

## Современные методы исследования атеросклероза и ишемической болезни сердца: проточная цитометрия

Стахнёва Е.М., Рагино Ю.И.

*Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины (НИИТПМ) – филиал Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ФИЦ ИЦиГ СО РАН)  
Россия, 630089, г. Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1*

### РЕЗЮМЕ

Проблема атеросклероза, формирующего патологическую основу ишемической болезни сердца, является одной из наиболее обсуждаемых в развитии сердечно-сосудистых заболеваний. Это хроническое воспалительное заболевание включает комплекс сложных взаимодействий между различными клетками, а атеросклеротическая бляшка представляет собой сложную иммунологическую среду. Современные количественные методы повышают понимание патофизиологических процессов, ответственных за прогрессирование атеросклеротической бляшки. Проточная цитометрия представляет собой мощный современный метод, позволяющий проводить комплексный анализ клеток одновременно. Данный обзор посвящен научным исследованиям атеросклероза и ишемической болезни сердца, выполненным с помощью метода проточной цитометрии.

**Ключевые слова:** проточная цитометрия, атеросклероз, воспаление, Т-лимфоциты, моноциты.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Источник финансирования.** Работа выполнена в рамках бюджетной темы по государственному заданию № АААА-А17-117112850280-2 и в рамках гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 19-015-00055.

**Для цитирования:** Стахнёва Е.М., Рагино Ю.И. Современные методы исследования атеросклероза и ишемической болезни сердца: проточная цитометрия. *Бюллетень сибирской медицины*. 2021; 20 (2): 184–190. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2021-2-184-190>.

---

## Modern methods for studying atherosclerosis and coronary artery disease: flow cytometry

Stakhneva E.M., Ragino Yu.I.

*Research Institute of Internal and Preventive Medicine (RIIPM) – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Branch of ICG SB RAS)  
175/1, Bogatkova Str., Novosibirsk, 630089, Russian Federation*

### ABSTRACT

The problem of atherosclerosis, which forms the pathological basis of coronary artery disease (CAD), is one of the most discussed ones in development of cardiovascular diseases. This chronic inflammatory disease involves interactions between different cells, and an atherosclerotic plaque is a complex immunological environment. Modern

quantitative methods increase the understanding of the pathophysiological processes responsible for progression of atherosclerotic plaques. Flow cytometry is a powerful modern method that allows for a complex and simultaneous cell analysis. This review is devoted to studies on atherosclerosis and CAD performed using flow cytometry.

**Key words:** flow cytometry, atherosclerosis, inflammation, T-lymphocytes, monocytes.

**Conflict of interest.** The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**Source of financing.** This study was conducted within the budgetary theme on the state assignment No. AAAA-A17-117112850280-2 and within the grant from the Russian Foundation for Basic Research No. 19-015-00055.

**For citation:** Stakhneva E.M., Ragino Yu.I. Modern methods for studying atherosclerosis and coronary artery disease: flow cytometry. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2021; 20 (2): 184–190. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2021-2-184-190>.

## ВВЕДЕНИЕ

Более 50 лет назад был разработан новый метод диагностики – импульсная цитофотометрия, который с 1978 г. стал называться «проточная цитометрия». Сегодня проточная цитофлуориметрия – методика исследования дисперсионных субстанций в режиме поштучного анализа частиц, входящих в состав дисперсионной фазы по сигналам, получаемым в ходе флуоресценции и рассеивания света. Проточная цитофлуориметрия базируется на совокупности современных цитохимических флуоресцентных методов анализа структурных компонентов клеток и их антигенов. Это современный и очень функциональный метод, который позволяет разносторонне анализировать различные популяции клеток [1].

## ПРИНЦИПЫ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Физические принципы проточной цитометрии просты: суспензию клеток, предварительно инкубированную с флуорохромами, помещают в поток жидкости, пропускаемый через проточную ячейку. Это порождает эффект гидродинамического фокусирования: исследуемые клетки выстраиваются в цепочку и в таком порядке пересекают пучок лазерных лучей. Таким образом происходит анализ каждой отдельно взятой клетки.

Свет, исходящий от флуорохромов, фокусируют при помощи оптической системы, состоящей из нескольких зеркал и линз, а затем раскладывают на определенные компоненты. Полученные световые сигналы преобразуют в электрические импульсы и анализируют при помощи специального программного обеспечения. Всего за несколько секунд сквозь проточную кювету проходят тысячи клеток, позволяя исследователю сделать вывод о составе и характеристиках клеточной суспензии.

Проточная цитометрия является мощным методом с массой достоинств: быстрый анализ, анализ большого количества клеток (до  $10^7$  клеток в секунду), объективное измерение интенсивности флуоресценции, получение данных для отдельной клеточной популяции, одновременный анализ разных процессов, способность охарактеризовать редкие события [1].

## МЕТОД ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА И АТЕРОСКЛЕРОЗА

Проблема атеросклероза и вызываемых им осложнений является одной из наиболее обсуждаемых в развитии сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). Атеросклероз развивается длительно и формирует патологическую основу ишемической болезни сердца (ИБС). Это сложное хроническое воспалительное заболевание включает взаимодействие между различными клетками. Новые технологии, в частности проточная цитометрия, позволяют проводить комплексный анализ разных клеток одновременно.

Одним из основных патофизиологических механизмов развития атеросклероза является нарушение структурной целостности и функциональной активности сосудистого эндотелия. Циркулирующие эндотелиальные клетки, отделяющиеся от стенки эндотелия в процессе его повреждения, могут выступать прямым клеточным маркером дисфункции эндотелия [2, 3].

С помощью метода проточной цитометрии выявили, что наличие более трех циркулирующих эндотелиальных клеток на  $3 \times 10^5$  лейкоцитов в периферической крови увеличивает относительный риск развития ИБС у женщин молодого и среднего возраста в 4 раза, а у женщин с ИБС повышает риск развития острого инфаркта миокарда в 8 раз [2].

Эндотелиальные прогениторные клетки, обладающие способностью к самообновлению и дифференцировке, участвуют в процессах восстановления эндотелия и формирования новых кровеносных сосудов. Процесс привлечения и миграции эндотелиальных прогениторных клеток в организме управляется клетками, находящимися непосредственно в зоне повреждения [4]. Большинство клеток-предшественников созревают из гематопозитических стволовых клеток, в основном находящихся в костном мозге, периферической крови и пупочном канатике, но также присутствующих в селезенке, кишечнике, печени, жировой ткани и адвентиции. Независимо от своего источника все гематопозитические стволовые клетки являются носителями маркеров CD34+ и CD133+ [4].

Эндотелиальные прогениторные клетки характеризуются экспрессией поверхностных маркеров: рецептора 2-го типа сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGFR-2), CD31, эндотелиальной синтазы оксида азота (NO) и сосудистого эндотелиального кадгерина. Поэтому для идентификации эндотелиальных прогениторных клеток используют поверхностные маркеры гематопозитических и эндотелиальных клеточных линий, такие как CD34, CD133, VEGFR-2 либо рецептор домена киназы (KDR) [4, 5]. У больных с артериальной гипертензией при высоком уровне липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) количество и миграционная способность циркулирующих эндотелиальных прогениторных клеток снижены [6, 7]. Количество и функциональная активность циркулирующих эндотелиальных прогениторных клеток в крови являются независимым предиктором заболеваемости и смертности от сердечно-сосудистых заболеваний [8].

Участие в атерогенезе эндотелиальных прогениторных клеток не вызывает сомнений. В исследовании S. Ai и соавт. при оценке экспрессии рецептора витамина D (VDR) обнаружено, что у пациентов с ИБС значительно экспрессия VDR на циркулирующих эндотелиальных прогениторных клетках была снижена и отрицательно коррелировала с уровнем гликированного гемоглобина. Стойкое высокое содержание глюкозы в сыворотке крови снижало экспрессию VDR на эндотелиальных прогениторных клетках, что потенциально может ускорять патологический процесс атеросклероза. Таким образом, низкий уровень экспрессии VDR на циркулирующих эндотелиальных прогениторных клетках может служить потенциальным фактором риска развития ИБС [9].

Клетки иммунной системы моноциты участвуют в формировании врожденного и приобретенного им-

мунитета. В атерогенезе моноциты играют ключевую роль, так как после привлечения в обогащенные липидами и липопротеинами области интимы артерий они под влиянием макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF), продуцируемого активированным эндотелием, дифференцируются в макрофаги [10, 11]. В периферической крови больных атеросклерозом моноциты преактивированы и обладают некоторыми чертами макрофагов [10]. Их адгезия к эндотелию в 1,5 раза выше, чем моноцитов здоровых субъектов, и они экспрессируют ряд рецепторов (Fcγ-рецептор типа I и II, ICAM) [12]. Моноциты неоднородны по составу. При атеросклерозе отмечают повышение относительного содержания моноцитов промежуточной (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup>) и неклассической (CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup>) субпопуляций в 2,3 и 1,8 раза соответственно [10, 13].

К.А. Arnold и соавт. определяли корреляцию подтипов моноцитов и культивированных из них макрофагов с прогрессированием ИБС. Группы участников исследования были сформированы после коронарной ангиограммы в соответствии с тяжестью ИБС: группа без ИБС (незначительные нарушения в просвете сосудов); ИБС с однососудистым поражением; ИБС с многососудистым поражением. У пациентов с ИБС (с однососудистым и многососудистым поражением) было повышено содержание в крови и промежуточной, и неклассической субпопуляций моноцитов по сравнению с пациентами без ИБС ( $p < 0,05$ ). Содержание регуляторных макрофагов (CD206<sup>+</sup>) также было снижено у пациентов с однососудистым и многососудистым поражением ( $p < 0,001$ ) [14].

Показана связь между атерогенным фенотипом липопротеинов и врожденным иммунитетом при атеросклерозе у пациентов с ИБС. Атерогенная фракция липопротеинов низкой плотности ассоциируется с увеличением содержания неклассической субпопуляции моноцитов (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) и уменьшением содержания классической субпопуляции (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) [15].

Лимфоциты играют ключевую роль в развитии воспалительных реакций при сердечно-сосудистых заболеваниях. При изучении содержания и фенотипа лимфоцитов в периферической крови, подкожной жировой клетчатке и эпикардиальной жировой клетчатке у пациентов с ИБС и без ИБС, перенесших плановую операцию на сердце, выяснилось, что эпикардиальная жировая ткань у пациентов с ИБС характеризуется повышенным количеством Т- и В-лимфоцитов, более высоким общим количеством лимфоцитов и сниженным количеством NK-клеток по сравнению с пациентами без ИБС [16].

Каскадная система комплемента участвует в патогенезе ССЗ, индуцируя воспаление и взаимодействуя с системой коагуляции крови [17]. Баланс между активацией и ингибированием системы комплемента имеет решающее значение в контроле уровня воспаления. Молекулы, участвующие в регуляции активации системы комплемента, включают: рецептор комплемента типа 1 (CR1, CD35), мембранный кофакторный белок (MCP, CD46), фактор ускорения распада (DAF, CD55) и мембранный ингибитор реактивного лизиса (MIRL, CD59), причем каждый белок отличается по механизму действия для регуляции каскада комплемента [18]. У пациентов с ИБС наблюдалась более низкая экспрессия CD46 и CD55 на поверхности лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов и более высокая поверхностная экспрессия CD35 и CD59 на гранулоцитах ( $p < 0,0001$ ) по сравнению со здоровыми донорами. Высокая экспрессия CD59 на гранулоцитах положительно коррелирует с тяжестью заболевания и может служить потенциальным маркером прогрессирования заболевания [18].

### **ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ В ИССЛЕДОВАНИЯХ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ БЛЯШЕК**

Одним из ключевых направлений изучения патогенеза атеросклероза является изучение структуры атеросклеротических бляшек. Существует большое количество экспериментальных исследований, посвященных изучению образования, созревания и разрыва атеросклеротических бляшек, однако механизмы этих явлений остаются во многом неясными. Традиционно материалом для научных исследований атеросклероза служит кровь, поскольку забор ткани связан с определенными трудностями. Но для изучения патофизиологических механизмов атеросклеротического процесса наибольший интерес представляет конкретно атеросклеротический очаг.

Современные количественные методы могут повысить понимание патологических процессов, ответственных за прогрессирование бляшки. Именно метод проточной цитометрии и разработка оригинальных протоколов ферментативного выделения клеток из атеросклеротических бляшек позволили наиболее полно проанализировать лимфоциты и их роль в иммунологических механизмах созревания, разрыва и их распределение в атеросклеротических бляшках [19, 20].

Ранее проводились попытки изучения роли лимфоцитов в атеросклеротическом очаге. Но при этом использовали выделение лимфоцитов из ткани в культивационную среду с различными активаторами миграции лимфоцитов, т.е. изучали отдельные лим-

фоциты, мигрировавшие из ткани атеросклеротической бляшки в культивационную среду. Это дало возможность не отрабатывать методику выделения живых клеток, но лишило возможности изучения клеточного состава самой ткани атеросклеротической бляшки [21].

При этом предпринимались попытки точного определения клеточного состава ткани атеросклеротических бляшек человека с помощью проточной цитометрии, где материал, полученный при проведении операции эндартеректомии сонных артерий, подвергали ферментативной обработке коллагеназой I (250 ед/мл) при 37 °С. Это исследование показало, что около 50% клеток в атеросклеротических бляшках являются воспалительными мононуклеарными клетками (Т-лимфоцитами и моноцитами (макрофагами)) [22].

В дальнейших исследованиях ученые шли по пути разработки оригинальных протоколов выделения клеток из ткани атеросклеротической бляшки и изучения целых комплексов антител, меченных флуорохромами. Кроме того, применение нескольких флуорохромов одновременно позволили исследовать различные процессы в клетке. В исследовании Ж.-Ш. Гривель и соавт. показано, что фенотипический состав Т-лимфоцитов в бляшке отличается от такового в крови. При сравнении уровней экспрессии клеточных маркеров CD3, CD4, CD16, CD45, CD45RA, CCR7 CD28, CD27, HLA-DR и CD38 выявили высокий уровень CD4 и CD8 Т-клеток в бляшках [19].

Доминирующей воспалительной клеткой при атеросклерозе является макрофаг, однако взаимодействие с другими воспалительными клетками может иметь значение в атерогенезе. Наличие тучных клеток в атеросклеротическом очаге, составляющих гетерогенную популяцию, было установлено с помощью иммуногистохимии. В 3-летнем исследовании на 270 пациентах со стенозом сонных артерий отмечено, что уровень тучных клеток в плазме крови ассоциируется с будущими острыми сердечно-сосудистыми событиями. Несмотря на то, что тучные клетки присутствуют в бляшке в небольшом количестве, они могут активно способствовать дестабилизации атеросклеротической бляшки [23].

Тучные клетки являются участниками воспалительных реакций в различных тканях, в том числе в интима атеросклеротических артерий. Тучные клетки активируются для дегрануляции, высвобождая большое количество медиаторов воспаления (гистамин, гепарин, протеазы и цитокины), хранящихся в их цитоплазме. Активированные тучные клетки в атеросклеротических очагах могут способствовать

хемотаксису лейкоцитов, адгезии к активированному эндотелию и последующей трансэндотелиальной миграции [24].

Для того чтобы более подробно охарактеризовать популяцию тучных клеток при атеросклеротических поражениях человека и определения ее активности, в исследовании E. Kritikou и соавт. использовали несколько маркеров одновременно (CD45, CD117, CD63, IgE, Tryptase/TPSAB1) [25]. Авторы подтвердили, что основной, но не единственный путь активации тучных клеток внутри бляшки – IgE-опосредованный, но при этом существует группа тучных клеток, которые активируются без связывания IgE [25].

Проточная цитометрия является мощным инструментом для выявления разнообразия лейкоцитарных подмножеств в атеросклеротической бляшке [26]. Атеросклеротическая бляшка представляет собой сложную иммунологическую среду. С момента открытия Т-клеток в атеросклеротической бляшке установлено, что Т-клетки играют важную роль в развитии атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний. Т-хелперы могут дифференцироваться в несколько фенотипов (Th1, Th2, Th9, Th17, Treg и т.д.), продуцировать различные интерлейкины и обладают как про-, так и противовоспалительными механизмами. С. Grönberg и соавт. предположили, что терапевтическое ингибирование активности дифференцировки Т-клеток в Th1-клетки представляет собой перспективную стратегию снижения прогрессии атеросклероза [27].

В атерогенезе Т-лимфоциты играют важную роль, но атерогенная или атеропротекторная роль CD8<sup>+</sup> Т-клеток на поздних стадиях развития атеросклероза остается дискуссионной. В исследовании J. van Duijn с соавт. показана локальная, защитная роль CD8<sup>+</sup> Т-клеток при прогрессирующем атеросклерозе, сравнивая фенотипы CD8<sup>+</sup> Т-клеток, полученных из бляшек аорты, селезенки и крови мышей. При прогрессирующем атеросклерозе на мышьяковой модели аортальные CD8<sup>+</sup> Т-клетки продуцировали меньшее количество IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  по сравнению с их системными аналогами, с одновременным повышением экспрессии эктонуклеотидазы CD39. При этом фармакологическое ингибирование CD39 у apoE<sup>-/-</sup> мышей частично восстановило продукцию цитокинов CD8<sup>+</sup> Т-клетками. Исследования на образцах атеросклеротических бляшек сонной и бедренной артерии человека подтвердили данные результаты [28, 29].

Гибель клеток ткани является характерным признаком прогрессирующих атеросклеротических бляшек, включая нестабильные поражения, которые в значительной степени ответственны за осложнения

сердечно-сосудистых заболеваний. Данные о накоплении цитотоксических лимфоцитов в очагах поражения человека убедительно свидетельствуют о том, что эти лимфоциты способствуют гибели клеток в атеросклеротических очагах и приводят к потенциальному разрыву бляшек [30].

Клетки-киллеры могут индуцировать гибель клеток различными путями, используя естественные рецепторы активации NK killer (KARs) или цитолитические компоненты перфорин и гранзим В с образованием иммунологического синапса, через который высвобождение цитолитических гранул в конечном итоге приводит к лизису клеток-мишеней [31, 32]. Т-клетки (CD8 и CD4,  $\gamma\delta$ -клетки), NK-клетки вовлечены в атерогенез. Эти клетки в большом количестве присутствуют в нестабильных бляшках. Данный факт свидетельствует о том, что их киллерная функция важна при прогрессировании атеросклеротического процесса [30].

Воспалительные клетки в атеросклеротической бляшке происходят из гемопоэтических стволовых клеток (HSPCs). При анализе мононуклеарных клеток крови методом проточной цитометрии с использованием антител CD38+CD45RA+CD34+HSPCs авторы выяснили, что у пациентов с ИБС (коронарный стеноз 50% и более) уровень циркулирующих HSPCs в периферической крови выше в 1,8 раза, чем у лиц без ИБС. Уровень HSPCs в крови связан со степенью коронарного стеноза. Кроме того, по данным многовариантного логистического анализа, уровень циркулирующих в крови HSPCs был единственным маркером, который связан с наличием легкого и тяжелого (70% и более) коронарного стеноза (ОШ 2,08 (95%-й ДИ 1,35–3,21),  $p = 0,0009$ ), что позволило авторам предложить, что HSPCs – важный маркер для оценки атеросклеротического коронарного стеноза [33].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проточная цитометрия получила бурное развитие как современный метод диагностики и исследований нарушений иммунной системы. Атеросклероз – мультифакторное хроническое воспалительное заболевание, включающее комплекс сложных взаимодействий между сосудистой стенкой и клетками крови, а атеросклеротическая бляшка представляет собой сложную иммунологическую среду.

Научные знания о составе атеросклеротической бляшки и о вкладе клеток, обнаруживаемых в очаге повреждения, постоянно пополняются, благодаря фундаментальным научным исследованиям. Но простая и доступная диагностика раннего атеросклероза остается проблемой, поскольку измерение и определение изменений в клеточных популяциях в области

атеросклеротического очага неосуществимы в клинической практике.

Возможно, именно проточная цитометрия станет приоритетным методом в определении новых прогностических маркеров периферической крови, отражающих тяжесть атеросклеротического процесса.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Черешнев В.А. Цитометрический анализ в клинической иммунологии. Екатеринбург: УрО РАН, 2011: 220.
2. Феоктистова В.С., Вавилова Т.В., Сироткина О.В., Болдуева С.А., Гайковская Л.Б., Леонова И.А., Ласковец А.Б., Ермаков А.И. Новый подход к оценке дисфункции эндотелия: определение количества циркулирующих эндотелиальных клеток методом проточной цитометрии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60 (4): 23–39.
3. Boos C.J., Balakrishnan B., Blann A.D., Lip G.Y.H. The relationship of circulating endothelial cells to plasma indices of endothelial damage/dysfunction and apoptosis in acute coronary syndromes: implications for prognosis. *J. Thromb. Haemost.* 2008; 6 (11): 1841–1850. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2008.03148.x.
4. Семёнова А.Е., Сергиенко И.В., Домбровский А.Л., Рвачева А.В. Роль эндотелиальных прогениторных клеток при атеросклерозе. *Атеросклероз и дислипидемии*. 2012, 3 (8): 14–24.
5. Fadini G.P., de Kreutzenberg S.V., Coracina A., Baesso I., Agostini C., Tiengo A., Avogaro A. Circulating CD34+ cells, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. *Eur. Heart J.* 2006; 27 (18): 2247–2255. DOI: 10.1093/eurheartj/ehl198.
6. Zhou B., Ma F.X., Liu P.X., Fang Z.H., Wang S.L., Han Z.B., Poon M.C., Han Z.C. Impaired therapeutic vasculogenesis by transplantation of OxLDL-treated endothelial progenitor cells. *J. Lipid. Res.* 2007; 48 (3): 518–527. DOI: 10.1194/jlr.M600251-JLR200.
7. Vasa M., Fichtlscherer S., Aicher A., Adler K., Urbich C., Martin H., Zeiher A.M., Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ. Res.* 2001; 89 (1): e1–7. DOI: 10.1161/hh1301.093953.
8. Sen S., McDonald S.P., Coates P.T., Bonder C.S. Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease. *Clin. Sci. (Lond.)*. 2011; 120 (7): 263–283. DOI: 10.1042/CS20100429.
9. Ai S., He Z., Ding R., Wu F., Huang Z., Wang J., Huang S., Dai X., Zhang J., Chen J., Liu L., Wu Z., Liang C. Reduced vitamin D receptor on circulating endothelial progenitor cells: A new risk factor of coronary artery diseases. *J. Atheroscler. Thromb.* 2018; 25 (5): 410–421. DOI: 10.5551/jat.40808.
10. Челомбитько М.А., Шишкина В.С., Ильинская О.П., Каминный А.И., Павлунина Т.О., Самовилова Н.Н., Грачева Е.В., Тарарак Э.М., Проказова Н.В. Цитофлуориметрическое изучение мембранных рафтов на субпопуляциях моноцитов человека при атеросклерозе. *Acta Naturae*. 2014, 6 (4): 86–94.
11. Thomas G.D., Hamers A.A.J., Nakao C., Marcovecchio P., Taylor A.M., McSkimming C., Nguyen A.T., McNamara C.A., Hedrick C.C. Human blood monocyte subsets: A new gating strategy defined using cell surface markers identified by mass cytometry. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2017; 37 (8): 1548–1558. DOI: 10.1161/ATVBAHA.117.309145.
12. Luu N.T., Madden J., Calder P.C., Grimble R.F., Shearman C.P., Chan T., Tull S.P., Dastur N., Rainger G.E., Nash G.B. Comparison of the pro-inflammatory potential of monocytes from healthy adults and those with peripheral arterial disease using an in vitro culture model. *Atherosclerosis*. 2007. 193 (2): 259–268. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.08.050.
13. Kapellos T.S., Bonaguro L., Gemünd I., Reusch N., Saglam A., Hinkley E.R., Schultze J.L. Human monocyte subsets and phenotypes in major chronic inflammatory diseases. *Front. Immunol.* 2019; 10: 2035. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02035.
14. Arnold K.A., Blair J.E., Paul J.D., Shah A.P., Nathan S., Alenghat F.J. Monocyte and macrophage subtypes as paired cell biomarkers for coronary artery disease. *Exp. Physiol.* 2019; 104 (9): 1343–1352. DOI: 10.1113/EP087827.
15. Krychtiuk K.A., Kastl S.P., Pfaffenberger S., Lenz M., Hofbauer S.L., Wannerth A., Koller L., Katsaros K.M., Pongratz T., Goliash G., Niessner A., Gaspar L., Huber K., Maurer G., Dostal E., Wojta J., Oravec S., Speidl W.S. Association of small dense LDL serum levels and circulating monocyte subsets in stable coronary artery disease. *PLoS One*. 2015; 10 (4): e0123367. DOI: 10.1371/journal.pone.0123367.
16. Mráz M., Cinkajzlová A., Kloučková J., Lacinová Z., Kratochvílová H., Lipš M., Pořízka M., Kopecký P., Pierzynová A., Kučera T., Melenovský V., Stříž I., Lindner J., Haluzik M. Coronary artery disease is associated with an increased amount of T lymphocytes in human epicardial adipose tissue. *Mediators Inflamm.* 2019; 2019: 4075086. DOI: 10.1155/2019/4075086.
17. Oikonomopoulou K., Ricklin D., Ward P.A., Lambris J.D. Interactions between coagulation and complement – their role in inflammation. *Semin. Immunopathol.* 2012; 34 (1): 151–165. DOI: 10.1007/s00281-011-0280-x.
18. Mishra N., Mohata M., Narang R., Lakshmy R., Hazarika A., Pandey R.M., Das N., Luthra K. Altered expression of complement regulatory proteins CD35, CD46, CD55, and CD59 on leukocyte subsets in individuals suffering from coronary artery disease. *Front. Immunol.* 2019; 10: 2072. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02072.
19. Гривель Ж.-Ш., Иванова О.И., Пинегина Н.В., Бланк П.С., Шпектор А.В., Марголис Л.Б., Васильева Е.Ю. Новый метод анализа клеточного состава атеросклеротических бляшек. *Креативная кардиология*. 2012; 1: 26–40.
20. Lebedeva A., Vorobyeva D., Vagida M., Ivanova O., Felker E., Fitzgerald W., Danilova N., Gontarenko V., Shpektor A., Vasilieva E., Margolis L. Ex vivo culture of human atherosclerotic plaques: A model to study immune cells in atherogenesis. *Atherosclerosis*. 2017; 267: 90–98. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.10.003.
21. Curry M.P., Norris S., Golden-Mason L., Doherty D.G., Deignan T., Collins C., Traynor O., McEntee G.P., Hegarty J.E., O'Farrelly C. Isolation of lymphocytes from normal adult human liver suitable for phenotypic and functional characterization. *J. Immunol. Methods*. 2000; 242 (1-2): 21–31. DOI: 10.1016/S0022-1759(00)00204-0.

22. 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): 158–165. DOI: 10.1002/(sici)1097-0320(20000201)39:2<158::aid-cyto9>3.0.co;2-8.
23. Willems S., Vink A., Bot I., Quax P.H., de Borst G.J., de Vries J.P., van de Weg S.M., Moll F.L., Kuiper J., Kovanen P.T., de Kleijn D.P., Hofer I.E., Pasterkamp G. Mast cells in human carotid atherosclerotic plaques are associated with intraplaque microvessel density and the occurrence of future cardiovascular events. *Eur. Heart J.* 2013; 34 (48): 3699–3706. DOI: 10.1093/eurheartj/cht186.
24. Kovanen P.T., Bot I. Mast cells in atherosclerotic cardiovascular disease – Activators and actions. *Eur. J. Pharmacol.* 2017; 816: 37–46. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.10.013.
25. Kritikou E., Depuydt M., de Vries M., Mulder K., Govaert A., Smit M., van Duijn J., Foks A., Wezel A., Smeets H., Slütter B., Quax P., Kuiper J., Bot I. Flow cytometry-based characterization of mast cells in human atherosclerosis. *Cells*. 2019; 8 (4): 334. DOI: 10.3390/cells8040334.
26. Winkels H., Ehinger E., Ghosheh Y., Wolf D., Ley K. Atherosclerosis in the single-cell era. *Curr. Opin. Lipidol.* 2018; 29 (5): 389–396. DOI: 10.1097/MOL.0000000000000537.
27. Grönberg C., Nilsson J., Wigren M. Recent advances on CD4+ T cells in atherosclerosis and its implications for therapy. *Eur. J. Pharmacol.* 2017; 816: 58–66. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.04.029.
28. Van Duijn J., van Elsas M., Benne N., Depuydt M., Wezel A., Smeets H., Bot I., Jiskoot W., Kuiper J., Slütter B. CD39 identifies a microenvironment-specific anti-inflammatory CD8+ T-cell population in atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*. 2019; 285: 71–78. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.04.217.
29. Van Duijn J., Kritikou E., Benne N., van der Heijden T., van Puijvelde G.H., Kröner M.J., Schaftenaar F.H., Foks A.C., Wezel A., Smeets H., Yagita H., Bot I., Jiskoot W., Kuiper J., Slütter B. CD8+ T-cells contribute to lesion stabilization in advanced atherosclerosis by limiting macrophage content and CD4+ T-cell responses. *Cardiovasc. Res.* 2019; 115 (4): 729–738. DOI: 10.1093/cvr/cvy261.
30. Kyaw T., Tipping P., Toh B.-H., Bobik A. Killer cells in atherosclerosis. *Eur. J. Pharmacol.* 2017; 816: 67–75. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.05.009.
31. Pegram H.J., Andrews D.M., Smyth M.J., Darcy P.K., Kershaw M.H. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol. Cell Biol.* 2011; 89 (2): 216–224. DOI: 10.1038/icb.2010.78.
32. Griffiths G.M., Tsun A., Stinchcombe J.C. The immunological synapse: A focal point for endocytosis and exocytosis. *J. Cell Biol.* 2010; 189 (3): 399–406. DOI: 10.1083/jcb.201002027.
33. Zhu F.L., Zhang N., Ma X.J., Yang J., Sun W.P., Shen Y.Q., Wen Y.M., Yuan S.S., Zhao D., Zhang H.B., Feng Y.M. Circulating hematopoietic stem/progenitor cells are associated with coronary stenoses in patients with coronary heart disease. *Sci. Rep.* 2019; 9 (1): 1680. DOI: 10.1038/s41598-018-38298-5.

## Сведения об авторах

**Стахнёва Екатерина Михайловна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск. ORCID 0000-0003-0484-6540

**Рагино Юлия Игоревна**, д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, руководитель НИИТПМ – филиала ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск. ORCID 0000-0002-4936-8362.

(✉) Стахнёва Екатерина Михайловна, e-mail: stahneva@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.01.2020

Подписана в печать 29.09.2020