

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616-018.74-076.5

Феоктистова В. С.<sup>1</sup>, Вавилова Т. В.<sup>1,2</sup>, Сироткина О. В.<sup>1,2,3</sup>, Болдуева С. А.<sup>1</sup>, Гайковская Л. Б.<sup>1</sup>, Леонова И. А.<sup>1</sup>, Ласковец А. Б.<sup>1</sup>, Ермаков А. И.<sup>1</sup>

## НОВЫЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ ДИСФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ: ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России, 191015, г. Санкт-Петербург; <sup>2</sup>ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России, 197341, г. Санкт-Петербург; <sup>3</sup>ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова», 188350, г. Гатчина, Ленинградская обл.

*Ведущее место в патогенезе развития сердечно-сосудистых заболеваний принадлежит дисфункции эндотелия. Прямым клеточным маркером повреждения и ремоделирования эндотелия могут выступать циркулирующие эндотелиальные клетки (ЦЭК) периферической крови. Целью настоящего исследования явилась разработка нового подхода к диагностике дисфункции эндотелия путем определения количества ЦЭК методом проточной цитометрии и использование определения ЦЭК в оценке риска развития ишемической болезни сердца (ИБС) у женщин молодого и среднего возраста. В исследовании приняли участие 62 пациентки с ангиографически подтвержденной ИБС, стенокардией напряжения на уровне I-II функционального класса (средний возраст 51 ± 6 лет) и 49 женщин без анамнеза ИБС (средний возраст 52 ± 9). Наличие более 3 ЦЭК на 3 • 10<sup>5</sup> 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. В работе показана возможность использования метода проточной цитометрии для количественного определения ЦЭК в периферической крови и прогнозирования риска развития ИБС у женщин молодого и среднего возраста в зависимости от уровня ЦЭК.*

**Ключевые слова:** дисфункция эндотелия; циркулирующие эндотелиальные клетки; проточная цитометрия; ишемическая болезнь сердца.

*Feoktistova V.S.<sup>1</sup>, Vavilkova T.V.<sup>1,2</sup>, Sirotkina O.V.<sup>1,2,3</sup>, Boldueva S.A.<sup>1</sup>, Gaikovaia L.B.<sup>1</sup>, Leonova I.A.<sup>1</sup>, Laskovets A.B.<sup>1</sup>, Ermakov A.I.<sup>1</sup>*

THE NEW APPROACH TO EVALUATION OF ENDOTHELIUM DYSFUNCTION: DETECTION OF NUMBER OF CIRCULATING ENDOTHELIUM CELLS USING FLOW CYTOMETRY TECHNIQUE

<sup>1</sup>The I.I. Mechnikov North-Western state medical university of Minzdrav of Russia, 191015 St. Petersburg, Russia; <sup>2</sup>The V.A. Almazov federal medical research center of Minzdrav of Russia, 197341 St. Petersburg, Russia; <sup>3</sup>The B.P. Konstantinov St. Petersburg institute of nuclear physics, 188350 Gatchina, Leningradskaia oblast, Russia

*The endothelium dysfunction takes leading place in pathogenesis of development of cardiovascular diseases. The circulating endothelium cells of peripheral blood can act as a direct cell marker of damage and remodeling of endothelium. The study was carried out to develop a new approach to diagnose of endothelium dysfunction by force of determination of number of circulating endothelium cells using flow cytometry technique and to apply determination of circulating endothelium cells for evaluation of risk of development of ischemic heart disease in women of young and middle age. The study embraced 62 female patients with angiography confirmed ischemic heart disease, exertional angina pectoris at the level of functional class I-II (mean age 51±6 years) and 49 women without anamnesis of ischemic heart disease (mean age 52±9 years). The occurrence of more than three circulating endothelium cells by 3x10<sup>5</sup> leukocytes in peripheral blood increases relative risk of development of ischemic heart disease up to 4 times in women of young and middle age and risk of development of acute myocardial infarction up to 8 times in women with ischemic heart disease. The study demonstrated possibility to apply flow cytometry technique to quantitatively specify circulating endothelium cells in peripheral blood and forecast risk of development of ischemic heart disease in women of young and middle age depending on level of circulating endothelium cells.*

**Key words:** endothelium dysfunction; circulating endothelium cells; flow cytometry; ischemic heart disease

**Введение.** Одним из основных патофизиологических механизмов развития ишемической болезни сердца (ИБС) является нарушение функциональной активности сосудистого эндотелия и его структурной целостности [1–3]. Для оценки функции эндотелия в клинической практике используются инструментальные методы исследования (прямая плетизмография, ультразвуковая диагностика) эндотелийзависимой и эндотелийнезависимой вазодилатации с помощью фармакологических проб (например, с ацетилхолином, нитроглицерином), пробы с реактивной гиперемией, холодным стрессом [4]. При всех достоинствах этих методик имеются опреде-

ленные ограничения для их применения в повседневной клинической практике - необходимость наличия дорогостоящей ультразвуковой аппаратуры, высококвалифицированных специалистов, трудоемкость, что делает возможным использование их лишь в крупных научных центрах. В лабораторной практике в настоящее время для оценки выраженности дисфункции эндотелия определяют в крови уровень антигена фактора Виллебранда как косвенного маркера повреждения эндотелия. Также возможно определение ряда биологически активных веществ, образующихся в эндотелии, таких как оксид азота (NO), эндотелин-1, ангиотензин-II, тромбоксан A2, фактор роста и пролиферации сосудов и др., однако, поскольку большая часть этих веществ синтезируется и в других клетках, их диагностическая ценность не однозначна [5, 6].

Циркулирующие эндотелиальные клетки (ЦЭК) – это зрелые дифференцированные клетки, которые отделяются от

Для корреспонденции:

Феоктистова Валерия Сергеевна, науч. сотр.  
E-mail: lerissima@yandex.ru

стенки эндотелия в процессе его повреждения [7, 8] и потому могут выступать прямым клеточным маркером дисфункции эндотелия. Количество ЦЭК в периферической крови у здоровых людей очень мало, так как при отсутствии патологических состояний процесс обновления эндотелия медленный, а нежизнеспособные ЦЭК быстро удаляются из кровотока ретикулоэндотелиальной системой [9]. В то же время рядом авторов показано увеличение количества этих клеток при различных патологических состояниях, включающих инфекционные заболевания, иммуно-опосредованные васкулиты, злокачественные новообразования и широкий спектр сердечно-сосудистых заболеваний [7, 8, 10–12]. Кроме того, у больных с острым инфарктом миокарда (ИМ) высокий уровень ЦЭК в периферической крови в первые сутки являлся независимым предиктором смерти и сердечно-сосудистых осложнений в отдаленном периоде, что может быть использовано в стратификации сердечно-сосудистого риска [3, 13, 14].

В настоящее время в клинической лабораторной практике подсчет количества клеток десквамированного эндотелия проводится по методике J. Hladovec, основанной только на визуальной оценке морфологии клеток при фазово-контрастной микроскопии [15], или CD146 опосредованной иммуномагнитной изоляции [8], однако оба метода являются трудоемкими и неавтоматизированными. Более перспективным для оценки уровня ЦЭК в периферической крови представляется использование проточной цитометрии, которая не имеет недостатков предыдущих методик.

Таким образом, целью настоящего исследования явилась разработка нового подхода к оценке дисфункции эндотелия путем определения количества ЦЭК методом проточной цитометрии. В этой связи были поставлены следующие задачи: разработать методику определения количества ЦЭК в периферической крови с помощью проточной цитометрии с использованием моноклональных флуоресцентно меченых антител к CD146 и CD45, определить уровень ЦЭК в периферической крови у женщин с ИБС молодого и среднего возраста и в контрольной группе и применить методику количественного определения ЦЭК при оценке риска развития ИБС и ее осложнения у женщин молодого и среднего возраста.

**Материалы и методы.** Определение количества ЦЭК в периферической крови осуществляли на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США) с использованием меченных флуорохромами моноклональных антител к поверхностным маркерам клеток: CD146-PE (phycoerythrin – фикоэритрин; Vesihan Coulter, США) в качестве метки для ЦЭК и CD45-PC5 (phycoerythrin + cyanine 5 - фикоэритрин + цианин 5; Beckman Coulter, США) как панлейкоцитарный маркер. Для исследования использовали цельную венозную кровь, взятую натощак в утренние часы из локтевой вены в стерильные вакуумные пробирки, содержащие 100 мкл 0,5 М ЭДТА (рН 8,0) в качестве антикоагулянта. Подробное описание методики определения ЦЭК приведено в разделе «Результаты».

В исследование было включено 111 женщин, из которых сформировали две группы: 1-я группа (основная) – 62 пациентки с ангиографически подтвержденной ИБС, стенокардией напряжения на уровне I–II функционального класса (от 35 до 59 лет, средний возраст  $51 \pm 6$  лет) и 2-я группа (контрольная) – 49 женщин без анамнеза ИБС и с отрицательным результатом нагрузочного тредмил-теста (от 35 до 74 лет, средний возраст  $52 \pm 9$  лет).

В основной группе у 51 (82%) женщины в анамнезе был острый инфаркт миокарда – ИМ (давностью более двух лет к моменту включения в исследование). Хирургическая реваскуляризация миокарда была выполнена у 58 (93%) больных 1-й группы (чрескожная ангиопластика и стентирование коронарных артерий у 33 (64%) женщин с ИБС и с ИМ в анамнезе и у 6 (54%) – с ИБС и без ИМ; аортокоронарное шунтирование – у 13 (25%) пациенток с ИБС и с ИМ в анамнезе и у 5 (46%) с ИБС и без ИМ) также давностью более двух лет

к моменту включения в исследование. Все больные получали антиагрегантную терапию препаратами ацетилсалициловой кислоты; кроме того 52 (86%) пациентки получали статины, 45 (73%) – ингибиторы АПФ, 48 (77%) –  $\beta$ -блокаторы.

Все лица, включенные в исследование, дали письменное информированное согласие. Критерии исключения для всех участников были: острые и хронические воспалительные заболевания, онкологические и системные заболевания, гематологические заболевания; алкоголизм; хроническая почечная недостаточность; пороки сердца и заболевания миокарда; оперативные вмешательства (в том числе и малоинвазивные процедуры) менее 6 мес назад.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного пакета STATISTICA 5.5 (Лиц. № АХХR402С29502). Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $M \pm m$ ). Весь анализ проводили непараметрическими статистическими методами: при сравнении групп по основным показателям применяли U-тест Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ . Пороговые значения количественных показателей были получены с помощью методов построения классификационных деревьев. Относительный риск (OR) рассчитывали с 95% доверительным интервалом (CI) по формуле:  $OR = a/bxd/c$ , где  $a$  и  $b$  – количество женщин с ИБС, у которых уровень ЦЭК в периферической крови соответственно выше и ниже порогового значения;  $c$  и  $d$  – количество женщин контрольной группы, у которых уровень ЦЭК в периферической крови соответственно выше и ниже порогового значения. Границы доверительного интервала вычисляли по формулам:  $OR_{min} = OR(1 - 1,96/\sqrt{\chi^2})$  и  $OR_{max} = OR(1 + 1,96/\sqrt{\chi^2})$ , где  $\chi^2 = ((axd - bxc) - 0,5n)2x(n - 1)/(n0xn1xm0xm1)$ ;  $n1 = a + b$ ;  $n0 = c + d$ ;  $m1 = a + c$ ;  $m0 = b + d$ ;  $n = n1 + n0 + m1 + m0$ .

**Результаты и обсуждение.** Анализ количества ЦЭК в общих группах проводили не позднее 3 ч с момента забора крови. Для исследования по 100 мкл крови переносили в сухие чистые пластиковые пробирки № 1 и № 2 вместимостью 5 мл. В пробирку № 1 добавляли 10 мкл CD45-PC5 (проба № 1), в пробирку № 2 – 10 мкл CD 146 = PE и 10 мкл CD45 PC5 (проба № 2) и инкубировали пробы при комнатной температуре в темноте в течение 15 мин. Затем с помощью визуирующего буфера IMMUNOPREP (Beckman Coulter, США) лизировали эритроциты на станции пробоподготовки COULTER TQ-Prep (Beckman Coulter, США). При проведении проточной цитофлуориметрии в каждой пробе анализировали 300 000 событий. По скатерограммам прямого и бокового светорассеяния лазерного луча исключали из анализа фрагменты разрушенных клеток (дебрис) и анализировали результаты скатерограмм исследуемых проб методом Буля для двойных позитивных событий. В качестве отрицательного контроля использовали пробу № 1 с панлейкоцитарным маркером CD45-PC5, что позволяло выделить область для ЦЭК (CD146-PE) в пробе № 2. ЦЭК определяли как негативные по маркеру CD45 (CD45<sup>-</sup>) и позитивные по маркеру CD146 (CD146<sup>+</sup>). Общее количество идентифицированных ЦЭК стандартизировали по отношению к концентрации CD45<sup>+</sup>-лейкоцитов (рис. 1).

Количество ЦЭК из расчета на  $3 \cdot 10^5$  лейкоцитов оказалось повышено в группе женщин с ИБС по сравнению с группой контроля:  $7,4 \pm 1,3$  и  $3,9 \pm 0,4$  соответственно ( $p = 0,003$ ) (рис. 2). В основной группе уровень ЦЭК был выше у женщин с ИМ в анамнезе в сравнении с группой без ИМ:  $8,2 \pm 1,5$  и  $3,6 \pm 0,8$  соответственно ( $p = 0,02$ ). Сохранялись статистически значимые различия по уровню ЦЭК у женщин с ИБС и ИМ в анамнезе в сравнении с группой контроля:  $8,2 \pm 1,5$  и  $3,9 \pm 0,4$  соответственно ( $p = 0,0005$ ). При сравнении количества ЦЭК в периферической крови у женщин с ИБС без ИМ в анамнезе и в контрольной группе достоверных различий найдено не было, что, однако, может быть обусловлено малой выборкой больных ИБС без ИМ ( $n = 11$ ) (рис. 3). По результатам нашего исследования, наличие более трех

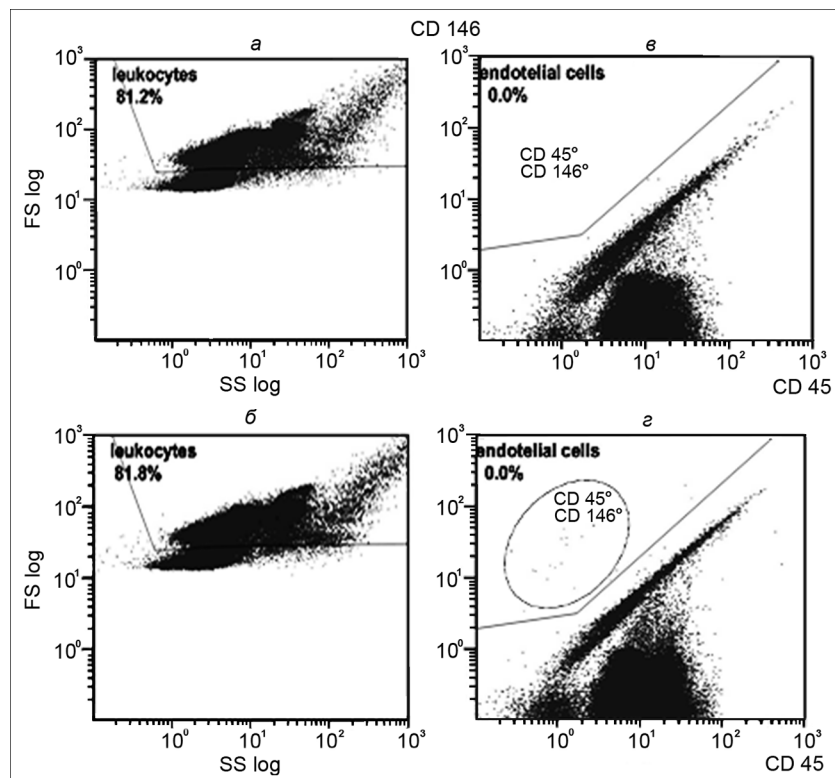


Рис. 1 Количество ЦЭК в периферической крови у женщины с ИБС

*a* – скатерограмма прямого и бокового светорассеяния пробы № 1; *б* – скатерограмма двойных позитивных событий для пробы № 1, позволяющая исключить из анализа (отрицательный контроль) область популяции лейкоцитов и фрагменты разрушенных клеток, неспецифически связанных с CD45-маркером; *в* – скатерограмма прямого и бокового светорассеяния пробы № 2; *г* – скатерограмма двойных позитивных событий для пробы № 2, ЦЭК определяют как негативные по маркеру CD45 (CD45-) и позитивные по маркеру CD146 (CD146+).

ЦЭК на  $3 \cdot 10^5$  лейкоцитов в периферической крови сопровождалось увеличением относительного риска развития ИБС у женщин молодого и среднего возраста в 4 раза ( $CI_{OR} = [0,74-2,5]$ ) и риска развития острого ИМ в 8 раз у женщин с ИБС ( $CI_{OR} = [0,62-4,3]$ ).

Впервые существование ЦЭК в периферической крови было описано в 1978 г. J. Hladovec, который наблюдал феномен так называемой эндотелиемии у крыс после введения им эндотоксина, гиалуронидазы, стрептокиназы и вазоактивных лекарственных препаратов [15]. С тех пор ЦЭК привлекают большое внимание многих ученых с точки зрения их клинического и патофизиологического значения в развитии различных заболеваний. Эндотелиальные клетки толщиной около 1–2 мкм диаметром 10–20 мкм имеют плоскую форму, вытянутое, расположенное в центре, ядро и как выяснилось, характеризуются выраженной морфологической неоднородностью [16]. Эндотелиальные клетки могут отсоединяться от стенки сосуда как в виде жизнеспособных клеток, так и в виде клеточных фрагментов, ЦЭК могут быть также представлены в периферической крови апоптотическими клетками, которые можно отличить путем окрашивания пропидием йодида, так как при апоптозе нарушена целостность плазматической мембраны [17].

До настоящего времени в России количество циркулирующих десквамированных эндотелиоцитов в периферической крови определяли по методике J. Hladovec в модификации Н. Н. Петрищева [18]. Метод основан на выделении десквамированных клеток эндотелия сосудов вместе с тромбоцитами с последующим осаждением последних с помощью раствора аденозиндифосфата. Суспензией выделенных клеток заполняют камеру Горяева и подсчитывают количество эн-

дотелиоцитов в двух сетках камеры методом фазово-контрастной микроскопии. Поскольку эндотелиальные клетки морфологически неоднородны данная методика не позволяет дифференцировать зрелые клетки от мертвых и не исключает наличие других, не эндотелиальных клеток в образце, и, таким образом, является субъективной и плохо воспроизводимой.

В зарубежных исследованиях для определения количества зрелых дифференцированных эндотелиальных клеток наиболее широко используется методика CD 146-опосредованной иммуномагнитной изоляции, основанная на инкубации клеток крови с магнитными шариками, которые связаны с моноклональными антителами, распознающими поверхностный антиген, экспрессируемый эндотелиальными клетками (анти-CD146). Подсчет клеток после их отделения концентратом магнитных частиц проводится с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии. Изолированные зрелые эндотелиальные клетки должны быть ядерными клетками большого диаметра, которые связывают более пяти магнитных шариков и окрашиваются лектином Ulex Europaeus Agglutinin 1 (UEA1), который селективно распознает эндотелиальные клетки путем связывания с фукозой на поверхности этих клеток [9, 19]. Ограничения этой методики связаны главным образом с невозможностью полного отделения ЦЭК от остальных циркулирующих в крови клеток, длительностью процедуры исследования и отсутствием автоматизации.

Сравнительно недавно методика иммуномагнитной изоляции ЦЭК в периферической крови стала активно вытесняться методом проточной цитометрии [20], основанном на регистрации сигналов светорассеяния и флуоресценции лазерного луча от каждой отдельно взятой клетки. Сигнал прямого светорассеяния дает представление о размере клетки, а бокового светорассеяния – о соотношении ядро цитоплазма, наличии гранул и других внутриклеточных включений, что позволяет в целом судить о морфологии клетки и выделять различные популяции клеток для дальнейшего анализа. Поскольку нежизнеспособные клетки, фрагменты разрушенных клеток (дебрис) и тромбоциты дают слабое светорассеяние, их можно исключить из анализа с помощью дискриминатора прибора. Сигнал флуоресценции, исходящий от флуоресцентных меток моноклональных антител к поверхностным антигенам клеток (CD-маркерам), регистрируется системой светофильтров и фотоумножителей в диапазоне длин волн, соответствующего флуорохрому, что позволяет дифференцировать клетки в зависимости от их CD-принадлежности. В нашем исследовании для идентификации ЦЭК мы использовали маркер CD146-PE (фикоэритрин) и в качестве панлейкоцитарного маркера CD45-PC5 (фикоэритрин + цианин 5), который в том числе связывает и активированные Т-лимфоциты. Некоторыми зарубежными исследователями с целью повышения чувствительности методики дополнительно используется маркер CD31 для исключения из анализа безъядерных клеток, таких как тромбоциты, и фрагментов разрушенных эндотелиальных клеток. Следует учитывать, что разрушенные клетки обладают склонностью к неспецифическому связыванию с CD-маркерами и хорошо видны на скатерограмме в виде «хвоста», тянущегося от двойной негативной популяции лейкоцитов под углом 45° в верхний правый угол и, следовательно, могут быть визуально исключены из анализа исследователем (см. рис. 1).

Метод проточной цитометрии для определения количества ЦЭК впервые был применен зарубежными исследова-

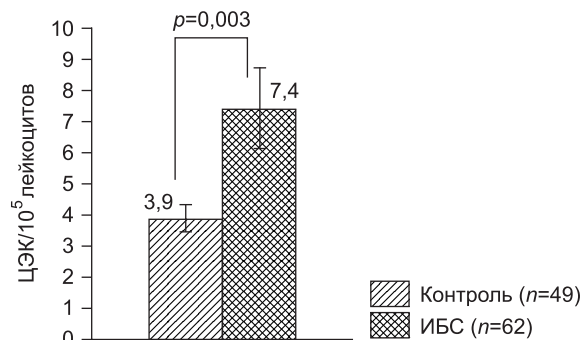


Рис. 2. Количество ЦЭК на  $3 \cdot 10^5$  лейкоцитов у женщин с ИБС и в контрольной группе.

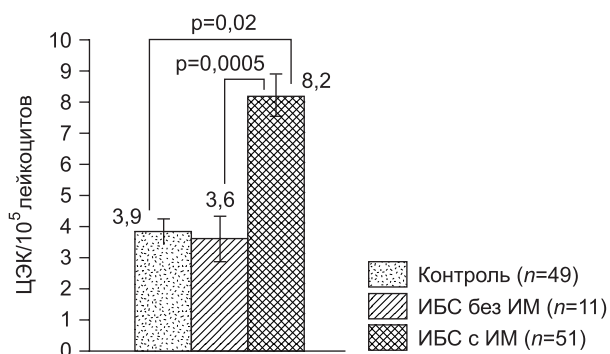


Рис. 3. Количество ЦЭК на  $3 \cdot 10^5$  лейкоцитов у женщин с различными формами ИБС и в контрольной группе.

лями у больных с неопластическими заболеваниями, однако до сих пор не существует единого протокола исследования [8, 9, 11, 21]. Показана хорошая сопоставимость (более 95%) методов иммуномагнитной изоляции и проточной цитометрии для количественной оценки ЦЭК в периферической крови [22]. Несмотря на то что иммуномагнитная изоляция считается золотым стандартом для определения уровня ЦЭК, метод проточной цитометрии является автоматизированным, имеет низкую вариабельность результатов, не требует больших затрат времени на исследование и подходит для рутинной клинической лабораторной практики.

Предполагают, что увеличение в крови содержания зрелых эндотелиальных клеток может наблюдаться во время нормального роста организма или регенерации ткани и быть либо физиологическим (например, после менструации), либо патологическим в ответ на повреждение стенки сосуда различными повреждающими факторами. Результаты достаточно большого количества исследований показали, что уровень ЦЭК в периферической крови повышается при заболеваниях, связанных с поражением сосудов: сердечно-сосудистых, иммуноопосредованных васкулитах, злокачественных новообразованиях, серповидно-клеточной анемии и др. Основываясь на этом факте, можно предполагать, что уровень ЦЭК в периферической крови является отражением системного повреждения эндотелия [9].

В ряде научных работ показано, что уровень ЦЭК у больных с острым коронарным синдромом (ОКС) был значимо выше, чем у пациентов со стабильной стенокардией и в контрольной группе, и достоверно не отличался от такового у больных со стабильной стенокардией и здоровых людей. Также не было найдено различий в количестве ЦЭК между пациентами с нестабильной стенокардией, острым ИМ с подъемом сегмента ST и острым ИМ без подъема сегмента ST [3, 13]. Тем не менее в этих же исследованиях отметили снижение количества ЦЭК уже через 48 ч от начала развития

ОКС; это позволяет предполагать, что высокий уровень ЦЭК у больных с ОКС скорее всего выступает маркером острого повреждения сосудистой стенки, нежели отражает дисфункцию эндотелия. Это подтверждают результаты исследований, в которых продемонстрирована прямая связь между уровнем ЦЭК в периферической крови и уровнем антигена фактора Виллебранда в плазме у больных острым ИМ [3, 11, 13]. Более того, было установлено, что высокий уровень ЦЭК в первые 48 ч у больных с ОКС выступает прогностически неблагоприятным фактором риска развития сердечно-сосудистых осложнений в раннем и отдаленном периодах заболевания [3, 13]. Таким образом, поскольку в нашем исследовании все больные на момент включения в исследование имели стабильное течение ИБС, высокий уровень ЦЭК у женщин с ИМ в анамнезе скорее всего обусловлен исходно более выраженной дисфункцией эндотелия, которая может не только лежать в основе развития атеросклероза коронарных артерий и, следовательно, ИБС, но и быть причиной неблагоприятных сердечно-сосудистых событий.

В представленной работе показаны возможности использования метода проточной цитометрии для количественного определения зрелых ЦЭК в периферической крови как маркеров повреждения и дисфункции эндотелия. Наличие более трех ЦЭК на  $3 \cdot 10^5$  лейкоцитов в периферической крови увеличивает относительный риск развития ИБС у женщин молодого и среднего возраста в 4 раза ( $CI_{OR} = [0,74-2,5]$ ) и у женщин с ИБС повышает риск развития острого ИМ в 8 раз ( $CI_{OR} = [0,62-4,3]$ ).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Deanfield J. E., Halcox J. P., Rabelink T. J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007; 115(10): 1285–95.
2. Агеев Ф. Т. Роль эндотелиальной дисфункции в развитии и прогрессировании сердечно-сосудистых заболеваний. *Сердечная недостаточность*. 2003; 1(4): 22–5.
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): 1841–50.
4. Celermajer D. S., Sorensen K. E., Gooch V. M., Spiegelhalter D. J., Miller O. I., Sullivan I. D. et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992; 340(8828): 1111–5.
5. Марков Х. М. Молекулярные механизмы дисфункции сосудистого эндотелия. *Кардиология*. 2005; 45(12): 62–72.
6. Петрищев Н. Н. Дисфункция эндотелия. Патогенетическое значение и методы коррекции. СПб.: ИИЦ ВМА; 2007.
7. Li C., Wu Q., Liu B., Yao Y., Chen Y. et al. Detection and Validation of Circulating Endothelial Cells, a Blood-based Diagnostic Marker of Acute Myocardial Infarction. *PLoS ONE*. 2013; 8(3): e58478.
8. Widemann A., Sabatier F., Amaud L., Bonello L., Al-Massarani G., Paganelli F. et al. CD146-based immunomagnetic enrichment followed by multiparameter flow cytometry: a new approach to counting circulating endothelial cells. *J. Thromb. Haemost.* 2008; 6(5): 869–76.
9. Fadini G. P., Avogaro A. Cell-based methods for ex vivo evaluation of human endothelial biology. *Cardiovascular Research*. 2010; 87(1): 12–21.
10. Elshal M., Abdelaziz A., Abbas A., Mahmoud K., Fathy H., Mongy S., Basyuoni S. et al. Quantification of circulating endothelial cells in peripheral blood of systemic lupus erythematosus patients: a simple and reproducible method of assessing endothelial injury and repair. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2009; 24(5): 1495–9.
11. Lampka M., Grąbczewska Z., Jendryczka-Mackiewicz E., Hołyńska-Iwan I., Sukiennik A., Kubica J. et al. Circulating endothelial cells in coronary artery disease. *Kardiologia Polska*. 2010; 68 (10): 1100–5.
12. Quilici J., Banzet N., Paule P., Meynard J. B., Mutin M., Bonnet J. L. et al. Circulating Endothelial Cell Count as a Diagnostic Marker for Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndromes. *Circulation*. 2004; 110(12): 1586–91.

13. Lee K. W., Lip G. Y., Tayebjee M., Foster W., Blann A. D. Circulating endothelial cells, vonWillebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Blood*. 2005; 105(2): 526–32.
14. Boos C. J., Soor S. K., Kang D., Lip G. Y. Relationship between circulating endothelial cells and the predicted risk of cardiovascular events in acute coronary syndromes. *European Heart Journal*. 2007; 28(9): 1092–1101.
15. Hladovec J. Circulating endothelial cells as a sign of vessel wall lesions. *Physiol. Bohemoslov.* 1978; 27(2): 140–4.
16. Rowand J. L., Martin G., Doyle G. V., Miller M. C., Pierce M. S., Connelly M. C. et al. Endothelial Cells in Peripheral Blood of Healthy Subjects and Patients with Metastatic Carcinomas. *Cytometry A*. 2007; 71(2): 105–13.
17. Mariucci S., Rovati B., Chatzileontiadou S., Bencardino K., Manzoni M., Delfanti S. et al. A six-colour flow cytometric method for simultaneous detection of cell phenotype and apoptosis of circulating endothelial cells. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2009; 69(3): 433–8.
18. Петрищев Н. Н., Беркевич О. А., Власов Т. Д., Волкова Е. В. Диагностическая ценность определения десквамированных эндотелиальных клеток в крови. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2001; 1: 50–2.
19. Никитенко Л. Л., Колесников С. И. Роль адrenomедуллина в биологии эндотелиальной клетки человека. М.: Геотар-Медиа; 2007.
20. Mancuso P., Antoniotti P., Quarna J., Called A., Rabascio C., Tacchetti C. et al. Validation of a standardized method for enumerating circulating endothelial cells and progenitors: flow cytometry and molecular and ultrastructural analyses. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15(1): 267–73.
21. Mancuso P., Burlini A., Pruned G., Goldhirsch A., Martinelli G., Bertolini F. Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood*. 2001; 97(11): 3658–61.
22. Goon P. K., Boos C. J., Stonelake P. S., Blann A. D., Lip G. Y. Detection and quantification of mature circulating endothelial cells using flow cytometry and immunomagnetic beads: a methodological comparison. *Thromb. Haemost.* 2006; 96(1): 45–52.
- of Circulating Endothelial Cells, a Blood-based Diagnostic Marker of Acute Myocardial Infarction. *PLoS ONE*. 2013; 8(3): e58478.
8. Widemann A., Sabatier F., Amaud L., Bonello L., Al-Massarani G., Paganelli F. et al. CD146-based immunomagnetic enrichment followed by multiparameter flow cytometry: a new approach to counting circulating endothelial cells. *J. Thromb. Haemost.* 2008; 6(5): 869–76.
9. Fadini G. P., Avogaro A. Cell-based methods for ex vivo evaluation of human endothelial biology. *Cardiovascular Research*. 2010; 87(1): 12–21.
10. Elshal M., Abdelaziz A., Abbas A., Mahmoud K., Fathy H., Mongy S., Basyuoni S. et al. Quantification of circulating endothelial cells in peripheral blood of systemic lupus erythematosus patients: a simple and reproducible method of assessing endothelial injury and repair. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009; 24(5): 1495–9.
11. Lampka M., Grąbczewska Z., Jendryczka-Maćkiewicz E., Hołyńska-Iwan I., Sukiennik A., Kubica J. et al. Circulating endothelial cells in coronary artery disease. *Kardiologia Polska*. 2010; 68 (10): 1100–5.
12. Quilici J., Banzet N., Paule P., Meynard J. B., Mutin M., Bonnet J. L. et al. Circulating Endothelial Cell Count as a Diagnostic Marker for Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndromes. *Circulation*. 2004; 110(12): 1586–91.
13. Lee K. W., Lip G. Y., Tayebjee M., Foster W., Blann A. D. Circulating endothelial cells, vonWillebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Blood*. 2005; 105(2): 526–32.
14. Boos C. J., Soor S. K., Kang D., Lip G. Y. Relationship between circulating endothelial cells and the predicted risk of cardiovascular events in acute coronary syndromes. *European Heart Journal*. 2007; 28(9): 1092–1101.
15. Hladovec J. Circulating endothelial cells as a sign of vessel wall lesions. *Physiol. Bohemoslov.* 1978; 27(2): 140–4.
16. Rowand J. L., Martin G., Doyle G. V., Miller M. C., Pierce M. S., Connelly M. C. et al. Endothelial Cells in Peripheral Blood of Healthy Subjects and Patients with Metastatic Carcinomas. *Cytometry A*. 2007; 71(2): 105–13.
17. Mariucci S., Rovati B., Chatzileontiadou S., Bencardino K., Manzoni M., Delfanti S. et al. A six-colour flow cytometric method for simultaneous detection of cell phenotype and apoptosis of circulating endothelial cells. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2009; 69(3): 433–8.
18. Petrishev N. N., Berkovitch O. A., Vlasov T. D., Volkova E. V. Diagnostic value of desquamated endothelial cells determination in the blood. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2001; 1: 50–2. (in Russian)
19. Nikitenko L. L., Kolesnikov S. I. Adrenomedullin role in the biology of human endothelial cells [Rol adrenomedulлина v biologii endotelialnoy kletki tcheloveka]. М.: Geotar-Media; 2007. (in Russian)
20. Mancuso P., Antoniotti P., Quarna J., Called A., Rabascio C., Tacchetti C. et al. Validation of a standardized method for enumerating circulating endothelial cells and progenitors: flow cytometry and molecular and ultrastructural analyses. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15(1): 267–73.
21. Mancuso P., Burlini A., Pruned G., Goldhirsch A., Martinelli G., Bertolini F. Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood*. 2001; 97(11): 3658–61.
22. Goon P. K., Boos C. J., Stonelake P. S., Blann A. D., Lip G. Y. Detection and quantification of mature circulating endothelial cells using flow cytometry and immunomagnetic beads: a methodological comparison. *Thromb. Haemost.* 2006; 96(1): 45–52.

## REFERENCES

Поступила 20.06.14  
Received 20.06.14