



Количество нейтрофильных гранулоцитов крови ассоциировано с диффузным поражением коронарных артерий у больных с повышенной концентрацией липопропротеида (а)

Филатова А. Ю., Ларина Е. А., Афанасьева О. И., Ильина Л. Н., Радюхина Н. В., Афанасьева М. И., Клесарева Е. А., Ширяев А. А., Курбанов С. К., Власова Э. Е., Васильев В. П., Покровский С. Н., Арефьева Т. И.

Цель. Оценить уровень липопропротеида (а) (Лп(а)) и другие параметры липидного спектра, состав лейкоцитов крови у больных с очаговым и диффузным атеросклерозом коронарных артерий, перенесших операцию аортокоронарного шунтирования (АКШ), изучить влияние Лп(а) на активацию лейкоцитов *in vitro*.

Материал и методы. Включено 120 пациентов мужского пола, средний возраст 67±5 лет, с многососудистым поражением коронарных артерий, которым была выполнена плановая операция АКШ. Согласно типу поражения коронарных артерий пациенты были разделены на группы диффузного (n=77) и очагового (n=43) атеросклероза. В образцах периферической крови определяли содержание основных фракций липопропротеидов, включая Лп(а). В цельной крови и в первичной культуре клеток оценивали активацию нейтрофильных гранулоцитов при внесении Лп(а).

Результаты. У пациентов с диффузным стенозированием коронарных артерий отмечалась тенденция к более высокому уровню Лп(а), изменений в других показателях липидного спектра не выявлено. В данной группе пациентов отмечено увеличение абсолютного количества лейкоцитов за счет нейтрофильных гранулоцитов. Абсолютное количество нейтрофилов >2,9 млн/мл ассоциировалось с диффузным поражением (AUC 0,69 (95% доверительный интервал (ДИ): 0,60-0,77), p=0,0002, чувствительность 85%, специфичность 42%). У пациентов с уровнем Лп(а) ≥30 мг/дл диагностическая значимость количества нейтрофилов >2,9 млн/мл в отношении диффузного стенозирования была выше (AUC 0,74 (95% ДИ: 0,60-0,86), p=0,005, чувствительность 90%, специфичность 48%). По данным логистического регрессионного анализа с введением в модель количества нейтрофилов и традиционных факторов риска (возраст, индекс массы тела, наличие артериальной гипертензии и курения), только количество нейтрофилов выше порогового уровня оставалось независимым фактором диффузного стенозирования коронарного русла. Лп(а) способен вызывать активацию нейтрофилов, детектируемую по увеличению экспозиции CD66b клетками в цельной крови, а также образованию нейтрофильных внеклеточных ловушек в первичной культуре клеток.

Заключение. Нейтрофильные гранулоциты могут участвовать в формировании диффузных атеросклеротических поражений коронарного русла. Одним из активаторов нейтрофилов может быть Лп(а). Сочетание высоких значений количества нейтрофилов и уровня Лп(а) в крови повышает шансы развития диффузного атеросклероза коронарных артерий.

Ключевые слова: коронарный атеросклероз, диффузный тип поражения, липопропротеид (а), нейтрофильные гранулоциты.

Отношения и деятельность. Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 22-25-00051 "Вклад нейтрофильных гранулоцитов в прогрессирование атеросклероза; участие атерогенных липопропротеидов в активации клеток" (в рамках гранта выполнены следующие эксперименты: изучение активации в "цельной" крови, изучение образования нейтрофильных внеклеточных ловушек в культуре клеток, выделенных из крови доноров).

ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. акад. Е. И. Чазова Минздрава России, Москва, Россия.

Филатова А. Ю.* — к.м.н., н.с. лаборатории клеточной иммунологии ИЭК, ORCID: 0000-0001-8911-1628, Ларина Е. А. — лаборант-исследователь лаборатории проблем атеросклероза ИЭК, ORCID: нет, Афанасьева О. И. — д.б.н., в.н.с. лаборатории проблем атеросклероза ИЭК, ORCID: 0000-0001-8909-8662, Ильина Л. Н. — к.м.н., н.с. лаборатории микрохирургии сердца и сосудов отдела сердечно-сосудистой хирургии ИКК, ORCID: 0000-0003-2789-4844, Радюхина Н. В. — к.б.н., с.н.с. лаборатории клеточной иммунологии ИЭК, ORCID: 0000-0002-2473-061X, Афанасьева М. И. — н.с. лаборатории проблем атеросклероза ИЭК, ORCID: 0000-0002-5725-3805, Клесарева Е. А. — к.т.н., н.с. лаборатории проблем атеросклероза ИЭК, ORCID: 0000-0002-0682-8699, Ширяев А. А. — член-корр. РАН, д.м.н., профессор, г.н.с. лаборатории микрохирургии сердца и сосудов отдела сердечно-сосудистой хирургии ИКК, ORCID: 0000-0002-3325-9743, Курбанов С. К. — к.м.н., м.н.с. лаборатории микрохирургии сердца и сосудов отдела сердечно-сосудистой хирургии ИКК, ORCID: 0000-0001-7767-1695, Власова Э. Е. — к.м.н., с.н.с. лаборатории микрохирургии сердца и сосудов отдела сердечно-сосудистой хирургии ИКК, ORCID: 0000-0003-2925-244X, Васильев В. П. — к.м.н., с.н.с. лаборатории микрохирургии сердца и сосудов отдела сердечно-сосудистой хирургии ИКК, ORCID: 0000-0002-2297-6026, Покровский С. Н. — д.б.н., профессор, руководитель лаборатории проблем атеросклероза ИЭК, ORCID: 0000-0001-5944-6427, Арефьева Т. И. — д.б.н., г.н.с., и.о. руководителя лаборатории клеточной иммунологии ИЭК, ORCID: 0000-0002-9500-1940.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):
anastasia.m088@yandex.ru

АКШ — аортокоронарное шунтирование, ДИ — доверительный интервал, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ЛВП — липопропротеиды высокой плотности, ЛНП — липопропротеиды низкой плотности, Лп(а) — липопропротеид (а), НВЛ — нейтрофильные внеклеточные ловушки, СРБ — С-реактивный белок, ТГ — триглицериды, ФР — фактор риска, ХС — холестерин, AUC — площадь под РОК-кривой.

Рукопись получена 08.08.2023

Рецензия получена 02.10.2023

Принята к публикации 16.10.2023



Для цитирования: Филатова А. Ю., Ларина Е. А., Афанасьева О. И., Ильина Л. Н., Радюхина Н. В., Афанасьева М. И., Клесарева Е. А., Ширяев А. А., Курбанов С. К., Власова Э. Е., Васильев В. П., Покровский С. Н., Арефьева Т. И. Количество нейтрофильных гранулоцитов крови ассоциировано с диффузным поражением коронарных артерий у больных с повышенной концентрацией липопропротеида (а). *Российский кардиологический журнал*. 2023;28(11):5559. doi:10.15829/1560-4071-2023-5559. EDN CDAJST

Number of blood neutrophil granulocytes is associated with diffuse coronary involvement in patients with increased lipoprotein (a)

Filatova A. Yu., Larina E. A., Afanasyeva O. I., Ilyina L. N., Radyukhina N. V., Afanasyeva M. I., Klesareva E. A., Shiryayev A. A., Kurbanov S. K., Vlasova E. E., Vasiliev V. P., Pokrovsky S. N., Arefieva T. I.

Aim. To assess the level of lipoprotein (a) (Lp(a)) and other lipid profile parameters, the composition of blood leukocytes in patients with focal and diffuse coronary atherosclerosis who underwent coronary artery bypass surgery (CABG), as well as to study the effect of Lp(a) on the activation of leukocytes *in vitro*.

Material and methods. The study included 120 male patients (mean age, 67±5 years) with multivessel coronary artery disease after elective CABG surgery. According to the type of coronary artery involvement, patients were divided into groups of diffuse (n=77) and focal (n=43) atherosclerosis. In peripheral blood samples, the content of the main fractions of lipoproteins, including Lp(a), was determined. Activation of neutrophil granulocytes upon addition of Lp(a) was assessed in whole blood and in primary cell culture.

Results. In patients with diffuse coronary stenosis, there was a tendency to higher Lp(a) levels; no changes in other lipid profile parameters were detected. In this group of patients, an increase in the absolute leukocyte count was noted due to neutrophilic granulocytes. An absolute neutrophil count >2,9 million/mL was associated with diffuse disease (AUC, 0,69 (95% confidence interval (CI) 0,60-0,77), p=0,0002, sensitivity 85%, specificity 42%). In patients with Lp(a) ≥30 mg/dL, the diagnostic value of a neutrophil count >2,9 million/mL for diffuse stenosis was higher (AUC, 0,74 (95% CI 0,60-0,86), p=0,0005, sensitivity 90%, specificity 48%). According to logistic regression analysis with the introduction of neutrophils and conventional risk factors (age, body mass index, hypertension and smoking) into the model, only the number of neutrophils above the threshold level remained an independent factor in diffuse coronary stenosis. Lp(a) can induce neutrophil activation, detected by increased CD66b overexpression in whole blood, as well as the formation of neutrophil extracellular traps in primary cell culture.

Conclusion. Neutrophil granulocytes can participate in the formation of diffuse atherosclerotic coronary lesions. One of the neutrophil activators may be Lp(a). The combination of high neutrophil count and Lp(a) level in the blood increases the risk of diffuse coronary atherosclerosis.

Keywords: coronary atherosclerosis, diffuse coronary artery disease, lipoprotein (a), neutrophil granulocytes.

Relationships and Activities. The study was supported by the Russian Science Foundation grant № 22-25-00051 "The contribution of neutrophil granulocytes to the progression of atherosclerosis; participation of atherogenic lipoproteins in cell activation".

E. I. Chazov National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russia.

Filatova A. Yu.* ORCID: 0000-0001-8911-1628, Larina E. A. ORCID: none, Afanasyeva O. I. ORCID: 0000-0001-8909-8662, Ilyina L. N. ORCID: 0000-0003-2789-4844, Radyukhina N. V. ORCID: 0000-0002-2473-061X, Afanasyeva M. I. ORCID: 0000-0002-5725-3805, Klesareva E. A. ORCID: 0000-0002-0682-8699, Shiryayev A. A. ORCID: 0000-0002-3325-9743, Kurbanov S. K. ORCID: 0000-0001-7767-1695, Vlasova E. E. ORCID: 0000-0003-2925-244X, Vasiliev V. P. ORCID: 0000-0002-2297-6026, Pokrovsky S. N. ORCID: 0000-0001-5944-6427, Arefieva T. I. ORCID: 0000-0002-9500-1940.

*Corresponding author: anastasia.m088@yandex.ru

Received: 08.08.2023 **Revision Received:** 02.10.2023 **Accepted:** 06.10.2023

For citation: Filatova A. Yu., Larina E. A., Afanasyeva O. I., Ilyina L. N., Radyukhina N. V., Afanasyeva M. I., Klesareva E. A., Shiryayev A. A., Kurbanov S. K., Vlasova E. E., Vasiliev V. P., Pokrovsky S. N., Arefieva T. I. Number of blood neutrophil granulocytes is associated with diffuse coronary involvement in patients with increased lipoprotein (a). *Russian Journal of Cardiology*. 2023;28(11):5559. doi:10.15829/1560-4071-2023-5559. EDN CDAJST

Ключевые моменты

- Сочетание высоких значений количества нейтрофилов и уровня липопротеида (а) повышает шансы развития диффузного атеросклероза коронарных артерий у пациентов старше 60 лет.
- Липопротеид (а) способен вызывать активацию нейтрофилов в "цельной крови", а также образование нейтрофильных внеклеточных ловушек в первичной культуре клеток.

Одной из наиболее тяжелых форм поражения коронарных артерий является диффузный атеросклероз, для которого характерно преобладание осложненных атеросклеротических поражений с кальцинированными и фиброзными бляшками [1, 2]. Диффузное поражение коронарного русла, захватывающее его дистальные сегменты, считается независимым фактором риска (ФР) сердечно-сосудистых осложнений и смертности у пациентов, перенесших операцию аортокоронарного шунтирования (АКШ)

Key messages

- The combination of high neutrophil count and Lp(a) levels increases the risk of diffuse coronary atherosclerosis in patients over 60 years of age.
- Lipoprotein(s) is capable of causing activation of neutrophils in whole blood, as well as the formation of neutrophil extracellular traps in primary cell culture.

[1]. С развитием эффективной медикаментозной терапии и возможностей эндоваскулярных методов лечения доля больных с диффузным стенозированием коронарных артерий, требующих реваскуляризации миокарда, увеличивается.

В развитие атеросклероза основной вклад вносят дислипидемия и воспаление. Моноциты считаются основной популяцией иммунных клеток, задействованных в атерогенезе. При воспалении моноциты мигрируют в субэндотелиальное пространство с по-

следующей дифференцировкой в макрофаги, которые продуцируют широкий спектр биологически активных молекул, способствуя ремоделированию сосудистой стенки. Результаты опубликованных исследований подтверждают взаимосвязь между типом поражения коронарных артерий и изменениями субпопуляционного состава моноцитов периферической крови [3].

Нейтрофилы также вовлечены во все этапы атерогенеза, начиная с ранних стадий и заканчивая развитием комплексных осложнений. Данные двух крупных системных обзоров и метаанализов показали, что увеличение нейтрофил-лимфоцитарного соотношения, свидетельствующее о наличии системного воспаления, ассоциировалось с повышенным риском сердечно-сосудистой смертности у пациентов, перенесших хирургическое вмешательство на сердце и сосудах [4, 5].

Среди липидных факторов, задействованных в атерогенезе, следует выделить липопротеид (а) (Лп(а)). Повышенный уровень Лп(а) в крови является доказанным и независимым ФР ранней манифестации атеросклероза различных сосудистых бассейнов и ассоциированных с ним сердечно-сосудистых осложнений в молодом и среднем возрасте [6]. Лп(а) локализуется в богатых макрофагами участках атеросклеротических бляшек человека [7]. Предполагается, что он может активировать клетки неспецифического иммунитета [7], однако до конца механизм его атерогенного действия пока не изучен.

В настоящей работе мы оценили уровень Лп(а) и других параметров липидного спектра, состав лейкоцитов крови у больных с очаговым и диффузным поражением коронарных артерий, перенесших операцию АКШ, изучили влияние Лп(а) на активацию нейтрофильных гранулоцитов в цельной крови и в первичной культуре клеток.

Материал и методы

В одномоментное одноцентровое исследование были включены 120 пациентов мужского пола, средний возраст 67 ± 5 лет, с клинической картиной стабильной стенокардии II-IV функционального класса, многососудистым поражением коронарных артерий, госпитализированные в НМИЦК им. Е. И. Чазова для выполнения плановой операции АКШ в 2018-2019 гг. В исследование не включали пациентов с инфарктом миокарда, острым нарушением мозгового кровообращения, хирургическими или эндоваскулярными вмешательствами в предшествующие 3 мес., злокачественными новообразованиями, тяжелой почечной или печеночной недостаточностью, с воспалительными/инфекционными заболеваниями, сахарным диабетом 2 типа, а также пациентов, принимавших иммунодепрессивные препараты или препараты, потенциально способные повлиять на уровень Лп(а) (аферез, никотиновая кислота, ингибиторы PCSK9, глюкокортико-

иды, половые гормоны). На момент включения в исследование все пациенты получали рекомендованную для больных атеросклерозом терапию: бета-блокаторы, аспирин/клопидогрел, ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента/сартаны, статины.

Исследование было выполнено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом ФГБУ "НМИЦК им. акад. Е. И. Чазова" Минздрава России (протокол № 231 от 27.11.2017). Все включенные пациенты дали письменное согласие на участие в исследовании.

Анализ предоперационной коронароангиографии проводился независимо двумя интервенционными кардиологами; анализ интраоперационных данных проводил сердечно-сосудистый хирург. Тип коронарного поражения (диффузный или очаговый) был определен на основании предоперационной коронароангиографии и протоколов операций. Критерием для включения пациента в группу с диффузным атеросклерозом было распространенное до дистальных сегментов поражение с диаметром сосуда < 2 мм на протяжении $> 75\%$ дистальнее значимого стеноза в ≥ 2 целевых для шунтирования коронарных артериях [8]. Кроме этого, в группу диффузного поражения были отнесены пациенты с диаметром шунтированных артерий в месте анастомоза $< 1,5$ мм, что оценивалось интраоперационно.

Всем пациентам был выполнен общий анализ крови с определением лейкоцитарной формулы с использованием анализатора крови Sysmex CA-50 (Япония). Забор образцов крови выполнялся перед проведением операции АКШ. Концентрацию общего холестерина (ХС), триглицеридов (ТГ), ХС липопротеидов высокой плотности (ЛВП) определяли в сыворотке ферментативным колориметрическим методом на анализаторе Architect С-8000 (Abbott, США). Уровень ХС липопротеидов низкой плотности (ЛНП) рассчитывали по формуле: Фридвальда с модификацией Далена: $ХС\ ЛНП_{корр} = ОХС - ХС\ ЛВП - ТГ/2,2 - 0,3 \times Лп(а)/38,7$, где $ХС\ ЛНП_{корр}$ — уровень ХС ЛНП, скорректированный по уровню Лп(а). Концентрацию Лп(а) в сыворотке крови измеряли при помощи разработанного в лаборатории иммуноферментного анализа с использованием моноспецифических поликлональных антител барана против Лп(а) человека [9].

Концентрацию С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке определяли высокочувствительным иммуноферментным методом при помощи набора "СРБ-ИФА-БЕСТ высокочувствительный" (Вектор БЕСТ, Россия).

Изучение активации нейтрофильных гранулоцитов в присутствии Лп(а) в цельной крови и в первичной культуре клеток

Препараты Лп(а) получали из плазмы крови методом ступенчатого ультрацентрифугирования в гра-

Таблица 1

Клинико-лабораторная характеристика пациентов в подгруппах очагового и диффузного поражения коронарных артерий

Показатель	Очаговое поражение (n=43)	Диффузное поражение (n=77)	p
ИМТ, кг/м ²	28 (26;31)	28 (25;30)	0,420
Артериальная гипертензия	39 (91)	69 (90)	0,849
Курение	21 (49)	34 (44)	0,704
Инфаркт миокарда в анамнезе	22 (51)	43 (56)	0,623
ЧКВ/стентирование в анамнезе	8 (18)	17 (22)	0,655
Лейкоциты, млн/мл	6,3 (5,3;7,0)	7,4 (6,2;8,3)	0,0002
Нейтрофилы, млн/мл	3,3 (2,5;4,1)	3,9 (3,4;4,6)	0,0005
Общий ХС, ммоль/л	3,9 (3,5;4,5)	4,0 (3,5;4,5)	0,887
ХС ЛВП, ммоль/л	1,0 (0,9;1,2)	1,0 (0,9;1,2)	0,957
ХС ЛНП, ммоль/л	2,3 (2,0;2,6)	2,3 (1,9;2,7)	0,720
ХС ЛНПкорр, ммоль/л	2,1 (1,6;2,4)	2,1 (1,5;2,4)	0,615
Триглицериды, ммоль/л	1,3 (1,0;1,6)	1,2 (0,9;1,6)	0,295
Лп(а), мг/дл	12,1 (4,0;45,6)	23,0 (7,0;53,0)	0,064
Лп(а) ≥30 мг/дл	15 (35)	34 (44)	0,343
СРБ, МЕ/л	3,7 (1,7;7,6)	3,1 (1,4;4,5)	0,310

Примечание: данные представлены как медиана (25-й процентиль; 75-й процентиль), или n (%).

Сокращения: ИМТ — индексы массы тела, Лп(а) — липопротеид (а), СРБ — С-реактивный белок, ХС — холестерин, ЛВП — липопротеиды высокой плотности, ЛНП — липопротеиды низкой плотности, ХС ЛНПкорр — холестерина липопротеидов низкой плотности, скорректированный по уровню Лп(а), ЧКВ — чрескожное коронарное вмешательство.

диенте плотности нейтральной соли NaBr или аффинной хроматографии на сорбенте, содержащем в качестве лиганда высокоспецифичные антитела барана против Лп(а) человека [10].

Препараты Лп(а) вносили в образцы цитратной крови здоровых добровольцев и инкубировали 2 ч при 37° С. Клетки окрашивали антителами к CD16 и CD66b (eBioscience, США). Лизис эритроцитов и фиксацию клеток проводили с использованием коммерческих наборов (BD Biosciences, США). Связывание антител оценивали методом цитофлуориметрии в потоке на приборе FACS Calibur (BD Immunocytometry Systems).

Для получения нейтрофильных гранулоцитов образцы крови доноров в цитратном антикоагулянте наслаивали на двойной градиент плотности стерильных растворов фиколла-верографина (ПанЭко, Россия) в соответствии с протоколом¹. После центрифугирования отбирали нижнее кольцо нейтрофильных гранулоцитов, клетки отмывали стерильным физиологическим раствором и ресуспендировали в среде X-vivo (Lonza, США) с добавлением 1 мМ пирувата натрия, 2 мМ L-глутамин, по 50 Ед/мл пенициллина и стрептомицина, смеси неэссенциальных аминокислот (Thermo Fisher Scientific, США) и 1% аутологичной сыворотки и высаживали в 24-луночный планшет, предварительно покрытый полилизином (Sigma-Aldrich, Германия).

В культуру клеток вносили препараты Лп(а); в контрольные образцы (позитивный контроль) вносили 50 нМ форболмиристатацетата (Sigma-Aldrich, Германия). Формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) наблюдали в течение 3 ч при 37° С в атмосфере 5% CO₂. Клетки фиксировали формалином при комнатной температуре и окрашивали ДНК-красителем DAPI (Thermo Fisher Scientific, США). Образцы анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии (LEICA CTR5000, Nikon TI-2).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета статистических программ MedCalc 20.104. Данные представлены как медиана (25-й процентиль; 75-й процентиль) в связи с ненормальным распределением. Межгрупповые различия оценивали с помощью критерия U Манна-Уитни. По качественным признакам группы сопоставляли с помощью критерия Фишера. Для оценки связи изучаемых параметров с наличием диффузного поражения коронарных артерий рассчитывали отношение шансов с 95% доверительным интервалом (ДИ). Пороговые значения количества нейтрофилов для предсказания наличия диффузного поражения коронарных артерий, определение их чувствитель-

ности и специфичности получены при построении кривых операционных характеристик (ROC-анализ). Многофакторный анализ выполняли методом логистической регрессии, в модель вводили ФР, продемонстрировавшие связь с диффузным поражением коронарных артерий при однофакторном анализе. При создании модели также учитывалось отсутствие внутренних корреляционных связей между оцениваемыми параметрами. Различия считались статически значимыми при p<0,05.

Финансирование. В рамках гранта РФФ № 22-25-00051 были выполнены следующие эксперименты: изучение активации нейтрофилов в цельной крови, изучение образования НВЛ в культуре клеток, выделенных из крови доноров.

Результаты

Согласно диффузному и локальному типу поражения коронарных артерий пациенты были разделены на две группы. Клинико-лабораторная характеристика групп представлена в таблице 1. При оценке показателей липидного спектра мы не обнаружили значимых различий среди больных, имеющих диффузное поражение коронарных артерий, в сравнении с пациентами с очаговым поражением коронарных

¹ Долгушин И. И., Рыжкова А. И., Савочкина А. Ю., Шишкова Ю. С. Способ выделения нейтрофильных гранулоцитов из периферической крови. Патент на изобретение. Номер патента 2 431 836. Дата госрегистрации 18.02.2010.

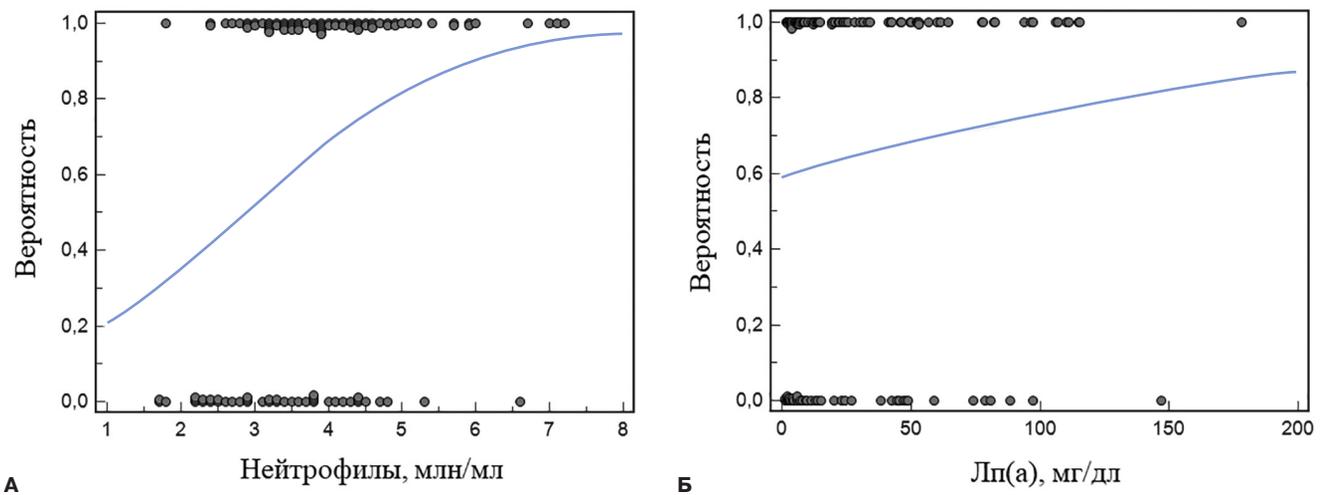


Рис. 1. Взаимосвязь абсолютного количества нейтрофилов (А) и уровня Лп(а) (Б) с диффузным поражением коронарных артерий по данным логического регрессионного анализа.

Сокращение: Лп(а) — липопротеид (а).

артерий. Отмечалась тенденция к более высокому уровню Лп(а) у пациентов с диффузным стенозированием коронарных артерий. В данной группе пациентов нами отмечено увеличение абсолютного количества лейкоцитов за счет нейтрофильных гранулоцитов. Достоверных различий в содержании других клеток (моноциты, лимфоциты, эозинофилы, базофилы) не выявлено. Концентрация СРБ также была сопоставима в обеих группах.

По данным ROC-анализа, абсолютное количество нейтрофилов >2,9 млн/мл с чувствительностью 85% и специфичностью 42% ассоциировалось с диффузным поражением коронарных артерий (AUC 0,69 (95% ДИ: 0,60-0,77), p=0,0002). В группе пациентов с уровнем Лп(а) <30 мг/дл количество нейтрофилов >2,9 млн/мл с чувствительностью 81% и специфичностью 37% ассоциировалось с диффузным поражением коронарных артерий (AUC 0,64 (95% ДИ: 0,51-

0,75), p=0,05). При этом в группе пациентов с уровнем Лп(а) ≥30 мг/дл диагностическая значимость количества нейтрофилов >2,9 млн/мл в отношении диффузного стенозирования коронарного русла была выше (AUC 0,74 (95% ДИ: 0,60-0,86), p=0,005, чувствительность 90%, специфичность 48%).

Для выявления параметров, оказывающих влияние на развитие диффузного поражения коронарного русла, выполнялся однофакторный логистический регрессионный анализ. Увеличение количества нейтрофилов ассоциировалось с развитием диффузного атеросклероза коронарных артерий (рис. 1). Вклад уровня Лп(а) был менее значимым и статистически недостоверным (рис. 1, табл. 2).

По данным многофакторного логистического анализа с введением в модель количества нейтрофилов и традиционных ФР (возраст, индекс массы тела, наличие артериальной гипертензии, курение) только

Таблица 2

Показатели, влияющие на развитие диффузного поражения коронарных артерий по данным логистического регрессионного анализа

Показатель	Модель 1	Модель 2	Модель 3	Модель 4	Модель 5
	ОШ (95% ДИ)				
Нейтрофилы, млн/мл	2,03 (1,33-3,11)*	—	—	2,23 (1,43-3,49)*	—
Нейтрофилы >2,9 млн/мл	—	5,44 (2,16-13,71)*	—	—	6,04 (2,31-15,77)*
Лп(а), мг/дл	—	—	1,01 (1,00-1,02)	—	—
Возраст, лет	—	—	—	1,00 (0,93-1,09)	1,01 (0,93-1,10)
Артериальная гипертензия, п (%)	—	—	—	0,98 (0,25-4,00)	1,08 (0,27-4,40)
ИМТ, кг/м ²	—	—	—	0,96 (0,86-1,07)	0,96 (0,86-1,08)
Курение, п (%)	—	—	—	0,51 (0,20-1,19)	0,66 (0,29-1,50)

Примечание: данные представлены как ОШ (95% ДИ), * — p<0,05.

Сокращения: ДИ — доверительный интервал, ИМТ — индекс массы тела, Лп(а) — липопротеид (а), ОШ — отношение шансов.

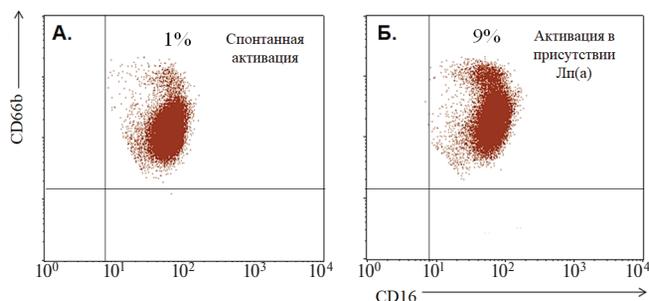


Рис. 2. Активация нейтрофильных гранулоцитов донора: спонтанная (в присутствии буфера для выделения Лп(а)) (А) и при внесении Лп(а) в конечной концентрации 10 мкг/мл (Б). Клетки гейтировали по характеристикам светорассеяния и окрашиванию антителами к CD16 и CD66b. Популяции активированных клеток выделены по высокой экспозиции CD66b. Приведены данные одного из пяти экспериментов.

Сокращение: Лп(а) — липопротеид (а).

количество нейтрофилов выше порогового уровня оставалось независимым фактором наличия диффузного стенозирования коронарного русла (табл. 2).

Исследование влияния Лп(а) на активацию нейтрофильных гранулоцитов в цельной крови и в культуре клеток

Препараты Лп(а) вносили в образцы донорской крови с цитратным антикоагулянтом; конечная концентрация Лп(а) составляла 10 мкг/мл. Внесение препаратов Лп(а) способствовало активации нейтрофилов, оцениваемой по увеличению мембранной экспозиции маркера нейтрофилов CD66b (рис. 2).

В первичной культуре нейтрофилов, выделенных из крови, в отсутствие стимуляторов морфология клеток не менялась, в то время как в присутствии форболмиристатацетата >70% клеток в течение 3 ч образовывали НВЛ (данные не приведены). При добавлении Лп(а) в конечной концентрации 10 мкг/мл мы также наблюдали формирование НВЛ, 50-70% клеток вступало в нетоз (рис. 3).

Таким образом, Лп(а) способен вызывать активацию нейтрофилов, детектируемую по увеличению экспозиции CD66b клетками в крови, а также образованию НВЛ в культуре.

Обсуждение

Основной и наиболее типичной формой коронарного атеросклероза является сегментарное поражение с вовлечением проксимальных и средних участков коронарных артерий. Диффузные формы, при которых захватываются дистальные участки артерий, ассоциируются с худшими результатами лечения ишемической болезни сердца (ИБС) и ограничивают проведение прямой реваскуляризации миокарда [1, 2].

Повышенный уровень Лп(а) в крови является доказанным ФР развития атеросклероза в молодом возрасте, причиной преждевременной манифестации ИБС и развития сердечно-сосудистых осложнений [11].

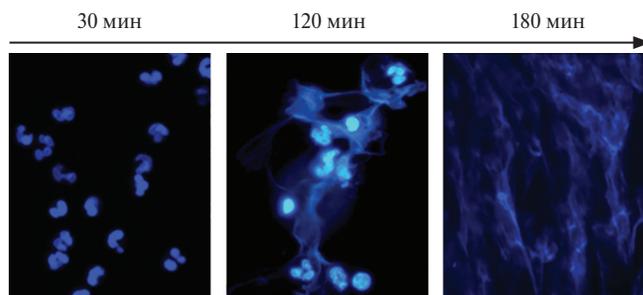


Рис. 3. Динамика образования НВЛ в культуре нейтрофильных гранулоцитов в присутствии Лп(а) в конечной концентрации 10 мкг/мл, х400. Краситель DAPI. Приведены данные одного из пяти экспериментов.

Состояние постоянного низкоинтенсивного воспаления, которое выражается в увеличении концентрации "растворимых" маркеров воспаления и количества моноцитов и нейтрофилов, характерно для процесса старения и сопровождается развитием возраст-ассоциированных заболеваний [12, 13]. Согласно клиническим данным, лейкоцитоз является независимым ФР ИБС, а также ассоциирован с низкой восприимчивостью к медикаментозной терапии у больных пожилого и старческого возраста [4]. В ряде исследований сообщалось, что повышенный уровень нейтрофилов при сердечно-сосудистых заболеваниях атеросклеротического генеза коррелирует с более высоким риском неблагоприятного исхода заболевания [14].

В настоящее время нейтрофилы рассматриваются как активные участники воспалительного процесса при атеросклерозе. Нейтрофилы и продукты их жизнедеятельности, в частности, НВЛ, обнаружены в атеросклеротических бляшках модельных животных и человека [15, 16]. НВЛ образуются вследствие нетоза и состоят из волокон хроматина, а также ядерных, цитоплазматических и гранулярных белков нейтрофилов [17]. В инициации образования НВЛ в стенках артерии участвуют окисленные ЛНП и кристаллы ХС [17].

В настоящем исследовании мы сравнили содержание основных популяций лейкоцитов крови, уровень Лп(а) и другие показатели липидного спектра у перенесших операцию АКШ пациентов с очаговым и диффузным поражением коронарного русла. По концентрации СРБ как общепринятого маркера воспаления группы не различались. При оценке популяций лейкоцитов в зависимости от типа поражения коронарных артерий нами было выявлено более высокое количество нейтрофилов в подгруппе больных с диффузным поражением коронарных артерий относительно больных с очаговым поражением. Данные изменения могут свидетельствовать о более выраженном хроническом воспалении в сосудистой стенке у такой категории больных. При сравнении параметров липидного спектра отмечалась тенденция к более высокому

уровню Лп(а) в подгруппе пациентов с диффузным стенозированием коронарных артерий. При анализе диагностической значимости количества нейтрофилов периферической крови в отношении диффузного типа коронарного стенозирования в подгруппе пациентов с гиперЛп(а) регистрировались более высокие значения площади под РОК-кривой. По сравнению с показателем количества нейтрофилов крови, повышенный уровень Лп(а), по данным регрессионного анализа, имел меньший вклад в развитие такого поражения коронарных артерий.

В экспериментах *in vitro* нами получены подтверждения того, что Лп(а) может активировать нейтрофилы. Внесение образцов Лп(а), полученных из крови пациентов с гиперхолестеринемией, приводило к увеличению экспозиции CD66b клетками в цельной крови и формированию НВЛ в условиях клеточной культуры. Таким образом, Лп(а) может реализовывать свою провоспалительную активность путем активации нейтрофилов.

Воспалительный потенциал Лп(а) может быть опосредован прямым действием входящих в его состав окисленных фосфолипидов на рецепторы клеток врожденного иммунитета, а также его способностью образовывать комплексы с провоспалительными молекулами [7]. Выявление механизмов реализации провоспалительной активности Лп(а) требует дальнейших исследований.

Литература/References

1. Akchurin RS, Shiryayev AA, Vasiliev VP, et al. Diffuse coronary disease in coronary surgery (analytical review). *Clin Experiment Surg. Petrovsky J.* 2018;6:75-81. (In Russ.) Акчурин Р.С., Ширяев А.А., Васильев В.П. и др. Диффузное поражение коронарных артерий в коронарной хирургии. Журнал имени академика Б.В. Петровского. 2018;6:75-81. doi:10.24411/2308-1198-2018-14011.
2. Gould KL, Johnson NP. Physiologic severity of diffuse coronary artery disease: hidden high risk. *Circulation.* 2015;131:4-6. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013815.
3. Brown R, Lip G, Varma C, Shantsila E. Impact of Mon2 monocyte-platelet aggregates on human coronary artery disease. *European Journal of Clinical Investigation.* 2018;48:1291-5. doi:10.1111/eci.12911.
4. Tan TP, Arekapudi A, Metha J, et al. Neutrophil-lymphocyte ratio as predictor of mortality and morbidity in cardiovascular surgery: a systematic review. *ANZ J Surg.* 2015;85:414-9. doi:10.1111/ans.13036.
5. Jackson SM, Perry LA, Borg C, et al. Prognostic significance of preoperative neutrophil-lymphocyte ratio in vascular surgery: systematic review and meta-analysis. *Vasc Endovascular Surg.* 2020;54:697-706. doi:10.1177/1538574420951315.
6. Lau FD, Giugliano RP. Lipoprotein(a) and its significance in cardiovascular disease: a review. *JAMA Cardiol.* 2022;7:760-9. doi:10.1001/jamacardio.2022.0987.
7. Afanasieva OI, Arefieva TI, Ezhov MV, Pokrovsky SN. Lipoprotein(a) and immunity. In: *Lipoprotein(a).* Humana press, Springer Nature. 2023:261-74. doi:10.1007/978-3-031-24575-6_16.
8. Gallego HC, Amat-Santos IJ, Llerena S, et al. Distal vessel quality score as a predictor of graft patency after aorto-coronary bypass graft: towards the optimization of the revascularization strategy. *Interv Cardiol J.* 2015;2:1. doi:10.21767/2471-8157100010.
9. Afanasieva OI, Tyurina AV, Klesareva EA, et al. Lipoprotein(a), immune cells and cardiovascular outcomes in patients with premature coronary heart disease. *J Pers Med.* 2022;2:269. doi:10.3390/jpm12020269.
10. Pokrovsky SN, Adamova IYu, Afanasieva OY, Benevolenskaya GF. Immunosorbent for selective removal of lipoprotein (a) from human plasma: in vitro study. *Artif Organs.* 1991;2:136-40. doi:10.1111/j.1525-1594.1991.tb00771.x.
11. Pirillo A, Catapano AL. Lp(a) as a cardiovascular risk factor. In: *Lipoprotein(a).* Humana press, Springer Nature. 2023:231-9.
12. Bektas A, Schurman SH, Sen R, Ferrucci L. Human T cell immunosenescence and inflammation in aging. *J Leukoc Biol.* 2017;4:977-88. doi:10.1189/jlb.3R10716-335R.
13. Liang Z, Zhang T, Liu H, et al. Inflammaging: the ground for sarcopenia? *Exp Gerontol.* 2022;168:111931. doi:10.1016/j.exger.2022.111931.
14. Sreejit G, Johnson J, Jagers RM, et al. Neutrophils in cardiovascular disease: warmongers, peacemakers, or both? *Cardiovasc Res.* 2022;118:2596-609. doi:10.1093/cvr/cvab302.
15. Quillard T, Frank G, Mawson T, et al. Mechanisms of erosion of atherosclerotic plaques. *Curr Opin Lipidol.* 2017;28:434-41. doi:10.1097/MOL.0000000000000440.
16. Nappi F, Bellomo F, Avtaar Singh SS. Worsening thrombotic complication of atherosclerotic plaques due to neutrophils extracellular traps: a systematic review. *Biomedicines.* 2023;11:113. doi:10.3390/biomedicines11010113.
17. Lee KH, Kronbichler A, Park DD, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: a comprehensive review. *Autoimmun Rev.* 2017;11:1160-73. doi:10.1016/j.autrev.2017.09.012.

Ограничения исследования. Дизайн исследования не позволяет установить причинно-следственную связь изучаемых показателей с типом поражения коронарных артерий. Были включены пациенты старше 60 лет. Учитывая известные возраст-ассоциированные изменения иммунитета, для выявления связи между количеством и составом лейкоцитов с выраженностью поражения коронарного русла у пациентов более молодого возраста требуются дополнительные исследования.

Заключение

Нейтрофильные гранулоциты могут участвовать в формировании диффузных поражений коронарного русла у больных пожилого возраста. Одним из активаторов нейтрофилов может быть Лп(а). Сочетание высоких значений (выше порогового уровня) количества нейтрофилов и уровня Лп(а) повышает шансы развития диффузного атеросклероза коронарных артерий.

Отношения и деятельность. Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 22-25-00051 "Вклад нейтрофильных гранулоцитов в прогрессирование атеросклероза; участие атерогенных липопротеидов в активации клеток" (в рамках гранта выполнены следующие эксперименты: изучение активации в "цельной" крови, изучение образования нейтрофильных внеклеточных ловушек в культуре клеток, выделенных из крови доноров).