



Зрелые нейтрофилы как маркер гипоехогенных каротидных атеросклеротических бляшек и предиктор прогрессирования мультифокального атеросклероза

Генкель В. В., Кузнецова А. С., Савочкина А. Ю., Батурина И. Л., Никушкина К. В., Минасова А. А., Пыхова Л. Р., Сумеркина В. А., Кудринская Я. И., Шапошник И. И., Долгушин И. И.

Цель. Оценка диагностической и прогностической ценности циркулирующих зрелых и стареющих нейтрофилов в отношении наличия гипоехогенных каротидных атеросклеротических бляшек (АСБ) и краткосрочного прогрессирования каротидного и мультифокального атеросклероза (МФА).

Материал и методы. В исследование были включены 200 пациентов, 89 мужчин и 111 женщин, в возрасте 40-64 лет. Всем пациентам проводили дуплексное сканирование артерий каротидного бассейна и артерий нижних конечностей на первом визите и на повторном визите через 12-24 мес. Ультразвуковую морфологию каротидных АСБ оценивали методом GSM-анализа. Фенотипирование и дифференцировку субпопуляций нейтрофилов осуществляли методом проточной цитометрии.

Результаты. Абсолютное и относительное количество зрелых нейтрофилов прямо коррелировало с ультразвуковыми индикаторами атеросклероза сонных артерий, количество стареющих нейтрофилов — со степенью стенозирования артерий нижних конечностей. Пациенты с гипоехогенными каротидными АСБ характеризовались статистически значимо большим абсолютным количеством зрелых нейтрофилов ($p=0,0340$). Увеличение количества зрелых нейтрофилов $>3023,0$ кл/мкл позволяло прогнозировать наличие гипоехогенных каротидных АСБ с чувствительностью 75,0% и специфичностью 69,5%. Пациенты с прогрессированием каротидного атеросклероза отличались большим абсолютным количеством зрелых нейтрофилов ($p=0,0140$), как и пациенты с прогрессированием МФА ($p=0,0162$). Увеличение количества зрелых нейтрофилов $>3223,0$ кл/мкл ассоциировалось с увеличением относительного риска прогрессирования МФА в 3,09 раза (95% доверительный интервал: 1,34-7,17; $p=0,0082$) после поправки на исходный сердечно-сосудистый риск.

Заключение. Среди пациентов 40-64 лет увеличение количества циркулирующих зрелых нейтрофилов ассоциируется с увеличением бремени каротидного атеросклероза и наличием гипоехогенных каротидных АСБ. Увеличение количества зрелых нейтрофилов $>3223,0$ кл/мкл ассоциировалось с увеличением относительного риска прогрессирования МФА в 3,09 раза после поправки на исходный сердечно-сосудистый риск.

Ключевые слова: атеросклероз, нейтрофилы, GSM-анализ, зрелые нейтрофилы, прогрессирование.

Отношения и деятельность: нет.

ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Челябинск, Россия.

Генкель В. В.* — к.м.н., доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней, ORCID: 0000-0001-5902-3803, Кузнецова А. С. — к.м.н., доцент кафедры госпитальной терапии, ORCID: 0000-0002-0357-5702, Савочкина А. Ю. — д.м.н., зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, ORCID: 0000-0002-0536-0924, Батурина И. Л. — к.м.н., с.н.с. НИИ иммунологии, ORCID: 0000-0002-5960-4189, Никушкина К. В. — к.м.н., в.н.с. НИИ иммунологии, ORCID: 0000-0002-3900-9278, Минасова А. А. — к.б.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии, ORCID: 0000-0002-9084-0577, Пыхова Л. Р. — к.б.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии, ORCID: 0000-0003-0658-7626, Сумеркина В. А. — к.м.н., к.н.с. ЦНИЛ, ORCID: 0000-0003-4842-0875, Кудринская Я. И. — старший лаборант кафедры пропедевтики внутренних болезней, ORCID: 0000-0002-7039-838X, Шапошник И. И. — д.м.н., профессор, зав. кафедрой пропедевтики внутренних болезней, ORCID: 0000-0002-7731-7730, Долгушин И. И. — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, президент, ORCID: 0000-0002-0901-8042.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):
henkel-07@mail.ru

АНК — артерии нижних конечностей, АСБ — атеросклеротическая бляшка, ДИ — доверительный интервал, ДС — дуплексное сканирование, МФА — мультифокальный атеросклероз, НВЛ — нейтрофильные внеклеточные ловушки, ССР — сердечно-сосудистый риск, RR — относительный риск.

Рукопись получена 21.03.2024

Рецензия получена 08.04.2024

Принята к публикации 15.05.2024



Для цитирования: Генкель В. В., Кузнецова А. С., Савочкина А. Ю., Батурина И. Л., Никушкина К. В., Минасова А. А., Пыхова Л. Р., Сумеркина В. А., Кудринская Я. И., Шапошник И. И., Долгушин И. И. Зрелые нейтрофилы как маркер гипоехогенных каротидных атеросклеротических бляшек и предиктор прогрессирования мультифокального атеросклероза. *Российский кардиологический журнал*. 2024;29(4):5851. doi: 10.15829/1560-4071-2024-5851. EDN TTRIVC

Mature neutrophils as a marker of hypoechoic carotid plaques and a predictor of polyvascular disease progression

Genkel V. V., Kuznetsova A. S., Savochkina A. Yu., Baturina I. L., Nikushkina K. V., Minasova A. A., Pykhova L. R., Sumerkina V. A., Kudrinskaya Ya. I., Shaposhnik I. I., Dolgushin I. I.

Aim. To evaluate the diagnostic and prognostic value of circulating mature and aging neutrophils in relation to hypoechoic carotid plaques and short-term progression of carotid and multifocal atherosclerosis.

Material and methods. The study included 200 patients (89 males and 111 females), aged 40-64 years. All patients underwent duplex ultrasound of the carotid and lower extremity arteries at the first visit and at a repeat visit after 12-24 months. Ultrasound morphology of carotid plaques was assessed using greyscale median analysis. Phenotyping and differentiation of neutrophil subpopulations was carried out using flow cytometry.

Results. The absolute and relative number of mature neutrophils directly correlated with ultrasound indicators of carotid atherosclerosis, while the number of aging

neutrophils — with the degree of lower extremity artery stenosis. Patients with hypoechoic carotid plaques were characterized by a significantly higher absolute number of mature neutrophils ($p=0,0340$). An increase in the number of mature neutrophils over 3023,0 cells/ μ L made it possible to predict the hypoechoic carotid plaques with a sensitivity of 75,0% and a specificity of 69,5%. Patients with carotid atherosclerosis progression had a higher absolute number of mature neutrophils ($p=0,0140$), as did patients with progression of multifocal atherosclerosis ($p=0,0162$). An increase in the number of mature neutrophils more than 3223,0 cells/ μ L was associated with an increase in the relative risk of polyvascular disease progression by 3,09 times (95% confidence interval, 1,34-7,17; $p=0,0082$) after adjustment for baseline cardiovascular disease risk.

Conclusion. Among patients aged 40-64 years, increased numbers of circulating mature neutrophils are associated with an increased carotid plaque burden and hypoechoic carotid plaques. An increase in the number of mature neutrophils over 3223,0 cells/ μ L was associated with a 3,09-fold increase in the relative risk of polyvascular disease after adjustment for baseline cardiovascular risk.

Keywords: atherosclerosis, neutrophils, greyscale median analysis, mature neutrophils, progression.

Relationships and Activities: none.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia.

Genkel V.V.* ORCID: 0000-0001-5902-3803, Kuznetsova A.S. ORCID: 0000-0002-0357-5702, Savochkina A.Yu. ORCID: 0000-0002-0536-0924, Baturina I.L. ORCID: 0000-0002-5960-4189, Nikushkina K.V. ORCID: 0000-0002-3900-9278,

Minasova A.A. ORCID: 0000-0002-9084-0577, Pykhova L.R. ORCID: 0000-0003-0658-7626, Sumerkina V.A. ORCID: 0000-0003-4842-0875, Kudrinskaya Ya. I. ORCID: 0000-0002-7039-838X, Shaposhnik I.I. ORCID: 0000-0002-7731-7730, Dolgushin I.I. ORCID: 0000-0002-0901-8042.

*Corresponding author:
henkel-07@mail.ru

Received: 21.03.2024 **Revision Received:** 08.04.2024 **Accepted:** 15.04.2024

For citation: Genkel V.V., Kuznetsova A.S., Savochkina A.Yu., Baturina I.L., Nikushkina K.V., Minasova A.A., Pykhova L.R., Sumerkina V.A., Kudrinskaya Ya. I., Shaposhnik I.I., Dolgushin I.I. Mature neutrophils as a marker of hypoechoic carotid plaques and a predictor of polyvascular disease progression. *Russian Journal of Cardiology*. 2024;29(4):5851. doi: 10.15829/1560-4071-2024-5851. EDN TTRIVC

Ключевые моменты

- Количество циркулирующих зрелых нейтрофилов прямо коррелировало с тяжестью каротидного атеросклероза.
- Циркулирующие зрелые нейтрофилы могут являться маркером "нестабильных" каротидных бляшек.
- Количество циркулирующих зрелых нейтрофилов является независимым предиктором прогрессирования мультифокального атеросклероза.

Key messages

- The number of circulating mature neutrophils directly correlated with the carotid plaque burden.
- Circulating mature neutrophils may be a marker of "vulnerable" carotid plaques.
- The number of circulating mature neutrophils is an independent predictor of polyvascular atherosclerosis progression.

Исследование роли нейтрофилов в атерогенезе активно ведется в последние несколько лет, что во многом связано с прогрессом в изучении фенотипической и функциональной пластичности нейтрофилов [1]. На сегодняшний день предложено несколько различных подходов к описанию гетерогенности нейтрофилов и идентификации отдельных подтипов: фенотипический профиль, стадия жизненного цикла, пролиферативная способность, тканевая локализация, эффекторные функции и т.д. [2]. Важным стимулом для дальнейших исследований гетерогенности нейтрофилов при различных заболеваниях является то, что отдельные подтипы нейтрофилов являются фактором, существенно модифицирующим течение заболевания и его прогноз, что было наглядно показано в экспериментальных и клинических исследованиях рака [3].

В настоящее время описаны различные механизмы участия нейтрофилов на всех этапах развития атеросклероза [4]. В очаге воспаления в сосудистой стенке активированные нейтрофилы осуществляют несколько синергетических стратегий для реализации своих функций: высвобождение протеолитических ферментов, выделение активных форм кислорода, секреция провоспалительных цитокинов

и аларминов, формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ), рекрутирование других иммунокомпетентных клеток и т.д. [5]. Вероятно, нейтрофилы играют ключевую роль на этапах роста и дестабилизации атеросклеротической бляшки (АСБ). Рекрутирование циркулирующих нейтрофилов в АСБ происходит особенно активно на продвинутых этапах эволюции АСБ, где они главным образом локализируются в регионах, обозначаемых как "плечи" бляшки [4]. Формируемые нейтрофилами в атероме НВЛ индуцируют гибель гладкомышечных клеток, а секретируемые матриксные металлопротеиназы способствуют ремоделированию и биодеградации экстрацеллюлярного матрикса, результатом чего является увеличение липидно-некротического ядра бляшки, рост атеромы и её дестабилизация [4, 6, 7].

В целом ряде клинических исследований было показано, что определение сывороточных маркеров активации нейтрофилов, НВЛ и металлопротеиназы может иметь диагностическое значение в отношении выявления нестабильных АСБ [8, 9]. Целью нашего исследования являлась оценка диагностической и прогностической ценности циркулирующих зрелых и стареющих нейтрофилов в отношении наличия гипоехогенных каротидных АСБ и краткосрочного прогрессирования каротидного и мультифокального атеросклероза (МФА).

Таблица 1

Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование

Показатель	Пациенты (n=200)
Возраст, лет, Ме (ИИ)	51,5 (45,0; 57,0)
Мужчины/женщины, n (%)	89 (44,5)/111 (55,5)
ИМТ, кг/м ² , Ме (ИИ)	26,9 (23,4; 30,0)
Ожирение, n (%)	49 (24,5)
Абдоминальное ожирение, n (%)	105 (52,5)
Курение, n (%)	37 (18,5)
Ишемическая болезнь сердца, n (%)	33 (16,5)
Постинфарктный кардиосклероз, n (%)	13 (6,50)
Реваскуляризация миокарда, n (%)	11 (5,50)
Сахарный диабет 2 типа, n (%)	18 (9,00)
Артериальная гипертензия, n (%)	103 (51,5)
Дезагреганты, n (%)	44 (22,0)
Бета-адреноблокаторы, n (%)	41 (20,5)
Ингибиторы РААС, n (%)	71 (35,5)
Диуретики, n (%)	19 (9,50)
Статины, n (%)	55 (27,5)
Пероральные сахароснижающие препараты, n (%)	18 (9,00)
ОХС, ммоль/л, Ме (ИИ)	5,53 (4,69; 6,42)
ХС ЛНП, ммоль/л, Ме (ИИ)	3,46 (2,79; 4,28)
ХС ЛВП, ммоль/л, Ме (ИИ)	1,38 (1,16; 1,60)
ТГ, ммоль/л, Ме (ИИ)	1,19 (0,86; 1,65)
вЧСРБ, мг/л, Ме (ИИ)	1,82 (0,90; 2,75)
Мочевая кислота, ммоль/л, Ме (ИИ)	277,0 (213,2; 346,0)
Глюкоза, ммоль/л, Ме (ИИ)	5,36 (4,97; 5,90)
Гликированный гемоглобин, %, Ме (ИИ)	5,61 (5,20; 6,05)
СКФ, мл/мин/1,73 м ² , Ме (ИИ)	72,0 (62,0; 87,0)
Нейтрофилы, 1*10 ⁹ /л, Ме (ИИ)	3,40 (2,64; 4,18)
CD16 ^{hi} CD11b ^{hi} CD62L ^{hi} (зрелые нейтрофилы), %, Ме (ИИ)	88,4 (79,5; 92,8)
CD16 ^{hi} CD11b ^{hi} CD62L ^{hi} (зрелые нейтрофилы), кл/мкл, Ме (ИИ)	2759,0 (2083,5; 3466,5)
CD16 ^{hi} CD11b ^{br} CD62L ^{lo} CXCR4 ^{hi} (стареющие нейтрофилы), %, Ме (ИИ)	15,8 (6,25; 21,4)
CD16 ^{hi} CD11b ^{br} CD62L ^{lo} CXCR4 ^{hi} (стареющие нейтрофилы), кл/мкл, Ме (ИИ)	410,5 (236,5; 795,5)

Сокращения: вЧСРБ — высокочувствительный С-реактивный белок, ИИ — интерквартильный интервал, ИМТ — индекс массы тела, ОХС — общий холестерин, РААС — ренин-ангиотензин-альдостероновая система, СКФ — скорость клубочковой фильтрации, ТГ — триглицериды, ХС ЛВП — холестерин липопротеинов высокой плотности, ХС ЛНП — холестерин липопротеинов низкой плотности, Ме — медиана.

Материал и методы

В исследование включали мужчин и женщин в возрасте от 40 до 64 лет. Всеми пациентами было подписано информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования был одобрен этическим комитетом (протокол заседания № 10 от 27.10.2018) и был описан нами ранее [10].

Дуплексное сканирование (ДС). Всем пациентам проводили ДС артерий каротидного бассейна и артерий нижних конечностей (АНК) на первом визите и на повторном визите через 12–24 мес. Исследование проводили в В-режиме, режиме цветового картирования, импульсной доплерографии. Определяли следующие показатели бремени каротидного атеросклероза: суммарная высота каротидных АСБ, максимальная высота каротидных АСБ, суммарная площадь каротидных АСБ [11]. Ультразвуковую мор-

фологию каротидных АСБ оценивали по данным GSM-анализа, методика которого была подробно описана нами ранее [12].

Лабораторное исследование. Всем пациентам проводили забор крови в утренние часы натощак. Определяли следующие показатели: общий холестерин, холестерин липопротеидов низкой плотности, холестерин липопротеидов высокой плотности, триглицериды, гликированный гемоглобин, глюкоза (венозная кровь), высокочувствительный С-реактивный белок (вЧСРБ) (АО "Вектор-Бест", Россия), мочевая кислота, креатинин (с последующим определением скорости клубочковой фильтрации по формуле СКД-ЕП).

Фенотипирование и дифференцировку субпопуляций нейтрофилов осуществляли методом проточной цитометрии на аппарате "Navios 6/2" ("Beckman Coulter", США) с использованием конъюгатов моно-

Таблица 2

Результаты ДС сонных артерий и АНК

Показатели	Пациенты (n=200)
АСБ в сонных артериях, n (%)	141 (70,5)
Максимальный стеноз сонных артерий, %, Ме (ИИ)	25,0 (0,00; 33,5)
Суммарная высота каротидных АСБ, мм, Ме (ИИ)	2,94 (1,60; 4,06)
Максимальная высота каротидных АСБ, мм, Ме (ИИ)	1,80 (1,40; 2,21)
Суммарная площадь каротидных АСБ, мм ² , Ме (ИИ)	22,0 (12,5; 40,5)
Эхогенность каротидных АСБ, усл. ед.	60,0 (40,2; 78,0)
АСБ в АНК, n (%)	107 (53,5)
Максимальный стеноз АНК, %, Ме (ИИ)	30,0 (0,00; 35,0)
АСБ в сонных артериях и АНК, %, Ме (ИИ)	90 (45,0)

Сокращения: АНК — артерии нижних конечностей, АСБ — атеросклеротическая бляшка, ИИ — интерквартильный интервал, Ме — медиана.

клональных антител — CD16-PE-Cy7.0 ("Invitrogen", США), CD11b-FITC, CD62L-PE ("Beckman Coulter", США), CD182 (CXCR2)-PE-Cy5.0, ("BD Biosciences", США), CD184 (CXCR4)-PE-CF594 ("BD Biosciences", США). Фенотипирование нейтрофилов проводили в цельной крови с детекцией не <30 тыс. событий.

Критерии прогрессирования атеросклероза. С целью оценки прогрессирования каротидного атеросклероза по динамике изменения суммарных площади и высоты АСБ проводили расчет ошибки измерения для указанных показателей (проводили измерения указанных показателей у 20 пациентов с интервалом 24-48 ч). Ошибка измерения (σ) была равна трем стандартным отклонениям разницы между двумя измерениями, проведенными с интервалом 24-48 ч [13]. Ошибка измерения суммарной площади АСБ и суммарной высоты АСБ составляла 0,053 см² и 0,16 мм, соответственно. Прогрессированием считали увеличение суммарной площади АСБ и/или суммарной высоты АСБ >2 σ , т.е. более чем на 0,106 см² и 0,32 мм, соответственно [13]. Таким образом, критериями прогрессирования субклинического атеросклероза являлись: 1) появление новой АСБ в сонных артериях и/или АНК; 2) увеличение степени стенозирования ранее имеющегося стеноза $\geq 10\%$; 3) увеличение суммарной площади каротидных АСБ более чем на 0,106 см² и/или увеличение суммарной высоты АСБ более чем на 0,32 мм.

Статистическая обработка. Анализ статистических данных проводили с использованием программного обеспечения MedCalc (версия 22.016), OriginPro 2024. Качественные данные были представлены в виде частот и процентов. Количественные переменные описывали медианой (Ме) с указанием интерквартильного интервала [25-й перцентиль; 75-й перцентиль]. В целях определения взаимосвязей показателей использовали корреляционный анализ Спирмена. Для оценки значимости различий между двумя группа-

ми использовали критерий Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при критическом уровне значимости 0,05. С целью установления пороговых значений исследуемых показателей проводили ROC-анализ с определением чувствительности и специфичности, а также расчетом площади под характеристической кривой (AUC) с 95% доверительным интервалом (ДИ). С целью выявления факторов риска для выживаемости использовали регрессионный пошаговый анализ Кокса. Зависимым (прогнозируемым) признаком при этом считали время до наступления исхода, независимым — изучаемый фактор.

Результаты

В исследование были включены 200 пациентов, удовлетворявших критериям включения, медиана возраста составляла 51,5 лет. Очень высокий сердечно-сосудистый риск (ССР) был установлен у 33 (16,5%) пациентов, высокий — у 32 (16,0%), умеренный — у 84 (42,0%), низкий — у 51 (25,5%) пациента. Клиническая характеристика пациентов представлена в таблице 1.

Результаты ультразвукового исследования артерий каротидного бассейна и АНК представлены в таблице 2.

С целью определения взаимосвязей между количеством циркулирующих нейтрофилов и ультразвуковыми маркерами атеросклероза сонных артерий и АНК был проведен корреляционный анализ, результаты которого представлены на рисунке 1.

Таким образом, не было выявлено взаимосвязей между общим количеством нейтрофилов и ультразвуковыми маркерами атеросклероза периферических артерий. Напротив, абсолютное и относительное количество зрелых нейтрофилов прямо коррелировало с ультразвуковыми индикаторами атеросклероза сонных артерий. Количество стареющих нейтрофилов, в свою очередь, коррелировало со степенью стенозирования АНК.

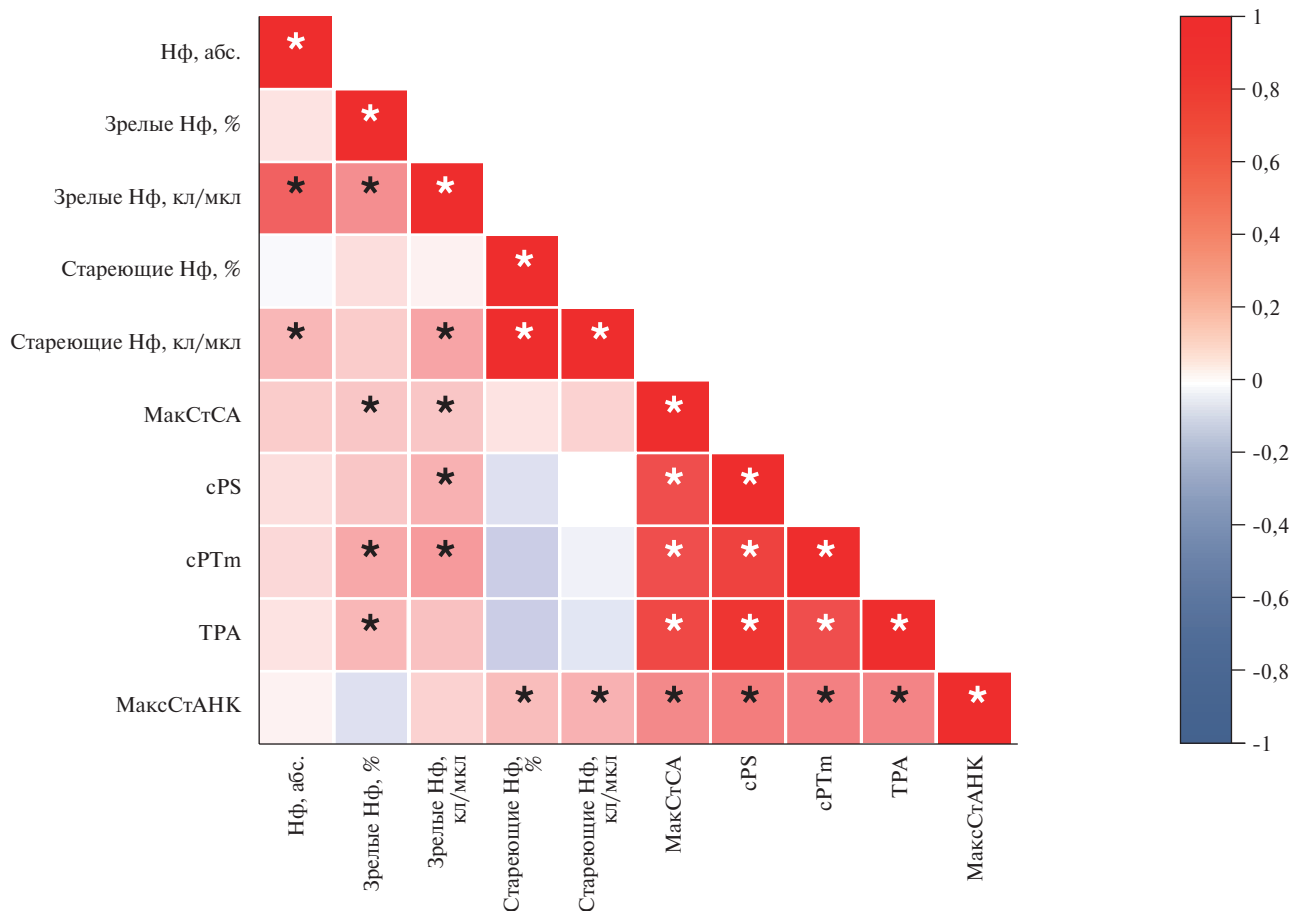


Рис. 1. Тепловая карта матрицы корреляций между количеством циркулирующих нейтрофилов и ультразвуковыми маркерами атеросклероза периферических артерий.

Примечание: * — $p < 0,05$. Цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

Сокращения: Нф — нейтрофилы, МаксСтСА — максимальная степень стенозирования сонных артерий, МаксСтАНК — максимальная степень стенозирования артерий нижних конечностей, сPS — суммарная высота каротидных атеросклеротических бляшек (carotid plaque score), сPTm — максимальная высота каротидных атеросклеротических бляшек (maximal carotid plaque thickness), ТРА — суммарная площадь каротидных атеросклеротических бляшек (total plaque area).

По результатам анализа взаимосвязей между экзогенностью каротидных АСБ и количеством циркулирующих зрелых и стареющих нейтрофилов были выявлены отрицательные корреляционные взаимосвязи между абсолютными количеством зрелых нейтрофилов и экзогенностью АСБ, которые, однако, не достигли уровня статистической значимости ($r = -0,220$; $p = 0,0516$). По данным анализа межгрупповых различий в субпопуляционном составе нейтрофилов в зависимости от наличия гипозоногенных каротидных АСБ (экзогенность ≤ 40 усл. ед., что соответствует первому квартилю) было установлено, что пациенты с гипозоногенными каротидными АСБ характеризуются статистически значимо большим абсолютным количеством зрелых нейтрофилов — 3383,0 (2660,2; 3742,0) кл/мкл vs 2633,0 (2031,2; 3245,7) кл/мкл ($p = 0,0340$).

С целью оценки потенциальной диагностической ценности абсолютного количества зрелых нейтрофилов в отношении наличия гипозоногенных каротидных АСБ был проведен ROC-анализ (рис. 2).

Таким образом, увеличение количества зрелых нейтрофилов $> 3023,0$ кл/мкл позволяло прогнозировать наличие гипозоногенных каротидных АСБ с чувствительностью 75,0% и специфичностью 69,5% (индекс Юдена 0,4449).

Повторное ДС периферических артерий было выполнено на втором визите с интервалом 15,5 (12,2; 23,5) мес. Прогрессирование каротидного атеросклероза было установлено у 44,0% пациентов, атеросклероз АНК — у 37,3%, МФА — у 22,3% пациентов. По данным анализа межгрупповых различий в субпопуляционном составе нейтрофилов в зависимости от прогрессирования атеросклероза было установлено, что пациенты с прогрессированием каротидного атеросклероза отличались большим абсолютным количеством зрелых нейтрофилов (3034,0 (2353,0; 3582,0) кл/мкл vs 2624,0 (1923,5; 3145,0) кл/мкл, $p = 0,0140$), как и пациенты с прогрессированием МФА (3463,0 (2326,0; 4052,2) кл/мкл vs 2662,0 (2050,0; 3207,0) кл/мкл, $p = 0,0162$). С целью оценки потенциальной

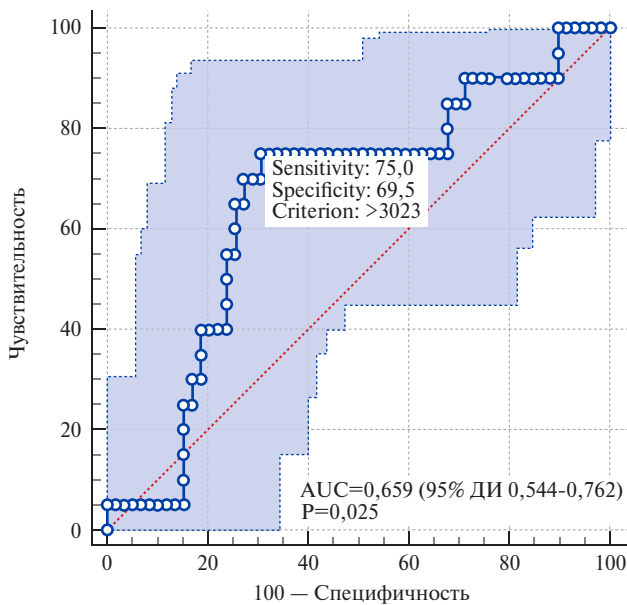


Рис. 2. ROC-кривая, демонстрирующая диагностическую эффективность абсолютного количества зрелых нейтрофилов в отношении наличия гипохолестеринемических каротидных АСБ.

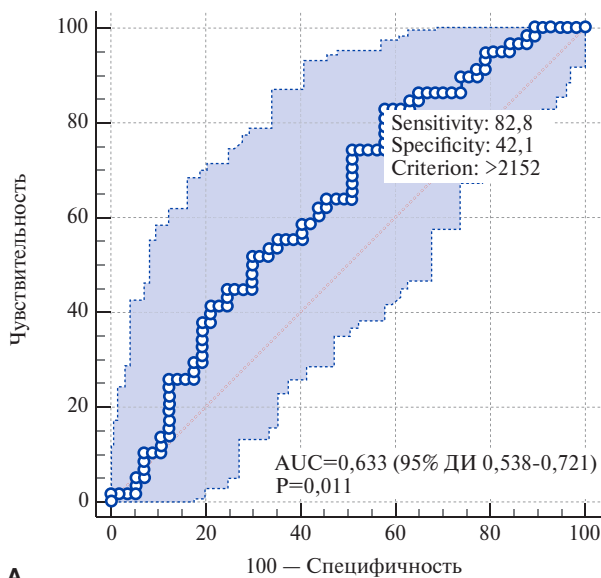
диагностической ценности абсолютного количества зрелых нейтрофилов в отношении прогрессирования атеросклероза был проведен ROC-анализ (рис. 3).

По результатам регрессионного анализа Кокса увеличение абсолютного количества зрелых нейтрофилов не было связано со статистически значимым увеличением риска прогрессирования каротидного

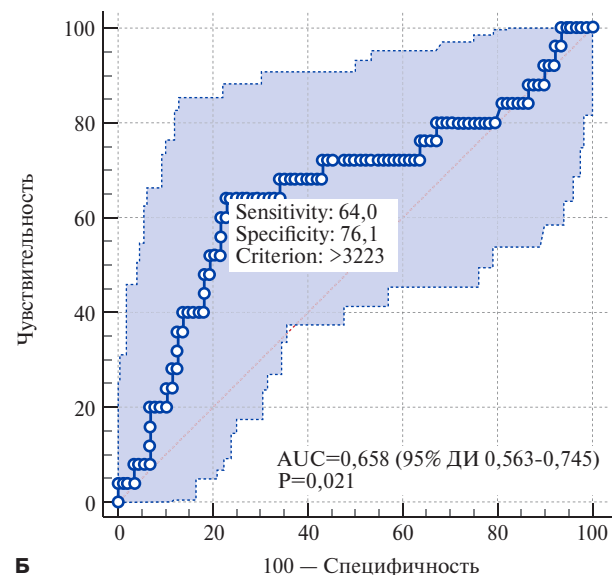
атеросклероза. Напротив, увеличение количества зрелых нейтрофилов $>3223,0$ кл/мкл ассоциировалось с увеличением относительного риска (RR) прогрессирования МФА в 3,19 раза (95% ДИ: 1,40-7,25; $p=0,0056$) в модели без поправки, в 2,62 раза (95% ДИ: 1,11-6,20; $p=0,0278$) в модели с поправкой на пол и возраст, в 3,09 раза (95% ДИ: 1,34-7,17; $p=0,0082$) в модели с поправкой на исходный ССР.

Обсуждение

Результаты клинических исследований свидетельствуют о наличии сильных взаимосвязей между количеством нейтрофилов и риском неблагоприятных сердечно-сосудистых событий. Так, по данным исследования CALIBER (cardiovascular disease research using linked bespoke studies and electronic health records), в которое был включен 775231 участник, увеличение количества нейтрофилов в пределах референсных значений было связано с увеличением RR развития сердечной недостаточности (RR 2,04), атеросклеротического заболевания периферических артерий (RR 1,95), аневризмы брюшной аорты (RR 1,72), нефатального инфаркта миокарда (RR 1,58) и коронарной смерти (RR 1,78) [14]. Вместе с тем в 2023г были опубликованы результаты исследования с Менделевской рандомизацией, продемонстрировавшего, что генетически обусловленное увеличение количества циркулирующих нейтрофилов на одно стандартное отклонение ассоциируется с увеличением RR ишемической болезни сердца (RR 1,15; 95% ДИ: 1,08-1,21), инфаркта миокарда (RR 1,22; 95% ДИ: 1,12-1,34) и атеросклеротического заболевания перифериче-



А



Б

Рис. 3. ROC-кривые, демонстрирующие диагностическую эффективность абсолютного количества зрелых нейтрофилов в отношении прогрессирования каротидного атеросклероза (**А**) и МФА (**Б**).

ских артерий (RR 1,19; 95% ДИ: 1,04–1,36) [15]. Таким образом, впервые были получены убедительные данные о каузальной роли нейтрофилов в развитии атеросклеротических сердечно-сосудистых событий [16]. Другой важной находкой являлось то, что различные гематологические индексы, включающие в себя нейтрофилы, такие как отношение нейтрофилов к лимфоцитам, не имеют дополнительной предиктивной ценности.

Основными результатами проведенного исследования являются: 1) количество зрелых нейтрофилов прямо коррелировало с ультразвуковыми индикаторами атеросклероза сонных артерий, стареющих нейтрофилов — с ультразвуковыми индикаторами атеросклероза АНК; общее количество нейтрофилов не коррелировало с ультразвуковыми индикаторами атеросклероза; 2) пациенты с гипоезогенными каротидными АСБ отличались большим количеством циркулирующих зрелых нейтрофилов; абсолютное количество зрелых нейтрофилов демонстрировало умеренную диагностическую эффективность в отношении выявления гипоезогенных каротидных АСБ; 3) пациенты с краткосрочным прогрессированием каротидного и МФА отличались большим количеством циркулирующих зрелых нейтрофилов; увеличение количества зрелых нейтрофилов $>3223,0$ кл/мкл ассоциировалось с увеличением RR прогрессирования МФА в модели с поправкой на исходный ССР.

Важно отметить, что общее количество нейтрофилов в проведенном исследовании не коррелировало с ультразвуковыми индикаторами бремени атеросклероза и не было связано с увеличением риска прогрессирования атеросклероза. С учетом представленных выше данных о том, что производные от общего количества нейтрофилов гематологические индексы могут иметь крайне ограниченную дополнительную ценность, именно углубленный анализ отдельных подтипов нейтрофилов может быть источником получения дополнительной диагностической и прогностической информации, что также демонстрирует проведенное нами и другие исследования [17].

Зрелые нейтрофилы являются доминирующей субпопуляцией нейтрофилов в системной циркуляции, составляющих в представленном исследовании ~90% от всех нейтрофилов. Вероятно, ассоциации между общим количеством нейтрофилов и атеросклеротическими сердечно-сосудистыми заболеваниями, которые были получены в крупных исследованиях, опосредованы вкладом именно этого подтипа нейтрофилов, и именно они реализуют общие атерогенные эффекты нейтрофилов. Кроме того, именно зрелые и стареющие нейтрофилы, которые зачастую рассматриваются как один из подтипов зрелых нейтрофилов, обладают наибольшей способностью к хемотаксису и миграции в ткани, в т.ч. и АСБ [18]. По мере роста атеромы важность количества циркулирующих нейтрофилов может существенно возрастать, поскольку нейтрофилы отличаются способностью к адгезии к эндотелию и миграции в стенку сосуда даже при высоких значениях напряжения сдвига, рост которого наблюдается по мере увеличения АСБ и степени стенозирования сосуда [19, 20]. Таким образом, количество зрелых нейтрофилов может служить маркером потенциально уязвимых АСБ, которые, в свою очередь, также являются предикторами прогрессирования атеросклероза в различных сосудистых бассейнах [21].

Заключение

Среди пациентов 40–64 лет увеличение количества циркулирующих зрелых нейтрофилов ассоциируется с увеличением бремени каротидного атеросклероза и наличием гипоезогенных каротидных АСБ. Увеличение количества зрелых нейтрофилов $>3223,0$ кл/мкл ассоциировалось с увеличением RR риска прогрессирования МФА за 15,5 мес. наблюдения в 3,09 раза (95% ДИ: 1,34–7,17; $p=0,0082$) в модели с поправкой на исходный ССР.

Отношения и деятельность: все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература/References

- Garratt LW. Current Understanding of the Neutrophil Transcriptome in Health and Disease. *Cells*. 2021;10(9):2406. doi:10.3390/cells10092406.
- Ng LG, Ostuni R, Hidalgo A. Heterogeneity of neutrophils. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(4):255–65. doi:10.1038/s41577-019-0141-8.
- Palomino-Segura M, Sicilia J, Ballesteros I, et al. Strategies of neutrophil diversification. *Nat Immunol*. 2023;24(4):575–84. doi:10.1038/s41590-023-01452-x.
- Zhang X, Kang Z, Yin D, et al. Role of neutrophils in different stages of atherosclerosis. *Innate Immun*. 2023;29(6):97–109. doi:10.1177/17534259231189195.
- Silvestre-Roig C, Braster Q, Ortega-Gomez A, et al. Neutrophils as regulators of cardiovascular inflammation. *Nat Rev Cardiol*. 2020;17(6):327–40. doi:10.1038/s41569-019-0326-7.
- Silvestre-Roig C, Braster Q, Wichapong K, et al. Externalized histone H4 orchestrates chronic inflammation by inducing lytic cell death. *Nature*. 2019;569(7755):236–40. doi:10.1038/s41586-019-1167-6.
- Volkov AM, Murashov IS, Polonskaya YaV, et al. Changes in the content of matrix metalloproteinases and their tissue expression in atherosclerotic plaques of different types. *Cardiologia*. 2018;58(10):12–8. (In Russ.) Волков А.М., Мурашов И.С., Полонская Я.В. и др. Изменение содержания матриксных металлопротеиназ и их тканевая экспрессия в атеросклеротических бляшках разных типов. *Кардиология*. 2018;58(10):12–8. doi:10.18087/cardio.2018.10.10180.
- de Vries JJ, Autar ASA, van Dam-Nolen DHK, et al. Association between plaque vulnerability and neutrophil extracellular traps (NETs) levels: The Plaque At RISK study. *PLoS One*. 2022;9(17(6)):e0269805. doi:10.1371/journal.pone.0269805.
- Ezhov M, Safarova M, Afanasieva O, et al. Matrix Metalloproteinase 9 as a Predictor of Coronary Atherosclerotic Plaque Instability in Stable Coronary Heart Disease Patients with Elevated Lipoprotein(a) Levels. *Biomolecules*. 2019;9(4):129. doi:10.3390/biom9040129.
- Genkel VV, Kuznetsova AS, Lebedev EV, et al. Prognostic significance of atherosclerotic lesion of one or two vascular basins in patients at high and very high cardiovascular risk. *Cardiovascular Therapeutics and Prevention*. 2021;20(2):2669. (In Russ.) Генкель В.В., Кузнецова А.С., Лебедев Е.В. и др. Прогностическая значимость атеросклеротического поражения одного или двух сосудистых бассейнов у пациентов высокого и очень высокого сердечно-сосудистого риска. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2021;20(2):2669. doi:10.15829/1728-8800-2021-2669.
- Genkel V, Kuznetsova A, Lebedev E, et al. Carotid total plaque area as an independent predictor of short-term subclinical polyvascular atherosclerosis progression and

- major adverse cardiac and cerebrovascular events. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2023; 17:17539447231194861. doi:10.1177/17539447231194861.
12. Genkel VV, Kuznetsova AS, Lebedev EV, et al. Factors associated with echogenicity of atherosclerotic plaques in patients aged 40-64 years with carotid atherosclerosis. *Cardiologia.* 2021;61(6):35-40. (In Russ.) Генкель В.В., Кузнецова А.С., Лебедев Е.В. и др. Факторы, связанные с эхогенностью атеросклеротических бляшек, у пациентов в возрасте 40-64 лет с каротидным атеросклерозом. *Кардиология.* 2021;61(6):35-40. doi:10.18087/cardio.2021.6.n1536.
13. Školoudík D, Kešnerová P, Hrbáč T, et al. Risk factors for carotid plaque progression after optimising the risk factor treatment: substudy results of the Atherosclerotic Plaque Characteristics Associated with a Progression Rate of the Plaque and a Risk of Stroke in Patients with the carotid Bifurcation Plaque Study (ANTIQU). *Stroke Vasc Neurol.* 2022;7(2):132-9. doi:10.1136/svn-2021-001068.
14. Shah AD, Denaxas S, Nicholas O, et al. Neutrophil Counts and Initial Presentation of 12 Cardiovascular Diseases: A CALIBER Cohort Study. *J Am Coll Cardiol.* 2017;69(9):1160-9. doi:10.1016/j.jacc.2016.12.022.
15. Luo J, Thomassen JQ, Nordestgaard BG, et al. Neutrophil counts and cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2023;44(47):4953-64. doi:10.1093/eurheartj/ehad649.
16. Soehnlein O, Döring Y. Beyond association: high neutrophil counts are a causal risk factor for atherosclerotic cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2023;44(47):4965-7. doi:10.1093/eurheartj/ehad711.
17. Wan M, Lu Y, Mao B, et al. Immature neutrophil is associated with coronary plaque vulnerability based on optical coherence tomography analysis. *Int J Cardiol.* 2023;374: 89-93. doi:10.1016/j.ijcard.2023.01.004.
18. Aroca-Crevillén A, Vicanolo T, Ovadia S, et al. Neutrophils in Physiology and Pathology. *Annu Rev Pathol.* 2024;19:227-59. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-051222-015009.
19. Liu F, Mao Y, Yan J, et al. Bionic Microbubble Neutrophil Composite for Inflammation-Responsive Atherosclerotic Vulnerable Plaque Pluripotent Intervention. *Research (Wash D C).* 2022;2022:9830627. doi:10.34133/2022/9830627.
20. Pérez-Rodríguez S, Huang SA, Borau C, et al. Microfluidic model of monocyte extravasation reveals the role of hemodynamics and subendothelial matrix mechanics in regulating endothelial integrity. *Biomedfluidics.* 2021;15(5):054102. doi:10.1063/5.0061997.
21. Liu M, Zhang Z, Zhao Y, et al. Combining ultrasound with bio-indicators reveals progression of carotid stenosis. *Ann Palliat Med.* 2021;10(11):11539-47. doi:10.21037/apm-21-2666.