артерий является актуальной задачей, эффективное решение которой позволяет выйти на новый уровень изучения атеросклероза – уровень

единичных клеток, поскольку именно патологические изменения в каждом отдельном типе клеток (а также отдельных подтипах клеток) определяют стадию, тяжесть течения и осложнения атеросклероза.

Главной проблемой дезагрегации артерий и атеросклеротических бляшек в частности является отсутствие системы, помогающей исследователю сориентироваться в существующем многообразии подходов, что порождает целый ряд проб и ошибок и существенно увеличивает время, необходимое на исследование. Накопленные сведения и опыт, обобщенные в настоящем обзоре, помогут сориентироваться исследователям, сталкивающимся с задачей получения отдельных клеток из образцов артериальной стенки с целью изучения патологических процессов и механизмов атерогенеза на уровне единичных клеток или отдельных типов клеток.

Конфликт интересов

Д.В. Шарыш заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.В. Марков заявляет об отсутствии конфликта интересов. М.С. Назаренко заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ № 17-75-10146.

Информация об авторах

Шарыш Диана Владимировна, аспирант, лаборант-исследователь лаборатории Научно-исследовательского института медицинской генетики федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Томск, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0003-2173-2772

Марков Антон Владимирович, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории Научно-исследовательского института медицинской генетики федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Томск, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-5824-6439

Назаренко Мария Сергеевна, доктор медицинских наук, руководитель лаборатории Научно-исследовательского института медицинской генетики федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Томск, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-0673-4094

Вклад авторов в статью

ШДВ – вклад в дизайн исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

МАВ – вклад в дизайн исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

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

Author Information Form

Sharysh Diana V., PhD student, laboratory assistant at the Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Science, Tomsk, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-2173-2772

Markov Anton V., PhD, researcher at the Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Science, Tomsk, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-5824-6439

Nazarenko Mariya S., PhD, Head of the Laboratory, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Science, Tomsk, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-0673-4094

Author Contribution Statement

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

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

NMS – contribution to the design of the study, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Tabas I., García-Cardeña G., Owens G.K. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol.* 2015;209(1):13. doi: 10.1083/jcb.201412052.
2. Gimbrone M.A., García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016 Feb 19;118(4):620–36. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301
3. Bennett M.R., Sinha S., Owens G.K. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Circ Res.* 2016 Feb 19;118(4):692–702. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306361
4. Gross A., Schoendube J., Zimmermann S., Steeb M., Zengerle R., Koltay P. Technologies for Single-Cell Isolation. *Int J Mol Sci.* 2015 Aug;16(8):16897–919. doi: 10.3390/ijms160816897.
5. Hu P., Zhang W., Xin H., Deng G. Single Cell Isolation and Analysis. *Front Cell Dev Biol [Internet].* 2016 Oct 25 [cited 2019 May 10];4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5078503/>
6. Worthington Tissue Dissociation Guide [Internet]. [cited 2019 May 10]. Available from: <http://www.worthington-biochem.com/tissuedissociation/basic.html>
7. Galkina E., Kadl A., Sanders J., Varughese D., Sarembock I.J., Ley K. Lymphocyte recruitment into the aortic wall before and during development of atherosclerosis is partially L-selectin dependent. *J Exp Med.* 2006 May 15;203(5):1273–82. doi: 10.1084/jem.20052205
8. Kwartler C., Zhou P., Kuang S.-Q., Duan X.-Y., Gong L., Milewicz D. Vascular Smooth Muscle Cell Isolation and Culture from Mouse Aorta. *BIO-Protoc [Internet].* 2016 [cited 2019 May 10];6(23). Available from: <https://bio-protocol.org/e2045>
9. Grivel J.-C., Ivanova O., Pinegina N., Blank P.S., Shpektor A., Margolis L.B., Vasilieva E. Activation of T lymphocytes in atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Dec;31(12):2929–37. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.237081
10. Tang J., Lobatto M.E., Hassing L., van der Staay S., van Rijns S.M., Calcagno C., Braza M.S., Baxter S., Fay F., Sanchez-Gaytan B.L., Duivenvoorden R., Sager H.B., Astudillo Y.M., Leong W., Ramachandran S., Storm G., Pérez-Medina C., Reiner T., Cormode D.P., Strijkers G.J., Stroes E.S.G., Swirski F.K., Nahrendorf M., Fisher E.A., Fayad Z.A., Mulder W.J.M. Inhibiting macrophage proliferation suppresses atherosclerotic plaque inflammation. *Sci Adv [Internet].* 2015 Apr 3 [cited 2019 May 10];1(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4539616/>
11. Sternberg Z., Ghanim H., Gillotti K.M., Tarió J.D., Munschauer F., Curl R., Noor S., Yu J., Ambrus J.L., Wallace P., Dandona P. Flow cytometry and gene expression profiling of immune cells of the carotid plaque and peripheral blood. *Atherosclerosis.* 2013 Aug;229(2):338–47. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.04.035.
12. Nikolic D.M., Djordjevic P.B., Sreckovic V.D., Paunovic I., Kalezic N., Popovic S., Nikolic B., Stefanovic D. Comparative analysis of collagenase XI and liberase H1 for the isolation of human pancreatic islets. *Hepatogastroenterology.* 2010 Dec;57(104):1573–8.
13. Danoviz M.E., Yablonska-Reuveni Z. Skeletal Muscle Satellite Cells: Background and Methods for Isolation and Analysis in a Primary Culture System. *Methods Mol Biol Clifton Nj.* 2012;798:21–52. doi: 10.1007/978-1-61779-343-1_2
14. Miersch C., Stange K., Röntgen M. Effects of trypsinization and of a combined trypsin, collagenase, and DNase digestion on liberation and in vitro function of satellite cells isolated from juvenile porcine muscles. *Vitro Cell Dev Biol - Anim.* 2018 Jun 1;54(6):406–12. doi: 10.1007/s11626-018-0263-5.
15. Lockhart R.A., Hakakian C. S., Aronowitz J. A. Tissue Dissociation Enzymes for Adipose Stromal Vascular Fraction Cell Isolation: A Review. *J Stem Cell Res Ther [Internet].* 2015 [cited 2019 May 10];5(12). Available from: <https://www.omicsonline.org/open-access/tissue-dissociation-enzymes-for-adipose-stromal-vascular-fraction-cellisolation-a-review-2157-7633-1000321.php?aid=66045>
16. Botting R.A., Bertram K.M., Baharlou H., Sandgren K.J., Fletcher J., Rhodes J.W., Rana H., Plasto TM, Wang XM, Lim JJK, Barnouti L, Kohout MP, Papadopoulos T, Merten S, Olbourne N., Cunningham A.L., Haniffa M., Harman A.N. Phenotypic and functional consequences of different isolation protocols on skin mononuclear phagocytes. *J Leukoc Biol.* 2017 Jun;101(6):1393–403. doi: 10.1189/jlb.4A1116-496R.
17. Mattsson L., Bondjers G., Wiklund O. Isolation of cell populations from arterial tissue, using monoclonal antibodies and magnetic microspheres. *Atherosclerosis.* 1991 Jul;89(1):25–34. doi: 10.1016/0021-9150(91)90004-m.
18. Patino W.D., Kang J.G., Matoba S., Mian O.Y., Gochuico B.R., Hwang P.M. Atherosclerotic plaque macrophage transcriptional regulators are expressed in blood and modulated by tristetraprolin. *Circ Res.* 2006 May;98(10):1282–9. doi:10.1161/01.RES.0000222284.48288.28
19. Kobayashi M., Inoue K., Warabi E., Minami T., Kodama T. A Simple Method of Isolating Mouse Aortic Endothelial Cells. *J Atheroscler Thromb.* 2005;12(3):138–42. doi:10.5551/jat.12.138
20. Beigi F., Patel M., Morales-Garza M.A., Winebrenner C., Gobin A.S., Chau E., Sampaio L.C., Taylor D.A. Optimized method for isolating highly purified and functional porcine aortic endothelial and smooth muscle cells. *J Cell Physiol.* 2017 Nov;232(11):3139–45. doi: 10.1002/jcp.25764.
21. Bonanno E., Mauriello A., Partenzi A., Anemona L., Spagnoli L.G. Flow cytometry analysis of atherosclerotic plaque cells from human carotids: a validation study. *Cytometry.* 2000;39(2):158–65. doi: 10.1002/(sici)1097-0320(20000201)39:2<158::aid-cyto9>3.0.co;2-8.
22. Galis Z.S., Sukhova G.K., Kranzhöfer R., Clark S., Libby P. Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(2):402–6. doi: 10.1073/pnas.92.2.402.
23. Fernandez D.M., Rahman A.H., Fernandez N.F., Chudnovskiy A., Amir E.D., Amadori L., Khan N.S., Wong C.K., Shamailova R., Hill C.A., Wang Z., Remark R., Li J.R., Pina C., Faries C., Awad A.J., Moss N., Bjorkegren J.L.M., Kim-Schulze S., Gnjatic S., Ma'ayan A., Mocco J., Faries P., Merad M., Giannarelli C. Single-cell immune landscape of human atherosclerotic plaques. *Nat Med.* 2019 Oct;25(10):1576–88. doi:10.1038/s41591-019-0590-4
24. Meekel J.P., Groeneveld M.E., Bogunovic N., Keekstra N., Musters R.J.P., Zandieh-Doulabi B., Pals G., Micha D., Niessen H.W.M., Wiersma A.M., Kievit J.K., Hoksbergen A.W.J., Wisselink W., Blankensteijn J.D., Yeung K.K. An in vitro method to keep human aortic tissue sections functionally and structurally intact. *Sci Rep.* 2018 May 25;8(1):8094. doi:10.1038/s41598-018-26549-4
25. Moss S.C., Bates M., Parrino P.E., Woods T.C. Isolation of Endothelial Cells and Vascular Smooth Muscle Cells from Internal Mammary Artery Tissue. *Ochsner J.* 2007;7(3):133–6.
26. Dobnikar L., Taylor A.L., Chappell J., Oldach P., Harman J.L., Oerton E., Dzierzak E., Bennett M.R., Spivakov M., Jørgensen H.F. Disease-relevant transcriptional signatures identified in individual smooth muscle cells from healthy mouse vessels. *Nat Commun.* 2018 Dec;9(1):4567.
27. Cochain C., Vafadarnejad E., Arampatzis P., Pelisek J., Winkels H., Ley K., Wolf D., Saliba A.-E., Zerneck A. Single-Cell RNA-Seq Reveals the Transcriptional Landscape and Heterogeneity of Aortic Macrophages in Murine Atherosclerosis. *Circ Res.* 2018 Jun 8;122(12):1661–74. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.312509
28. Metz R.P., Patterson J.L., Wilson E. Vascular smooth muscle cells: isolation, culture, and characterization. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2012;843:169–76. doi: 10.1007/978-1-61779-523-7_16.
29. Weber S.C., Gratopp A., Akanbi S., Rheinlaender C., Sallmon H., Barikbin P., Koehne P.S. Isolation and culture of fibroblasts, vascular smooth muscle, and endothelial cells from the fetal rat ductus arteriosus. *Pediatr Res.* 2011 Sep;70(3):236–41. doi: 10.1203/PDR.0b013e318225f748.
30. Radziwon-Balicka A., Degn M., Johansson S.E., Warfvinge K., Edvinsson L. A novel multicolor flow-cytometry application for quantitative detection of receptors on vascular smooth muscle cells. *PLOS ONE.* 2017 Oct 30;12(10):e0186504. doi: 10.1371/journal.pone.0186504.

Для цитирования: Д.В. Шарыш, А.В. Марков, М.С. Назаренко. Получение клеточных суспензий артерий при атеросклерозе. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2020; 9 (2): 114-122. DOI: 10.17802/2306-1278-2020-9-2-114-122

To cite: D. V. Sharysh, A. V. Markov, M. S. Nazarenko. Preparation of cell suspensions from arteries affected with atherosclerosis. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2020; 9 (2): 114-122. DOI: 10.17802/2306-1278-2020-9-2-114-122