

## КЛЕТОЧНАЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ КАРДИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012

УДК 616-018

### Новый метод анализа клеточного состава атеросклеротических бляшек

Ж.-Ш. Гривель<sup>1</sup>, О. И. Иванова<sup>2\*</sup>, Н. В. Пинегина<sup>2</sup>, П. С. Бланк<sup>1</sup>, А. В. Шпектор<sup>2</sup>,  
Л. Б. Марголис<sup>1</sup>, Е. Ю. Васильева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национальный институт детского здоровья и развития человека им. Юнис Кеннеди Шрайвер, США;

<sup>2</sup>кафедра кардиологии ФПДО Московского государственного медико-стоматологического университета

**Цель.** Исследование лимфоцитарного состава и статуса лимфоцитов в атеросклеротических бляшках для выявления иммунологических механизмов их созревания и разрыва.

**Методы.** Мы разработали протокол выделения находящихся в бляшке иммунных клеток и анализа их состояния с использованием многоцветной проточной цитометрии.

**Результаты.** Показано, что фенотипический состав Т-лимфоцитов в бляшке отличается от такового в крови. CD4 Т-клетки и в особенности CD8 Т-клетки в бляшках высоко активированы; фракция CD8 Т-клеток, коэкспрессирующих CD25 и HLA-DR, в бляшках была в 10 раз больше, чем в крови.

**Заключение.** Анализ состава Т-клеток в атеросклеротических бляшках показал, что бляшки представляют собой отличный от крови иммунологический резервуар, содержащий Т-лимфоциты с высокой степенью активации, что согласуется с присутствием в бляшке антигена(-ов), вызывающего активацию и миграцию этих клеток. В результате нашей работы появилась возможность выделить и охарактеризовать Т-лимфоциты для последующей идентификации их антигенной специфичности.

**Ключевые слова:** атеросклероз, клетки крови, иммунная система, иммунологические методики.

**Objective.** To study lymphocytic composition and lymphocyte state in atherosclerosis plaques for detection of immunologic mechanisms of their development and rupture.

**Methods.** We developed a protocol of immune cell release, located in plaque. The analysis of their state was performed with multicolor flow cytometry.

**Results.** It is shown that phenotypic composition of T-lymphocytes in plaque differs from the proper one in blood. CD4 T-cells and especially CD8 T-cells are highly activated in plaques; fraction of CD8 T-cells, expressing CD25 and HLA-DR, in plaques it was 10 times as great as in blood.

**Conclusion.** The analysis composition of T-cells in atherosclerosis plaques demonstrated that plaques represent different immunologic reservoir from blood that contains T-lymphocytes with high level of activation, related to antigen(s) in plaque that induces activation and cell migration. As a result, it's possible to emphasize and characterize T-lymphocytes for following identification of their antigenic specificity.

**Key words:** atherosclerosis, cell blood, immune system, immunologic methods.

Несмотря на большое количество клинических и экспериментальных данных об образовании, созревании и разрыве атеросклеротических бляшек, механизмы этих явлений остаются во многом неизвестными. Показано, что системное воспаление играет важную роль в этом процессе [17, 29]. Воспаление — это сложное явление, включающее миграцию реактивных клеток, в частности лимфоцитов и моноцитов, и их многоступенчатую активацию

с последующим выбросом различных цитокинов. Гистохимический анализ [10] и полимеразная цепная реакция [8] с ДНК, выделенной из атеросклеротических бляшек, выявили привлечение (в очаг воспаления) и активацию Т-клеток в нестабильной бляшке, что значительно расширило наше представление о факторах, связанных с нестабильностью бляшек.

Однако этих знаний недостаточно, поскольку полимеразная цепная реакция да-

\* E-mail: angeoksana@gmail.com

ет возможность выявить лишь общие характеристики Т-лимфоцитов, а при помощи иммуногистохимии можно определять только 1–2 клеточных антигена.

Для более полной характеристики лимфоцитов и их роли в иммунологических механизмах созревания и разрыва бляшки необходимо проанализировать лимфоцитарные фенотипы и их распределение в отдельных бляшках. Единственная современная технология, позволяющая выполнить эти задачи, — многоцветная проточная цитометрия. Однако методы выделения лимфоцитов из бляшек для анализа с помощью проточной цитометрии отсутствуют. Поэтому исследования такого рода никогда не проводились на клетках, находящихся внутри атеросклеротической бляшки. В настоящей работе такое исследование описано. Нами был разработан оригинальный протокол выделения клеток из бляшек, который позволил сохранить маркеры на клеточной поверхности клеток. Это, в свою очередь, позволило детально охарактеризовать выделенные лимфоциты с использованием метода многоцветной проточной цитометрии.

## Материал и методы

### Пациенты

В исследование было включено 27 пациентов: 20 мужчин и 7 женщин, в возрасте от 26 до 80 лет (медиана 64 года). Работа одобрена этическим комитетом, ее участники подписали информированное согласие. В 5 хирургических центрах Москвы в ходе операций эндартерэктомии и аортобедренного шунтирования было взято 22 атеросклеротические бляшки из сонных артерий и 5 бляшек из аорты. Двадцать один пациент имел ишемический анамнез, включая ишемическую болезнь сердца (ИБС), цереброваскулярную болезнь и атеросклероз периферических артерий, и у 6 пациентов выявлен бессимптомный атеросклероз.

Процент стеноза сонных артерий варьировал от 70 до 90% (медиана 80%). Кровь 7 здоровых доноров из того же географического региона была использована для сравнения с кровью пациентов. Основные клинические характеристики пациентов приведены в таблице.

### Клинические характеристики пациентов

Характеристика	Пациенты	Контрольная группа	<i>p</i>
Источник бляшек (сонная артерия/аорта), <i>n</i>	22/5	–	N/S*
Возраст, М±SD	64 ± 12	41 ± 11	< 0,0001
Мужчины, <i>n</i> (%)	20 (74)	3 (43)	N/S (0,1276) MW**
Степень стеноза сонной артерии, М±SD, %	80,2 ± 8,3	–	–
Факторы риска, <i>n</i> (%)			
гиперхолестеринемия	3 (11)	1 (14)	N/S (0,8487) MW
сахарный диабет	16 (59)	1 (14)	0,039 MW
гипертензия	23 (85)	1 (14)	0,0003 MW
курение	10 (37)	1 (14)	0,2699 MW
случаи ишемии в прошлом, <i>n</i> (%)	21 (78)	0 (0)	0,0002 MW
ишемическая болезнь сердца	13 (48)	0 (0)	0,0228 MW
цереброваскулярная болезнь	8 (30)	0 (0)	N/S (0,1111 MW)
атеросклероз периферических артерий	14 (52)	0 (0)	0,0154 MW
Прием лекарственных средств, <i>n</i> (%)			
аспирин	14 (52)	0 (0)	0,0154 MW
клопидогрел	3 (11)	0 (0)	N/S (0,3862) MW
статины	13 (48)	1 (14)	0,1157 MW

\*N/S – статистически незначимый.

\*\*MW – U-критерий Манна–Уитни.

### *Анализ бляшек*

Операционный материал (атеросклеротические бляшки) транспортировали в среде RPMI 1640 при комнатной температуре. Между операцией и выделением клеток проходило не более 2 ч. От атеросклеротической бляшки отделяли фрагмент, который фиксировали в 2% формалине. Остаток ткани нарезали на несколько кубиков, число которых зависело от размера бляшки, и затем подвергали ферментативной обработке.

### *Подготовка лейкоцитов крови для анализа*

Забор крови осуществлялся в пробирку с 3,8% цитратом натрия, после центрифугирования (10 мин при 800 g) удаляли плазму, затем к клеточному осадку добавляли раствор для лизирования эритроцитов («Biolegend», США) и центрифугировали при 400 g в течение 5 мин, после чего клетки ресуспензировали в растворе фосфатного буфера (PBS).

### *Проточная цитометрия*

Для определения фенотипа лейкоцитов при помощи проточной цитометрии использовался прибор «FACS Canto II» («BD Biosciences», США). Для отделения живых клеток от мертвых применяли набор, содержащий краситель Pacific Orange с реактивной аминогруппой («Invitrogen», США). В дальнейшем 50 мкл клеточной суспензии окрашивали комбинациями моноклональных антител. После окраски клетки отмывали и фиксировали в 1% растворе формальдегида в PBS и анализировали на проточном цитометре. Предварительно определяли концентрацию выделенных клеток и взвешивали ткань. Это позволяло подсчитать количество клеток в 1 мг ткани.

Для окраски мы пользовались следующими комбинациями моноклональных антител, разведенных до оптимального титра:

– CD45 Cy7-PE, CD3 Cy5. 5-PerCp, CD4 eFluor780-APC, CD28 PE, CD27

FITC, CD197 APC и CD45RA eFluor 450 для выявления популяций Т-клеток памяти и наивных Т-клеток;

– CD45 Cy7-PE, CD3 Cy5. 5-PerCp, CD4 eFluor780-APC, CD25 PE, CD146 FITC, CD38 APC и HLA-DR Pacific Blue для определения Т-клеточной активации;

– CD45 Cy7-PE, CD3 Cy5. 5-PerCp, CD4 eFluor780-APC, CD19 PE, CD16 FITC, CD56 APC и CD8 eFluor450 для анализа Т-клеток, В-клеток и натуральных киллеров (NK).

В дополнение к этому клетки были окрашены для выявления интерферона гамма (IFN  $\gamma$ ), интерлейкинов IL-2, IL-12, IL-22, IL-17A, T-Bet и Foxp3 следующими комбинациями антител:

– CD45 Cy7-PE, CD3 Cy5. 5-PerCp, CD4 eFluor780-APC, CD25 PE, CD27 FITC, Foxp3 APC и CD8 eFluor450 для обнаружения регуляторных Т-клеток;

– IFN  $\gamma$  Cy7-PE, IL-22 Alexa 710-PE Cy5. 5-PerCp, CD45 eFluor780-APC, CD161 PE, CD3 FITC, IL-17A APC и CD8 eFluor450 для выявления Th-17-клеток;

– IFN  $\gamma$  Cy7-PE, CD3 Cy5. 5-PerCp, CD45 eFluor780-APC, T-Bet PE, IL-2 FITC, IL-12 APC и CD8 eFluor450 для обнаружения Th-1-клеток.

Клетки обрабатывали брефельдином А («Sigma-Aldrich», США) в концентрации 10 мкг/мл в течение 4 ч в присутствии или в отсутствие клеточных активаторов PMA (50 нг/мл) и иономицина (1 мкмоль/л) («Sigma-Aldrich»). Окраску на внутриклеточные антигены проводили, используя буфер для фиксации и пермеабиллизации, содержащий Foxp-3 антитела («eBioscience», США) в соответствии с инструкцией изготовителя. Мы ставили одноцветные реакции компенсации для каждой окраски в каждом эксперименте, используя сферические микрочастицы (бусы) AbC («Invitrogen») или Comp («Becton Dickinson»).

В качестве контроля для установки области анализа и подтверждения специфичности окраски использовали те же комбинации антител, что и в эксперимен-

те, но за вычетом одного из антител [21, 32]. При окончательном анализе использовалось перекрытие спектров различных флюорофоров. Также для проверки специфичности внутриклеточной окраски на цитокины и ядерный фактор транскрипции мы дополнительно использовали изотипический контроль окраски (isotype control staining).

Сбор данных осуществлялся в течение 24 ч после окраски при помощи программы Diva 6. 1. 3. Анализ данных проводился с использованием программы FlowJo версии 9.3.3 («Tree Star», США).

#### **Оптимизация смеси ферментов для гидролиза ткани**

Для определения оптимального состава и концентрации ферментативной смеси, которая наименьшим образом влияла бы на экспрессию поверхностных клеточных маркеров, мы лизировали полиморфноядерные клетки периферической крови (моноклеарные клетки периферической крови (МКПК)) здоровых добровольцев и фрагменты атеросклеротических бляшек в течение 1 ч при 37 °C коллагеназой XI («Sigma-Aldrich»), коллагеназой IV («Invitrogen») или либеразой DL («Roche Diagnostics», США) в присутствии ДНКазы I в концентрации 0,2 мг/мл («Roche Diagnostics»). Клетки собирали, отмывали и окрашивали моноклональными антителами в соответствии с протоколом, приведенным выше. Затем мы сравнивали уровни экспрессии клеточных маркеров CD3, CD4, CD16, CD45, CD45RA, CCR7 CD28, CD27, HLA-DR и CD38 на поверхности подвергшихся ферментативной обработке и контрольных необработанных МКПК.

Для определения эффективности высвобождения клеток из бляшек, используя протокол, описанный выше, мы приготовили несколько криосрезов до и после выделения лимфоцитов. Мы практически не обнаружили лимфоцитов в образцах ткани, подвергшихся ферментативному гидролизу (менее 4% от количества клеток,

присутствовавших до гидролиза). Таким образом, наш протокол позволяет выделять большую часть лимфоцитов и их субпопуляций.

#### **Статистический анализ**

Все данные, полученные в настоящей работе, имели нормальное распределение, что было оценено при помощи тестов нормальности Д'Агостино и Пирсон омнибус. Нормальность и гомоскедастичность полученных данных была проверена с помощью теста нормальности Пирсона, теста Барлетта и F-теста. T-тест использовали для сравнения показателей между бляшкой и кровью и между группами мужчин и женщин. В случае, если распределение данных не было гомоскедастичным по оценке F-теста, использовалась поправка Уэлша к t-тесту.

При сравнении данных из нескольких групп, например кровь пациентов, бляшки пациентов и кровь из контрольной группы, выполняли анализ one-way ANOVA, с применением теста Тьюкей–Крамера. Когда распределение данных не соответствовало критериям нормальности, мы использовали тест Манна–Уитни для парных сравнений и непараметрический тест Краскала–Уоллиса для сравнения нескольких групп. Статистический анализ был выполнен при помощи программ Prism 5.0d («GraphPad Software», США) и JMP 9.0 («SAS Institute Inc», США). Уровень статистической значимости определяли как  $\alpha$ -уровень, равный 0,05.

#### **Результаты**

##### **Разработка протокола ферментативного выделения клеток из атеросклеротических бляшек**

Для выделения клеток из бляшек вначале мы использовали разные коллагеназы, которые тестировали на сохранение таких поверхностных клеточных маркеров МКПК, как: CD3, CD4, CD16, CD45, CD45RA, CD197, CD28, CD27, HLA-DR и

CD38. Мы обрабатывали МКПК коллагеназой XI в концентрациях 5, 10 и 2,5 мг/мл. Наименьшая концентрация фермента привела к снижению экспрессии CD8 на 90% по сравнению с необработанными клетками. Также экспрессия CD4, CD3, CD27 и CD28 снизилась на 40, 12, 50 и 42% соответственно. Вследствие обнаружения таких разрушительных эффектов способность этого фермента высвобождать клетки из ткани далее не исследовалась.

Далее мы обрабатывали МКПК коллагеназой IV в концентрации 10, 5 и 2,5 мг/мл и выявили, что в максимальных концентрациях экспрессия CD4 и CD8 уменьшилась на 29 и 23% соответственно. При концентрации коллагеназы IV 1,25 мг/мл уровень экспрессии поверхностных клеточных маркеров снижался на  $4,9 \pm 3,4\%$  по сравнению с необработанными МКПК.

На следующем этапе мы использовали либеразу DL в концентрациях 62,5 и 31,5 мкг/мл, CD4 снижался примерно на 70%, тогда как при концентрации 15 мкг/мл экспрессия этого маркера снижалась на  $20 \pm 7\%$ . Уровни экспрессии CD3, CD8, CD16, CD45 и HLA-DR были затронуты незначительно.

В дальнейшем для высвобождения клеток из атеросклеротических бляшек мы применяли ферменты в концентрациях, при которых уровень экспрессии клеточных молекул на поверхности МКПК снижался незначительно. Кусочки бляшки лизировали коллагеназой IV (2,5 и 1,25 мг/мл) и либеразой DL (25 и 12,5 мкг/мл) в присутствии 0,2 мг/мл ДНКазы I в течение 1 ч при 37 °С. Клетки затем окрашивали моноклональными антителами к CD45, CD3, CD4 и CD8. При гидролизе коллагеназой IV в концентрации 1,25 мг/мл высвобождалось больше лимфоцитов, чем при концентрации 2,5 мг/мл, что было оценено как относительное количество лимфоцитов внутри аналитических ворот («гейта»), которые устанавливали по боковому рассеиванию (SSC) по одной оси и

экспрессии CD45 – по другой. На основании относительного выхода лимфоцитов (CD45+) мы выбрали обработку коллагеназой IV в течение 1 ч при 37 °С в качестве эффективного метода выделения лимфоцитов из атеросклеротических бляшек при сохранении большинства поверхностных клеточных маркеров. Мы использовали этот протокол во всех последующих экспериментах, описанных ниже. Тем не менее концентрация фермента нуждалась в оптимизации для каждой партии фермента и в наших экспериментах варьировала от 1 до 1,25 мг/мл.

#### **Сравнение основных субпопуляций лимфоцитов из бляшек и крови**

Мы проводили окраску клеток для выявления набора маркеров, комбинация которых позволяет идентифицировать CD4 T-, CD8 T-, В-лимфоциты, а также NK-клетки с использованием аналитической стратегии, изображенной на рисунке 1. Лимфоциты определяли как популяцию с минимальным боковым рассеиванием (SSC) и высокой экспрессией CD45, моноциты – как клетки, имеющие промежуточный уровень SSC и высокий уровень экспрессии CD45, а гранулоциты – как клетки с очень высоким SSC и сниженной экспрессией CD45. T-клетки идентифицировали по наличию экспрессии CD3, CD4 и CD8 и разделяли на подгруппы наивных клеток и клеток памяти, как описано выше. В среднем бляшка содержала  $127\ 000 \pm 26\ 000$  T-клеток, из которых  $60\ 200 \pm 12\ 000$  принадлежали к подгруппе CD8 T-клеток, а  $66\ 500 \pm 13\ 000$  – к подгруппе CD4 T-клеток ( $n=28$ ). Также мы оценивали количество различных субпопуляций T-клеток, содержащихся в 1 мг ткани бляшки. В среднем на 1 г ткани бляшки приходилось  $190\ 700 \pm 84\ 300$  лимфоцитов ( $n=7$ ); средняя масса бляшки составила  $702 \pm 0,13$  мг ( $n=6$ ).

На рисунке 2 представлены обобщенные данные, полученные из клеток бляшек. Проточная цитометрия показала, что



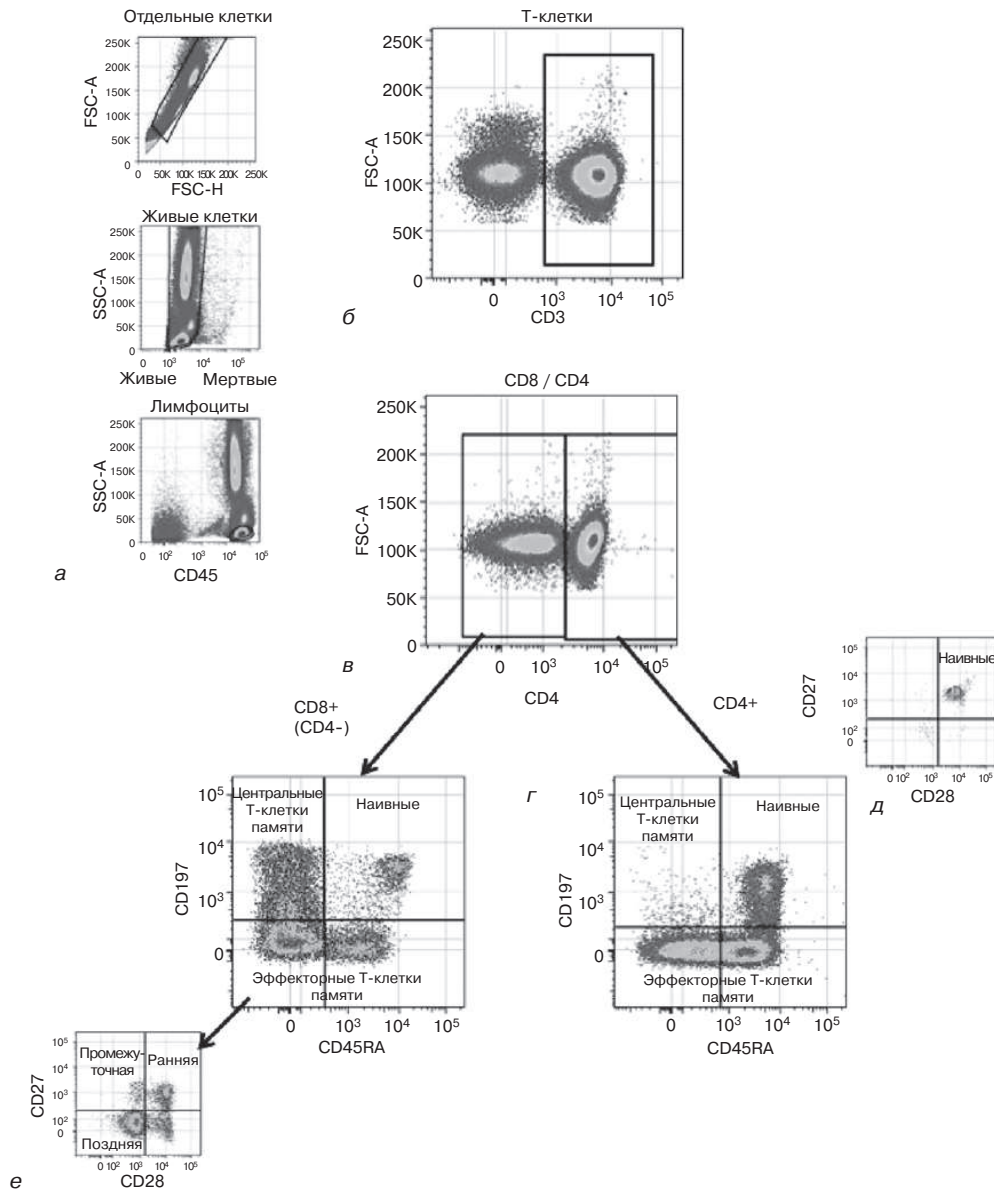


Рис. 1. Стратегия гейтирования при исследовании лимфоцитов. Отдельные клетки выявляли на гистограмме FSC-Area/FSC-Height. Мертвые клетки при этом исключали на основе их позитивного окрашивания аминореактивным красителем для выявления живых и мертвых клеток. Лимфоциты определяли как клетки с низким боковым светорассеянием (SSC), ярко окрашенные на CD45 (а). Т-клетки определяли среди остальных лимфоцитов по экспрессии CD3 (б) и подразделяли при этом на клетки CD4+ и CD8+ (CD4-) на гистограмме CD3/CD4 (в). На основании экспрессии CD197 и CD45RA каждую фракцию Т-клеток (CD4+ и CD4-) подразделяли далее на наивные клетки (CD45RA+CD197+), центральные Т-клетки памяти ( $T_{cm}$ : CD197+CD45RA-) и эффекторные Т-клетки памяти ( $T_{em}$ : CD45RA+/-CD197-) (г). В дальнейшем каждую клеточную субпопуляцию проверяли на экспрессию CD28 и CD27 для уточнения наивного фенотипа (CD45RA+CD197+CD27+CD28+) (д) и для разделения  $T_{em}$  на клетки, находящиеся на ранней (CD27+CD28+), промежуточной (CD27+CD28- или CD27-CD28-) и поздней стадии (CD27-CD28-) дифференцировки (е)

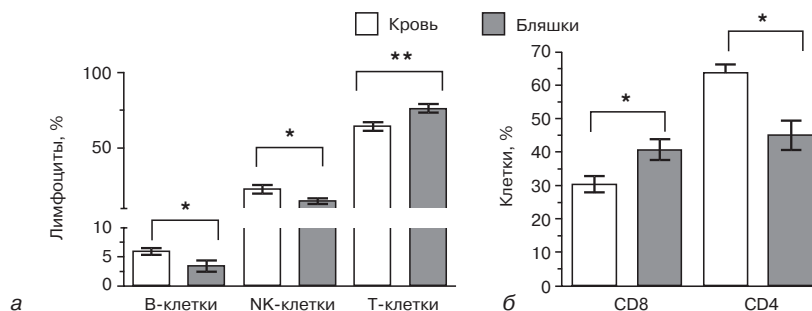


Рис. 2. Сравнение распределения лимфоцитов в кровотоке и в атеросклеротических бляшках. Клетки крови и клетки, выделенные из атеросклеротических бляшек, одновременно окрашивали на CD45, CD3, CD4, CD19, CD16, CD56 и CD8:

*а* – состав лимфоцитов: Т-клетки, В-клетки и NK-клетки определялись по экспрессии CD3, CD19, CD56 и CD16, при этом их относительная распространенность выражена в процентах от общего количества лимфоцитов, выявленных так, как это было описано на рисунках 1, *а-1*, *в*. Для лучшей визуализации низкой распространенности В-клеток и NK-клеток ось ординат сделана прерывистой; *б* – сравнение относительной распространенности CD4 и CD8 Т-клеток, исключая цитотоксические лимфоциты (ЦТЛ). Статистическая значимость показана с помощью двустороннего критерия Стьюдента.

\* 0,01 < *p* < 0,05, \*\* *p* < 0,01.

по сравнению с кровью бляшки содержали больше Т-клеток, которые в этой ткани составляли  $76,17 \pm 2,7\%$  ( $n=22$ ), а в крови  $64,26 \pm 2,4\%$  всех лимфоцитов ( $n=21$ ;  $p=0,005$ ). В образцах, в которых анализировали содержание В-, NK-, NKT- и Т-клеток, В-клетки (CD19+CD45+) были также неодинаково представлены в бляшке и в крови, соответственно  $3,42 \pm 0,91\%$  ( $n=22$ ) и  $5,92 \pm 0,56\%$  всех лимфоцитов ( $n=21$ ;  $p=0,013$ ) (см. рис. 2, *а*). Распределение NK-клеток между бляшками и кровью также было неодинаково: NK-клетки составляли в этих тканях соответственно  $15,17 \pm 1,77\%$  ( $n=22$ ) и  $22,78 \pm 2,7\%$  ( $n=21$ ) от общего числа лимфоцитов ( $p=0,023$ ). Для оценки количества CD8+Т-клеток, определяемых как CD8+CD3+Т-клетки, мы вначале исключили подгруппу NK Т-клеток, которые также экспрессируют CD3, но могут быть идентифицированы по способности экспрессировать CD16 и CD56. В бляшках CD8 Т-клетки составили  $40,77 \pm 3,08\%$  ( $n=22$ ), тогда как в крови –  $30,33 \pm 2,34\%$  от всех Т-клеток ( $n=21$ ;  $p=0,01$ ) (см. рис. 2, *в*).

Так как CD8 и CD4 Т-клетки вместе составляют почти весь пул Т-лимфоцитов, CD4 Т-клетки были менее представ-

лены в бляшках, чем в крови, и составили в этих двух компартментах  $45,04 \pm 4,39\%$  ( $n=22$ ) и  $63,83 \pm 2,33\%$  ( $n=22$ ) Т-клеток ( $p=0,001$ ) соответственно. Таким образом, бляшки были значительно обогащены CD8 Т-клетками по сравнению с кровью.

#### Т-клеточные субпопуляции в бляшках и в крови

Мы проводили окраску клеток на наличие маркеров, которые позволят классифицировать Т-клетки как наивные (CD45+CD3+CD45RA+CD197+CD27+CD28+) и клетки памяти. Последние, в свою очередь, подразделялись на центральные клетки памяти (Т<sub>cm</sub>) (CD45+CD3+CD45RA-CD197+CD27+CD28+) и эффекторные клетки памяти (Т<sub>em</sub>) (CD45+CD3+CD45RA+/-CD197-). Анализ этих субпопуляций выявил значительные различия между кровью и атеросклеротическими бляшками, а также между кровью пациентов с неразрывавшимися (стабильными) бляшками и кровью пациентов с разрывавшимися (нестабильными) бляшками.

Субпопуляции CD8 Т-клеток в бляшках и в крови. Среди CD8 Т-клеток фракция

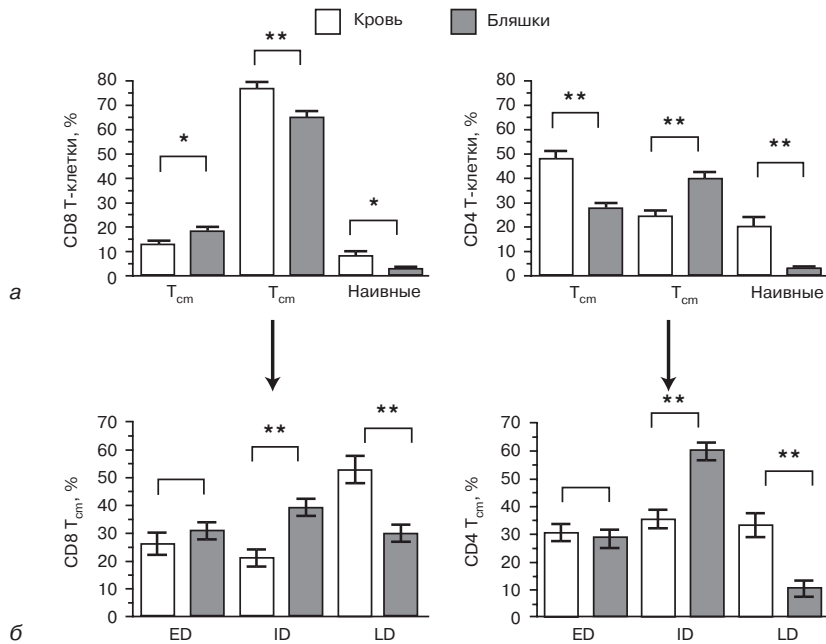


Рис. 3. Сравнение фенотипов Т-клеток в кровотоке и в атеросклеротических бляшках. Клетки крови и клетки, выделенные из атеросклеротических бляшек, одновременно окрашивали на CD45, CD3, CD4, CD28, CD27, CD197 и CD45RA. Т-клетки были определены по методу, представленному на рисунке 1. На основе экспрессии CD4 Т-клетки подразделялись на CD4+ и CD4- (CD8+) Т-клетки:

а – дифференциальная экспрессия CD197, CD45RA и CD28 и CD27 позволила разделить CD4 и CD8 Т-клетки на наивные клетки (CD45RA+CD197+CD27+CD28+), центральные Т-клетки памяти (Т<sub>cm</sub>: CD197+CD45RA-) и эффекторные Т-клетки памяти (Т<sub>em</sub>: CD45RA+/-CD197-); б – эффекторные Т-клетки памяти на основе экспрессии CD27 и CD28 подразделяли на клетки, находящиеся на ранней (ED) (CD27+CD28+), промежуточной (ID) (CD27+CD28- или CD27-CD28+) и поздней (LD) стадиях (CD27-CD28-) дифференцировки. Статистическая значимость показана с помощью двустороннего критерия Стьюдента.

\*0,01<p<0,05, \*\*p<0,01.

Т<sub>cm</sub> в бляшках отличалась от таковой в крови (18,25±1,84 и 13,16±1,53% D8 Т-клеток соответственно; n=28 и n=25, p=0,042). Подобно этому Т<sub>em</sub> составляли меньшую фракцию CD8 Т-клеток в бляшке, чем в крови (рис. 3, а), составляя 64,96±2,50 (n=28) и 76,23±2,82% (n=25; p=0,0042) соответственно.

На основании экспрессии маркеров CD28 и CD27 Т<sub>em</sub>-клетки могут быть подразделены на раннедифференцированные (CD45+CD3+CD45RA-CD197-CD27++CD28+) (Т<sub>em</sub>ED), промежуточные (CD45+CD3+CD45RA-CD197-CD27+/-CD28+) (Т<sub>em</sub>ID), и поздне-дифференцированные клетки (CD45+CD3+CD45RA+/-CD197-CD27-CD28-) (Т<sub>em</sub>LD) [1]. Рас-

пределение CD8 Т<sub>em</sub>-клеток по этим подгруппам в бляшках и крови и в крови пациентов с неразорвавшимися и разорвавшимися бляшками различаются (рис. 3, б). В бляшках и крови фракции CD8 Т<sub>em</sub>ID-клеток составляли 39,20±2,87 и 22,25±2,74% от общего количества CD8 Т<sub>em</sub>-клеток соответственно (p=0,001); фракции CD8 Т<sub>em</sub>LD-клеток составляли 29,25±3,61 и 53,45±4,98% от общего количества CD8 Т<sub>em</sub>-клеток (n=25-28; p<0,001) соответственно. Наоборот, фракции CD8 Т<sub>em</sub>ED-клеток в бляшке и в крови не отличались и составили 31,5±2,96% в бляшке (n=28) и 24,28±3,71% в крови пациентов (n=25; p=0,13). Также наивные CD8 Т-клетки были неравномерно рас-



пределены между бляшками и кровью и составили соответственно  $2,86 \pm 0,73$  и  $8,13 \pm 2,0\%$  ( $n=28$  и  $n=25$ ,  $p=0,019$ ) от всех CD8 T-клеток в этих тканях.

**CD4 T-клеточные субпопуляции в бляшках и крови.** В отличие от CD8 T-клеток CD4 T<sub>cm</sub>-клетки были представлены в меньшем количестве в бляшках, чем в крови, и составляли соответственно  $27,68 \pm 2,43$  и  $50,44 \pm 2,99\%$  от CD4 T-клеток в этих тканях ( $n=28$  и  $n=25$ ,  $p<0,001$ ) (см. рис. 3, а). В среднем CD4 T-клетки в бляшках были более дифференцированы, чем в крови: популяция T<sub>em</sub>-клеток составила соответственно  $39,95 \pm 2,73$  и  $23,79 \pm 2,27\%$  от общего количества CD4 T-клеток в этих тканях ( $n=28$  и  $n=25$ ,  $p<0,001$ ) (см. рис. 3, б). CD4 T<sub>em</sub>ED-клетки были одинаково представлены в бляшках и в крови и составляли  $29,06 \pm 2,68$  и  $32,0 \pm 3,11\%$  соответственно от числа CD4 T<sub>em</sub>-клеток ( $n=28$  и  $n=25$ ,  $p=0,476$ ). CD4 T<sub>em</sub>ID-клетки составляли в бляшках и в крови соответственно  $60,24 \pm 3,1$  и  $37,38 \pm 3,34\%$  от общего числа CD4 T<sub>em</sub>-клеток ( $n=28$  и  $n=25$ ,  $p<0,001$ ), и, наконец, CD4 T<sub>em</sub>TD-клетки составляли в бляшках и в крови соответственно  $10,68 \pm 3,25$  и  $30,61 \pm 4,18\%$  от общего числа CD4 T<sub>em</sub>-клеток ( $n=28$  и  $n=25$ ,  $p<0,001$ ). Наивные CD4 T-клетки были неравномерно распределены между бляшкой и кровью и составляли соответственно  $3,34 \pm 0,73$  и  $19,27 \pm 3,21\%$  ( $n=28$  и  $n=25$ ,  $p<0,001$ ), от количества CD4 T-клеток в этих тканях. Таким образом, спектры T-клеток различаются в периферической крови и в атеросклеротических бляшках.

Также мы сравнили фракции регуляторных T-клеток в бляшке и в крови. Мы определяли регуляторные T-клетки как CD4 T-клетки, которые экспрессировали фактор транскрипции Foxp3 и CD25, рецептор к IL-2. Клетки выделяли из бляшек и из крови пяти пациентов и окрашивали на поверхностные маркеры и CD25, затем фиксировали и пермеабелизировали в Foxp3-совместимой буферной системе. Мы

не нашли никаких различий между бляшкой и кровью в количествах регуляторных T-клеток. В бляшках Foxp3+CD25+ клетки составляли  $2,29 \pm 0,89\%$ , тогда как в крови —  $0,95 \pm 0,53\%$  от общего числа CD4 T-клеток ( $p=0,313$ ).

В вышеописанном анализе мы не разделяли образцы на полученные от мужчин и женщин. Тем не менее мы проверили, не влияет ли на результаты исследования факт преобладания «мужских» бляшек над «женскими» в нашей когорте. Для этого мы сравнили подгруппы T-клеток в бляшках и в крови, полученных от 7 женщин и 20 мужчин. Не было обнаружено статистически значимых различий между величиной фракции В-клеток ( $p=0,48$ ), NK-клеток ( $p=0,345$ ), T-клеток ( $p=0,667$ ), CD4 T-клеток ( $p=0,370$ ) и CD8 T-клеток ( $p=0,312$ ) из этих групп. Не было найдено и различий между подгруппами CD8 T-клеток, полученных из мужских и женских тканей. Исключение составили субпопуляции CD8 T<sub>cm</sub>- и CD8 T<sub>em</sub>-клеток. Фракция CD8 T<sub>cm</sub>-клеток была немного меньше в образцах, полученных от женщин, чем от мужчин (соответственно  $10,11 \pm 1,6$  и  $17,53 \pm 1,45\%$ ,  $p=0,012$ ). Фракция CD8 T<sub>em</sub>-клеток была больше в образцах от женщин, чем от мужчин ( $78,69 \pm 2,79$  против  $67,81 \pm 2,32\%$ ,  $p=0,022$ ).

Аналогично тонкий анализ фенотипов CD4 T-клеток показал, что единственным различием в подгруппах мужчин и женщин было количество CD28-CD4+ T-клеток, которое было больше в образцах, полученных от женщин ( $11,95 \pm 2,84$  против  $6,53 \pm 1,01\%$ ,  $p=0,033$ ).

#### **Анализ активации T-клеток в бляшках и в крови**

Мы сравнили экспрессию поздних маркеров активации CD25, CD38 и HLA-DR, а также IFN  $\gamma$  и IL-2 на CD8 и CD4 T-клетках, выделенных из бляшек и из крови пациентов.

**Активация CD8 T-клеток в бляшках и в крови.** При анализе экспрессии маркеров

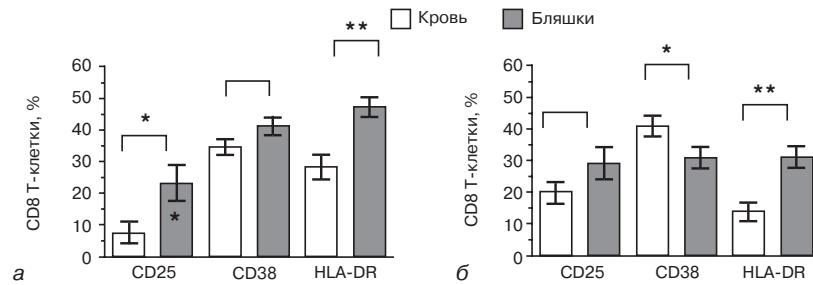


Рис. 4. Сравнение активации лимфоцитов в кровотоке и в атеросклеротических бляшках. Клетки крови и клетки, выделенные из атеросклеротических бляшек одновременно окрашивали на CD45, CD3, CD4, CD25, CD38 и HLA-DR:

*a* – сравнение активации CD8 Т-клеток в кровотоке и в атеросклеротических бляшках; *б* – сравнение активации CD4 Т-клеток в кровотоке и в атеросклеротических бляшках. Статистическая значимость показана с помощью двустороннего критерия Стьюдента.

\* $0,01 < p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

активации было выявлено, что в бляшках CD8 Т-клетки активированы в большей степени, чем в крови (рис. 4, *a*). В бляшках и в крови CD25 экспрессировали соответственно  $23,05 \pm 4,6$  ( $n=28$ ) и  $7,41 \pm 4,77$  ( $n=26$ ;  $p=0,02$ ) CD8 Т-клеток. CD38 также экспрессировали в бляшках большее число CD8 Т-клеток, чем в крови: соответственно  $41,26 \pm 2,69$  ( $n=28$ ) и  $34,55 \pm 2,79$  ( $n=26$ ). Однако эти различия не были статистически достоверными ( $p=0,089$ ). Также фракция клеток, экспрессирующих HLA-DR была выше в бляшках, чем в крови, и составляла соответственно  $47,26 \pm 3,54$  ( $n=28$ ) и  $28,31 \pm 3,67$  ( $n=26$ ;  $p < 0,001$ ) от общего числа CD8 Т-клеток. Фракция клеток, ко-экспрессирующих CD25 и HLA-DR, была наиболее отличающимся показателем между бляшками и кровью, составив  $14,88 \pm 3,29$  ( $n=22$ ) в бляшках и только  $2,48 \pm 3,54$  ( $n=19$ ) в крови ( $p=0,011$ ).

*Активация CD4 Т-клеток в бляшках и в крови.* CD4 Т-клетки (рис. 4, *б*) в крови и в бляшках не отличались по уровню экспрессии CD25: этот маркер активации экспрессировали  $29,3 \pm 14,35$  ( $n=28$ ) CD4 Т-клеток бляшек и  $20,09 \pm 4,51$  ( $n=26$ ) CD4 Т-клеток крови ( $p=0,143$ ). Напротив, экспрессия CD38 различалась между CD4 Т-клетками в бляшках и в крови:  $31,14 \pm 3,25$  ( $n=28$ ) и  $41,13 \pm 3,38$

( $n=26$ ) соответственно ( $p=0,038$ ). Сходным образом, фракции CD4 Т-клеток, экспрессирующих HLA-DR, были различны в бляшках и в крови и в этих двух тканях составили  $37,16 \pm 2,92$  ( $n=28$ ) и  $14,12 \pm 3,03$  ( $n=26$ ;  $p < 0,001$ ) соответственно.

Таким образом, сравнение активации CD4 и CD8 Т-клеток показало, что в бляшках преимущественно активированы CD8 Т-клетки:  $41,26 \pm 2,69$  CD8 Т-клеток в бляшке экспрессировали CD38 по сравнению с  $31,14 \pm 3,25$  CD4 Т-клеток ( $n=28$ ,  $p < 0,001$ ). Также HLA-DR экспрессировали  $47,26 \pm 3,54$  CD8 Т-клеток и  $37,16 \pm 2,92$  CD4 Т-клеток ( $n=26$ ,  $p < 0,001$ ). В крови экспрессия HLA-DR была также выше на CD8 Т-клетках, чем на CD4 Т-клетках:  $28,31 \pm 3,67$  против  $7,41 \pm 4,77$  соответственно ( $n=26$ ,  $p < 0,001$ ). Однако экспрессия CD25 была выше на CD4 Т-клетках, чем на CD8 Т-клетках:  $20,09 \pm 4,51$  против  $7,4 \pm 3,8$  соответственно ( $n=26$ ,  $p < 0,001$ ).

Далее, мы выявили уровень продукции IFN  $\gamma$  и IL-2. Эти цитокины не экспрессировались до тех пор, пока клетки не были активированы поликлональным активатором РМА в присутствии иономицина. После такой активации  $29,54 \pm 8,3$  CD8 Т-клеток в бляшке (медиана  $29,76$ , IQR  $4,66-54,28$ %,  $n=5$ ) экспрессировали

IL-2 и  $34,09 \pm 15,46\%$  (медиана  $22,95\%$ , IQR  $9,07-64,68\%$ ,  $n=5$ ) экспрессировали IFN  $\gamma$ . В клетках крови уровень экспрессии этих цитокинов составил соответственно  $4,13 \pm 8,29\%$  (медиана  $1,97\%$ , IQR  $0,28-9,08\%$ ,  $n=5$ ) и  $20,63 \pm 15,64\%$  (медиана  $5,75\%$ , IQR  $2,53-46,16\%$ ). Подобный анализ CD4 T-клеток выявил, что в бляшках  $40,73 \pm 8,9\%$  клеток (медиана  $36,90\%$ , IQR  $16,51-66,85\%$ ,  $n=5$ ) экспрессировали IL-2 и  $26,55 \pm 10,66\%$  (медиана  $18,5\%$ , IQR  $5,07-52,05\%$ ,  $n=5$ ) экспрессировали IFN  $\gamma$ . В клетках крови уровень экспрессии этих цитокинов составил  $7,79 \pm 8,9\%$  (медиана  $4,12\%$ , IQR  $0,75-16,66\%$ ,  $n=5$ ) и  $9,9 \pm 10,62\%$  (медиана  $3,24\%$ , IQR  $0,84-22,33\%$ ) соответственно.

Мы также предприняли попытку обнаружить провоспалительные Th17-клетки, определяемые как экспрессирующие CD161 клетки, которые секретируют IL-17A [6]. В ответ на стимуляцию бо́льшая фракция CD8 T-клеток в бляшке, чем в крови, экспрессировала CD161 и продуцировала IL-17 ( $29,15 \pm 4,3$ ,  $17,18 \pm 3,14$ ,  $0,48 \pm 0,26$  и  $0,08 \pm 0,04\%$  соответственно). Однако эти различия не достигли уровня статистической значимости ( $p=0,186$  и  $p=0,054$  соответственно,  $n=5$ ). Не было найдено различий в числе клеток, коэкспрессирующих IL-17 и CD161 ( $0,48 \pm 0,26$  против  $0,08 \pm 0,04\%$  CD8 T-клеток соответственно,  $p=0,186$ ).

Также, бо́льшая фракция CD4 T-клеток в бляшке, чем в крови, экспрессировала CD161 в ответ на стимуляцию ( $63,16 \pm 2,28$  против  $28,97 \pm 6,02$  соответственно,  $n=5$ ,  $p=0,003$ ) и секретировала IL-17 ( $1,5 \pm 0,48$  против  $0,25 \pm 0,13\%$ ,  $n=5$ ,  $p=0,041$ ). Когда эти два маркера объединили, чтобы обнаружить Th17-клетки, достоверность этих различий исчезла. Клетки CD161+Th17+ составили  $0,91 \pm 0,42\%$  в крови и  $0,13 \pm 0,17\%$  CD4 T-клеток в бляшке ( $p=0,12$ ). Таким образом, мы не нашли статистически достоверной разницы в уровнях экспрессии цитокинов между искусственно стимулированными T-клетками из крови и из бляшек,

возможно, вследствие большой вариабельности данных.

В вышеприведенном анализе мы сравнили фракции и статус активации T-клеток в бляшках и крови от тех же пациентов. Ниже мы сравнили эти параметры с показателями клеток крови здоровых доноров.

Различия между фракциями T-лимфоцитов в этих трех группах тканей были достоверны ( $p=0,026$ ). Хотя единственное достоверное различие было найдено между фракцией T-клеток в бляшке и крови пациентов ( $p=0,008$ ). Достоверное различие было найдено между тремя группами во фракциях CD4 и CD8 T-клеток ( $p<0,001$  и  $p=0,007$  соответственно).

В дополнение к вышеописанным различиям между клетками бляшек и крови пациентов *post hoc*-анализ выявил различия между бляшками и кровью в контрольной группе во фракциях CD4 ( $p=0,002$ ) и CD8 ( $p=0,028$ ) T-клеток. Напротив, фракции CD4 и CD8 клеток из крови пациентов и крови здоровых доноров не различались ( $0,7 < p < 0,77$ ). Анализ подгрупп CD4 T-клеток подтвердил вышеописанные различия между клетками бляшек и крови, а также выявил различия между кровью пациентов и кровью контрольной группы: последняя содержала достоверно больше CD4 T<sub>em</sub>ED-клеток ( $51,32 \pm 5,6$  против  $32,01 \pm 2,97\%$ ,  $p=0,0098$ ), тогда как CD4 T<sub>em</sub>LD-клетки были более многочисленны в крови пациентов, чем в крови контрольной группы (соответственно  $30,6 \pm 3,65$  и  $9,3 \pm 6,9\%$ ,  $p=0,023$ ). Наивные CD4 T-клетки преобладали в крови контрольной группы, чем в крови пациентов ( $40,18 \pm 4,26$  против  $19,27 \pm 2,25\%$ ,  $p<0,001$ ). Наконец, этот анализ выявил различия в распределении CD4+CD28-T-клеток, которые были достоверны только между кровью пациентов и кровью здоровых доноров ( $9,16 \pm 1,39$  против  $1,91 \pm 2,5\%$ ,  $p=0,043$ ).

Анализ подгрупп CD8 T-клеток между тремя группами выявил, что кровь здоровых доноров содержит достоверно меньше

CD8 T<sub>em</sub>, чем кровь пациентов ( $48,97 \pm 5,49$  против  $76,23 \pm 2,91\%$ ,  $p < 0,001$ ). Анализ ANOVA выявил различия в распределении CD8 T<sub>em</sub> ID- и CD8 T<sub>em</sub> LD-клеток между тремя тканями ( $p=0,0001$  и  $p=0,0006$  соответственно), однако *post hoc*-анализ не показал никаких различий между кровью пациентов и кровью контрольной группы ( $0,143 < p < 0,9359$ ).

Наивные CD8 T-клетки не были равномерно распределены между тремя группами ( $p < 0,001$ ); так, *post hoc*-анализ выявил различия между кровью пациентов и бляшкой и достоверные различия между кровью здоровых доноров ( $33,40 \pm 3,18\%$ ) и кровью пациентов ( $p < 0,001$ ) и бляшкой ( $p < 0,001$ ).

Фракции В-клеток и НК-клеток достоверно не отличались при сравнении бляшек, крови доноров бляшек и нормальной крови ( $p=0,058$  и  $p=0,11$  соответственно).

Таким образом, наши данные показывают, что бляшки сильно насыщены активированными Т-клетками, особенно имеющими фенотип CD8.

### Обсуждение

Роль воспаления в развитии атеросклероза обсуждается со времен Рудольфа Вирхова, однако решающее значение воспаления в росте и разрушении бляшек стали признавать сравнительно недавно. Известно, что содержание многих провоспалительных цитокинов в крови коррелирует со смертностью у больных коронарной болезнью сердца [17, 27]. Также было показано что повышение содержания определенной группы лимфоцитов в крови связано с увеличением частоты сердечно-сосудистых событий у пациентов с ИБС, ревматоидным артритом, сахарным диабетом и хронической почечной недостаточностью [12, 19, 20, 24]. Не только системное воспаление, но и локальный удаленный воспалительный процесс влияет на состояние атеросклеротических бляшек. Например, была выявлена связь заболеваемости периодонтитом и коро-

нарным атеросклерозом [14]. Еще более важен тот факт, что воспаление в бляшке может вызывать ее рост и разрыв покрышки, приводя к таким клиническим проявлениям, как нестабильная стенокардия или острый инфаркт миокарда.

Как и воспаление любой другой локализации, воспаление в бляшке характеризуется инфильтрацией и активацией клеток иммунной системы [10, 22, 30]. Однако детальный анализ состояния отдельных клеток в бляшках до настоящего времени не был проведен за исключением анализа традиционной иммуногистохимией. Гистохимический анализ выявил, что в осложненных бляшках, полученных в ходе каротидной эндартерэктомии, содержится больше лимфоцитов [8, 25] и дендритных клеток [9], чем в контрольных образцах артерий.

Одним из основных препятствий к использованию современной технологии многоцветной проточной цитометрии для всестороннего изучения параметров клеток, содержащихся в бляшке, является сложность выделения клеток из бляшки без повреждения поверхностных клеточных маркеров, определяющих фенотип клеток. В настоящем исследовании нам удалось преодолеть эту проблему и разработать оригинальный протокол для выделения содержащихся в бляшке лимфоцитов, который позволяет сохранить их поверхностные структуры.

Мы сравнили, как действуют на клеточные маркеры МКПК различные ферментативные коктейли, которые в принципе возможно использовать для выделения клеток из тканей.

На основании такого анализа была выбрана оптимальная комбинация ферментов на основе коллагеназы IV, которая позволяет выделять клетки из атеросклеротических бляшек, сохраняя их поверхностные маркеры. Это дало нам возможность выполнить высокоинформативный анализ клеточного состава бляшки с помощью проточной цитометрии.

Первый вопрос, который мы задали, — являются ли бляшки отдельным иммунологическим компарментом, то есть отличается ли набор лимфоцитов в бляшках от такового в крови? Мы выяснили, что действительно, состав лимфоцитов в бляшках и в крови существенно различается: бляшки обогащены CD8 Т-клетками (отношение количества CD4/CD8 Т-клеток в крови было  $2,76 \pm 0,4$ , тогда как в бляшках это отношение составляло лишь  $1,3 \pm 0,24$ ). Затем мы исследовали экспрессию ряда маркеров активации, таких как CD25, CD38 и HLA-DR. Этот анализ показал, что Т-лимфоциты и особенно CD8 Т-клетки в бляшках более активированы, чем в крови. Фракция клеток, коэкспрессирующих CD25 и HLA-DR, в бляшках была в 10 раз больше, чем в крови. Несмотря на высокий уровень активации клеток, мало продуцировали цитокины, до тех пор пока клетки искусственно не стимулировали. Мы наблюдали такое же явление при использовании клеток крови, что согласуется с ранее опубликованными данными [4, 28, 31]. Ввиду недостаточного знания антигенов, ответственных за активацию этих клеток *in vivo*, использование *in vitro* поликлональных активаторов, таких как PMA [28], может помочь выявить систему цитокинов, поляризующих Т-клетки, действующую *in vivo*.

В целом полученные нами данные показывают, что лимфоциты, найденные в бляшках, не являются клетками крови, попавшими в анализируемую фракцию при выделении. В подтверждение этого вывода мы обнаружили, что CD8 Т-лимфоциты в атеросклеротических бляшках по сравнению с кровью не только преобладающая, но и более активированная фракция, что указывает на наличие местного воспалительного процесса в бляшках. Возможным объяснением факта, что CD8, а не CD4 Т-клетки более активированы в бляшках, является то, что антигены, ответственные за активацию этих Т-клеток, имеют вирусное или внутрикле-

точное происхождение (например, белки теплового шока или продукты перекисного окисления липидов) [10, 16, 18, 19]. В будущем наш подход позволит более детально охарактеризовать Т-клетки, чтобы проверить это предположение.

Одним из недостатков настоящего исследования было то, что мы не разделяли различные виды бляшек. К сожалению, достоверное разделение бляшек на разорвавшиеся и неразорвавшиеся не представляется возможным ввиду сильной травматизации тканей в процессе атерэктомии.

Тем не менее использование нашего протокола выделения Т-клеток в будущем позволит проанализировать возможные различия между Т-лимфоцитами в тканях пациентов с разорвавшимися и неразорвавшимися бляшками, а также с бляшками, имеющими поверхностные эрозии.

Также в будущем необходимо продолжить настоящее исследование, используя большее количество образцов для выявления различий между Т-клетками, содержащимися в бляшках мужчин и женщин. В частности, будет интересно подтвердить наше наблюдение, что в бляшках женщин содержится большее количество CD28-CD4+ Т-клеток по сравнению с бляшками мужчин. Высокое содержание этих клеток в крови связано с рецидивирующей нестабильной стенокардией, сахарным диабетом II типа [11, 12] и синдромом поликистозных яичников с высоким риском развития острого коронарного синдрома (ОКС) [23]. Высокий уровень CD28-CD4+ клеток в женских бляшках может быть соотнесен с меньшим риском возникновения обструктивной коронарной болезни у женщин с ОКС по сравнению с мужчинами [13]. Еще одним многообещающим продолжением настоящей работы может стать анализ Т-клеточных субпопуляций у пациентов с поверхностными эрозиями бляшек, которые чаще встречаются у женщин [3].

В настоящей работе мы сконцентрировались на сравнении бляшек и крови,



взятых от одних и тех же пациентов. При этом один важный сравнительный анализ клеточных популяций, а именно сравнение клеток крови пациентов и крови здоровых доноров, в основном осталось за пределами нашей работы, поскольку требовало сопоставления двух групп по большому количеству параметров. Тем не менее в настоящей работе мы сравнили клеточный состав трех групп образцов: клеток бляшек, клеток крови доноров бляшек и клеток крови здоровых лиц. Мы обнаружили, что кровь, полученная от доноров бляшек, содержала больше CD4 T<sub>em</sub>, терминально-дифференцированных CD4 T-клеток и CD4+CD28-T-клеток, но меньше наивных CD4 и CD8 T-клеток, так же как и раннедифференцированных T<sub>em</sub>, чем кровь здоровых доноров. Также кровь доноров бляшек содержала больше активированных T-клеток. Эти результаты согласуются с ранее опубликованными работами [10, 18, 19].

В целом накопление в бляшках CD8 T-клеток и преимущественная их активация и CD4 T-клеток по сравнению с кровью, может указывать на присутствие чужеродных антигенов в бляшках, как и предполагалось ранее [7, 8, 15, 16, 25, 26]. Для идентификации антигенов, стимулирующих миграцию T-клеток в артериальную стенку [5] и их активацию в бляшке, требуется проведение анализа специфичности взаимодействия отдельных T-клеток и потенциальных антигенов. С разработкой протокола выделения и идентификации T-клеток из бляшек, описанного в данной статье, становится возможным выполнение этого анализа.

Мы благодарим профессора Ю. В. Белова, профессора Н. А. Дарвиша, профессора И. В. Жбанова и профессора А. В. Покровского за их неоценимый вклад в организацию получения интраоперационного материала для данной работы.

## Л и т е р а т у р а

1. Appay V., Dunbar P. R., Callan M. et al. Memory CD8 T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections // *Nat. Med.* 2002. Vol. 8. P. 379–385.
2. Appay V., van Lier R. A., Sallusto F., Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues // *Cytometry A*. 2008. Vol. 73. P. 975–983.
3. Arbustini E., Dal Bello B., Morbini P. et al. Plaque erosion is a major substrate for coronary thrombosis in acute myocardial infarction // *Heart*. 1999. Vol. 82. P. 269–272.
4. Asemussen A. M., Nagorsen D., Keilholz U. et al. Flow cytometric determination of intracellular or secreted IFN for the quantification of antigen reactive t cells // *J. Immunol. Methods*. 2001. Vol. 251. P. 101–108.
5. Barlic J., Murphy P. M. Chemokine regulation of atherosclerosis // *J. Leukoc. Biol.* 2007. Vol. 82. P. 226–236.
6. Brucklacher-Waldert V., Steinbach K., Lioznov M. et al. Phenotypical characterization of human Th17 cells unambiguously identified by surface IL-17A expression // *J. Immunol.* 2009. Vol. 183. P. 5494–5501.
7. Chen S., Crother T. R., Ardit M. Emerging role of IL-17 in atherosclerosis // *J. Innate. Immun.* 2010. Vol. 2. P. 325–333.
8. De Palma R., Del Galdo F., Abbate G. et al. Patients with acute coronary syndrome show oligoclonal T-cell recruitment within unstable plaque: evidence for a local, intracoronary immunologic mechanism // *Circulation*. 2006. Vol. 113. P. 640–646.
9. Erbel C., Sato K., Meyer F. B. et al. Functional profile of activated dendritic cells in unstable atherosclerotic plaque // *Basic. Res. Cardiol.* 2007. Vol. 102. P. 123–132.
10. Gewaltig J., Kummer M., Koella C. et al. Requirements for CD8 T-cell migration into the human arterial wall // *Hum. Pathol.* 2008. Vol. 39. P. 1756–1762.
11. Giubilato S., Campioni M., Severino A. et al. Altered adaptive immune response in type 2 diabetes mellitus: enhanced pro-inflammatory activity of CD4+CD28null T-cells in diabetic versus nondiabetic patients with acute coronary syndromes // *Circulation*. 2010. Vol. 122. P. A151–158.
12. Giubilato S., Liuzzo G., Brugaletta S. et al. Expansion of CD4+CD28null T-lymphocytes in diabetic patients: exploring new pathogenetic mechanisms of increased cardiovascular risk in diabetes mellitus // *Eur. Heart J.* 2011. Vol. 32. P. 1214–1226.
13. Hochman J. S., Tamis J. E., Thompson T. D. et al. Sex, clinical presentation, and outcome in patients with acute coronary syndromes: global use of strategies to open occluded coronary arteries in acute coronary syndromes IIB investigators // *N. Engl. J. Med.* 1999. Vol. 341. P. 226–232.
14. Humphrey L. L., Fu R., Buckley D. I. et al. Periodontal disease and coronary heart disease inci-



- dence: a systematic review and meta-analysis // J. Gen. Intern. Med. 2008. Vol. 23. P. 2079–2086.
15. *Ionita M. G., Arslan F., de Kleijn D. P., Pasterkamp G.* Endogenous inflammatory molecules engage Toll-like receptors in cardiovascular disease // J. Innate. Immun. 2010. Vol. 2. P. 307–315.
  16. *Keller T. T., van der Meer J. J., Teeling P.* et al. Selective expansion of influenza A virus-specific T cells in symptomatic human carotid artery atherosclerotic plaques // Stroke. 2008. Vol. 39. P. 174–179.
  17. *Libby P., Okamoto Y., Rocha V. Z., Folco E.* Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice // Circ. J. 2010. Vol. 74. P. 213–220.
  18. *Libby P., Ridker P. M., Maseri A.* Inflammation and atherosclerosis // Circulation. 2002. Vol. 105. P. 1135–1143.
  19. *Libby P.* Role of inflammation in atherosclerosis associated with rheumatoid arthritis // Am. J. Med. 2008. Vol. 121. P. S21–S31.
  20. *Liuzzo G., Biasucci L. M., Trota G.* et al. Unusual CD4+CD28null T lymphocytes and recurrence of acute coronary events // J. Am. Coll. Cardiol. 2007. Vol. 50. P. 1450–1458.
  21. *Mahnke Y. D., Roederer M.* Optimizing a multicolor immunophenotyping assay // Clin. Lab. Med. 2007. Vol. 27. P. 469–485.
  22. *Naruko T., Ueda M., Haze K.* et al. Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes // Circulation. 2002. Vol. 106. P. 894–2900.
  23. *Niccoli G., Apa R., Lanzone A.* et al. CD4+CD28 null T lymphocytes are expanded in young women with polycystic ovary syndrome // Fertil. Steril. 2011. Vol. 95. P. 2651–2654.
  24. *Rizzello V., Liuzzo G., Brugaletta S.* et al. Modulation of CD4(+)CD28 null T lymphocytes by tumor necrosis factor- blockade in patients with unstable angina // Circulation. 2006. Vol. 113. P. 2272–2277.
  25. *Rossmann A., Henderson B., Heidecker B.* et al. T-cells from advanced atherosclerotic lesions recognize hHSP60 and have a restricted T-cell receptor repertoire // Exp. Gerontol. 2008. Vol. 43. P. 229–237.
  26. *Shi Y., Tokunaga O.* Chlamydia pneumoniae and multiple infections in the aorta contribute to atherosclerosis // Pathol. Int. 2002. Vol. 52. P. 755–763.
  27. *Stefanadi E., Tousoulis D., Papageorgiou N.* et al. Inflammatory biomarkers predicting events in atherosclerosis // Curr. Med. Chem. 2010. Vol. 17. P. 1690–1707.
  28. *Sullivan K. E., Cutilli J., Piliero L. M.* et al. Measurement of cytokine secretion, intracellular protein expression, and mRNA in resting and stimulated peripheral blood mononuclear cells // Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2000. Vol. 7. P. 920–924.
  29. *Tahara N., Imaizumi T., Virmani R., Narula J.* Clinical feasibility of molecular imaging of plaque inflammation in atherosclerosis // J. Nucl. Med. 2009. Vol. 50. P. 331–334.
  30. *Taleb S., Tedgui A., Mallat Z.* Regulatory T-cell immunity and its relevance to atherosclerosis // J. Intern. Med. 2008. Vol. 263. P. 489–499.
  31. *Theodorou G. L., Marousi S., Ellul J.* et al. T helper 1 (Th1)/Th2 cytokine expression shift of peripheral blood CD4+ and CD8- T cells in patients at the post-acute phase of stroke // Clin. Exp. Immunol. 2008. Vol. 152. P. 456–463.
  32. *Tung J. W., Heydari K., Tirouvanziam R.* et al. Modern flow cytometry: a practical approach // Clin. Lab. Med. 2007. Vol. 27. P. 453–468.

Поступила 20.06.2012