



Клеточная гетерогенность и клональный гемопоэз клеток иммунной системы при атеросклерозе

Слепцов А. А.

Недавние исследования в области секвенирования РНК единичных клеток улучшили понимание структуры субпопуляции иммунных клеток при атеросклерозе. С помощью новых технологий выявлены новые субпопуляции иммунных клеток, участвующих в атеросклерозе. Кроме того, появился относительно распространенный и сильный фактор сердечно-сосудистого риска: клональный гемопоэз с неопределенным потенциалом, возникающий в результате накопления соматических мутаций в течение жизни с формированием популяций мутантных клонов циркулирующих лейкоцитов. Лица с таким состоянием имеют высокий риск сердечно-сосудистых осложнений, таких как инфаркт миокарда и инсульт, вне зависимости от традиционных факторов риска. В данном обзоре освещаются последние данные в области исследования клеточной гетерогенности клеток иммунной системы при атеросклерозе, а также роль клонального гемопоэза в его развитии.

Ключевые слова: атеросклероз, сердечно-сосудистый риск, клеточный иммунитет, клональный гемопоэз, клеточная гетерогенность.

Отношения и деятельность. Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 22-25-00745.

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия.

Слепцов А. А. — к.м.н., н.с. лаборатории популяционной генетики, ORCID: 0000-0003-3226-1750.

Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): alexei.sleptcov@medgenetics.ru

КГНП — клональный гемопоэз с неопределенным потенциалом, ФР — фактор риска.

Рукопись получена 19.09.2022

Рецензия получена 24.09.2022

Принята к публикации 04.10.2022



Для цитирования: Слепцов А. А. Клеточная гетерогенность и клональный гемопоэз клеток иммунной системы при атеросклерозе. *Российский кардиологический журнал*. 2022;27(10):5228. doi:10.15829/1560-4071-2022-5228. EDN EGQSYV

Cellular heterogeneity and clonal hematopoiesis of immune system cells in atherosclerosis

Sleptsov A. A.

Recent studies in single cell RNA sequencing have improved understanding of the structure of the immune cell subpopulation in atherosclerosis. With the help of novel technologies, new subpopulations of immune cells involved in atherosclerosis have been identified. In addition, a following relatively common and strong cardiovascular risk factor has emerged: clonal hematopoiesis of indeterminate potential resulting from the accumulation of somatic mutations during life with the appearance of populations of mutant leukocyte clones. Individuals with this condition are at high risk for cardiovascular complications such as myocardial infarction and stroke, regardless of conventional risk factors. This review highlights the latest data on the study of cellular heterogeneity of immune system cells in atherosclerosis, as well as the role of clonal hematopoiesis in its development.

Keywords: atherosclerosis, cardiovascular risk, cellular immunity, clonal hematopoiesis, cellular heterogeneity.

Relationships and Activities. The study was supported by the Russian Science Foundation grant № 22-25-00745.

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russia.

Sleptsov A. A. ORCID: 0000-0003-3226-1750.

Corresponding author: alexei.sleptcov@medgenetics.ru

Received: 19.09.2022 **Revision Received:** 24.09.2022 **Accepted:** 04.10.2022

For citation: Sleptsov A. A. Cellular heterogeneity and clonal hematopoiesis of immune system cells in atherosclerosis. *Russian Journal of Cardiology*. 2022;27(10):5228. doi:10.15829/1560-4071-2022-5228. EDN EGQSYV

Ключевые моменты

- Новые технологии в области секвенирования единичных клеток позволили раскрыть ряд основных моментов клеточной гетерогенности атеросклероза.
- Клональный гемопоэз с неопределенным потенциалом в структуре риска сердечно-сосудистых осложнений играет важную роль, сопоставимую с традиционными факторами риска.

Key messages

- Novel technologies in the field of single cell sequencing have made it possible to reveal a number of key points of cellular heterogeneity in atherosclerosis.
- Clonal hematopoiesis with indeterminate potential plays an important role in the risk structure of cardiovascular events comparable to conventional risk factors.

Парадигма метаболического синдрома как движущего фактора атеросклероза все меньше привлекает внимание, ввиду совокупности убедительных экспериментальных и клинических исследований, указывающих на фундаментальную роль воспалительного компонента в атерогенезе [1]. Воспаление не отменяет липидный фактор риска (ФР), а скорее выступает связующим звеном, за счет ряда сигнальных метаболических путей, между липидным и другими традиционными ФР атеросклероза и его осложнений [2, 3].

В атерогенезе участвует врожденный (неспецифический) и приобретенный (адаптивный, специфический) иммунитет. Так, оценка С-реактивного белка с помощью высокочувствительного анализа, известного как hsCRP, является надежным и клинически оправданным показателем общего врожденного иммунного статуса по отношению к риску сердечно-сосудистых осложнений, вызванных атеросклеротическим поражением [4].

Помимо врожденного иммунитета, который в значительной степени зависит от цитокинов и макрофагов, в атерогенезе немаловажную роль играет адаптивное звено иммунного ответа. Однако адаптивный иммунитет демонстрирует двойственную природу, т.е. может играть как атеропротективную роль, например, за счет Т-хелперов и регуляторных Т-клеток, так и атерогенную [1, 5]. Подобная неопределенность роли адаптивного иммунитета вызвала серьезные споры в научном сообществе [6, 7].

В историческом аспекте оценка гетерогенности иммунных клеток при атеросклерозе появляется в середине 80-х годов с развитием технологии окрашивания двумя маркерами [8]. Современные модификации иммуногистохимических исследований позволяют использовать до 16 маркеров [9].

Применение проточной цитометрии, и, в особенности, масс-цитометрии (цитометрии по времени пролета, СуТОF) с возможностью использования до 40 маркеров, значительно расширило картину клеточной гетерогенности атеросклероза [10-12]. А с появлением технологии секвенирования РНК единичных клеток (single-cell RNA-sequencing, scRNA-seq), а также секвенирования Т- и В-лимфоцитарных рецепторов (*TCR*, *BCR*) значительно расширилась возможность обнаруживать новые типы клеток, оценивать их происхождение и в целом определять соотношение субпопуляций клеток.

Наряду с этим, широкое применение полногеномного секвенирования в медицинской практике позволило выявить такой ранее неизвестный ФР сердечно-сосудистых осложнений, как клеточный гемопоэз, который имеет сильное влияние на риск инфаркта миокарда и инсульта, даже по сравнению с традиционными ФР. Данный обзор посвящен новым направлениям исследований атеросклероза и риска сердечно-сосудистых осложнений.

Клеточная гетерогенность при атеросклерозе

Современная картина атерогенеза представляет собой многостадийный процесс. Эндотелий сосудов противостоит адгезии лейкоцитов, однако в атерогенной среде эндотелиальные клетки экспрессируют молекулы адгезии, что обеспечивает ролинг лейкоцитов вдоль сосудистой стенки, а за счет хемокинов их дальнейшему хемотаксису в интиму артерий.

Первичным звеном в цепочке последующих событий атеросклероза является **рекрутинг лейкоцитов**. Однако, ввиду незавершенности трансмиграции, мононуклеарные лейкоциты, находясь в транзитной зоне (в интиме), активируются и приступают к активной пролиферации, фагоцитируя окисленные липопротеиды низкой плотности с последующей трансформацией в пенистые клетки [13]. Гибель мононуклеарных фагоцитов в интиме в совокупности с дефектным их эффероцитозом способствуют формированию некротического (липидного) ядра атеросклеротической бляшки [14].

В то время как клетки врожденного иммунитета способствуют аккумуляции липидов, Т- и В-лимфоциты принимают активное участие в его регуляции внутри интимы [15, 16]. Кроме того, активное участие в поглощении липидов начинают принимать и клетки меди [17, 18]. Исследования по оценке происхождения клонов пенистых клеток показали, что многие пенистые клетки происходят из гладкомышечных клеток, которые подвергаются метаплазии, становясь макрофагоподобными [19].

Кооперация клеточных компонентов в атеросклеротической бляшке запускает активную выработку провоспалительных цитокинов, которые поддерживают и усиливают локальное воспаление. Однако атеросклероз не является прогрессивно необратимым дегенеративным процессом, а скорее имеет динамичную и прерывистую эволюцию атероматозных образований, с эпизодами системного и регионального воспаления, провоцирующего усиление миграции и пролиферации клеток [20-22]. Таким образом, клеточная популяция атеросклеротической бляшки может отличаться по времени: увеличиваться в **кризисные моменты** и снижаться в фазах **относительного затишья**.

Появление таких передовых технологий, как сортировка клеток с активированной флуоресценцией (fluorescence-activated cell sorting, FACS) и секвенирование РНК единичных клеток (scRNA-seq), раскрыло более высокую, чем представлялось ранее, степень гетерогенности иммунных клеточных популяций атеросклеротической бляшки (рис. 1) [23-27]. Подобные пилотные исследования выполняют поисковую роль и нам еще предстоит выяснить функциональное значение новых идентифицированных типов клеток, участвующих в атерогенезе.

В крови преобладают покоящиеся CD4⁺ Т-лимфоциты, экспрессирующие ингибиторы Т-клеток (*KLF2*,

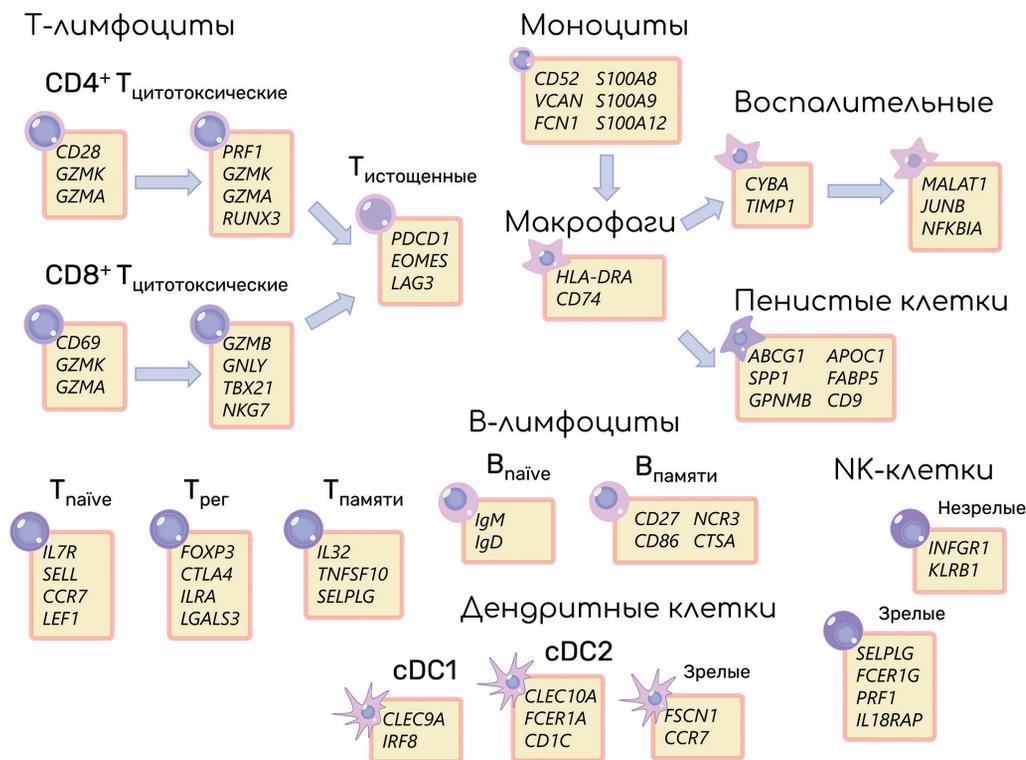


Рис. 1. Атлас основных субпопуляций клеток иммунной системы и их ключевые маркерные гены в атеросклеротической бляшке.

TXNIP). В атеросклеротической же бляшке CD4⁺ Т-лимфоциты экспрессируют, главным образом, факторы их активации, такие как *NFATC2*, *FYN* и *ZAP70*, а также связанные с их цитотоксичностью гранзимы (*GZMA*, *GZMK*) [26]. Среди CD4⁺ Т-лимфоцитов, присутствующих в атеросклеротической бляшке, обнаружено несколько субпопуляций [28].

Т-лимфоциты с активной цитотоксической ролью подразделяются на две отдельные субпопуляции, CD4⁺CD28^{null} Т-клетки, экспрессирующие перфорин (*PRF1*), но не *CD28*, которые, как известно, весьма устойчивы к апоптозу [29] и имеют характер клональной инвазии вплоть до полной моноклональной популяции CD28^{null} Т-лимфоцитов [30]. Увеличение данной субпопуляции в крови ассоциировано с острым коронарным синдромом [31]. При этом обнаруживается другая небольшая цитотоксическая субпопуляция, которая, напротив, активно экспрессирует *CD28*, но не *PRF1*.

Предполагается, что CD28^{null} и CD28⁺ Т-клетки происходят независимо друг от друга, однако существует и другая версия, при которой CD28⁺ Т-лимфоциты являются предшественниками CD28^{null} Т-клеток, которые в ходе активации утрачивают *CD28* [32]. При этом CD28⁺ Т-лимфоциты обладают высокой пролиферативной способностью по сравнению с CD28^{null} Т-лимфоцитами [33]. Вероятнее всего, CD28⁺ Т-лимфоциты и обеспечивают высокую

клональную инвазию с последующей их активацией и утратой *CD28*.

Кроме того, в атеросклеротической бляшке хорошо обнаруживаются naive, регуляторные и центральной памяти CD4⁺ Т-клетки, экспрессирующие, главным образом, *IL7R*, *LEF1* и *SELL* [29]. Небольшая часть Т-лимфоцитов является истощенной с активной экспрессией *EOMES*, *PDCD1* и *LAG3* [26]. Численность остальных типов CD4⁺ Т-клеток столь невелика, что в настоящий момент трудно оценить их принадлежность ввиду ограничений существующих технологий.

Неожиданной находкой явилось то, что цитотоксические CD8⁺ Т-клетки более значительно преобладают в атеросклеротической бляшке (46%) по сравнению с циркулирующими в крови (10%), чем ожидалось ранее [26]. В атеросклеротической бляшке обнаруживаются и CD8⁺ Т-лимфоциты с цитотоксической ролью, активно экспрессирующие гранзимы А и К [28], а также ранее неизвестную в отношении атеросклероза CD8⁺ субпопуляцию, экспрессирующую *CD69* [28, 34].

Мембранный рецептор *CD69* является антигеном ранней активации лимфоцитов [35]. Вероятно, это пул недавно мигрировавших цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов, сохранивших данный маркер активации. Среди цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов выделяется субпопуляция, активно

экспрессирующая гранзим В (*GZMB*), гранулизин (*GNLY*) и ряд других молекул (*TBX21*, *NKG7*, *ZNF683* и *CX3CR1*), но лишенных CD69. Вероятнее всего, что это вторая стадия развития цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов с видоизменением набора ферментов с утратой CD69. Однако неясно, по каким причинам они могут персистировать до стадии истощения (экспрессия *PD-1*, *EOMES* и *LAG-3*), т.к. не всегда обнаруживаются [26, 28].

Макрофаги также подразделяются на ряд специфических субпопуляций. Одна из субпопуляций макрофагов находится в фазе активации (*HLA-DRA*, *CD74*). После активации часть макрофагов принимает участие в воспалительном процессе с регуляцией активности оксидоредуктазы (*CYBA*) и с ингибитором металлопротеаз *TIMP1*. Другая субпопуляция провоспалительных макрофагов, напротив, экспрессирует гены *JUNB*, *NFKBIA*, и, в особенности, имеет высокую экспрессию *MALAT1*.

Известно, что *MALAT1* представляет собой длинную некодирующую РНК и ранее демонстрировала ассоциацию с атеросклерозом [36]. Кроме того, *MALAT1* тесно связана с развитием и прогрессированием онкологических заболеваний [37, 38]. Данная находка указывает на то, что формируется отдельная субпопуляция макрофагов, которая выполняет только воспалительную роль и не участвует в поглощении липидов, поскольку *MALAT1* показатель терминальной стадии клетки [39], в связи с чем в ряде случаев подобные клетки отбраковываются из анализа данных [28].

Помимо воспалительных макрофагов, отдельно выделяется субпопуляция макрофагов, поглощающих (экспрессируют *APOC1* и *APOE*) и аккумулирующих липиды (*PLIN2*), постепенно трансформируясь в пенистые клетки. Эти макрофаги, напротив, имеют очень низкий уровень провоспалительных сигналов (*IL-1*, *IFN*), что в целом согласуется с противовоспалительной природой пенистых клеток. Кроме макрофагов и пенистых клеток (АВСГ-позитивные), поглощающих липиды, обнаруживается и субпопуляция дендритных клеток (CD1c-позитивные), экспрессирующих *CLEC10A* и *FCERIA*. Кластерный анализ также показал неоднозначную субпопуляцию клеток, напоминающую дублеты между моноцитами и Т-клетками [40], которые экспрессируют как маркеры Т-лимфоцитов (*CD3E*, *GNLY*, *FOXP3*, *CD2*), так и миелоидных клеток (*CD14*, *CD68*, *KIT*) [28]. Функциональное значение подобных Т-клеточно-моноцитарных комплексов еще предстоит выяснить.

Клональный гемопоэз с неопределенным потенциалом в структуре атеросклероза

Как известно, в онтогенезе человека возникают соматические мутации в гемопоэтических стволовых клетках костного мозга, которые нередко могут приводить к лейкозам [41, 42]. Исследования, направленные на поиск драйверных генов лейкоза,

обнаружили, что в контрольных выборках также наблюдается некоторое количество циркулирующих клонов лейкоцитов, несущих соматические мутации в ряде генов, включая драйверные гены лейкемии. Поскольку эти мутации не блокируют гемопоэтическую дифференцировку, пролиферация мутантных клонов происходит свободно.

Показана прямая корреляция между количеством мутантных клонов и возрастом человека, доля которых может быть выше 10%. Кроме того, известно, что к 70 годам их доля составляет не менее 2% [43, 44]. Данное парафизиологическое состояние известно как **клональный гемопоэз с неопределенным потенциалом** (КГНП).

Как и ожидалось, чем выше уровень КГНП, тем выше риск развития лейкоза и ниже выживаемость. Однако обнаружилось, что высокий уровень КГНП также значительно увеличивает риск инфаркта миокарда и инсульта по сравнению с традиционными ФР сердечно-сосудистых заболеваний (за исключением возраста) [44]. Именно потому, что нельзя предсказать будет ли в результате КГНП острое сосудистое событие или сформируется лейкоз, данное явление можно назвать **патоантагонистическим плейотропизмом** и оно не является частным случаем дистропии или обратной коморбидности, т.к. одно состояние не отменяет другое.

Для понимания КГНП необходимо разобрать несколько терминов, пересекающихся с ним. **Фракция альтернативного аллеля** (variant allele fraction, VAF) — процентное соотношение альтернативного аллеля к общему количеству просеквенированных молекул ДНК методами секвенирования нового поколения, терминологически говоря доля *ридов* альтернативного аллеля *по покрытию*. Классическим примером является обнаружение низкомозаичных соматических мутаций в онкогенах, представляющих собой "скрытую угрозу" при терапии онкологических заболеваний, т.к. они могут дать толчок развитию новых онкоклов с селективным преимуществом.

Клональный гемопоэз — появление в костном мозге клонов, несущих соматические мутации, способных к клональной экспансии. **Идиопатические цитопении с неопределенным значением** — ряд необъяснимых цитопений, которые не соответствуют диагностическим критериям миелодиспластического синдрома и других гематологических нарушений, и не имеют установленного клонального происхождения. С другой стороны, под термином **идиопатические дисплазии с неопределенным потенциалом** понимаются дисплазии лейкоцитарной формулы, т.е. нарушение соотношения клеток крови, не сопровождающееся цитопенией и с не установленным клональным гемопоэзом.

Клональная цитопения с неопределенным значением отличается от КГНП тем, что наблюдается, на-

против, низкий уровень соматических мутаций (VAF <2%), ассоциированных с гематологическими неоплазиями, сопровождаемых необъяснимыми цитопениями, не подпадающими под диагностические критерии миелодиспластического синдрома и других гематологических нарушений.

В целом плеiotропизм КГНП напоминает **моноклональную гаммапатию с неопределенным значением**, при которой высокий уровень парапротеина, также случайно выявленного, способен повышать риск множественной миеломы, однако наличие некоторого уровня парапротеина встречается повсеместно. Таким образом, подобные состояния в некотором роде можно отнести к доброкачественным, однако, как и в онкологической практике, "доброкачественный" не тождественно "безвредный".

Доказательства важности КГНП для ССЗ, вероятнее всего, в будущем приведет к пересмотру предсказательных оценок риска сердечно-сосудистых осложнений. Впрочем, приставка "неопределенный потенциал" отражает суть нашей текущей несостоятельности предсказать судьбу подобных мутантных клонов, которые могут привести либо к сердечно-сосудистым осложнениям, либо к лейкозу [45, 46].

Гемопоз является ключевым связующим фактором между атерогенезом и стимулами окружающей среды [47]. Стресс, нарушение сна, травмы, инфекции стимулируют гемопоз в костном мозге, в особенности лейкоцитов, которые в силу своей специфики будут активно "заселять" атеросклеротические бляшки, способствуя тем самым воспалению [47, 48]. Вместе с тем экстрамедуллярный гемопоз и пул лейкоцитов селезенки также могут мобилизоваться в стрессовых ситуациях.

Экспериментальные работы на модельных животных показывают, что смоделированная КГНП у мышей путем создания нокаутного пула клонов по гену *Tet2* на фоне ФР атеросклероза (инактивированный *Ldlr*) приводит к ускоренному росту атеросклеротической бляшки [44, 49]. Анализ РНК-секвенирования клонов, нокаутных по гену *Tet2*, показал повышенную экспрессию проатерогенных медиаторов, включая интерлейкин-1-бета и интерлейкин-6 [41].

Список генов, способных вызывать КГНП, в настоящее время пополняется и на данный момент он включает *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *PPMD1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *TP53* и *JAK2* [50-54]. Их особенностью является ассо-

циация с развитием лейкоза. Таким образом, открытия в области изучения КГНП показали гораздо более сильную взаимосвязь между атерогенезом и онкогенезом, о которой ранее и не предполагали.

Заключение

Внедрение методов секвенирования единичных клеток, в особенности с использованием методов селекции антителами, расширяет наше представление о клеточной гетерогенности атеросклероза. С накоплением новых данных можно ожидать детализации атласа клеток иммунной системы при атеросклерозе, а также эволюцию представлений о них (патоонтогенетическую трансформацию) и понимание взаимоотношений. Наряду с этим, непрекращающаяся в своем развитии технология секвенирования генома и ее широкая доступность ставят новые задачи перед клиницистами, т.к. они все чаще будут наблюдать в своей практике КГНП.

Отсюда возникает множество вопросов, например, существуют ли мажорные мутации при КГНП, способные привести к определенному клиническому фенотипу (инфаркту миокарда или лейкозу), или в рамках омнигенетической концепции существует генетическая гетерогенность, которая не имеет фенотипически предсказательной силы? Сыграет ли существенную роль персонификация тактики лечения в зависимости от конкретного мутантного клона или, напротив, стандартизация клинических рекомендаций не окажет существенного прогресса в терапии и необходима персонификация? И в целом есть ли необходимость в элиминации мутантных клонов, и если да, то как и каким образом нужно проводить последующее диагностическое сопровождение пациента? Будет ли это выполняться по конкретно выявленному варианту или по расширенному списку мутаций, ввиду риска упущения новых мутантных клонов, или не будет альтернативы кроме как секвенировать весь геном? В настоящее время разрабатываются рекомендации по тактике ведения пациентов с КГНП, однако они сводятся, главным образом, к включению в группу риска с усиленным наблюдением [47].

Отношения и деятельность. Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 22-25-00745.

Литература/References

- Libby P, Hansson GK. From Focal Lipid Storage to Systemic Inflammation: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol*. 2019;74:1594-607. doi:10.1016/j.jacc.2019.07.061.
- Hansen SEJ, Madsen CM, Varbo A, et al. Low-Grade Inflammation in the Association between Mild-to-Moderate Hypertriglyceridemia and Risk of Acute Pancreatitis: A Study of More Than 115000 Individuals from the General Population. *Clin Chem*. 2019;65:321-32. doi:10.1373/clinchem.2018.294926.
- Xiao L, Harrison DG. Inflammation in Hypertension. *Can J Cardiol*. 2020;36:635-47. doi:10.1016/j.cjca.2020.01.013.
- Ridker PM. A Test in Context: High-Sensitivity C-Reactive Protein. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67:712-23. doi:10.1016/j.jacc.2015.11.037.
- Ketelhuth DF, Hansson GK. Adaptive Response of T and B Cells in Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118:668-78. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306427.
- Hansson GK. Inflammation and Atherosclerosis: The End of a Controversy. *Circulation*. 2017;136:1875-7. doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.313591.
- Baylis RA, Gomez D, Mallat Z, et al. The CANTOS Trial: One Important Step for Clinical Cardiology but a Giant Leap for Vascular Biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37:e174-e177. doi:10.1161/ATVBAHA.117.310097.

8. Hansson E. Primary astroglial cultures. A biochemical and functional evaluation. *Neurochem Res.* 1986;11:759-67. doi:10.1007/BF00965202.
9. Tang J, van PN, Kastenmüller W, Germain RN. The future of immunomaging—deeper, bigger, more precise, and definitively more colorful. *Eur J Immunol.* 2013;43:1407-12. doi:10.1002/eji.201243119.
10. Galkina E, Kadl A, Sanders J, et al. Lymphocyte recruitment into the aortic wall before and during development of atherosclerosis is partially L-selectin dependent. *J Exp Med.* 2006;203:1273-82. doi:10.1084/jem.20052205.
11. Cole JE, Park I, Ahern DJ, et al. Immune cell census in murine atherosclerosis: cytometry by time of flight illuminates vascular myeloid cell diversity. *Cardiovasc Res.* 2018;114:1360-71. doi:10.1093/cvr/cvy109.
12. Winkels H, Ehinger E, Vassallo M, et al. Atlas of the Immune Cell Repertoire in Mouse Atherosclerosis Defined by Single-Cell RNA-Sequencing and Mass Cytometry. *Circ Res.* 2018;122:1675-88. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.312513.
13. Robbins CS, Hilgendorf I, Weber GF, et al. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med.* 2013;19:1166-72. doi:10.1038/nm.3258.
14. Yurdagul AJ, Doran AC, Cai B, et al. Mechanisms and Consequences of Defective Efferocytosis in Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med.* 2017;4:86. doi:10.3389/fcvm.2017.00086.
15. Lichtman AH, Binder CJ, Tsimikas S, et al. Adaptive immunity in atherogenesis: new insights and therapeutic approaches. *J Clin Invest.* 2013;123:27-36. doi:10.1172/JCI63108.
16. Gisterà A, Hansson GK. The immunology of atherosclerosis. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13:368-80. doi:10.1038/nrneph.2017.51.
17. Swirski FK, Libby P, Aikawa E, et al. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest.* 2007;117:195-205. doi:10.1172/JCI29950.
18. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, et al. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 2007;117:185-94. doi:10.1172/JCI28549.
19. Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118:692-702. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306361.
20. Kubo T, Maehara A, Mintz GS, et al. The dynamic nature of coronary artery lesion morphology assessed by serial virtual histology intravascular ultrasound tissue characterization. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:1590-7. doi:10.1016/j.jacc.2009.07.078.
21. Deliaris EN. Intravascular ultrasound virtual histology derived thin cap fibroatheroma now you see it, now you don't. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:1598-9. doi:10.1016/j.jacc.2009.10.069.
22. Vergallo R, Crea F. Atherosclerotic Plaque Healing. *N Engl J Med.* 2020;383:846-57. doi:10.1056/NEJMra2000317.
23. Williams JW, Winkels H, Durant CP, et al. Single Cell RNA Sequencing in Atherosclerosis Research. *Circ Res.* 2020;126:1112-26. doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.315940.
24. Kalluri AS, Vellarikal SK, Edelman ER, et al. Single-Cell Analysis of the Normal Mouse Aorta Reveals Functionally Distinct Endothelial Cell Populations. *Circulation.* 2019;140:147-63. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.038362.
25. Kalucka J, de Rooij LPMH, Goveia J, et al. Single-Cell Transcriptome Atlas of Murine Endothelial Cells. *Cell.* 2020;180:764-79.e20. doi:10.1016/j.cell.2020.01.015.
26. Fernandez DM, Rahman AH, Fernandez NF, et al. Single-cell immune landscape of human atherosclerotic plaques. *Nat Med.* 2019;25:1576-88. doi:10.1038/s41591-019-0590-4.
27. Wirka RC, Wagh D, Paik DT, et al. Atheroprotective roles of smooth muscle cell phenotypic modulation and the TCF21 disease gene as revealed by single-cell analysis. *Nat Med.* 2019;25:1280-9. doi:10.1038/s41591-019-0512-5.
28. Depuydt MAC, Prange KHM, Slenders L, et al. Microanatomy of the Human Atherosclerotic Plaque by Single-Cell Transcriptomics. *Circ Res.* 2020;127:1437-55. doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.316770.
29. Kovalcsik E, Antunes RF, Baruah P, et al. Proteasome-mediated reduction in proapoptotic molecule Bim renders CD4⁺CD28^{null} T cells resistant to apoptosis in acute coronary syndrome. *Circulation.* 2015;131:709-20. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013710.
30. Liuzzo G, Goronzy JJ, Yang H, et al. Monoclonal T-cell proliferation and plaque instability in acute coronary syndromes. *Circulation.* 2000;101:2883-8. doi:10.1161/01.cir.101.25.2883.
31. Téó FH, de ORT, Mamoni RL, et al. Characterization of CD4⁺CD28^{null} T cells in patients with coronary artery disease and individuals with risk factors for atherosclerosis. *Cell Immunol.* 2013;281:11-9. doi:10.1016/j.cellimm.2013.01.007.
32. Horiuchi T, Hirokawa M, Kawabata Y, et al. Identification of the T cell clones expanding within both CD8(+)/CD28(+) and CD8(+)/CD28(-) T cell subsets in recipients of allogeneic hematopoietic cell grafts and its implication in post-transplant skewing of T cell receptor repertoire. *Bone Marrow Transplant.* 2001;27:731-9. doi:10.1038/sj.bmt.1702859.
33. Scheuring UJ, Sabzevari H, Theofilopoulos AN. Proliferative arrest and cell cycle regulation in CD8(+)/CD28(-) versus CD8(+)/CD28(+) T cells. *Hum Immunol.* 2002;63:1000-9. doi:10.1016/s0198-8859(02)00683-3.
34. Martín P, Blanco-Domínguez R, Sánchez-Díaz R. Novel human immunomodulatory T cell receptors and their double-edged potential in autoimmunity, cardiovascular disease and cancer. *Cell Mol Immunol.* 2021;18:919-35. doi:10.1038/s41423-020-00586-4.
35. Sancho D, Gómez M, Sánchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* 2005;26:136-40. doi:10.1016/j.it.2004.12.006.
36. Cremer S, Michalik KM, Fischer A, et al. Hematopoietic Deficiency of the Long Noncoding RNA MALAT1 Promotes Atherosclerosis and Plaque Inflammation. *Circulation.* 2019;139:1320-34. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029015.
37. Zhao M, Wang S, Li Q, et al. MALAT1: A long non-coding RNA highly associated with human cancers. *Oncol Lett.* 2018;16:19-26. doi:10.3892/ol.2018.8613.
38. Liu J, Peng WX, Mo YY, et al. MALAT1-mediated tumorigenesis. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2017;22:66-80. doi:10.2741/4472.
39. Zhang B, Arun G, Mao YS, et al. The lncRNA Malat1 is dispensable for mouse development but its transcription plays a cis-regulatory role in the adult. *Cell Rep.* 2012;2:111-23. doi:10.1016/j.celrep.2012.06.003.
40. Burel JG, Pomaznoy M, Lindestam ACS, et al. Circulating T cell-monocyte complexes are markers of immune perturbations. *Elife.* 2019;8. doi:10.7554/eLife.46045.
41. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med.* 2014;371:2488-98. doi:10.1056/NEJMoa1408617.
42. Genovese G, Köhler AK, Handsaker RE, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med.* 2014;371:2477-87. doi:10.1056/NEJMoa1409405.
43. Busque L, Buscarlet M, Mollica L, et al. Concise Review: Age-Related Clonal Hematopoiesis: Stem Cells Tempting the Devil. *Stem Cells.* 2018;36:1287-94. doi:10.1002/stem.2845.
44. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, et al. Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 2017;377:111-21. doi:10.1056/NEJMoa1701719.
45. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2015;126:9-16. doi:10.1182/blood-2015-03-631747.
46. Libby P, Sidlow R, Lin AE, et al. Clonal Hematopoiesis: Crossroads of Aging, Cardiovascular Disease, and Cancer: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol.* 2019;74:567-77. doi:10.1016/j.jacc.2019.06.007.
47. Schloss MJ, Swirski FK, Nahrendorf M. Modifiable Cardiovascular Risk, Hematopoiesis, and Innate Immunity. *Circ Res.* 2020;126:1242-59. doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.315936.
48. Libby P, Nahrendorf M, Swirski FK. Leukocytes Link Local and Systemic Inflammation in Ischemic Cardiovascular Disease: An Expanded Cardiovascular Continuum. *J Am Coll Cardiol.* 2016;67:1091-103. doi:10.1016/j.jacc.2015.12.048.
49. Fuster JJ, MacLauchlan S, Zurriaga MA, et al. Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. *Science.* 2017;355:842-7. doi:10.1126/science.aag1381.
50. Abelson S, Collord G, Ng SWK, et al. Prediction of acute myeloid leukaemia risk in healthy individuals. *Nature.* 2018;559:400-4. doi:10.1038/s41586-018-0317-6.
51. Desai P, Mencia-Trinchant N, Savenkov O, et al. Somatic mutations precede acute myeloid leukemia years before diagnosis. *Nat Med.* 2018;24:1015-23. doi:10.1038/s41591-018-0081-z.
52. Sellar RS, Jaiswal S, Ebert BL. Predicting progression to AML. *Nat Med.* 2018;24:904-6. doi:10.1038/s41591-018-0114-7.
53. Dorsheimer L, Assmus B, Rasper T, et al. Association of Mutations Contributing to Clonal Hematopoiesis With Prognosis in Chronic Ischemic Heart Failure. *JAMA Cardiol.* 2019;4:25-33. doi:10.1001/jamacardio.2018.3965.
54. Libby P, Jaiswal S, Lin AE, et al. CHIPPING Away at the Pathogenesis of Heart Failure. *JAMA Cardiol.* 2019;4:5-6. doi:10.1001/jamacardio.2018.4039.