

Методы изучения клеточного и молекулярного состава атеросклеротических бляшек: обзор литературы

Саранчина Ю. В., Килина О. Ю., Дутова С. В., Польща Н. Г., Ханарин Н. В., Кулакова Т. С.

ФГБОУ ВО Хакассский государственный университет им. Н. Ф. Катанова. Абакан, Россия

В настоящее время высокая распространенность атеросклеротического поражения стенок сосудов и развитие на этом фоне сердечно-сосудистых заболеваний привлекает к этой проблеме специалистов из различных областей. Основное внимание сосредоточено на изучении факторов риска атеросклероза и его клинических осложнений с целью разработки методов профилактики и лечения. Новые знания, полученные в ходе фундаментальных исследований механизмов развития атеросклероза на молекулярном и клеточных уровнях, также способствуют разработке новых методов профилактики и лечения этой патологии. В статье представлен обзор основных современных лабораторных методов работы с атеросклероти-

ческими бляшками. Обсуждаются возможности методов для изучения клеточного состава бляшек и оценки функциональных возможностей клеток атеросклеротической бляшки.

Ключевые слова: атеросклеротическая бляшка, культивирование, цитокины, лимфоциты.

Кардиоваскулярная терапия и профилактика, 2017; 16(5): 95–101
<http://dx.doi.org/10.15829/1728-8800-2017-5-95-101>

Поступила 21/09-2017

Принята к публикации 25/09-2017

Methods for cellular and molecular compound of atherosclerotic plaques assessment: literary review

Saranchina Yu. V., Kilina O. Yu., Dutova S. V., Polshcha N. G., Khanarin N. V., Kulakova T. S.

FSBEI HE N. F. Katanov Khakassky State University. Abakan, Russia

Recently, high prevalence of atherosclerotic lesion of the vascular walls and further development of cardiovascular pathology attracts the specialists from different fields. The main attention is paid to the risk factors of atherosclerosis and its clinical complications with the aim of prevention and treatment methods development. New knowledge from fundamental research of atherosclerosis at cellular and molecular levels facilitates the development of novel methods for prevention and treatment of the pathology. The article points on the review of the main

modern laboratory tests for atherosclerotic plaques assessment. The opportunities discussed for the study of cellular contents of the plaques, as functional evaluation of the cells in plaques.

Key words: atherosclerotic plaque, cultivation, cytokines, lymphocytes.

Cardiovascular Therapy and Prevention, 2017; 16(5): 95–101
<http://dx.doi.org/10.15829/1728-8800-2017-5-95-101>

АС — атеросклероз, АСБ — атеросклеротическая бляшка, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ИГХ — иммуногистохимия, ИФА — иммуноферментный анализ, ПЦ — проточная цитометрия, ФД — ферментативная дезагрегация, ELISA — enzyme-linked immunosorbent assay, FBS — Fetal Bovine Serum, IL — Interleukin, INF — Interferon, MEM — Modified Eagle's, PMSF — phenylmethane sulfonyl fluoride, RPMI-1640 среда — Roswell Park Memorial Institute, TLR — Toll-like receptors, TNF — Tumor necrosis factor.

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания, в частности ишемическая болезнь сердца (ИБС) и ее осложнение — инфаркт миокарда являются главной причиной смертности населения в России и зарубежных странах [1-3]. Основным этиологическим фактором ИБС является атеросклероз (АС) коронарных артерий. У 95% пациентов с ИБС в коронарных артериях, преимущественно в проксимальных отделах, находят атеросклеротические поражения. Проблема АС является одной из самых актуальных в современной медицине в связи с его широкой распро-

страненностью, продолжительностью латентного периода течения и выраженностью неблагоприятных исходов [4-6].

В связи с высокой смертностью населения ученые всего мира на протяжении многих лет занимаются изучением механизмов развития АС. Итогом этого изучения стало появление большого количества теорий атерогенеза. Доминирующими среди них являются теории: липопротеидной инфильтрации, предложенной патоморфологом Н. Н. Аничковым в 1913г [7], и дисфункции эндотелия, выдвинутой в середине 70-х годов R. Ross

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

Тел.: + 7 (960) 775-23-65

e-mail: july.saran4ina2010@yandex.ru

[Саранчина Ю. В. — к. б. н., доцент кафедры фундаментальной медицины и гигиены, Килина О. Ю. — д. м. н., директор медико-психолого-социального института, Дутова С. В. — д. фарм. н., доцент кафедры фундаментальной медицины и гигиены, Польща Н. Г. — к. м. н., зав. кафедрой внутренних болезней, Ханарин Н. В. — к. м. н., доцент кафедры общепрофессиональных дисциплин, Кулакова Т. С. — ординатор кафедры внутренних болезней].

(1976) [8]. Также разрабатываются такие теории как вирусная [9, 10], аутоиммунная [7], генетическая [11] и моноклональная [12]. Несмотря на значительный прогресс в исследовании АС и многочисленные гипотезы, объясняющие его возникновение и течение, ряд ключевых моментов патогенеза заболевания остаются дискуссионными и недостаточно изученными.

В настоящее время одной из наиболее развиваемых является теория АС, связанная с вовлеченностью в патологический процесс иммунной системы. Согласно этой концепции, под АС понимают хроническое, вялотекущее, воспалительное заболевание, поражающее интиму артерий, характеризующееся локальным накоплением в ней липидов, клеточных элементов и развитием фиброзной ткани с последующим сужением просвета сосудов [13-15]. Проблема АС, обсуждаемая с позиции хронической воспалительной патологии артериальной стенки, предполагает вовлечение в патологический процесс как врожденных, так и адаптивных иммунновоспалительных механизмов, ведущую роль в которых играют медиаторы межклеточного взаимодействия — цитокины [16-20].

Патогенез АС, называемый также атерогенезом, включает в себя несколько последовательных стадий, каждой из которых соответствует свой тип атеросклеротического повреждения стенки сосуда. Основным элементом атеросклеротического поражения является атеросклеротическая бляшка (АСБ), которая, выступая в просвет сосуда, вызывает его сужение и затрудняет нормальный кровоток. Бляшка состоит из скопления внутриклеточных и внеклеточных липидов, фибрина, гладкомышечных клеток, соединительной ткани, промежуточного вещества (гликозаминогликанов и др.) и кальция. Она, увеличиваясь в размерах и изъязвляясь, может задерживать на своей поверхности кровяные элементы и сгустки крови, пропитываться солями кальция, а при ее разрыве содержимое бляшки может попасть в кровь и стать причиной тромбоза артерий сердца, мозга и других органов [21].

В настоящее время АСБ изучаются с различных сторон с помощью инструментальных и лабораторных методов. Инструментальные методы — различные виды томографии: позитронно-эмиссионная томография, магнитно-резонансная, мультиспиральная компьютерная томография, а также внутрисосудистое ультразвуковое исследование, направлены на установление местоположения, визуализацию, оценку риска дестабилизации и разрыва АСБ [22-26].

С помощью лабораторных методов проводятся количественная и качественная оценки клеточного состава АСБ, основными из них являются иммуногистохимия и проточная цитометрия. Исследований, посвященных изучению функцио-

нальной активности клеток, изолированных из АСБ *in vitro*, существует мало. Поэтому целью данного обзора является оценка имеющихся методов исследования АСБ.

Для реализации цели были проанализированы статьи, взятые из баз данных PubMed и РИНЦ, посвященные изучению различных свойств и состава АСБ. Анализ современных источников показал, что исследование АСБ можно проводить с помощью различных методов в зависимости от цели исследования. В связи с признанной ведущей ролью воспаления в атерогенезе, изучение АСБ ведется в основном в направлении изучения клеточного состава АСБ, а именно субпопуляционного содержания лейкоцитов с помощью методов иммуногистохимии (ИГХ) и проточной цитометрии (ПЦ), а также определяется уровень цитокинов в гомогенатах бляшек. В ходе анализа литературных данных было выявлено, что с целью изучения состава АСБ работа проводится в несколько этапов (рисунок 1): получение АСБ, выделение клеток из бляшек, оценка жизнеспособности выделенных клеток, культивирование выделенных клеток. Рассмотрим основные этапы изучения АСБ более подробно.

Методы получения и предварительной обработки АСБ

АСБ получают в ходе плановых операций в результате эндартерэктомии [27-34] и транспортируют в среде RPMI (Roswell Park Memorial Institute) — 1640 при комнатной температуре [28, 29]. Использование этой среды обусловлено тем, что ее состав разработан для культивирования именно лимфоидных клеток.

Работу с АСБ рекомендуется проводить не позже чем в течение 2 ч после операции [28-30]. Вероятно, это обусловлено тем, что более длительное хранение может привести к снижению жизнеспособности клеток и изменению их количества. Для исследований также могут быть использованы участки артерий, пораженные АС, полученные от пациентов после внезапной смерти в результате острой сердечной недостаточности [35, 36]. Все работы с АСБ проводятся стерильными инструментами в ламинарном шкафу с вертикальным потоком [29].

Полученный материал подвергают обработке в фосфатно-солевом буфере для удаления мононуклеарных клеток периферической крови [29]. При необходимости проводят декальцинирование в этилендиаминтетрауксусной кислоте. АСБ обязательно подвергают макроскопическому исследованию. При этом оцениваются изъязвления поверхности АСБ, наличие тромбов, кровоизлияния в АСБ, разрывы и надрывы, степень стенозирования просвета артерий, наличие обызвествления и другие изменения [37, 38].

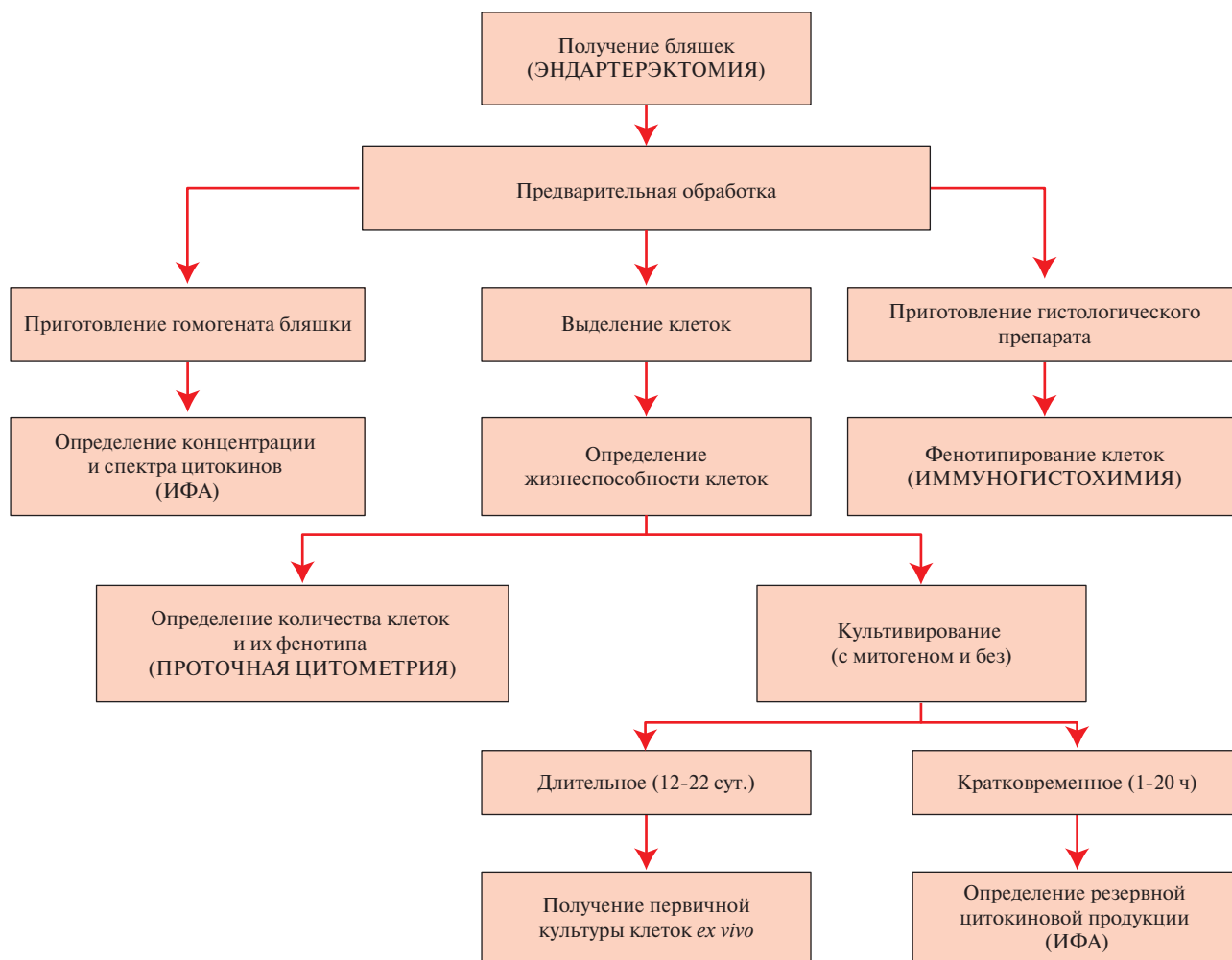


Рис. 1 Этапы работы с АСБ (по данным Leroyer AS, et al., 2007; Гривель Ж.-Ш. и др., 2012; Profumo E, et al., 2012; Пагино Ю. И. и др. 2014; Шишкина В. С. и др., 2014; Vorobyova DA, et al., 2016; Shalhoud J, et al., 2016; Karadimou G, et al. 2017).

После макроскопического исследования предварительно обработанный материал может быть разделен на несколько частей для проведения различных исследований. Для гистологического исследования АСБ и биоптаты артерий нарезают на кусочки толщиной 5-7 мм, фиксируют в 2% параформальдегиде и заключают в парафин [28, 31, 36, 37]. Также они могут быть обработаны моноклональными флуоресцентными антителами и изучены методом ИГХ или ПЦ [28, 39-41].

Другая часть материала может быть заморожена в жидком азоте для изучения биохимического состава АСБ и содержания цитокинов методом иммуноферментного анализа (ИФА) [28, 29, 31, 36, 42].

Для качественной и количественной оценок клеточного состава АСБ подвергают культивированию в условиях *in vitro* [43] и *ex vivo* [29, 30].

Методы выделения клеток из АСБ

Для культивирования используют эндотелиальные [37, 44, 45], гладкомышечные клетки стенок интима-медиа [35, 46], а также лейкоциты (лимфо-

циты, макрофаги), входящие в состав АСБ или биоптата артерии [28, 29, 47, 48].

Для выделения клеток из полученного материала (АСБ или биоптат артерий) могут быть использованы два метода: механическое экстрагирование и ферментативная дезагрегация (ФД). В случае механической обработки фрагмент ткани измельчают до кусочков размером ~1 мм, которые прикрепляются к субстрату, благодаря собственной адгезивности. ФД дает более высокий выход клеток, хотя метод является селективным, поскольку не все клетки выдерживают диссоциацию. На практике, наиболее успешное получение первичных клеток из многих тканей связано с использованием фермента коллагеназы, приводящим к снижению размера экспланта до небольшого кластера клеток, который прикрепляется к субстрату и расплывается [49].

Для изучения роли воспаления в формировании атеросклеротического поражения из АСБ чаще выделяют лимфоциты. Наиболее эффективным методом их выделения является обработка ком-

плексом ферментов. Перед выделением клеток методом ФД АСБ и биоптаты нарезают на фрагменты размером 2•2 мм и взвешивают для того, чтобы рассчитать необходимое количество фермента. В работе Гривель Ж.Ш. и др. (2012) были использованы два типа коллагеназ: коллагеназа XI (“Sigma-Aldrich”) и коллагеназа IV (“Invitrogen”), а также либераз DL (“Roche Diagnostics”, США) в присутствии ДНКазы I (“Roche Diagnostics”). В результате тестирования всех ферментов в разных концентрациях было получено, что наиболее эффективным для выделения клеток из АСБ, обеспечивающим сохранение большинства поверхностных маркеров, является коллагеназа IV (“Invitrogen”) в концентрации 1,25 мг/мл при времени ферментирования в течение 1 ч при 37° С. Полученные клетки собирали, отмывали и окрашивали моноклональными антителами для их дальнейшего фенотипирования [28].

В работе Черновой Е.В. и др. (2013) лизис биоптата артерии проводился с помощью фермента коллагеназы II типа (Worthington Diagnostic System, США) в среде 199, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Flow, Великобритания), 2 мМ L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина, 2,5 мкг/мл фунгизона (все реактивы Grand Island Biological Company — GIBCO, США) из расчета 10 мл раствора фермента на 1 г сырой ткани. Инкубация биоптата с ферментом проводилась до полного растворения ткани. Эффективность растворения ткани оценивалась визуально. Полученную суспензию клеток фильтровали через стерильную нейлоновую сетку и центрифугировали при 4° С в течение 20 мин при 1800 g на низкоскоростной центрифуге (Beckman TJ-6, Beckman Division, США). Осажденные клетки промывали в 10 мл ростовой среды 199, содержащей антибиотиков и 10% эмбриональной телячьей сыворотки, и повторно центрифугировали при тех же условиях. Осадок ресуспендировали в 10 мл ростовой среды. Подсчет полученного количества клеток проводили в счетной камере [35]. Выделенные клетки культивировались и использовались для воспроизведения процессов атерогенеза на клеточном уровне и оценки антиатерогенных свойств исследуемых лекарственных препаратов.

Таким образом, в зависимости от типа клеток и от цели исследования используются различные методы выделения клеток из АСБ и биоптатов артерий. При этом внимание исследователей сосредоточено в основном на клеточном составе. Методов выделения клеток из АСБ с целью изучения их функционального состояния не обнаружено.

Методы оценки жизнеспособности выделенных клеток

Обязательным условием эффективности проведения культивирования клеток является оценка их

жизнеспособности. В литературе описано несколько способов, используемых для отделения живых клеток от погибших, выделенных из АСБ,

В работе Лебедевой А.М. и др. (2012) клетки обрабатывались реактивом, содержащим 1 мг/мл красителя, реагирующего с аминогруппой pacific orange (“Invitrogen”, США). Окраску проводили в течение 15 мин при комнатной температуре, затем клетки растворялись в большом объеме фосфатно-солевого буфера, содержащего 2% нормальной мышиной сыворотки, и после центрифугирования ресуспендировались в 1 мл буфера для окраски. Все клетки пропускали через цитометр и анализировали на определение фенотипа [29].

В работе Shalhoub J, et al. (2016) для оценки жизнеспособности клеток использовались трипановый синий и флуоресцентные красители (пропидий йодида). Во всех образцах выживаемость клеток достигала >95% [30].

Методы культивирования участков артерий, пораженных АС

Методы культивирования участков артерий с АСБ с целью изучения развития АС описаны в работах Лебедевой А.М. и др. (2012). В состав среды для культивирования входили среда RPMI-1640, эмбриональная телячья сыворотка, инактивированная нагреванием, пируват натрия, пенициллин, стрептомицин и амфотерицин В, модифицированная среда МЕМ (Modified Eagle’s), содержащая заменимые аминокислоты [29, 30]. Блоки ткани помещались в чашки Петри с питательной средой на границе раздела среда — воздух на коллагеновые губки, согласно методу, разработанному Гривель Ж.Ш. и др. (2009) [50]. Ткань культивировалась в течение 12 сут. в инкубаторе с 5% CO₂ при 37° С, каждые 3 сут. образцы тканей фиксировались в 2% параформальдегиде, и их жизнеспособность оценивалась с помощью гистологии. Все покровные стекла тщательно исследовались на наличие мигрировавших из культивируемых образцов клеток, у которых изучалась морфология и показатели жизнеспособности. На 12-е сут. все образцы культивируемых тканей обрабатывались оригинальной оптимизированной смесью ферментов, которая позволяла выделять клетки и сохранять при этом поверхностные клеточные маркеры [29].

Можно встретить сообщения о возможности культивирования клеток с добавлением стимуляторов пролиферации. В работе Karadimou G, et al. (2017) проводилось культивирование клеток с имиквимодом, индуцирующим экспрессию провоспалительных цитокинов: Tumor necrosis factor (TNF), Interleukin (IL)-2, IL-6, IL-12, Interferon (INF)-α, INF-γ) в культуре клеток через взаимодействие с Toll-like receptors 7 (TLR7). Для этого кусочки АСБ инкубировали с митогеном в дозе 2,5, 5 и 12,5 мкг/мл в культуральной среде RPMI 1640 в течение

Таблица 1

Клетки и молекулы, обнаруженные в составе АСБ

Клетки	Авторы публикаций
Т-лимфоциты (CD3, CD4, CD8, CD45)	Гривель Ж.-Ш., Иванова О. И., Пинегина Н. В. и др., 2012 Profumo E, Buttari B, Tosti ME, et al., 2012 Vorobyova DA, Lebedev AM, Vagida MS, et al., 2016 Karadimou G, Folkersen L, Berg M, et al., 2017
В-лимфоциты (CD19)	Гривель Ж.-Ш., Иванова О. И., Пинегина Н. В. и др., 2012 Vorobyova DA, Lebedev AM, Vagida MS, et al., 2016
NK — клетки (CD16, CD56)	Гривель Ж.-Ш., Иванова О. И., Пинегина Н. В. и др., 2012 Vorobyova DA, Lebedev AM, Vagida MS, 2016
Моноциты/макрофаги (M1 (CD 68) и M2 (CD 163))	Leroyer AS, Isobe H, Lesèche G, et al., 2007 Karadimou G, Folkersen L, Berg M, et al., 2017
Гранулоциты (CD66b)	Leroyer AS, Isobe H, Lesèche G, et al., 2007
NKT-клетки (CD57, CD8)	Cai L, Yu L, Liu S, 2017
Цитокины	Авторы публикаций
Провоспалительные	
TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18	Гривель Ж.-Ш., Иванова О. И., Пинегина Н. В. и др., 2012 Рагино Ю. И., Чернявский А. М., Полонская Я. В. и др., 2012, Profumo E, Buttari B, Tosti ME, et al., 2012 Шишкина В. С., Челомбитко М. А., Ефремова Ю. Е. и др., 2014 Auguet T, Aragonès G, Guiu-Jurado E, et al., 2016 Vorobyova DA, Lebedev AM, Vagida MS, et al., 2016 Shalhoud J, Viiri LE, Cross AJ, et al., 2016 Cai L, Yu L, Liu S, et al., 2017 Maione AS, Cipolletta E, Sorriento D, et al., 2017 Karadimou G, Folkersen L, Berg M, et al., 2017
Противовоспалительные	
IL-10	Profumo E, Buttari B, Tosti ME, et al., 2012 Maione AS, Cipolletta E, Sorriento D, 2017 Karadimou G, Folkersen L, Berg M, et al., 2017
Факторы роста клеток	
GM-CSF	Shalhoud J, Viiri LE, Cross AJ, et al., 2016 Karadimou G, Folkersen L, Berg M, et al., 2017
TGF β -1	Шишкина В. С., Челомбитко М. А., Ефремова Ю. Е. и др., 2014
VEGF	Maione AS, Cipolletta E, Sorriento D, 2017 Karadimou G, Folkersen L, Berg M, et al., 2017
M-CSF	Shalhoud J, Viiri LE, Cross AJ, et al., 2016
Хемокины	Авторы публикаций
MCP-1	Рагино Ю. И., Чернявский А. М., Полонская Я. В. и др., 2012 Шишкина В. С., Челомбитко М. А., Ефремова Ю. Е. и др., 2014
СРБ, ЕМАР-II, sICAM-1, sVCAM-1	Рагино Ю. И., Чернявский А. М., Полонская Я. В. и др., 2012
CCL3, CCL18, CCL24	Шишкина В. С., Челомбитко М. А., Ефремова Ю. Е. и др., 2014
CCL5, CCL20, CXCL9	Shalhoud J, Viiri LE, Cross AJ, et al., 2016
Ферменты	Авторы публикаций
MMP-3, MMP-9	Shalhoud J, Viiri LE, Cross AJ, et al., 2016 Maione AS, Cipolletta E, Sorriento D, 2017

Примечание: CD — cluster of differentiation, NK — natural killer, NKT — natural killer T, GM-CSF — granulocyte-macrophage colony stimulating factor, TGF β — transforming growth factor beta, VEGF — vascular endothelial growth factor, M-CSF — macrophage colony-stimulating factor, MCP — monocyte chemoattractant protein, СРБ — С-реактивный белок, ЕМАР-II — endothelial monocyte activating polypeptide-II, sICAM-1 — soluble intercellular adhesion molecule-1, sVCAM-1 — soluble vascular cellular molecule, CCL-C — C motif chemokine ligand, MMP — matrix metalloproteinase.

20 ч. Для оценки цитокиновой продукции использовался супернатант [43].

Методы определения цитокинов в АСБ

В работах Рагино Ю. И. (2012) и Шишкина В. С. и др. (2014) для определения цитокинов замороженные в жидком азоте фрагменты образцов атеросклер-

ротических поражений различного типа гомогенизируются в ФСБ при pH = 7,4 (500 мкл буфера: 100 мкг ткани), содержащем коктейль ингибиторов протеаз при температуре 4° С. В 1 мл буфера содержатся в конечной концентрации 1 mM диэтилтри-тола, 1 mM PMSF, 10 μ г леупептина (Sigma, США).

Супернатант после гомогенизации и центрифугирования хранится при -700°C . Полученный таким способом супернатант используется для определения цитокинов методом ИФА с использованием наборов ELISA (наборы фирм BCM Diagnostics, Bender Medsystems, Biomedica) [31, 36].

Заключение

На основании анализа литературных источников по методам получения АСБ и выделения из них клеток были выявлены основные популяции лейкоцитов, входящих в состав АСБ и продуцируемые ими медиаторы воспаления (таблица 1). Было установлено, что для изучения клеток, изолированных из АСБ, их необходимо соответствующим способом подготовить, при необходимости осуществить культивирование. При этом основными методами оценки количественного и качественного клеточных составов АСБ являются проточная цитометрия и иммуногистохимия, которые позволяют определять клетки по поверхностным маркерам, а также по характеру их экспрессии судить о степени активности клеток. Основным методом определения цитокинов является иммуноферментный анализ.

Литература

- Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: full text. Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Eur Heart J 2007; 28 (19): 2375-414.
- Shalnova SA, Konradi AO, Karpov YuA, et al. Analysis of mortality from cardiovascular diseases in 12 regions of the Russian Federation involved in the study "Epidemiology of cardiovascular diseases in different regions of Russia". Russian Journal of Cardiology 2012; 5 (97): 6-11. (In Russ.) DOI:10.15829/1560-4071-2012-5-6-11 Russian (Шальнова С. А., Конради А. О., Карпов Ю. А. Анализ смертности от сердечно-сосудистых заболеваний в 12 регионах российской федерации, участвующих в исследовании "Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в различных регионах России". Российский кардиологический журнал 2012; 5 (97): 6-11 DOI:10.15829/1560-4071-2012-5-6-11).
- Sajgitov RT, Chulok AA. Cardiovascular disease in the context of socio-economic priorities of long-term development of Russia. Annals of the Russian academy of medical sciences 2015; 70 (3): 286-9. Russian (Сайгитов Р.Т., Чулок А.А. Сердечно-сосудистые заболевания в контексте социально-экономических приоритетов долгосрочного развития России. ВЕСТНИК РАМН 2015; 70 (3): 286-9).
- Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. Nature 2011; 473: 317-25.
- Wang Z, Lee J, Zhang Y. Increased Th17 cells in coronary artery disease are associated with neutrophilic inflammation. Scand Cardiovasc J 2011; 45: 54-61.
- Duerrschmid C, Crawford JR, Reineke E, et al. TNF receptor 1 signaling is critically involved in mediating angiotensin-II-induced cardiac fibrosis. J of Molecular and Cellular Cardiology 2013; 57: 59-67.
- Kuharchuk VV. Atherosclerosis. Topical issues of prevention and therapy. Cardiovascular Therapy and Prevention 2003; 2 (3): 80-5. Russian (Кухарчук В.В. Атеросклероз. Актуальные вопросы профилактики и терапии. Кардиоваскулярная терапия и профилактика 2003; 2 (3): 80-5).
- Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis. N Engl J Med 1976; 295: 369-77.
- Epstein F.H. Atherosclerosis — an inflammatory disease. New Engl J Med 1999; 340 (2):115-26.
- Mazurov VI, Veber VV, Stolov SV, et al. Immune correlation with different variants of IBS. Annals of the Russian academy of medical sciences 2005; 7: 9-14. Russian (Мазуров В.И., Вебер В.В., Столов С.В. и др. Иммунная взаимосвязь при различных вариантах ИБС. Вестник РАМН 2005; 7: 9-14).
- Partigulova AS, Naumov VG. Inflammation in atherosclerosis: the role of the renin-angiotensin-aldosterone system and its blockade. Kardiologiya 2010; 50 (10): 50-5. Russian (Партигулова А.С., Наумов В.Г. Воспаление при атеросклерозе: роль ренин-ангиотензин-альдостероновой системы и ее блокады. Кардиология 2010; 50 (10): 50-5).
- Frostegard J. Autoimmunity, oxidized LDL and cardiovascular disease. Autoimmun Rev 2002; 1: 233-7.
- Moiseev VS, Pavlikova EP, Meraj IA. The role of inflammation in atherogenesis and in the development of cardiovascular complications. The Doctor 2003; 3: 3-7. Russia (Моисеев В.С., Павликова Е.П., Мерай И.А. Роль воспаления в процессах атерогенеза и в развитии сердечно-сосудистых осложнений. Врач 2003; 3: 3-7).
- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. N Engl J Med 2005; 352: 1685-95.
- Ajmagambetova AO. Atherogenesis and inflammation. Science & healthcare 2016; 1: 24-39. Russia (Аймагамбетова А.О. Атерогенез и воспаление. Наука и здравоохранение 2016; 1: 24-39).
- Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. Physiol Rev 2006; 86 (2): 515-81.
- Bui QT, Prempeh M, Wilensky RL. Atherosclerotic plaque development. Int J Biochem Cell Biol 2009; 41 (11): 2109-13.
- Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. JACC 2009; 54 (23): 2129-38.
- Mc Cullough PA, Peacock FW, O'Neil B, et al. Capturing the pathophysiology of acute coronary syndromes with circulating biomarkers. Rev Cardiovasc Med 2010; 11 (2): 3-12.
- Turmov E, Markelova EV, Silaev AA, et al. The characteristics of cytokine status in patients with atherosclerosis. Medical Immunology (Russia) 2014; 16 (4): 323-32. Russia (Турмова Е.П., Маркелова Е.В., Силаев А.А. и др. Особенности цитокинового статуса у больных с атеросклерозом. Медицинская иммунология 2014; 16 (4): 323-32).
- Aronov DM, Lupanov VP. Some aspects of the pathogenesis of atherosclerosis. The Journal of Atherosclerosis and Dyslipidemias 2011; 1: 48-56. Russia (Аронов Д.М., Лупанов В.П. Некоторые аспекты патогенеза атеросклероза. Атеросклероз и дислипидемии 2011; 1: 48-56).
- Mitroshkin MG, Matchin YUG, Safarova MS, et al. Morphological features of atherosclerotic plaques depending on the degree of stenosis of coronary arteries in patients with stable ischemic heart disease. Kardiologicheskij Vestnik 2013; 8 (1): 35-40. Russia (Митрошкин М.Г., Матчин Ю.Г., Сафарова М.С. и др. Морфологические особенности атеросклеротических бляшек в зависимости от степени стенозирования коронарных артерий у больных со стабильной ишемической болезнью сердца. Кардиологический вестник 2013; 8 (1): 35-40).
- Nozadze DN. Instrumental and laboratory methods to identify unstable atherosclerotic plaques. The Journal of Atherosclerosis and Dyslipidemias 2013; 3: 4-10. Russia (Нозадзе Д.Н. Инструментальные и лабораторные методы в выявлении нес-

- табильных атеросклеротических бляшек. Атеросклероз и дислипидемии 2013; 3: 4-10).
24. Ershova AI, Meshkov AN, Shal'nova SA, et al. Ultrasound parameters of the carotid and femoral arteries in patients with coronary heart disease. The Journal of Preventive Medicine 2014; 6:56-63. Russia (Ершова А.И., Мешков А.Н., Шальнова С.А. и др. Ультразвуковые параметры атеросклероза сонных и бедренных артерий у больных ишемической болезнью сердца. Профилактическая медицина 2014; 6: 56-63).
25. Barysheva NA, Merkulova IN, Shabanova MS, et al. Structural changes of atherosclerotic plaques according multislice computed tomography during follow-up. The Journal of Atherosclerosis and Dyslipidemias 2015; 4: 5-14. Russia (Барышева Н.А., Меркулова И.Н., Шабанова М.С. и др. Структурные изменения атеросклеротических бляшек по данным мультиспиральной компьютерной томографии при динамическом наблюдении. Атеросклероз и дислипидемии 2015; 4: 5-14).
26. Gubar'kova EV, Kiseleva EB, Kirillin My, et al. Quantitative evaluation of polarization characteristics of atherosclerotic plaques in the coronary arteries at different stages of development. Modern Technologies in Medicine 2015; 7 (4): 39-49. Russia (Губарькова Е.В., Киселева Е.Б., Кириллин М.Ю. и др. Количественная оценка поляризационных характеристик атеросклеротических бляшек коронарных артерий на разных стадиях развития. Современные технологии в медицине 2015; 7 (4): 39-49).
27. Bart V, Willem E, Frans L. Carotid atherosclerotic plaques in patients with transient ischemic attacks and stroke have unstable characteristics compared with plaques in asymptomatic and amaurosis fugax patients. J Vasc Surg 2007; 34: 1075-81.
28. Grivel' ZH-SH, Ivanova OI, Pinegina NV, et al. New method for the analysis of the cellular composition of atherosclerotic plaques. Creative Cardiology 2012; 1: 26-40. Russia (Гривель Ж.-Ш., Иванова О.И., Пинегина Н.В. и др. Новый метод анализа клеточного состава атеросклеротических бляшек. Креативная кардиология 2012; 1: 26-40).
29. Lebedeva AM, Grivel' Zh-Sh, Ivanova OI, et al. Atherosclerotic plaques in the ex vivo system. Creative Cardiology 2012; 1: 43-50. Russia (Лебедева А.М., Гривель Ж.-Ш., Иванова О.И. и др. Атеросклеротические бляшки в системе ex vivo. Креативная кардиология 2012; 1: 43-50).
30. Shalhoub J, Viiri LE, Cross AJ, et al. Multi-analyte profiling in human carotid atherosclerosis uncovers pro-inflammatory macrophage programming in plaques. Thrombosis and Haemostasis 2016; 115(5): 1-9.
31. Ragino Yul. Factors and mechanisms of coronary atherosclerosis and its complications. The Journal "Ateroskleroz" 2012; 8 (1): 61-4. Russia (Рагино Ю.И. Факторы и механизмы коронарного атеросклероза и его осложнений. Атеросклероз 2012; 8 (1): 61-4).
32. Profumo E, Buttarì B, Tosti ME, et al. Plaque-infiltrating T lymphocytes in patients with carotid atherosclerosis: an insight into the cellular mechanisms associated to plaque destabilization. J Cardiovascular Surg (Torino) 2013; 54 (3): 349-57.
33. Vorobyova DA, Lebedev AM, Vagida MS, et al. Immunological analysis of human atherosclerotic plaques in ex vivo culture system. Kardiologiya 2016; 56 (11): 78-85. Russia (Воробьева Д.А., Лебедев А.М., Вагида М.С. и др. Иммунологический анализ атеросклеротических бляшек человека в системе культивирования ex vivo. Кардиология 2016; 56 (11): 78-85).
34. Stavik B, Holm S, Espada S, et al. Increased expression of TFPI in human carotid stenosis. Thromb Res 2017; 155: 31-7.
35. Chernova EV, Sobenin IA, Mel'nichenko AA, et al. Aterogennoe serum as pathogenetic targets for direct anti-atherosclerotic therapy. Pathogenesis 2013; 11 (3): 32-48. Russia (Чернова Е.В., Собенин И.А., Мельниченко А.А. и др. Атерогенность сыворотки крови как патогенетическая мишень для прямой антиатеросклеротической терапии. Патогенез 2013; 11 (3): 32-48).
36. Shishkina VS, Chelombit'ko MA, Efremova YuE, et al. Cytokines pro- and anti-inflammatory subpopulations of macrophages and their importance in the formation and stabilization of atherosclerotic plaques in the carotid arteries of a person. Kardiologicheskij Vestnik 2014; 4: 62-70. Russia (Шишкина В.С., Челомбитко М.А., Ефремова Ю.Е. и др. Цитокины про- и противовоспалительной субпопуляций макрофагов и их значение в формировании и стабилизации атеросклеротических бляшек в сонных артериях человека. Кардиологический вестник 2014; 4: 62-70).
37. Gulevskaya TS, Morgunov VA, Anufriev PL. Structure of atherosclerotic plaques of the carotid sinus and the cerebral circulation. Clinical neurology 2010; 4 (1): 13-9. Russian (Гулевская Т.С., Моргунов В.А., Ануфриев П.Л. Структура атеросклеротических бляшек каротидного синуса и нарушения мозгового кровообращения. Клиническая неврология 2010; 4 (1): 13-9).
38. Ragino Yul, Chernyavskij AM, Polonskaya YaV, et al. The activity of inflammatory process in different types of unstable atherosclerotic plaques. Bulletin of Experimental Biology and Medicine 2012; 153 (2): 150-3. (In Russ.) Рагино Ю.И., Чернявский А.М., Полонская Я.В. и др. Активность воспалительного процесса в разных типах нестабильных атеросклеротических бляшек. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2012; 153 (2): 150-3.
39. Herrmann J, Edwards WD, Holmes DR. Increased ubiquitin immunoreactivity in unstable atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndromes. JACC 2002; 40 (11): 1919-27.
40. Heider P, Pfaffle N, Pelisek J, et al. Is serum pregnancy-associated plasma protein a really a potential marker of atherosclerotic carotid plaque stability? Eur J Vasc Endovasc Surg 2010; 39 (6): 668-75.
41. Cai L, Yu L, Liu S, et al. Reconfiguration of NKT cell subset compartment is associated with plaque development in patients with carotid artery stenosis. Inflammation 2017; 40 (1): 92-9.
42. Auguet T, Aragonès G, Guiu-Jurado E, et al. Adipo/cytokines in atherosclerotic secretomes: increased visfatin levels in unstable carotid plaque. BMC Cardiovasc Disord 2016; 16 (1): 149.
43. Karadimou G, Folkersen L, Berg M, et al. Low TLR7 gene expression in atherosclerotic plaques is associated with major adverse cardiovascular events. Cardiovascular Res 2017; 113: 30-9.
44. Malinin VV, Durnova AO, Polyakova VO. Growth factors and adhesion molecules of vascular endothelium as molecular targets for the design of peptide drugs against atherosclerosis. Molecular medicine 2013; 3: 53-5. Russia (Малинин В.В., Дурнова А.О., Полякова В.О. Факторы роста и молекулы адгезии эндотелия сосудов как молекулярные мишени для создания пептидных лекарственных препаратов против атеросклероза. Молекулярная медицина 2013; 3: 53-5).
45. Orekhov AN, Andreeva ER, Krushinsky AV, et al. Primary cultures of enzyme-isolated cells from normal and atherosclerotic human aorta. Med Biol 1984; 62 (4): 255-9.
46. Michiels CF, Apers S, Meyer GDe, et al. Metformin attenuates expression of endothelial cell adhesion molecules and formation of atherosclerotic plaques via autophagy induction. Ann Clin Exp Metabol 2016; 1 (1): 1001: 1-9.
47. Leroyer AS, Isobe H, Lesèche G, et al. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. JACC 2007; 49 (7): 772-7.
48. Maione AS, Cipolletta E, Sorriento D, et al. Cellular subtype expression and activation of CaMKII regulate the fate of atherosclerotic plaque. Atherosclerosis 2017; 256: 53-61.
49. Blazhevich OV. Cultivation of cells: a course of lectures. Minsk: Belarusian state University, 2004; 78 p. (In Russ.) Блажевич О.В. Культивирование клеток: курс лекций. Минск: БГУ 2004; 78 с.
50. Grivel' Zh-Sh, Margolis L. Use of human tissue explants to study human infectious agents. Nat Protoc 2009; 4: 256-69.