

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ / ORIGINAL ARTICLES

DOI 10.52727/2078-256X-2022-18-3-208-221

**Иммунофенотипирование циркулирующих лейкоцитов
как инструмент оптимизации диагностики каротидного атеросклероза
с использованием методов машинного обучения**

В.В. Генкель¹, И.И. Долгушин¹, П.А. Астанин², А.Ю. Савочкина¹,
И.Л. Батурина¹, К.В. Никушкина¹, А.А. Минасова¹, В.А. Сумеркина¹,
Л.Р. Пыхова¹, А.С. Кузнецова¹, И.И. Шапошник¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Южно-Уральский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
454948, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
117997, Россия, г. Москва, ул. Островитянова, 1, стр. 6

Аннотация

Целью исследования являлось изучение возможности использования иммунофенотипирования циркулирующих лимфоцитов, нейтрофилов и моноцитов в целях диагностики прогностически неблагоприятного каротидного атеросклероза с применением алгоритмов машинного обучения. **Материал и методы.** В исследовании приняли участие пациенты в возрасте 40–64 лет, которым было проведено дуплексное сканирование сонных артерий и артерий нижних конечностей. Фенотипирование и дифференцировку субпопуляций лимфоцитов, нейтрофилов и моноцитов осуществляли методом проточной цитометрии на аппарате «Navios 6/2» (Beckman Coulter, США). Статистическая обработка данных производилась с использованием программно-прикладного пакета SPSS 23 и собственных программных наработок, созданных с использованием основных библиотек языка программирования Python 3.8 (Scikit-learn, Pandas, Numpy, Scipy) и IDE Spyder. **Результаты.** В исследование были включены 78 пациентов, 39 (50,0 %) мужчин и 39 (50,0 %) женщин, медиана возраста 50,0 года. Возраст старше 56 лет ($p = 0,001$), повышенное содержание холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП) ($p < 0,001$) и мочевой кислоты ($p = 0,001$), а также иммуносупрессорных нейтрофилов ($p = 0,005$) статистически значимо ассоциированы с развитием каротидных атеросклеротических бляшек. В то же время уменьшение популяций проангиогенных нейтрофилов ($p = 0,009$), классических моноцитов, экспрессирующих CD36 ($p = 0,019$), неклассических моноцитов ($p = 0,021$), промежуточных моноцитов, экспрессирующих TLR4 ($p = 0,033$), а также классических моноцитов, экспрессирующих TLR2 ($p = 0,044$), статистически значимо ассоциировано с повышенным шансом наличия каротидных атеросклеротических бляшек. Были созданы две прогностические модели. Первая модель включала базовые клинико-лабораторные параметры (возраст, содержание ХС ЛПНП, мочевой кислоты), вторая – все отобранные параметры, а также иммунологические показатели. Включение выявленных иммунологических предикторов в модель привело к значимому увеличению всех стандартных метрик качества бинарной классификации. Точность модели возросла на 13 % ($p = 0,014$), чувствительность – на 20 % ($p = 0,003$), специфичность – на 6 % ($p = 0,046$), прогностическая ценность положительного результата – на 9 % ($p = 0,037$), прогностическая ценность отрицательного результата – на 16 % ($p = 0,011$). По данным ROC-анализа, без включения в модель иммунологических предикторов площадь под ROC-кривой (AUC) составляла 0,765 [0,682; 0,848], включение же иммунологических предикторов приводило к статистически значимому увеличению AUC (0,906 [0,854; 0,958], $p = 0,041$). **Заключение.** У пациентов 40–64 лет без установленных атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваний включение в модель иммунологических маркеров, получаемых при иммунофенотипировании лейкоцитов, позволило увеличить ее диагностическую эффективность в отношении выявления прогностически неблагоприятного каротидного атеросклероза. Диагностическую ценность продемонстрировали субпопуляции моноцитов, экспрессирующих TLR2, TLR4 и CD36, а также иммуносупрессорные и проангиогенные нейтрофилы.

Ключевые слова: атеросклероз, нейтрофилы, воспаление, моноциты, Toll-подобные рецепторы.

© Генкель В.В., Долгушин И.И., Астанин П.А., Савочкина А.Ю., Батурина И.Л., Никушкина К.В., Минасова А.А., Сумеркина В.А., Пыхова Л.Р., Кузнецова А.С., Шапошник И.И., 2022

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Генкель В.В., e-mail: henkel-07@mail.ru

Для цитирования: Генкель В.В., Долгушин И.И., Астанин П.А., Савочкина А.Ю., Батурина И.Л., Никушкина К.В., Минасова А.А., Сумеркина В.А., Пыхова Л.Р., Кузнецова А.С., Шапошник И.И. Иммунофенотипирование циркулирующих лейкоцитов как инструмент оптимизации диагностики каротидного атеросклероза с использованием методов машинного обучения. *Атеросклероз*, 2022; 18 (3): 208–221. doi: 10.52727/2078-256X-2022-18-208-221

Immunophenotyping of circulating leukocytes as a tool to optimize diagnosis of carotid atherosclerosis using machine learning approach

V.V. Genkel¹, I.I. Dolgushin¹, P.A. Astanin², A.Yu. Savochkina¹,
I.L. Baturina¹, K.V. Nikushkina¹, A.A. Minasova¹, V.A. Sumerkina¹,
L.R. Pykhova¹, A.S. Kuznetsova¹, I.I. Shaposhnik¹

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education
«South-Ural State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation
64, Vorovskiy str., Chelyabinsk, 454048, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University
1, bld. 6, Ostrovityanov str., Moscow, 117997, Russia

Abstract

The aim of the present study was to investigate the possibility of using immunophenotyping of circulating lymphocytes, neutrophils and monocytes to diagnose prognostically unfavorable carotid atherosclerosis using machine learning algorithms. **Material and methods.** A sample of patients aged 40 to 64 years, who underwent duplex scanning of the carotid arteries and the lower limb arteries, served as a source of patients for analysis. Phenotyping and differentiation of subpopulations of lymphocytes, neutrophils, and monocytes were performed by flow cytometry using the “Navios 6/2” device (Beckman Coulter, USA) device. Data were statistically processed using software package SPSS 23 and our own software programs created using main libraries of Python 3.8 programming language (Scikit-learn, Pandas, Numpy, Scipy) and IDE Spyder. **Results.** Seventy-eight patients, 39 (50.0 %) males and 39 (50.0 %) females, median age 50.0 years, were included in the study. Age over 56 ($p = 0.001$), elevated low density lipoprotein (LDL) cholesterol ($p < 0.001$) and uric acid ($p = 0.001$), as well as immunosuppressive neutrophils level ($p = 0.005$) were statistically significantly associated with the development of carotid plaque. At the same time, decreased cell populations of proangiogenic neutrophils ($p = 0.009$), classical monocytes expressing CD36 ($p = 0.019$), non-classical monocytes ($p = 0.021$), intermediate monocytes expressing TLR4 ($p = 0.033$), and classical monocytes expressing TLR2 ($p = 0.044$) were statistically significantly associated with an increased chance of carotid plaque. Taking into account the selected parameters, two prognostic models were created. The first model included basic clinical and laboratory parameters (age, LDL cholesterol and uric acid), and the second model included all selected parameters as well as immunological parameters. Inclusion of the identified immunological predictors in the model resulted in a significant increase in all standard quality metrics of the binary classification. Model accuracy increased by 13 % ($p = 0.014$), sensitivity by 20 % ($p = 0.003$), specificity by 6 % ($p = 0.046$), predictive value of a positive result by 9 % ($p = 0.037$), predictive value of a negative result by 16 % ($p = 0.011$). According to the ROC analysis, without the inclusion of immunological predictors in the model, the area under the ROC curve (AUC) was 0.765 [0.682; 0.848], the inclusion of immunological predictors resulted in a statistically significant increase in AUC (0.906 [0.854; 0.958], $p = 0.041$). **Conclusions.** In patients 40–64 years old without established atherosclerotic cardiovascular disease, inclusion of immunological markers derived from leukocyte immunophenotyping in the model allowed increasing its diagnostic efficacy with regard to the detection of prognostically unfavorable carotid atherosclerosis. Subpopulations of monocytes expressing TLR2, TLR4, and CD36, as well as immunosuppressive and proangiogenic neutrophils, demonstrated diagnostic value.

Keywords: atherosclerosis, neutrophils, inflammation, monocytes, Toll-like receptors.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Correspondence: Genkel V.V., e-mail: henkel-07@mail.ru

Citation: Genkel V.V., Dolgushin I.I., Astanin P.A., Savochkina A.Yu., Baturina I.L., Nikushkina K.V., Minasova A.A., Sumerkina V.A., Pykhova L.R., Kuznetsova A.S., Shaposhnik I.I. Immunophenotyping of circulating leukocytes as a tool to optimize diagnosis of carotid atherosclerosis using machine learning approach. *Atherosclerosis*, 2022; 18 (3): 208–221. doi: 10.52727/2078-256X-2022-18-3-208-221

Введение

В настоящее время основной причиной развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий является атеросклероз [1]. По данным ряда исследований, крупные сердечно-сосудистые события у лиц молодого и среднего возраста зачастую развиваются у бессимптомных субъектов с исходно низким и/или умеренным сердечно-сосудистым риском (ССР), не имеющих показаний к гиполипидемической терапии [2, 3]. Существующие ограничения применяемых для оценки ССР шкал обуславливают поиск альтернативных подходов, позволяющих улучшить стратификацию ССР и прогнозирование сердечно-сосудистых катастроф [4]. В последние годы наибольшее развитие получили подходы, основанные на использовании методов неинвазивной визуализации, биомаркеров и омиксных технологий, генетических маркеров и полигенных шкал риска [5–8].

Хроническое персистирующее неразрешающееся воспаление является важнейшим механизмом атерогенеза [9]. В каждом из представленных выше подходов исследованию воспаления уделяется большое внимание: оценка воспаления в сосудистой стенке и атеросклеротической бляшке (АСБ) методами гибридной визуализации; оценка циркулирующих биомаркеров и генов, репрезентирующих активацию врожденного и адаптивного иммунитета [10–12]. Поиск новых информативных биомаркеров воспаления и их интеграция в клинические шкалы представляют собой перспективный путь улучшения оценки ССР и прогнозирования сердечно-сосудистых событий [13, 14]. Исследование иммунокомпетентных клеток периферической крови методом проточной цитометрии является ценным инструментом в поиске и внедрении в практику клеточных маркеров атеросклероза [15, 16]. Параллельно совершенствованию методов идентификации клеточных популяций и других биомаркеров в периферической крови широкое развитие в кардиоваскулярной медицине получило использование алгоритмов машинного обучения [17, 18]. Применение методов машинного обучения в целях создания моделей диагностики заболеваний и прогнозирования клинических исходов позволяет улучшить их эффективность по сравнению с традиционными шкалами риска [18]. Целью настоящего исследования являлось изучение возможности использования иммунофенотипирования циркулирующих лимфоцитов, нейтрофилов и моноцитов в целях диагностики прогностически неблагоприятного каротидного атеросклероза с применением алгоритмов машинного обучения.

Материал и методы

Анализ выполнен на выборке из 474 пациентов в возрасте 40–64 лет, которым проведено дуплексное сканирование сонных артерий и артерий нижних конечностей. В анализ включали пациентов, не имеющих установленных атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваний (АССЗ) и прошедших обследование согласно протоколу исследования, дизайн которого представлен на рис. 1. При включении в исследование все пациенты подписывали информированное согласие. Протокол его проведения одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 10 от 27.10.2018). Работа выполнена в рамках государственного задания «Клинико-иммунологическая оценка мультифокального атеросклероза у пациентов с различным статусом кардиоваскулярного риска» (номер регистрации 121020800023-9). Критериями не включения в исследование и/или исключения из него являлись следующие клинические состояния: перенесенные ишемический инсульт и/или транзиторная ишемическая атака, реваскуляризация сонных артерий, перемежающаяся хромота, реваскуляризация артерий нижних конечностей, тяжелые нарушения функции печени и почек (снижение скорости клубочковой фильтрации (СКФ) менее 30 мл/мин/1,73 м²), злокачественные новообразования, установленные хронические воспалительные заболевания, прием противовоспалительных препаратов и иммуносупрессантов.

Методика и протокол ДС сонных артерий подробно описаны нами ранее [19]. В качестве зависимой переменной предложенной диагностической модели каротидного атеросклероза определено наличие каротидных АСБ с максимальной высотой $\geq 2,5$ мм, которые представляют собой атеромы максимальной (третьей) степени в соответствии с клиническими рекомендациями Американского общества эхокардиографии по оценке каротидных АСБ с целью стратификации ССР, являющиеся наиболее прогностически неблагоприятными и свидетельствующие о 10-летнем ССР по фрамингемской шкале ≥ 20 % [20].

Определяли следующие биохимические лабораторные показатели крови после как минимум 8 часов голодания: содержание общего холестерина (ОХС), холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП), триглицеридов (ТГ), гликированного гемоглобина, креатинина с последующим расчетом СКФ по формуле CKD-EPI (BioChem Analette,

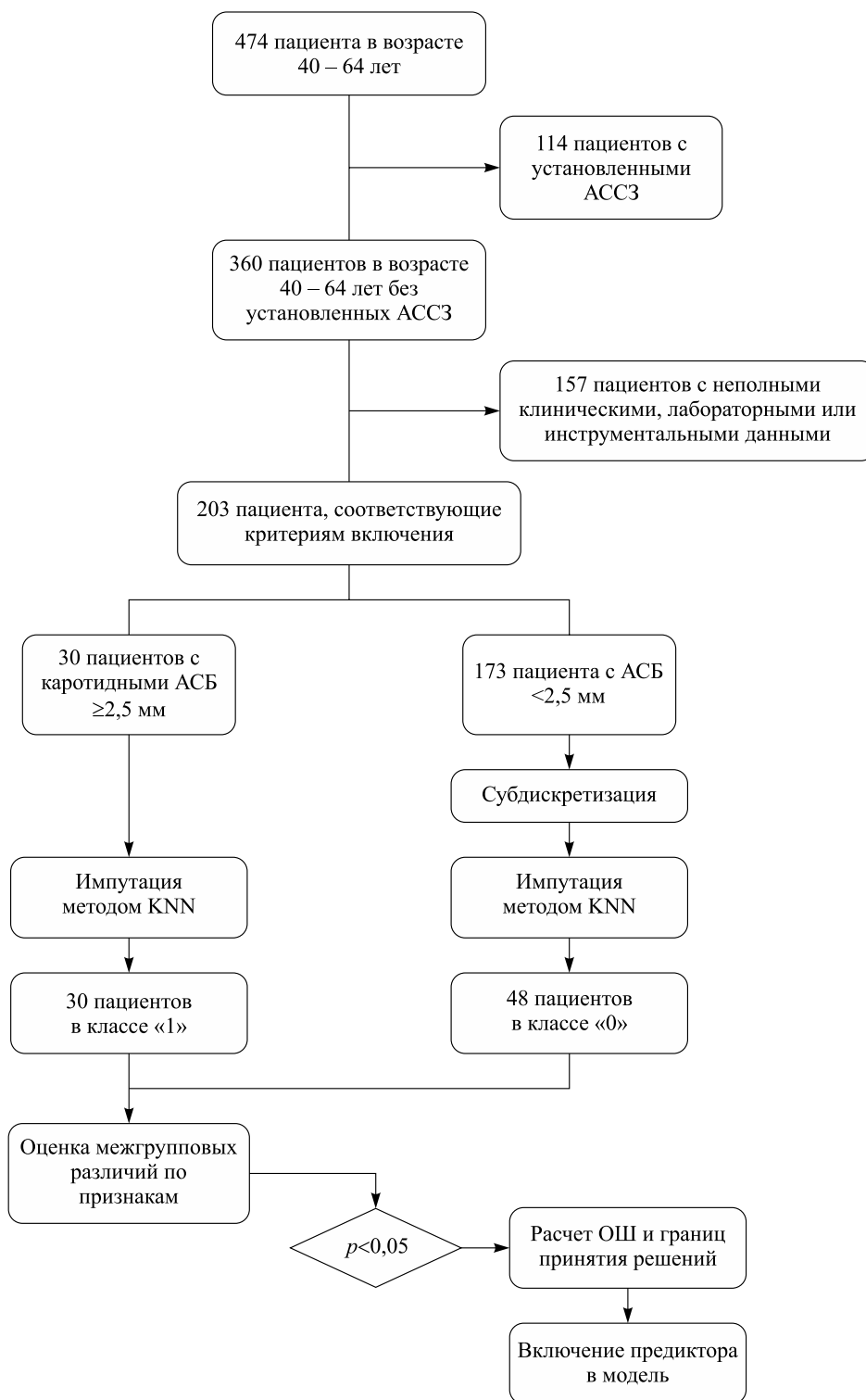


Рис. 1. Блок-схема исследования

Fig. 1. Flowchart of the study

USA). Концентрацию высокочувствительного С-реактивного белка (вЧСРБ) в сыворотке крови измеряли с использованием наборов для иммуноферментного анализа (АО «Вектор-Бест», Россия).

Фенотипирование и дифференцировку субпопуляций лимфоцитов, нейтрофилов и моноцитов осуществляли методом проточной цитометрии на аппарате «Navios 6/2» (Beckman Coulter, США). Фенотипирование клеток проводили в цельной крови с детекцией не менее 30 000 событий. Использовали следующие конъюгаты моноклональных антител: CD3 (PE-eFluor 610, eBioscience (Thermo Fisher Scientific, США)); CD4 (APC, eBioscience); CD8 (PE-Cy5.5, Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, США)); CD11b (FITC, eBioscience); CD25 (PE-Cy7, eBioscience); HLA-DR (APC, eBioscience); CD127 (FITC, eBioscience); CD14 (PerCP-Cy5.5, eBioscience); CD282 (TLR2) (Alexa Fluor 647, BioLegend, США); CD284 (TLR4) (Alexa Fluor 647, BioLegend); CD36 (FITC, BD Biosciences, США); CD62L-PE (Beckman Coulter); CD184 (CXCR4)-PE-CF594 (BD Biosciences); CD182 (CXCR2)-PerCP-eFluor 710 (BD Biosciences); CD309 (VEGFR2)–Alexa Fluor 647 (BioLegend).

Статистическая обработка данных производилась с использованием программно-прикладного пакета SPSS 23 и собственных программных наработок, созданных с использованием основных библиотек языка программирования Python 3.8 (Scikit-learn, Pandas, Numpy, Scipy) и IDE Spyder. Для проверки количественных данных на нормальность распределения применялся критерий Шапиро – Уилка. Описание количественных данных с нормальным распределением осуществлялось с помощью среднего и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Для данных с иным распределением определялись медиана, 1-й и 3-й квартили ($Me [Q_1; Q_3]$). Для качественных (бинарных) признаков рассчитывались доли (m) с последующим выражением их в процентах (%). Первым этапом отбора предикторов явилась оценка межгрупповых различий по зависимой бинарной переменной с использованием критерия Стьюдента для нормально распределенных количественных групп и критерия Манна – Уитни для количественных групп данных с иным распределением. На втором этапе для отобранных предикторов (для которых межгрупповые различия были значимыми или близкими к значимым) осуществлялась оценка отношений шансов (ОШ) с подбором соответствующей границы принятия решений и оценка значимости данного разделения с использованием точного критерия Фишера. Затем выполнялось построение моделей машинного обучения

на основе алгоритма логистической регрессии с включением указанных предикторов.

Для сравнительного анализа обобщающей способности предикторов проводилось построение двух моделей: первая модель включала только базовые клинико-анамнестические параметры, вторая модель – как базовые, так и иммунологические (лабораторные) показатели, исследованные в данной работе. Оценка моделей осуществлялась с использованием стандартных бинарных метрик классификации: точности, чувствительности, специфичности, а также прогностической ценности отрицательного и положительного результатов. Для всех метрик выполнялось построение 95%-го доверительного интервала (95 % ДИ) и оценка различий между их значениями для двух моделей. В рамках препроцессинга проводилась субдискретизация (undersampling) данных, что позволило исключить избыточные примеры из мажорного (преобладающего) класса и решить проблему дисбаланса классов. Полученная выборка разделялась на обучающую и валидационную в соотношении 60/40. Обучение модели производилось только на обучающей выборке, а тестирование (валидация) – на валидационной выборке. Статистически значимыми считались результаты проверки статистических гипотез при $p < 0,050$.

Результаты

В исследование были включены 78 пациентов (см. рис. 1), 39 (50,0 %) мужчин и 39 (50,0 %) женщин, медиана возраста которых составляла 50,0 года. Клинико-анамнестическая характеристика пациентов и результаты лабораторного исследования (до проведения процедуры импутации данных) представлены в табл. 1 и 2. Как следует из табл. 1, статистически значимые различия между группами наблюдались по таким показателям, как возраст, содержание ХС ЛПНП, ХС ЛПВП, ТГ и мочевой кислоты. Статистически значимо чаще наличие каротидных АСБ с высотой не менее 2,5 мм встречалось среди лиц мужского пола и лиц с артериальной гипертензией в анамнезе.

По результатам разведочного анализа полученных данных до проведения процедуры импутации методом KNN в сочетании с экспертными оценками в отношении параметров со статистически значимыми или близкими к значимым межгрупповым различиями были отобраны предикторы наличия каротидных АСБ $\geq 2,5$ мм среди базовых клинико-лабораторных показателей, а также среди показателей, полученных при проведении иммунофенотипирования циркулирующих лейкоцитов (табл. 3).

Таблица 1

Клинико-лабораторная характеристика участников исследования

Table 1

Clinical and laboratory characteristics of study participants

Показатель / Indicator	Группа пациентов / Group of patients			<i>p</i>
	АСБ $\geq 2,5$ мм / AP $\geq 2,5$ mm (<i>n</i> = 30)	АСБ $< 2,5$ мм / AP $< 2,5$ mm (<i>n</i> = 48)	Общая / General (<i>n</i> = 78)	
Возраст, лет / Age, years	56,0 [47,2; 58,0]	47,0 [45,0; 54,5]	50,0 [45,0; 57,0]	0,005
Мужской пол / Male gender	23 (76,6)	16 (33,3)	39 (50,0)	<0,001
ИМТ, кг/м ² / BMI, kg/m ²	28,7 [25,9; 30,5]	26,8 [24,3; 29,8]	27,7 [24,8; 30,0]	0,136
Ожирение / Obesity	10 (33,3)	11 (22,9)	21 (26,9)	0,277
Курение / Smoking	12 (40,0)	21 (43,7)	33 (42,3)	0,465
Сахарный диабет 2 типа / Type 2 diabetes mellitus	2 (6,66)	0 (0,00)	2 (2,56)	0,145
Артериальная гипертензия / Arterial hypertension	23 (76,6)	20 (41,6)	43 (55,1)	0,002
Бета-адреноблокаторы / Beta-adrenoblockers	5 (16,6)	4 (8,33)	9 (11,5)	0,233
Ингибиторы РААС / RAAS inhibitors	11 (36,6)	12 (25,0)	23 (29,5)	0,199
Диуретики / Diuretics	2 (6,66)	4 (8,33)	6 (7,69)	0,149
Статины / Statins	6 (20,0)	7 (14,6)	13 (16,6)	0,379
Содержание ОХС, ммоль/л / Total cholesterol, mmol/l	6,30 [5,40; 6,92]	5,73 [5,03; 6,22]	5,93 [5,17; 6,60]	0,068
Содержание ХС ЛПНП, ммоль/л / LDL cholesterol, mmol/l	4,10 [3,62; 4,91]	3,80 [3,12; 4,31]	4,00 [3,28; 4,69]	0,025
Содержание ХС ЛПВП, ммоль/л / High density lipoprotein cholesterol, mmol/l	1,25 [1,10; 1,45]	1,40 [1,20; 1,62]	1,35 [1,15; 1,52]	0,029
Содержание ТГ, ммоль/л / TG, mmol/l	1,50 [0,98; 1,88]	1,10 [0,87; 1,47]	1,20 [0,95; 1,70]	0,025
Содержание ВчСРБ, мг/л / hsCRP, mg/L	1,96 \pm 1,46	2,16 \pm 1,19	2,16 \pm 1,39	0,227
Содержание гликированного гемоглобина, % / Glycated hemoglobin, %	5,30 [5,10; 5,66]	5,72 [5,48; 6,01]	5,59 [5,30; 6,00]	0,056
СКФ, мл/мин/1,73 м ² / GFR, ml/min/1,73 м ²	74,5 [62,2; 96,0]	67,5 [61,0; 76,5]	69,0 [61,0; 83,7]	0,150
Содержание мочевой кислоты, мкмоль/л / Uric acid, μ mol/l	340,9 [315,2; 377,7]	253,6 [204,5; 321,9]	311,5 [216,9; 344,3]	<0,001

Примечание. ИМТ — индекс массы тела; РААС — ренин-ангиотензин-альдостероновая система; *p* — уровень значимости различий между двумя группами пациентов, разделенных по высоте каротидных АСБ.

Note. AP — atherosclerotic plaque; BMI — body mass index; DM — diabetes mellitus; RAAS — renin-angiotensin-aldosterone system; HDL cholesterol — high density lipoprotein cholesterol; TG — triglycerides; hsCRP — high-sensitivity C-reactive protein; GFR — glomerular filtration rate; *p* — significance level of differences between two groups of patients separated by the height of carotid atherosclerotic plaques.

Исходя из данных табл. 3, можно заключить, что более старший возраст, повышенное содержание ХС ЛПНП и мочевой кислоты, а также иммуносупрессорных нейтрофилов статистически значимо ассоциированы с развитием каротидных АСБ. В то же время уменьшение клеточных популяций проангиогенных нейтро-

филов, классических моноцитов, экспрессирующих CD36, неклассических моноцитов, промежуточных моноцитов, экспрессирующих TLR4, а также классических моноцитов, экспрессирующих TLR2, статистически значимо ассоциировано с повышенным шансом наличия каротидных АСБ.

Таблица 2

Table 2

Результаты иммунофенотипирования лимфоцитов, моноцитов и нейтрофилов

Results of immunophenotyping of lymphocytes, monocytes, and neutrophils

Показатель / Indicator	Группа пациентов / Group of patients						p	
	АСБ ≥ 2,5 мм / AP ≥ 2,5 mm (n = 30)		АСБ < 2,5 мм / AP < 2,5 mm (n = 48)		Общая / General (n = 78)			
	n	%	n	%	n	%	n	%
CD3 ⁺ (Т-лимфоциты / T-lymphocytes)	1461 [1260; 1940]	76,9 [72,7; 81,3]	1477 [1333; 1999]	76,2 [72,8; 81,9]	1468 [1291; 1975]	76,2 [72,8; 81,7]	0,570	0,770
CD19 ⁺ (В-лимфоциты / B-lymphocytes)	197,0 [126,2; 388,0]	11,8 [7,89; 13,4]	249,9 [187,0; 308,0]	12,1 [10,3; 14,1]	243,9 [181,0; 319,0]	12,1 [9,83; 14,1]	0,455	0,508
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (Т-хелперы / T-helpers)	891,0 [769,7; 1071]	47,7 [46,1; 55,5]	1012 [815,0; 1348]	51,7 [44,1; 56,4]	981,0 [797,0; 1342]	50,1 [45,1; 56,3]	0,377	0,471
NK-клетки / NK-cells	177,0 ± 100,2	8,72 ± 5,25	189,9 ± 112,7	8,09 ± 4,25	187,4 ± 107,9	8,28 ± 4,37	0,725	0,668
NKT-клетки / NKT-cells	320,0 [46,2; 404,0]	14,6 [2,63; 23,1]	456,5 [374,0; 634,5]	22,7 [18,6; 27,5]	427,0 [331,0; 626,0]	21,8 [16,3; 27,3]	0,012	0,028
CD3 ⁺ CD8 ⁺ (Т-цитотоксические / T-cytotoxic)	473,0 [404,5; 673,0]	28,2 [19,8; 32,4]	518,5 [402,5; 657,5]	24,6 [19,1; 29,7]	508,0 [402,5; 657,5]	24,7 [19,5; 30,7]	0,883	0,436
CD3 ⁺ CD25 ⁺ (активированные Т-лимфоциты / activated T-lymphocytes)	22,0 [14,6; 67,5]	1,32 [0,60; 3,21]	34,5 [27,0; 78,7]	1,92 [1,28; 3,53]	33,0 [25,0; 75,0]	1,84 [1,21; 3,54]	0,643	0,770
CD4 ⁺ CD25 ⁺ (активированные Т-хелперы / activated T-helpers)	53,0 [38,5; 116,0]	3,04 [2,24; 6,30]	53,0 [34,7; 83,5]	2,19 [1,59; 4,28]	53,0 [34,2; 85,5]	2,26 [1,66; 4,31]	0,347	0,728
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ (регуляторные Т-лимфоциты / regulatory T-lymphocytes)	101,0 [89,5; 135,7]	5,60 [5,00; 6,52]	117,0 [78,7; 161,0]	5,65 [4,70; 7,62]	112,0 [81,5; 152,5]	5,65 [4,70; 7,50]	0,462	0,295
CD8 ⁺ CD25 ⁺ (активированные Т-цитотоксические / activated T-cytotoxic)	4,00 [0,00; 46,5]	0,23 [0,01; 2,15]	2,50 [0,00; 23,5]	0,17 [0,00; 1,04]	3,00 [0,00; 25,0]	0,18 [0,01; 1,08]	0,929	0,917
Моноциты / Monocytes	0,52 [0,44; 0,70]	8,70 [7,22; 9,10]	0,50 [0,40; 0,57]	8,00 [7,00; 9,75]	0,50 [0,43; 0,59]	8,00 [7,00; 9,55]	0,158	0,435
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ (классические моноциты / classical monocytes)	506,0 [171,5; 551,0]	81,2 [32,2; 87,8]	277,0 [129,0; 357,7]	55,3 [30,9; 78,4]	283,0 [129,0; 379,5]	57,0 [30,9; 80,1]	0,094	0,077
CD14 ⁺ CD16 ⁺ (промежуточные моноциты / intermediate monocytes)	14,0 [11,7; 229,0]	3,29 [1,98; 46,2]	25,0 [12,0; 59,5]	5,05 [2,40; 13,2]	25,0 [12,0; 89,5]	4,86 [2,33; 21,8]	0,601	0,420
CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺ (неклассические моноциты / non-classical monocytes)	4,00 [1,00; 24,0]	0,69 [0,20; 6,30]	26,0 [13,0; 45,0]	6,07 [3,83; 8,68]	24,0 [12,5; 43,0]	5,89 [2,88; 8,57]	0,011	0,027

CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ CD36 ⁺ (классические моноциты, экспрессирующие CD36 / classical monocytes expressing CD36)	18,0 [12,0; 100,0]	3,55 [2,20; 25,7]	53,0 [34,5; 314,1]	10,6 [6,70; 86,8]	51,0 [26,0; 314,1]	10,0 [5,79; 86,1]	0,009	0,031
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ CD282 ⁺ (классические моноциты, экспрессирующие TLR2 / classical monocytes expressing TLR2)	18,0 [9,25; 76,0]	2,75 [1,83; 17,7]	65,0 [13,0; 275,2]	13,7 [3,96; 78,6]	41,0 [12,0; 231,0]	10,8 [2,92; 62,3]	0,073	0,018
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ CD284 ⁺ (классические моноциты, экспрессирующие TLR4 / classical monocytes expressing TLR4)	136,0 [78,7; 294,0]	29,6 [11,2; 50,9]	313,5 [156,0; 412,0]	76,5 [35,9; 95,1]	299,0 [132,0; 410,0]	71,6 [30,6; 92,7]	0,052	0,007
CD14 ⁺ CD16 ⁺ CD36 ⁺ (промежуточные моноциты, экспрессирующие CD36 / intermediate monocytes expressing CD36)	299,0 [174,2; 483,0]	51,8 [31,3; 96,8]	309,5 [151,5; 418,7]	54,8 [33,6; 92,4]	306,0 [151,5; 436,5]	51,8 [32,4; 93,5]	0,968	0,665
CD14 ⁺ CD16 ⁺ CD282 ⁺ (промежуточные моноциты, экспрессирующие TLR2 / intermediate monocytes expressing TLR2)	352,0 [167,0; 430,0]	50,0 [25,2; 92,8]	317,2 [212,0; 430,7]	74,8 [44,5; 92,4]	321,3 [203,5; 431,5]	73,7 [43,6; 92,5]	0,382	0,279
CD14 ⁺ CD16 ⁺ CD284 ⁺ (промежуточные моноциты, экспрессирующие TLR4 / intermediate monocytes expressing TLR4)	422,0 [317,5; 563,0]	83,3 [60,7; 86,8]	429,5 [316,0; 500,2]	95,8 [83,2; 98,6]	426,0 [316,0; 512,5]	95,2 [81,7; 98,1]	0,564	0,079
CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺ CD36 ⁺ (неклассические моноциты, экспрессирующие CD36 / nonclassical monocytes expressing CD36)	18,0 [12,0; 102,0]	2,94 [2,13; 26,1]	42,0 [24,5; 336,5]	9,07 [5,64; 94,7]	41,0 [19,0; 329,1]	8,70 [4,28; 90,2]	0,104	0,035
CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺ CD282 ⁺ (неклассические моноциты, экспрессирующие TLR2 / nonclassical monocytes expressing TLR2)	176,0 [87,5; 328,0]	25,9 [14,3; 71,4]	284,0 [71,0; 383,7]	61,6 [16,0; 92,7]	274,0 [71,0; 383,5]	61,0 [16,0; 91,7]	0,104	0,189
CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺ CD284 ⁺ (неклассические моноциты, экспрессирующие TLR4 / nonclassical monocytes expressing TLR4)	256,0 [247,7; 488,0]	59,5 [39,2; 92,8]	407,0 [329,5; 527,7]	95,7 [83,2; 97,8]	390,0 [303,5; 507,0]	92,8 [80,0; 97,6]	0,068	0,007
CD16 ^{hi} CD11b ^{hi} CD62L ^{hi} (зрелые нейтрофилы / mature neutrophils)	3471 [3134; 3787]	88,1 [84,2; 91,4]	2558,0 [2066; 3514]	88,4 [75,2; 92,9]	2862,0 [2088; 3629]	88,4 [76,7; 92,9]	0,026	0,533
CD16 ^{hi} CD11b ^{hi} CD62L ^{lo} CXCR4 ^{hi} (старение нейтрофилы / aging neutrophils)	430,0 [179,0; 566,0]	10,9 [4,11; 16,6]	514,5 [317,5; 834,5]	17,2 [7,92; 23,9]	502,0 [304,0; 779,0]	16,4 [7,69; 22,6]	0,442	0,073
CD16 ^{hi} CD11b ^{hi} CD62L ^{lo} CXCR2 ^{hi} VEGFR2 ^{hi} (проангиогенные нейтрофилы / proangiogenic neutrophils)	42,0 [0,00; 128,0]	1,12 [0,00; 3,25]	42,5 [11,5; 189,5]	1,69 [0,51; 6,02]	42,0 [8,50; 177,5]	1,53 [0,28; 5,24]	0,173	0,338
CD16 ^{hi} CD11b ^{lo} CD62L ^{br} (иммуносупрессорные нейтрофилы / immunosuppressive neutrophils)	288,0 [206,7; 456,0]	7,31 [5,44; 11,0]	227,0 [92,8; 425,5]	5,80 [3,51; 11,0]	234,0 [104,0; 444,0]	6,43 [3,51; 11,0]	0,377	0,613

Примечание. n – абсолютные значения, количество клеток в одном микролитре; % – относительные значения.

Note. n – absolute values, number of cells in 1 microliter; % – relative values.

Таблица 3

Предикторы наличия каротидных АСБ с максимальной высотой $\geq 2,5$ мм

Table 3

Predictors of carotid atherosclerotic plaques with a maximum height $\geq 2,5$ mm

Обозначение в уравнении / Designation in the equation	Параметр (содержание) / Parameter (content)	Граница принятия решения / The decision-making boundary	ОШ [95 % ДИ] / OR [95 % CI]	<i>p</i>
X_1	Возраст / Age	≥ 56 лет	5,7 [2,1; 16]	0,001
X_2	ХС ЛНП / LDL cholesterol	$\geq 4,94$ ммоль/л	6,4 [1,6; 26]	< 0,001
X_3	Мочевая кислота / Uric acid	≥ 250 мкмоль/л	5,0 [2,4; 24]	0,001
X_4	Иммуносупрессорные нейтрофилы / Immunosuppressive neutrophils	$\geq 5,96$ %	4,1 [2,4; 13]	0,005
X_5	Проангиогенные нейтрофилы / Proangiogenic neutrophils	$< 3,30$ %	3,4 [2,0; 16]	0,009
X_6	Классические моноциты, экспрессирующие CD36 / Classic monocytes expressing CD36	$< 26,5$ %	2,6 [1,8; 11]	0,019
X_7	Неклассические моноциты / Nonclassical monocytes	$< 3,77$ %	2,5 [1,7; 10]	0,021
X_8	Промежуточные моноциты, экспрессирующие TLR4 / Intermediate monocytes expressing TLR4	$< 75,7$ %	2,2 [1,3; 6,5]	0,033
X_9	Классические моноциты, экспрессирующие TLR2 / Classic monocytes expressing TLR2	$< 5,01$ %	2,1 [1,1; 4,5]	0,044

Примечание. ОШ – отношение шансов.

Note. OR – odds ratio, 95 % CI – confidence interval.

С учетом отобранных параметров были созданы две прогностические модели. Первая модель включала базовые клинико-лабораторные параметры (возраст, содержание ХС ЛПНП и мочевой кислоты), вторая – все отобранные и указанные в табл. 3 параметры, включая иммунологические показатели.

Уравнение логистической регрессии для расширенной (второй) модели с включением иммунологических показателей выглядит следующим образом:

$$y = -0,025 + 0,075 \cdot X_1 + 0,041 \cdot X_2 + 0,061 \cdot X_3 - 0,068 \cdot X_4 - 0,036 \cdot X_5 - 0,036 \cdot X_6 - 0,052 \cdot X_7 - 0,010 \cdot X_8 - 0,015 \cdot X_9.$$

Для вычисления вероятности наличия каротидных АСБ $\geq 2,5$ мм у пациента полученное значение логистической функции (y) необходимо подставить в уравнение сигмоидальной функции:

$$P(\text{АСБ} \geq 2,5 \text{ мм}) = \frac{1}{1 + e^{-y}}.$$

Таким образом, при значении вероятности более 0,500 прогнозируется неблагоприятный исход (наличие каротидных АСБ), при значении вероятности менее 0,500 – благоприятный исход (отсутствие каротидных АСБ).

Сравнительная характеристика метрик моделей бинарной классификации в зависимости от включения в нее иммунологических параметров представлена в табл. 4.

Включение выявленных иммунологических предикторов в модель привело к значимому увеличению всех стандартных метрик качества бинарной классификации. Точность модели возросла на 13 % ($p = 0,014$), чувствительность – на 20 % ($p = 0,003$), специфичность – на 6 % ($p = 0,046$), прогностическая ценность положительного результата – на 9 % ($p = 0,037$), прогностическая ценность отрицательного результата – на 16 % ($p = 0,011$).

По данным ROC-анализа (рис. 2), без включения в модель иммунологических предикторов площадь под ROC-кривой (AUC) составляла 0,765 [0,682; 0,848], включение же иммунологических предикторов приводило к статистически значимому увеличению AUC (0,906 [0,854; 0,958], $p = 0,041$).

Таблица 4

Сравнительная характеристика метрик моделей бинарной классификации

Table 4

Comparative characteristics of binary classification model metrics

Метрика бинарной классификации / Binary classification metric	Включение иммунологических предикторов / Inclusion of immunological predictors		<i>p</i>
	Нет / No	Да / Yes	
Точность, % / Accuracy, %	78 [73; 83]	91 [88; 94]	0,014
Чувствительность, % / Sensitivity, %	73 [68; 78]	93 [90; 96]	0,003
Специфичность, % / Specificity, %	82 [79; 85]	88 [85; 91]	0,046
ПЦПР, % / predictive value of a positive result, %	79 [74; 83]	88 [84; 92]	0,037
ПЦОР, % / predictive value of a negative result, %	78 [73; 83]	94 [91; 97]	0,016

Примечание. ПЦПР – прогностическая ценность положительного результата; ПЦОР – прогностическая ценность отрицательного результата.

Обсуждение

Поиск и интеграция новых биомаркеров в существующие системы оценки ССР являются перспективным направлением персонализации кардиоваскулярной профилактики [21, 22]. В настоящее время известно большое количество биомаркеров воспаления, имеющих потенциал для использования в исследованиях и клинической практике [23]. Помимо оценки сывороточных биомаркеров исследование циркулирующих клеток врожденного и адаптивного иммунитета также может служить источником дополнительной диагностической и прогностической информации [24–26].

Основным результатом представленного исследования является установление дополнительной диагностической ценности количественного определения отдельных субпопуляций нейтрофилов и моноцитов в отношении выявления прогностически неблагоприятного каротидного атеросклероза у пациентов без установленных АССЗ. Среди двадцати семи исследуемых клеточных субпопуляций нами отобраны шесть, включение которых в диагностическую модель, созданную с использованием методов машинного обучения, позволило улучшить прогнозирование наличия каротидных АСБ с максимальной высотой более 2,5 мм.

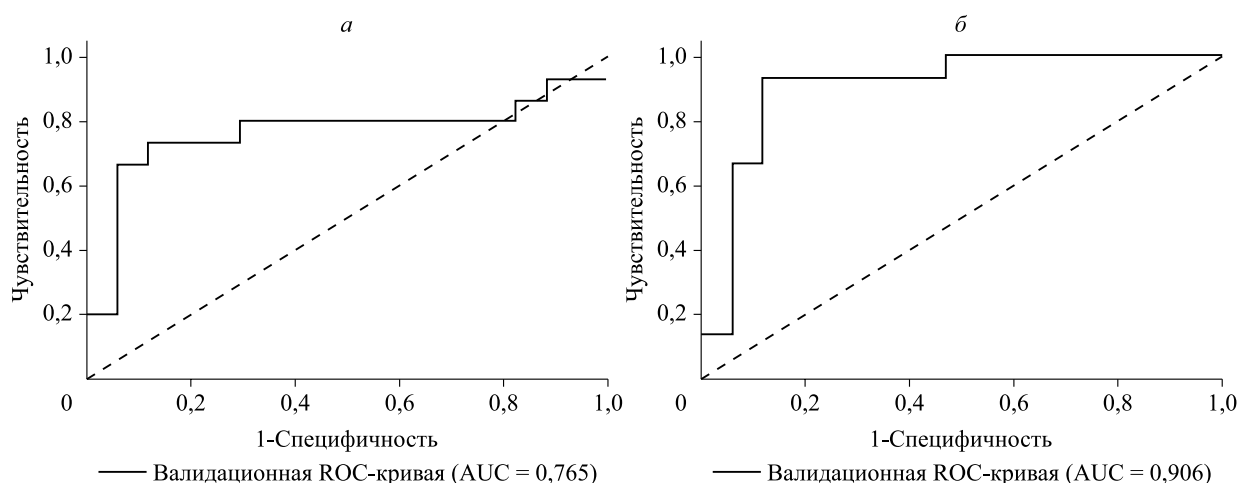


Рис. 2. ROC-кривые для моделей бинарной классификации без включения (а) и с включением (б) иммунологических предикторов

Fig. 2. ROC curves for binary classification models without inclusion of immunological predictors (a) and with inclusion of immunological predictors (b)

Ранее нами продемонстрированы независимые обратные взаимосвязи между количеством проангиогенных нейтрофилов и временем каротидного атеросклероза, оцениваемым по максимальной высоте АСБ, а также предложены потенциальные механизмы данных ассоциаций [27]. Кроме того, нами установлено, что увеличение количества иммуносупрессорных нейтрофилов ассоциируется с увеличением Т-регуляторных лимфоцитов и снижением количества циркулирующих моноцитов, экспрессирующих паттерн-распознающие рецепторы (TLR2, TLR4 и CD36) [28]. Впервые в данной работе как увеличение числа иммуносупрессорных нейтрофилов, так и снижение количества экспрессирующих TLR2, TLR4 и CD36 моноцитов позволило улучшить эффективность базовой модели диагностики каротидного атеросклероза.

В исследовании S. Gupta et al. получены данные о влиянии различных характеристик сахарного диабета на уровень экспрессии TLR моноцитами и нейтрофилами [29]. Авторами показано, что у пациентов с сахарным диабетом и хорошим контролем гликемии отмечается увеличение экспрессии TLR моноцитами, в то время как у пациентов с неудовлетворительным контролем гликемии и осложнениями сахарного диабета наблюдается снижение экспрессии TLR. Кроме того, в ряде исследований установлено, что воздействие медиаторов воспаления, факторов роста и хемокинов на моноциты могут способствовать down-регуляции TLR и CD36 [30–33]. С другой стороны, как острая воспалительная реакция (сепсис или травма), так и хроническое воспаление способствуют увеличению количества иммуносупрессорных нейтрофилов и миелоидных супрессорных клеток в системной циркуляции [34–36]. На наш взгляд, как снижение числа моноцитов, экспрессирующих PRR, так и повышение количества иммуносупрессорных нейтрофилов может отражать активацию противовоспалительных механизмов с развитием иммуносупрессии, которое в той или иной мере может наблюдаться при различных хронических воспалительных и возраст-зависимых заболеваниях и, вероятно, свидетельствует о кумулятивном бремени заболевания [37]. Оценка не только сывороточных маркеров воспаления, но и маркеров иммуносупрессии может иметь дополнительную диагностическую и прогностическую ценность у пациентов с АССЗ.

В последние годы появляется все больше данных клинических и экспериментальных исследований, демонстрирующих диагностическую и прогностическую роль новых генетических, серологических и радиологических маркеров у пациентов с АССЗ. Использование техник ма-

шинного обучения является наиболее многообещающим подходом, позволяющим интегрировать информацию, получаемую из разных источников, в единые диагностические и прогностические модели [38].

Заключение

У пациентов 40–64 лет без установленных АССЗ включение в модель иммунологических маркеров, получаемых при иммунофенотипировании лейкоцитов, позволило увеличить ее диагностическую эффективность в отношении выявления прогностически неблагоприятного каротидного атеросклероза. Диагностическую ценность продемонстрировали субпопуляции моноцитов, экспрессирующих TLR2, TLR4 и CD36, а также иммуносупрессорные и проангиогенные нейтрофилы.

Список литературы / References

1. Virani S.S., Alonso A., Aparicio H.J., Benjamin E.J., Bittencourt M.S., Callaway C.W., Carson A.P., Chamberlain A.M., Cheng S., Delling F.N., Elkind M.S.V., Evenson K.R., Ferguson J.F., Gupta D.K., Khan S.S., Kissela B.M., Knutson K.L., Lee C.D., Lewis T.T., Liu J., Loop M.S., Lutsey P.L., Ma J., Mackey J., Martin S.S., Matchar D.B., Mussolino M.E., Naveethan S.D., Perak A.M., Roth G.A., Samad Z., Satou G.M., Schroeder E.B., Shah S.H., Shay C.M., Stokes A., VanWagner L.B., Wang N.Y., Tsao C.W., American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2021 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 2021; 143 (8): e254–e743. doi: 10.1161/CIR.0000000000000950
2. Wu W.Y., Berman A.N., Biery D.W., Blankstein R. Recent trends in acute myocardial infarction among the young. *Curr. Opin. Cardiol.*, 2020; 35 (5): 524–530. doi: 10.1097/HCO.0000000000000781
3. Garg N., Muduli S.K., Kapoor A., Tewari S., Kumar S., Khanna R., Goel P.K. Comparison of different cardiovascular risk score calculators for cardiovascular risk prediction and guideline recommended statin uses. *Indian Heart J.*, 2017; 69 (4): 458–463. doi: 10.1016/j.ihj.2017.01.015
4. Martins A.M.A., Paiva M.U.B., Paiva D.V.N., de Oliveira R.M., Machado H.L., Alves L.J.S.R., Picosi C.R.C., Faccio A.T., Tavares M.F.M., Barbas C., Giraldez V.Z.R., Santos R.D., Monte G.U., Atik F.A. Innovative Approaches to Assess Intermediate Cardiovascular Risk Subjects: A Review From Clinical to Metabolomics Strategies. *Front. Cardiovasc. Med.*, 2021; 8: 788062. doi: 10.3389/fcvm.2021.788062
5. Klesareva E.A., Afanasieva O.I., Sherstyuk E.E., Tmoyan N.A., Razova O.A., Tyurina A.V., Afanasieva M.I., Ezhov M.V., Pokrovsky S.N. The relationship between the level of Lp(a) and the prevalence of atherosclerosis among young patients. *Terapevticheskiy arkhiv (Ter. arkh.)*, 2022; 94 (4): 479–484.

- (In Russ.) Клесарева Е.А., Афанасьева О.И., Шерстюк Е.Е., Тмоян Н.А., Разова О.А., Тюрина А.В., Афанасьева М.И., Ежов М.В., Покровский С.Н. Гиперлипидемия (а) и повышенный уровень С-реактивного белка как факторы риска стенозирующего мультифокального атеросклероза у пациентов молодого и среднего возраста. *Терапевт. арх.*, 2022; 4 (94): 479–484. doi: 10.26442/00403660.2022.04.201454
6. Hoogeveen R.M., Pereira J.P.B., Nurmohamed N.S., Zampoleri V., Bom M.J., Baragetti A., Boekholdt S.M., Knaapen P., Khaw K.T., Wareham N.J., Groen A.K., Catapano A.L., Koenig W., Levin E., Stroes E.S.G. Improved cardiovascular risk prediction using targeted plasma proteomics in primary prevention. *Eur. Heart. J.*, 2020; 41 (41): 3998–4007. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa648
 7. Vaes B., Indestege P., Serneels T., Hegendörfer E., van Peet P.G., Poortvliet R.K.E., Wallemacq P., Gussekloo J., Degryse J. Biomarkers versus traditional risk factors to predict cardiovascular events in very old adults: cross-validated prospective cohort study. *BMJ Open*, 2020; 10 (6): e035809. doi: 10.1136/bmjopen-2019-035809
 8. Kurilova O.V., Kiseleva A.V., Meshkov A.N., Sotnikova E.A., Ershova A.I., Ivanova A.A., Limonova A.S., Drapkina O.M. Scales for assessing the genetic risk of developing type 2 diabetes mellitus. *Профилактическая медицина*. 2021; 24 (12): 115–122. (In Russ.) Курилова О.В., Киселева А.В., Мешков А.Н., Сотникова Е.А., Ершова А.И., Иванова А.А., Лимонова А.С., Драпкина О.М. Шкалы для оценки генетического риска развития сахарного диабета 2-го типа. *Профилактическая медицина*, 2021; 24 (12): 115–122. doi: 10.17116/profmed202124121115
 9. Libby P. Inflammation in atherosclerosis – no longer a theory. *Clin. Chem.*, 2021; 67 (1): 131–142. doi: 10.1093/clinchem/hvaa275
 10. Reddy A.S., Uceda D.E., Al Najafi M., Dey A.K., Mehta N.N. PET Scan with Fludeoxyglucose/Computed Tomography in Low-Grade Vascular Inflammation. *PET Clin.*, 2020; 15 (2): 207–213. doi: 10.1016/j.cpet.2019.11.009
 11. Hong L.Z., Xue Q., Shao H. Inflammatory Markers Related to Innate and Adaptive Immunity in Atherosclerosis: Implications for Disease Prediction and Prospective Therapeutics. *J. Inflamm. Res.*, 2021; 14: 379–392. doi: 10.2147/JIR.S294809
 12. Björkegren J.L.M., Lusis A.J. Atherosclerosis: Recent developments. *Cell.*, 2022; 185 (10): 1630–1645. doi: 10.1016/j.cell.2022.04.004
 13. Li H., Zhang P., Yuan S., Tian H., Tian D., Liu M. Modeling analysis of the relationship between atherosclerosis and related inflammatory factors. *Saudi J. Biol. Sci.*, 2017; 24 (8): 1803–1809. doi: 10.1016/j.sjbs.2017.11.016
 14. Wainstein M.V., Mossmann M., Araujo G.N., Gonçalves S.C., Gravina G.L., Sangalli M., Veadrigo F., Matte R., Reich R., Costa F.G., Andrades M., da Silva A.M.V., Bertoluci M.C. Elevated serum interleukin-6 is predictive of coronary artery disease in intermediate risk overweight patients referred for coronary angiography. *Diabetol. Metab. Syndr.*, 2017; 9: 67. doi: 10.1186/s13098-017-0266-5
 15. Stakhneva E.M., Ragino Yu.I. Modern methods for studying atherosclerosis and coronary artery disease: flow cytometry. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2021; 20 (2): 184–190. (In Russ.) Стахнёва Е.М., Рагино Ю.И. Современные методы исследования атеросклероза и ишемической болезни сердца: проточная цитометрия. *Бюл. сиб. медицины*. 2021; 20 (2): 184–190. doi: 10.20538/1682-0363-2021-2-184-190
 16. Baumer Y., Gutierrez-Huerta C.A., Saxena A., Dagur P.K., Langerman S.D., Tamura K., Ceasar J.N., Andrews M.R., Mitchell V., Collins B.S., Yu Q., Teague H.L., Playford M.P., Bleck C.K.E., Mehta N.N., McCoy J.P., Powell-Wiley T.M. Immune cell phenotyping in low blood volumes for assessment of cardiovascular disease risk, development, and progression: a pilot study. *J. Transl. Med.*, 2020; 18 (1): 29. doi: 10.1186/s12967-020-02207-0
 17. Kaledina E.A., Kaledin O.E., Kulyagina T.I. Applying machine learning for prediction of cardiovascular diseases on small data sets. *Problems of Informatics*, 2022; 1 (54): 66–75. (In Russ.) Каледина Е.А., Каледин О.Е., Кулягина Т.И. Применение методов машинного обучения для предсказания сердечно-сосудистых заболеваний на малых наборах данных. *Проблемы информатики*, 2022; 1 (54): 66–75. doi: 10.24412/2073-0667-2022-1-66-76
 18. Sánchez-Cabo F., Rossello X., Fuster V., Benito F., Manzano J.P., Silla J.C., Fernández-Alvira J.M., Oliva B., Fernández-Friera L., López-Melgar B., Mendiguren J.M., Sanz J., Ordovás J.M., Andrés V., Fernández-Ortiz A., Bueno H., Ibáñez B., García-Ruiz J.M., Lara-Pezzi E. Machine Learning Improves Cardiovascular Risk Definition for Young, Asymptomatic Individuals. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2020; 76 (14): 1674–1685. doi: 10.1016/j.jacc.2020.08.017
 19. Genkel V.V., Kuznetsova A.S., Lebedev E.V., Shaposhnik I.I. Factors associated with the presence of prognostically unfavorable carotid atherosclerosis in men and women over age 40. *Atherosclerosis and Dyslipidemia*, 2021; 4 (45): 33–40. (In Russ.) Генкель В.В., Кузнецова А.С., Лебедев Е.В., Шапошник И.И. Факторы, связанные с наличием прогностически неблагоприятного каротидного атеросклероза у мужчин и женщин старше 40 лет. *Атеросклероз и дислипидемии*, 2021; 4 (45): 33–40. doi: 10.34687/2219-8202.JAD.2021.04.0004
 20. Johri A.M., Nambi V., Naqvi T.Z., Feinstein S.B., Kim E.S.H., Park M.M., Becher H., Sillesen H. Recommendations for the Assessment of Carotid Arterial Plaque by Ultrasound for the Characterization of Atherosclerosis and Evaluation of Cardiovascular Risk: From the American Society of Echocardiography. *J. Am. Soc. Echocardiogr.*, 2020; 33 (8): 917–933. doi: 10.1016/j.echo.2020.04.021
 21. Vassalle C. New biomarkers and traditional cardiovascular risk scores: any crystal ball for current effective advice and future exact prediction? *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2018; 56 (11): 1803–1805. doi: 10.1515/cclm-2018-0490
 22. Stakhneva E.M., Striukova E.V., Ragino Y.I. Proteomic Studies of Blood and Vascular Wall in Atherosclerosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021; 22 (24): 13267. doi: 10.3390/ijms222413267

23. Bargiel W., Cierpiszewska K., Maruszczak K., Pakula A., Szwanowska D., Wrzesinska A., Gutowski L., Formanowicz D. Recognized and Potentially New Biomarkers-Their Role in Diagnosis and Prognosis of Cardiovascular Disease. *Medicina (Kaunas)*, 2021; 57 (7): 701. doi: 10.3390/medicina57070701
24. Fani L., van der Willik K.D., Bos D., Leening M.J.G., Koudstaal P.J., Rizopoulos D., Ruiter R., Stricker B.H.C., Kavousi M., Ikram M.A., Ikram M.K. The association of innate and adaptive immunity, subclinical atherosclerosis, and cardiovascular disease in the Rotterdam Study: A prospective cohort study. *PLoS Med.*, 2020; 17 (5): e1003115. doi: 10.1371/journal.pmed.1003115
25. Hong L.Z., Xue Q., Shao H. Inflammatory Markers Related to Innate and Adaptive Immunity in Atherosclerosis: Implications for Disease Prediction and Prospective Therapeutics. *J. Inflamm. Res.*, 2021; 14: 379–392. doi: 10.2147/JIR.S294809
26. Feinstein M.J., Buzkova P., Olson N.C., Doyle M.F., Sitlani C.M., Fohner A.E., Huber S.A., Floyd J., Sinha A., Thorp E.B., Landay A., Freiberg M.S., Longstreth W.T.Jr., Tracy R.P., Psaty B.M., Delaney J.A. Monocyte subsets, T cell activation profiles, and stroke in men and women: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis and Cardiovascular Health Study. *Atherosclerosis*, 2022; 351: 18–25. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2022.05.007
27. Genkel V., Dolgushin I., Baturina I., Savochkina A., Nikushkina K., Minasova A., Kuznetsova A., Shaposhnik I. Associations between Circulating VEGFR2hi-Neutrophils and Carotid Plaque Burden in Patients Aged 40–64 without Established Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *J. Immunol. Res.*, 2022; 2022: 1539935. doi: 10.1155/2022/1539935
- Dolgushin I.I., Genkel V.V., Baturina I.L., Savochkina A.Yu., Minasova A.A., Nikushkina K.V., Pykhova L.R., Kuznetsova A.S., Shaposhnik I.I. Interactions between immunosuppressor neutrophils, innate and adaptive immunity indexes in the patients with subclinical atherosclerosis. *Medical Immunology (Russia)*, 2022; 24 (2): 283–294. (In Russ.) Долгушин И.И., Генкель В.В., Батурина И.Л., Савочкина А.Ю., Минасова А.А., Никушкина К.В., Пыхова Л.Р., Кузнецова А.С., Шапошник И.И. Взаимосвязи иммуносупрессорных нейтрофилов и показателей врожденного и адаптивного иммунитета у пациентов с субклиническим атеросклерозом. *Мед. иммунология*, 2022; 24 (2): 283–294. doi: 10.15789/1563-0625-IBI-2463
29. Gupta S., Maratha A., Siednienko J., Natarajan A., Gajanayake T., Hoashi S., Miggin S. Analysis of inflammatory cytokine and TLR expression levels in Type 2 Diabetes with complications. *Sci. Rep.*, 2017; 7 (1): 7633. doi: 10.1038/s41598-017-07230-8
30. Sadeghi K., Wisgrill L., Wessely I., Diesner S.C., Schüller S., Dürr C., Heinle A., Sachet M., Pollak A., Förster-Waldl E., Spittler A. GM-CSF Down-Regulates TLR Expression via the Transcription Factor PU.1 in Human Monocytes. *PLoS One.*, 2016; 11 (10): e0162667. doi: 10.1371/journal.pone.0162667
31. Zamora C., Cantó E., Nieto J.C., Angels Ortiz M., Juárez C., Vidal S. Functional consequences of CD36 downregulation by TLR signals. *Cytokine*, 2012; 60 (1): 257–265. doi: 10.1016/j.cyt.2012.06.020
32. Gazatova N.D., Menailo M.E., Malashchenko V.V., Goncharov A.G., Melashchenko O.B., Morozova E.M., Seledtsov V.I. Direct effects of gm-csf on the functions of human monocytes/macrophages. *Medical Immunology (Russia)*, 2019; 21 (3): 419–426. (In Russ.) Газатова Н.Д., Меняйло М.Е., Малашенко В.В., Гончаров А.Г., Мелашенко О.Б., Морозова Е.М., Селедцов В.И. Прямые эффекты гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора на функциональные свойства моноцитов/макрофагов человека. *Мед. иммунология*, 2019; 21 (3): 419–426. doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-419-426
33. Boyer J.F., Balard P., Authier H., Faucon B., Bernad J., Mazières B., Davignon J.L., Cantagrel A., Pipy B., Constantin A. Tumor necrosis factor alpha and adalimumab differentially regulate CD36 expression in human monocytes. *Arthritis Res. Ther.*, 2007; 9 (2): R22. doi: 10.1186/ar2133
34. Herrero-Cervera A., Soehnlein O., Kenne E. Neutrophils in chronic inflammatory diseases. *Cell. Mol. Immunol.*, 2022; 19 (2): 177–191. doi: 10.1038/s41423-021-00832-3
35. Qi X., Yu Y., Sun R., Huang J., Liu L., Yang Y., Rui T., Sun B. Identification and characterization of neutrophil heterogeneity in sepsis. *Crit. Care.*, 2021; 25 (1): 50. doi: 10.1186/s13054-021-03481-0
36. Filep J.G. Targeting Neutrophils for Promoting the Resolution of Inflammation. *Front. Immunol.*, 2022; 13: 866747. doi: 10.3389/fimmu.2022.866747
37. Salminen A. Increased immunosuppression impairs tissue homeostasis with aging and age-related diseases. *J. Mol. Med. (Berl.)*, 2021; 99 (1): 1–20. doi: 10.1007/s00109-020-01988-7
38. Williams M.C., Newby D.E. Machine learning to predict cardiac events in asymptomatic individuals. *Atherosclerosis*, 2021; 318: 38–39. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.12.006

Сведения об авторах:

Вадим Викторович Генкель, канд. мед. наук, доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней, Челябинск, Россия, <http://orcid.org/0000-0001-5902-3803>, e-mail: henkel-07@mail.ru

Илья Ильич Долгушин, д-р мед. наук, проф., заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, президент ФГБОУ ВО ЮУГМУ МЗ РФ, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии, директор НИИ иммунологии, Челябинск, Россия, <http://orcid.org/0000-0002-0901-8042>, e-mail: dol-ii@mail.ru

Павел Андреевич Астанин, ассистент кафедры медицинской кибернетики и информатики, Москва, Россия, <http://orcid.org/0000-0002-1854-8686>, e-mail: med_cyber@mail.ru

Альбина Юрьевна Савочкина, д-р мед. наук, проф. кафедры клинической лабораторной диагностики, главный научный сотрудник НИИ иммунологии, Челябинск, Россия, <http://orcid.org/0000-0002-0536-0924>, e-mail: alina7423@mail.ru

Ирина Леонидовна Батурина, канд. мед. наук, старший научный сотрудник НИИ иммунологии, Челябинск, Россия, <http://orcid.org/0000-0002-5960-4189>, e-mail: irisha_baturina@mail.ru

Карина Викторовна Никушкина, канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник НИИ иммунологии, Челябинск, Россия, <http://orcid.org/0000-0002-3900-9278>, e-mail: knikushkina81@gmail.com

Анна Александровна Минасова, канд. биол. наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии, Челябинск, Россия, <http://orcid.org/0000-0002-9084-0577>, e-mail: pandora_anna@mail.ru

Вероника Андреевна Сумеркина, канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник ЦНИЛ, начальник отдела научной работы, Челябинск, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4842-0875>, e-mail: veronika.sumerkina@mail.ru

Любовь Романовна Пыхова, старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии, Челябинск, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0658-7626>, e-mail: lyubov_pykhova@mail.ru

Алла Сергеевна Кузнецова, канд. мед. наук, доцент кафедры госпитальной терапии, Челябинск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0357-5702>, e-mail: alla.kusnezowa@googlemail.com

Игорь Иосифович Шапошник, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой пропедевтики внутренних болезней, Челябинск, Россия, <http://orcid.org/0000-0002-7731-7730>, e-mail: shaposhnik@yandex.ru

Information about the authors:

Vadim V. Genkel, candidate of medical sciences, associate professor, assistant of the department of propaedeutics of internal medicine, Chelyabinsk, Russia, <http://orcid.org/0000-0001-5902-3803>, e-mail: henkel-07@mail.ru

Ilya I. Dolgushin, doctor of medical sciences, professor, member of the Russian Academy of Sciences, President of South-Ural State Medical University, head of the department of microbiology, virology, immunology, Chelyabinsk, Russia, <http://orcid.org/0000-0002-0901-8042>, e-mail: dol-ii@mail.ru

Pavel A. Astanin, assistant of the department of medical cybernetics and informatics, Moscow, Russia, <http://orcid.org/0000-0002-1854-8686>, e-mail: med_cyber@mail.ru

Albina Yu. Savochkina, doctor of medical sciences, professor of department of clinical laboratory diagnostics, principal researcher of Research Institution of Immunology, South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia, <http://orcid.org/0000-0002-0536-0924>, e-mail: alina7423@mail.ru

Irina L. Baturina, candidate of medical sciences, senior researcher of Research Institution of Immunology, Chelyabinsk, Russia, <http://orcid.org/0000-0002-5960-4189>, e-mail: irisha_baturina@mail.ru

Karina V. Nikushkina, candidate of medical sciences, leading researcher of Research Institution of Immunology, Chelyabinsk, Russia, <http://orcid.org/0000-0002-3900-9278>, e-mail: knikushkina81@gmail.com

Anna A. Minasova, candidate of medical sciences, associate professor, department of microbiology, virology, immunology, Chelyabinsk, Russia, <http://orcid.org/0000-0002-9084-0577>, e-mail: pandora_anna@mail.ru

Veronika A. Sumerkina, candidate of medical sciences, leading researcher of Research Institution of Immunology, Chelyabinsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4842-0875>, e-mail: veronika.sumerkina@mail.ru

Lyubov R. Pykhova, senior lecturer of department of microbiology, virology, immunology, Chelyabinsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0658-7626>, e-mail: lyubov_pykhova@mail.ru

Alla S. Kuznetsova, candidate of medical sciences, assistant of the department of clinical therapy, Chelyabinsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0357-5702>, e-mail: alla.kusnezowa@googlemail.com

Igor I. Shaposhnik, doctor of medical sciences, professor, head of the department of propaedeutics of internal medicine, Chelyabinsk, Russia, <http://orcid.org/0000-0002-7731-7730>, e-mail: shaposhnik@yandex.ru

Статья поступила 10.07.2022
После доработки 29.07.2022
Принята к печати 10.08.2022

Received 10.07.2022
Revision received 29.07.2022
Accepted 10.08.2022

