

На правах рукописи

Домбровский Андрей Леонидович

Влияние терапии статинами в разных дозах на эндотелиальные прогениторные клетки и факторы ангиогенеза у больных ИБС

14.01.05 – «Кардиология»

Автореферат диссертации
на соискание учёной степени кандидата медицинских наук

Москва 2015 г.

Работа выполнена: в отделе проблем атеросклероза и в отделе нейрогуморальных и иммунологических исследований Института клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» МЗ РФ.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук Сергиенко Игорь Владимирович

Научный консультант:

кандидат медицинских наук Рвачева Анна Валерьевна

Официальные оппоненты:

Гиляревский Сергей Руджерович, д.м.н., профессор кафедры клинической фармакологии и терапии Российской Медицинской Академии Последипломного Образования МЗ РФ

Арабидзе Григорий Гурамович, д.м.н., профессор кафедры госпитальной терапии №2 Московского Государственного Медико-стоматологического Университета им А.И. Евдокимова

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины» СО РАМН

Защита состоится «18» февраля 2016 г. на заседании диссертационного совета Д 208.073.04 по присуждению ученой степени кандидата медицинских наук в ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» МЗ РФ (121552 Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «РНКПК» МЗ РФ

Автореферат разослан _____

Ученый секретарь диссертационного совета

кандидат медицинских наук

Сорокин Евгений Владимирович

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. В 1997 году в работе Asahara et al. было показано, что некоторые клетки, выделенные из костного мозга, могут быть использованы для репарации эндотелия сосудов и восстановления кровоснабжения в ишемизированных тканях. С этого момента было выполнено множество экспериментальных работ, доказавших, что эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК) оказывают влияние на ишемические процессы (Higashi Y. et al., 2004; Kalka C. et al., 2000).

Тем не менее, эти многообещающие данные не вполне подтвердились с дальнейшими клиническими исследованиями. Несмотря на то, что низкий уровень циркулирующих ЭПК признается независимым фактором риска сердечно-сосудистых осложнений, что может отражать недостаточность репарации эндотелия (Schmidt-Lucke et al., 2005), механизмы участия ростовых факторов и ЭПК в восстановлении поврежденных тканей и формировании новых сосудов не вполне изучены до сих пор. Кроме того, прогениторные клетки могут оказывать и деструктивные эффекты – потенцировать атеросклеротические процессы, оказывать влияние на дестабилизацию бляшки и ремоделирование артерий. Несмотря на выявление множества различных классов ЭПК, из них не вполне определены пригодные терапевтически фенотипы, способные дифференцироваться исключительно в эндотелиальные клетки (Werner et al., 2006). Так, все гематопозитические стволовые клетки являются носителями маркеров CD34+ и CD133+, при этом на поверхности ЭПК экспрессируются и эндотелиальные маркеры, такие как рецептор-2 сосудистого эндотелиального фактора роста VEGFR-2 (CD309), а также CD31, эндотелиальная синтаза оксида азота (NO) и сосудистый эндотелиальный кадгерин (Yoder et al., 2009). В эндотелиальные клетки могут дифференцироваться как менее зрелые предшественники (фенотипа CD133+/CD34+/CD309-), так и более зрелые. Все же многие авторы сходятся во мнении, что к ЭПК следует относить разные субпопуляции клеток-предшественников, в основном коэкспрессирующие указанные три маркера в различных сочетаниях: CD133+/CD34+, CD133+/CD309+, CD34+/CD309+, CD133+/CD34+/CD309+ (Friedrich et al., 2006). Ввиду такого разнообразия классов ЭПК, в настоящее время имеется несколько наборов для выявления различных их фенотипов, что приводит к ситуации, когда культуры в разных условиях продуцируют разные сочетания фенотипов ЭПК, в частности, “ранних” (недифференцированных) и “поздних” клеток.

Среди факторов, способствующих повышению плазменного титра ЭПК и привлечению их в область повреждения, следует упомянуть оксид азота, эстрогены, липопротеины высокой плотности (ЛВП), эритропоэтин, а также группу сосудистых эндотелиальных факторов роста (VEGF) (Zhang et al., 2010; Сергиенко и соавт., 2009). VEGF оказывают множество эффектов на эндотелиальные клетки, связанные с ангиогенезом: повышенную миграцию, увеличение выживаемости клеток, продукцию активаторов плазминогена и интерстициальных коллагеназ (Rissanen et al., 2003).

Важным направляющим сигналом для ЭПК при мобилизации в зону повреждения является стромальный хемокин SDF-1. Другой хемокин – моноцитарный хемотаксический протеин-1 (MCP-1), повышает приток мононуклеарных клеток, также стимулируя ангиогенез. MCP-1, из-за его направленной клеточной специфичности, играет патогенную роль при множестве различных заболеваний, характеризующихся инфильтрацией мононуклеарных клеток, включая атеросклероз и ревматоидный артрит. Повышенные уровни MCP-1 были выявлены в связи с ишемией миокарда (Lin et al., 2014).

К факторам, ингибирующим ангиогенез, относятся тромбоспондин, ангиостатин и эндостатин. В частности, эндостатин ингибирует пролиферацию эндотелиальных клеток, соответственно подавляя ангиогенез и рост опухолей (Fu et al., 2008).

Помимо собственно терапии с помощью ЭПК, существует и другой подход, связанный с попыткой активации пролиферации собственных ЭПК, увеличения их выживаемости и активности в зоне повреждения с помощью медикаментозной терапии, в том числе статинами. Так, в некоторых исследованиях показано, что статины оказывают положительные эффекты на стволовые клетки, снижая уровень их апоптоза и увеличивая способность к регенерации ишемизированных тканей (Mangialardi et al., 2011). В связи с этим, представляется актуальным изучить влияние терапии разными дозами статинов на содержание эндотелиальных прогениторных клеток, и соотнести полученные изменения с динамикой факторов ангиогенеза и показателями липидного профиля.

Цель исследования: Определить содержание эндотелиальных прогениторных клеток (endothelial progenitor cells, ЭПК) и ростовых факторов у больных ИБС и оценить влияние на них терапии аторвастатином в дозе 10 и 40 мг.

Задачи исследования:

1. Сопоставить содержание ЭПК, сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), эндостатина и MCP-1 в крови у больных ИБС и здоровых добровольцев
2. Оценить связь ЭПК, VEGF, эндостатина и MCP-1 с факторами риска у больных ИБС
3. Сопоставить содержание ЭПК с показателями липидного профиля, концентрацией VEGF, эндостатина, MCP-1 и СРБ в крови у больных ИБС
4. Оценить влияние терапии аторвастатином в дозе 10 мг/сут и 40 мг/сут на уровень ЭПК
5. Оценить влияние терапии аторвастатином в дозе 10 мг/сут и 40 мг/сут на уровень факторов ангиогенеза
6. Сопоставить динамику ЭПК с динамикой показателей липидного профиля у больных ИБС на фоне терапии аторвастатином

Научная новизна:

На фоне терапии аторвастатином было выявлено достоверное увеличение числа ЭПК. Такая достоверность прослеживалась как в группе аторвастатина 10 мг/сут, так и в группе аторвастатина 40 мг в сутки. То есть, доза статина не оказывала влияние на выраженность прироста количества ЭПК. Показано, что чем ниже были исходные значения ЭПК у пациентов перед началом терапии статином, тем более значительный их прирост наблюдался на фоне терапии.

Практическая значимость работы:

Продемонстрированное в работе дозозависимое влияние терапии аторвастатином на уровень ЭПК открывает еще один механизм действия данных препаратов, что может быть использовано для дальнейших исследований в области плейотропного действия статинов. Это имеет важное практическое значение в вопросах выбора моно- или комбинированной гиполипидемической терапии. Поскольку восстановление количества ЭПК у больных с ИБС реализуется вне зависимости от дозы статина, то при выборе терапевтической тактики не имеет смысла отдавать предпочтение использованию высоких доз статинов перед умеренными дозами в комбинации с блокаторами всасывания холестерина или в комбинации с другими перспективными гиполипидемическими препаратами, появление которых в Российской Федерации ожидается в 2016 г (антитела к пропротеинсубтилизин-кексинкиназе 9).

Апробация состоялась 01 июля 2015 года на межотделенческой конференции НИИ клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ «РКНПК» МЗ РФ.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК. Основные положения диссертации были изложены на конгрессе Европейского общества атеросклероза (EAS 2014, Мадрид).

Объем и структура. Диссертация состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материал и методы, результаты, обсуждение), выводов и списка литературы, включающего в себя 236 источников. Диссертация изложена на 104 стр., содержит 1 схему, 9 таблиц и 18 рисунков.

Материал и методы.

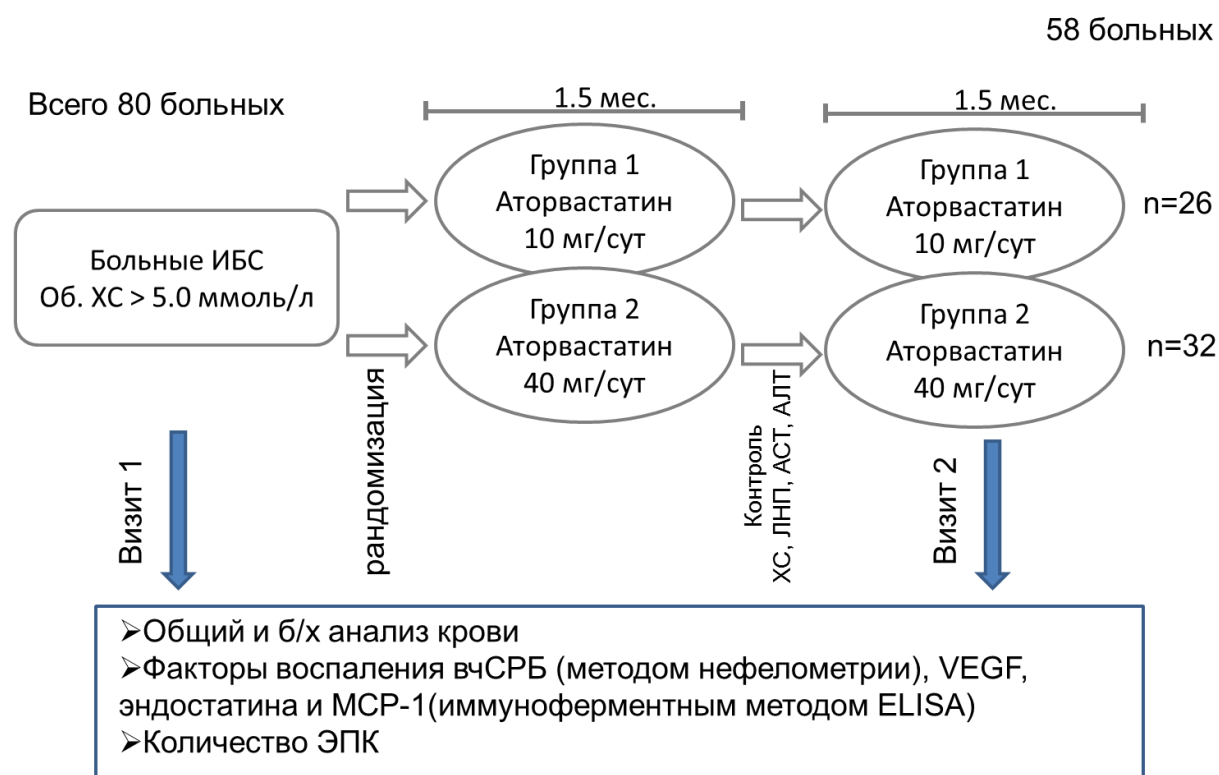
В исследование было включено 80 больных ИБС старше 18 лет, имеющих показания для приема статинов. Исключались пациенты с ОКС или ИМ менее чем 6-месячной давности, гемодинамически значимыми пороками сердца, недостаточностью кровообращения III-IV класса по NYHA, инфекционными

заболеваниями, повышением уровня трансаминаз > 2 верхней границы нормы, а также пациенты после предшествующей (менее 6 месяцев назад) терапии статинами.

Группу контроля составили 15 добровольцев без клинических проявлений атеросклероза, нарушений углеводного обмена, аутоиммунных и острых воспалительных заболеваний, без онкологических и других соматических заболеваний, без гипертонической болезни и гиперлипидемии.

Включённые в работы пациенты с ИБС были методом конвертов рандомизированы на 2 группы – группу пациентов, принимающих аторвастатин в дозе 10 мг в сутки – группа 1 и группу пациентов, принимающих аторвастатин в дозе 40 мг в сутки – группа 2. Через 1,5 месяца после начала терапии в соответствии с Российскими рекомендациями по ведению пациентов с нарушением липидного обмена (2012 г.) было проведено промежуточное обследование с целью предварительной оценки эффекта терапии. По результатам лабораторных данных 12 пациентам из группы 1 и 6 из группы 2 доза статина была увеличена, а 4 пациентам из группы 2 – уменьшена, эти 22 пациента были исключены из анализа. Пациенты были исключены из работы, так как оценивать у них динамику количества ЭПК и факторов ангиогенеза было бы некорректно, учитывая изменение дозы статина. Дизайн исследования представлен на схеме 1.

Схема 1. Дизайн исследования



Таким образом, основную группу составили 58 пациентов: 26 в группе 1, 32 в группе 2. Клинические характеристики пациентов основной группы, группы 1

(принимавших аторвастатин в дозе 10 мг/сут) и группы 2 (принимавших аторвастатин в дозе 40 мг/сут), а также контрольной группы приведены в таблице 1. В подгруппах 1 и 2 анализировалась частота приема следующих препаратов: аспирин, β -блокаторы, антагонисты кальция, нитраты, ингибиторы АПФ и диуретики, значимых различий в частоте приема каждой из указанных групп препаратов в подгруппах не выявлено ($p>0.3$).

Таблица 1. Клиническая характеристика групп больных ИБС и контрольной группы.

	ИБС (n=58)			Контроль (n=15)	p
	Группа 1 (10 мг, n=26)	Группа 2 (40 мг, n=32)	p		
Мужчины	22 (38%)			7 (47%)	н.д.**
	12 (46%)	10 (31%)	н.д.**		
Возраст, лет	66 (55-70)			59 (42-66)	н.д.*
	61(54-69)	67(60-72)	н.д.*		
ИМТ, кг/м ²	29.0 (26.4-32.0)			23.7 (23.1-24.8)	<0.01*
	28.4 (26.0-31.5)	29.4 (26.7-32.3)	н.д.*		
Обхват талии, см	97 (92-104)			76 (70-82)	<0.01*
	97 (87-107)	97 (92-103)	н.д.*		
САД, мм рт. ст.	130 (120-140)			120 (120-125)	н.д.*
	123 (120-130)	130 (120-143)	0.03*		
ДАД, мм рт. ст.	80 (70-80)			70 (65-70)	0.012*
	73 (70-80)	80 (70-90)	0.02*		
ЧСС, уд/мин	68 (66-72)			67 (64-70)	н.д.*
	68 (66-70)	70 (66-74)	н.д.*		
Отяг. сем.анамнез	42 (72%)			1 (7%)	<0.01**
	19 (73%)	23 (72%)	н.д.**		
Курение	10 (17%)			1 (7%)	н.д.**
	7 (27%)	3 (9%)	н.д.**		
АГ	47 (81%)			0 (0%)	<0.01**
	20 (77%)	27 (84%)	н.д.**		
СД	6 (10%)			0 (0%)	н.д.**
	1 (4%)	5 (16%)	н.д.**		

ИМ	7 (12%)			0 (0%)	н.д.**
	4 (15%)	3 (9%)	н.д.**		
Терапия					
аспирин	26 (100%)	32 (100%)	н.д.**		
β-блокаторы	16 (62%)	18 (56%)	н.д.**		
антаг. кальция	6 (23%)	4 (13%)	н.д.**		
нитраты	4 (15%)	3 (9%)	н.д.**		
ингиб. АПФ	18 (69%)	18 (56%)	н.д.**		
диуретики	4 (15%)	3 (9%)	н.д.**		

* тест Манна-Уитни, ** точный тест Фишера, н.д. – недостоверно

Как видно из таблицы, в исследование включено больше женщин. Группы 1 и 2 значительно не различались по возрасту, факторам риска и принимаемой терапии.

Диагноз ИБС ставился на основании наличия одного из трёх критериев:

1. Перенесённый инфаркт миокарда.
2. Выявленная ишемия миокарда по данным нагрузочного теста – тредмил-тест или велоэргометрия.
3. Атеросклеротическое поражение коронарных артерий с наличием одного или более стеноза > 70%.

У 12 (21%) пациентов имелась стенокардия I функционального класса (ФК), у 32 (55) – 2 ФК, у 14 (24) – 3 ФК. Пациенты со стенокардией 4 ФК в исследование не включены.

Инструментальные исследования выполнены в Городской поликлинике № 131 Департамента здравоохранения города Москвы, лабораторные, включая измерение количества ЭПК в ФГБУ «РКНПК» МЗ РФ.

Методы исследования

Всем пациентам проводилось стандартное клиничко-лабораторное и инструментальное обследование. Забор крови в объеме 50 мл проводился натощак из кубитальной вены. До забора крови не разрешалось курение, приём короткодействующих нитратов, исключалась физическая активность. 10 мл крови отправляли в биохимическую лабораторию для проведения общего и биохимического анализа (липидный спектр, уровень глюкозы, СОЭ). 20 мл инкубировалось 5-10 мин при комнатной температуре, центрифугировалось в течение 20 мин при 1500 об/мин. После этого образцы хранились при температуре -70°C для последующего определения VEGF, эндостатина и MCP-1.

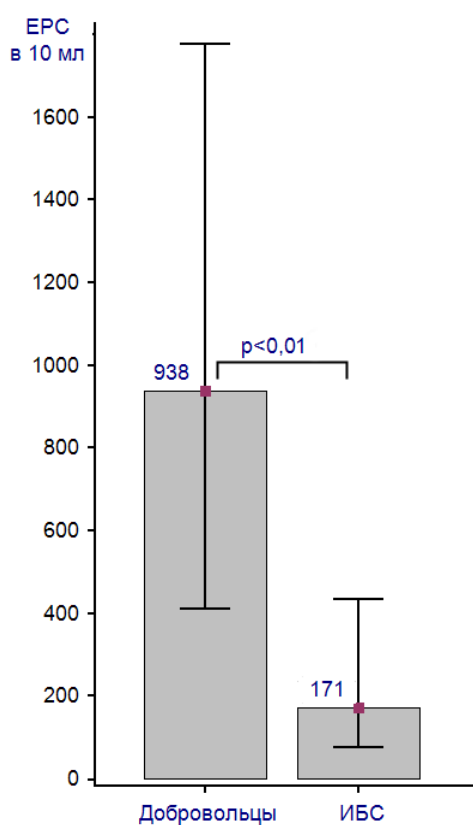
Определение уровня ЭПК. Ключевым анализом в работе было определение циркулирующих ЭПК в цельной крови, для чего использовали 20 мл крови с EDTA. Клетки были выделены методом магнитной сепарации. Основным критерием отбора ЭПК из общего пула лейкоцитов была одновременная экспрессия ими маркеров CD34, CD133 и CD309, таким образом, отбирались “молодые” ЭПК. Число ЭПК фенотипа CD34+/CD133+/CD309+(VEGFR-2+) измеряли в тестовом образце цельной крови объемом 10 мл, с помощью набора от Miltenyi Biotec GmbH с использованием технологии MACS, методом проточной цитофлуориметрии (Cytomics FC500, Beckman Coulter). Еще 10 мл крови использовалось в качестве контрольного образца CD309. Все измерения проводили двукратно – до начала терапии и через 3 месяца. У добровольцев указанные анализы проводились однократно.

Статистический анализ. Ввиду отсутствия нормального распределения (по критерию Шапиро-Уилка) в большинстве сравниваемых групп, данные, если не оговорено особо, анализировались непараметрическими методами: средние представлены в виде “медиана (межквартильный размах)”, корреляционный анализ проводился по Спирмену, сравнение медиан независимых групп – по Манну-Уитни, зависимых – по Уилкоксоу, к качественным данным применяли точный критерий Фишера. Для анализа влияния двух факторов на изменение исследуемых параметров применяли двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA (в случае ненормального распределения выборки – после ее нормализации преобразованием Бокс-Кокса). Обработка данных выполнялась в программах MedCalc 14 и Microsoft Excel.

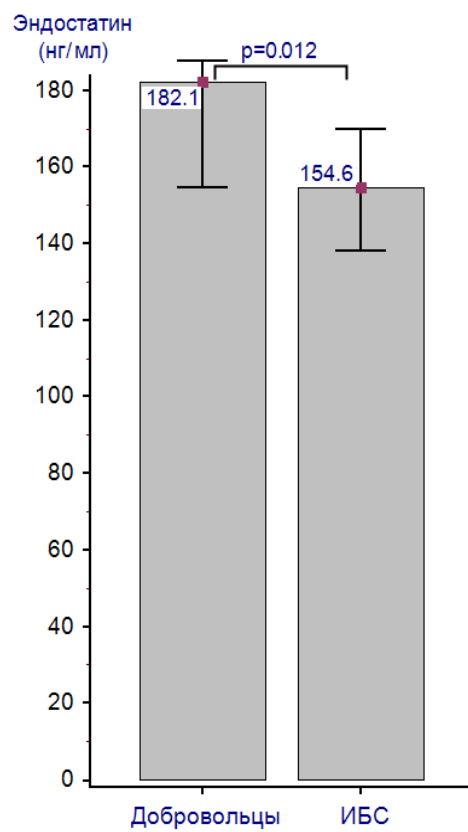
Глава III. Результаты исследования

3.1 Содержание ЭПК, сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), эндостатина и MCP-1 в крови у больных ИБС и здоровых добровольцев

Было отмечено, что в группе пациентов ИБС число ЭПК достоверно ниже, чем у здоровых добровольцев (рис. 1А). Также у больных ИБС по сравнению с добровольцами отмечено достоверное снижение числа лейкоцитов и концентрации эндостатина (рис. 1Б), а также достоверное повышение концентрации ОХС (рис. 2А), ХС ЛНП (рис. 2Б), VEGF (рис. 3А), СРБ (рис. 3Б), глюкозы, а также СОЭ.

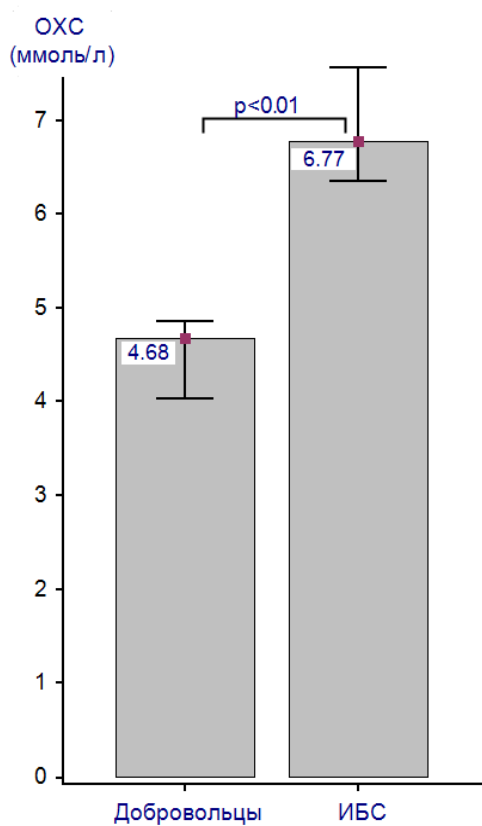


А

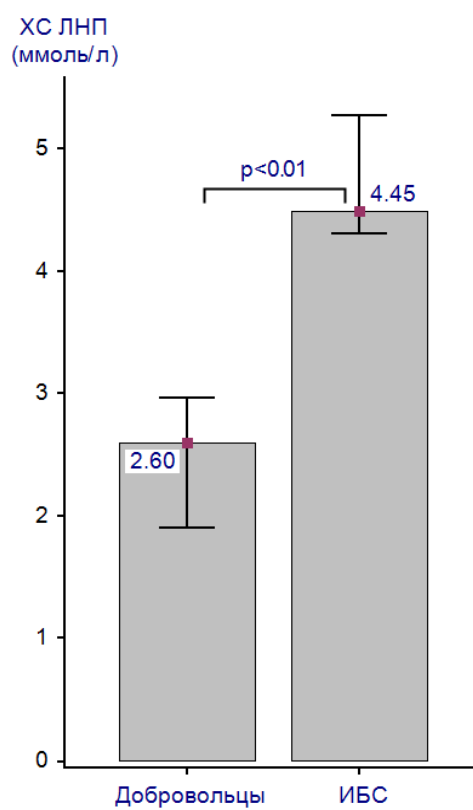


Б

Рис. 1. Уровень ЭПК (А) и эндостатина (Б) у больных ИБС и здоровых добровольцев.

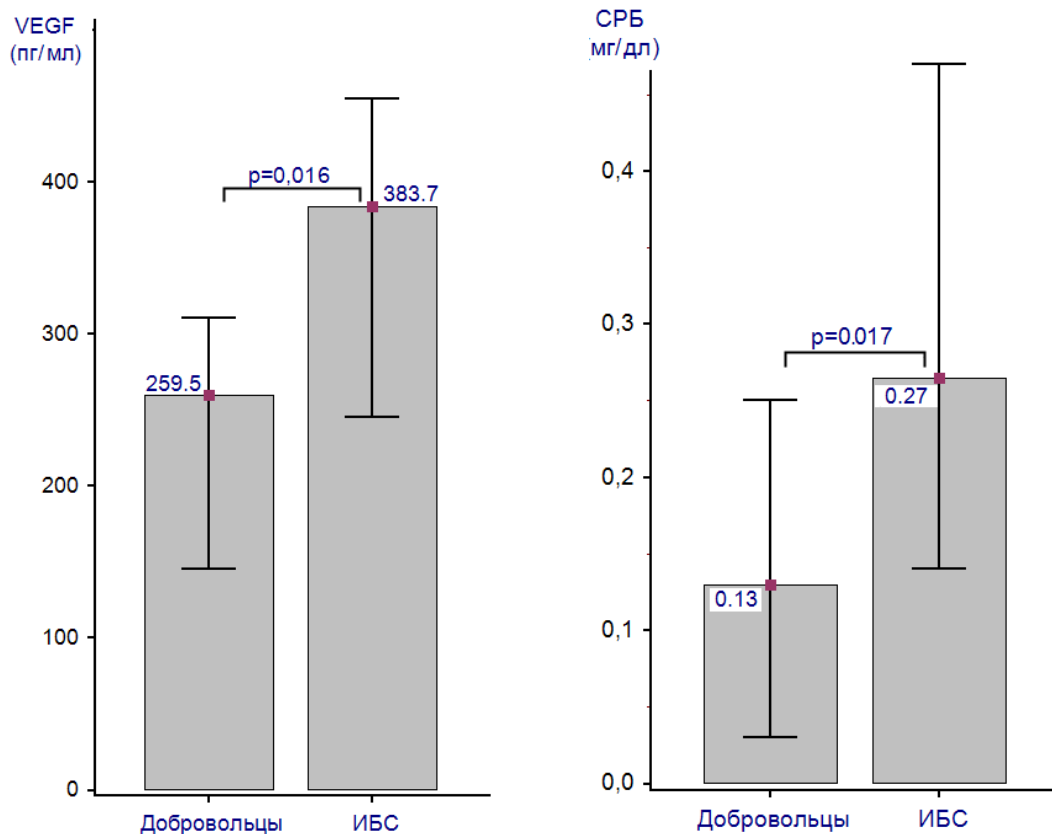


А



Б

Рис. 2. Уровень ОХС (А) и ХС ЛНП (Б) у больных ИБС и здоровых добровольцев.



А

Б

Рис. 3. Уровень VEGF (А) и СРБ (Б) у больных ИБС и здоровых добровольцев.

Достоверных различий в уровнях ХС ЛВП, ТГ, МСР-1 между этими группами выявлено не было. В двух подгруппах больных ИБС по дозе статина не было отмечено достоверных различий в значениях исследуемых параметров. Обращают на себя внимания большие значения дисперсий числа ЭПК во всех группах, что является следствием особенностей методики подсчета числа ЭПК исследуемого фенотипа, который оказался очень редким. По-видимому, этим и объясняется недостоверное различие числа ЭПК между группами больных ИБС, хотя и отмечается тенденция к более низким значениям ЭПК в группе 2 (с большими значениями ХС ЛНП).

Все данные по сравнению содержания ЭПК фенотипа CD34+/CD133+/CD309+ на 10 мл цельной крови, числа лейкоцитов, концентрации VEGF, МСР-1, СРБ и эндостатина в группах больных ИБС и в контрольной группе суммированы в таблице 2.

Таблица 2. Сравнение содержания исследуемых показателей в группах больных ИБС и контрольной группе.

Показатель	ИБС (n=58)			Контроль (n=15)	p*
	Группа 1 (10 мг, n=26)	Группа 2 (40 мг, n=32)	p*		
ЭПК, кол-во на 10 мл	171 (77-435)			938 (412-1778)	<0.01
	234 (114-434)	142 (70-443)	0.33		
Лейкоциты, млн/мл	6.4 (5.6-7.2)			7.6 (6.5-8.1)	0.013
	6.4 (5.9-7.1)	6.3 (5.6-7.5)	0.81		
ОХС, ммоль/л	6.77 (6.35-7.56)			4.68 (4.03-4.86)	<0.01
	6.55 (6.10-6.98)	6.95 (6.42-7.84)	0.07		
ОХС>5.2 ммоль/л	57 (98%)			0 (0%)	<0.01
ХС ЛНП, ммоль/л	4.45(4.26-5.19)			2.60 (1.90-2.97)	<0.01
	4.34 (3.96-4.63)	4.59 (4.14-5.28)	0.09		
ХС ЛВП, ммоль/л	1.31 (1.10-1.66)			1.15 (0.91-1.38)	0.08
	1.20 (1.09-1.66)	1.37 (1.11-1.66)	0.67		
ТГ, ммоль/л	1.67 (1.25-2.43)			1.46 (0.98-1.97)	0.49
	1.38 (1.11-2.16)	1.86 (1.36-2.64)	0.10		
VEGF, пг/мл	383.7 (244.8-454.7)			259.5 (144.9-310.3)	0.016
	375.3 (244.8-462.3)	388.4 (253.6-448.4)	0.94		
Эндостатин, нг/мл	154.6 (138.1-170.0)			182.1 (154.5-187.6)	0.012
	150.9 (139.1-160.8)	156.4 (137.5-179.3)	0.32		
МСР-1, пг/мл	211.6 (175.0-275.8)			200.7 (168.9-251.2)	0.57
	219.9 (175.0-278.0)	209.6 (175.0-247.1)	0.65		
СРБ, мг/дл	0.27 (0.14-0.47)			0.13 (0.03-0.25)	0.017
	0.22 (0.10-0.39)	0.31 (0.18-0.49)	0.07		
Глюкоза, ммоль/л	5.57 (4.94-6.06)			4.96 (4.70-5.22)	0.04
	5.44 (4.94-6.06)	5.62 (4.93-6.06)	0.52		
СОЭ,мм/ч	11.5 (7.0-19.0)			5.5 (2.0-10.0)	<0.01
	10 (7-14)	11 (7-20)	0.59		

* тест Манна-Уитни

3.2 Связь ЭПК, VEGF, эндостатина и MCP-1 с факторами риска у больных ИБС

При сравнении уровней ЭПК, VEGF, эндостатина и MCP-1 у мужчин и женщин достоверных различий не выявлено. Также не выявлена связь этих факторов с возрастом, индексом массы тела, наличием отягощенного анамнеза, наличием артериальной гипертензии, с перенесенным ранее инфарктом миокарда. Наиболее достоверные связи были выявлены в группах, разделенных по такому фактору риска, как курение. У некурящих больных ИБС уровень эндостатина был достоверно выше, чем у курящих – 156.9 (138.6-176.2) нг/мл и 140.2 (136.9-151.1) нг/мл соответственно ($p=0.043$, рис. 4А). Практически достигло критериев достоверности повышенное содержание ЭПК и VEGF в группе курильщиков по сравнению с некурящими пациентами ИБС ($p=0.053$ и 0.061 , соответственно, рис. 4Б, 5А). Сахарный диабет как фактор еще более низкого содержания ЭПК (по сравнению с больными ИБС без СД) также почти достиг критериев достоверности ($p=0.066$, рис. 5Б).

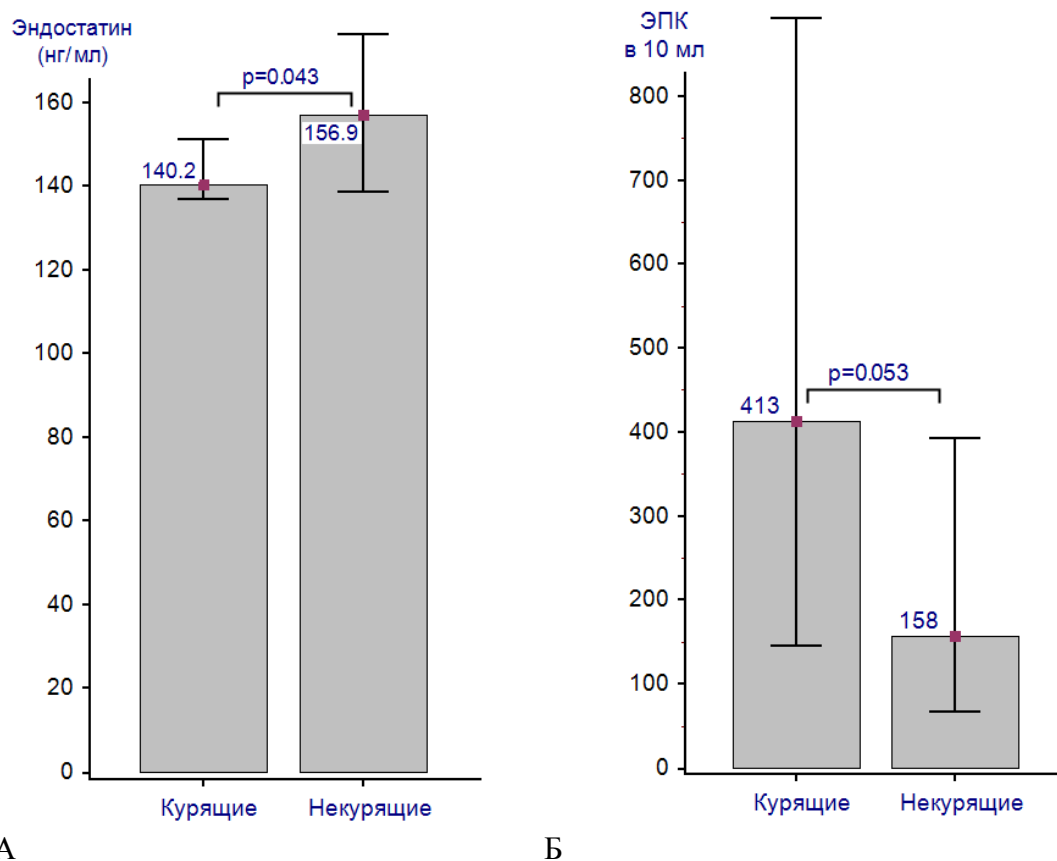


Рис. 4. Уровень эндостатина (А) и ЭПК (Б) у курящих и некурящих больных ИБС.

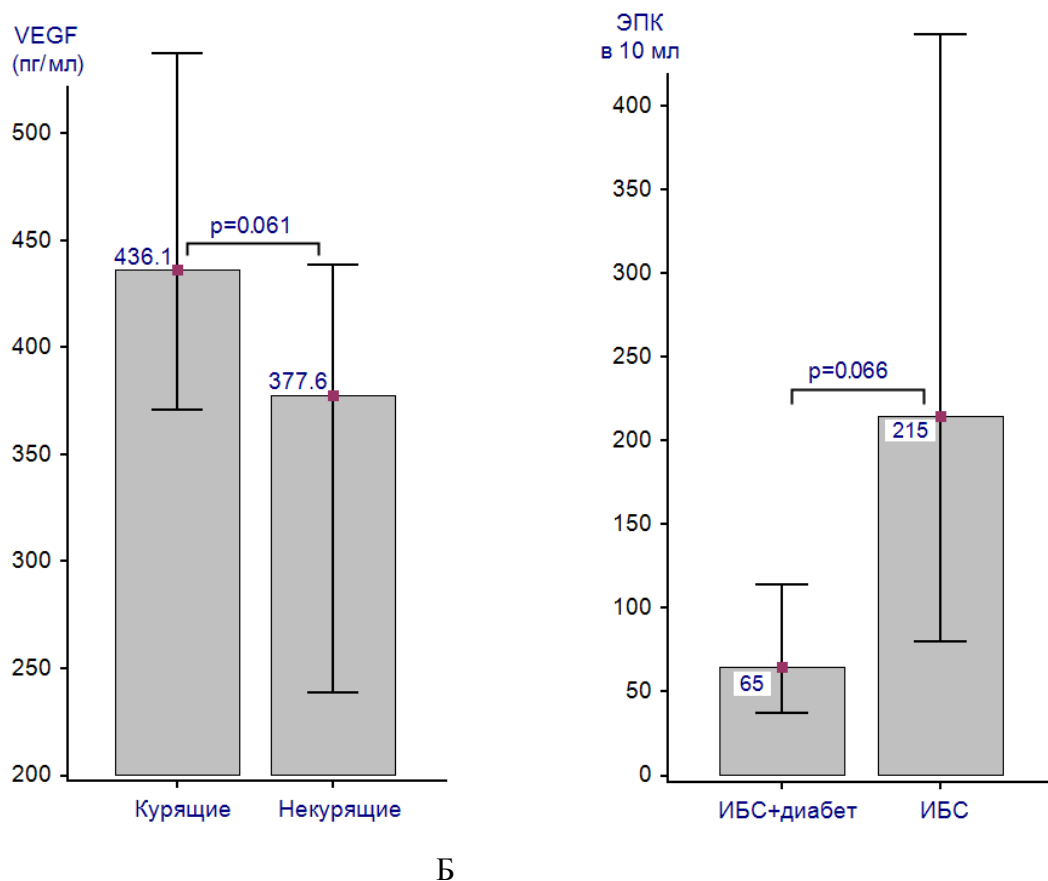


Рис. 5. А. Уровень VEGF у курящих и некурящих больных ИБС. Б. Уровень ЭПК у пациентов ИБС с диабетом и без диабета.

3.3 Сопоставление содержания ЭПК, показателей липидного профиля и концентрации VEGF, эндостатина, MCP-1 и CRP в крови у больных ИБС

Проведен анализ корреляции содержания ЭПК с общим числом лейкоцитов, концентрацией ОХС, ХС ЛНП, ХС ЛВП, ТГ, VEGF, эндостатина, MCP-1 и CRP в исследуемых группах (у больных ИБС до терапии статинами и у здоровых добровольцев). За исключением положительной корреляции между ЭПК и ОХС в группе добровольцев, достоверных связей обнаружено не было (табл. 3, рис. 6). Практически достигла критериев достоверности положительная корреляция между VEGF и ЭПК в группе больных ИБС (рис. 7)

Таблица 3. Корреляции числа ЭПК и других исследуемых параметров

Корреляция: ЭПК и.	ИБС (n=58)		Контроль (n=15)	
	r*	p**	r*	p**
Лейкоциты	-0.12	0.38	0.31	0.38
ОХС	0.01	0.95	0.65	0.04
ХС ЛНП	-0.09	0.50	0.09	0.80
ХС ЛВП	0.00	1.00	-0.33	0.35

ТГ	0.07	0.58	0.20	0.58
VEGF	0.25	0.06	0.20	0.58
Эндостатин	-0.04	0.74	0.24	0.51
МСР-1	-0.22	0.10	-0.44	0.20
СРБ	-0.07	0.62	-0.02	0.96

* коэффициент ранговой корреляции по Спирмену

** уровень значимости для r

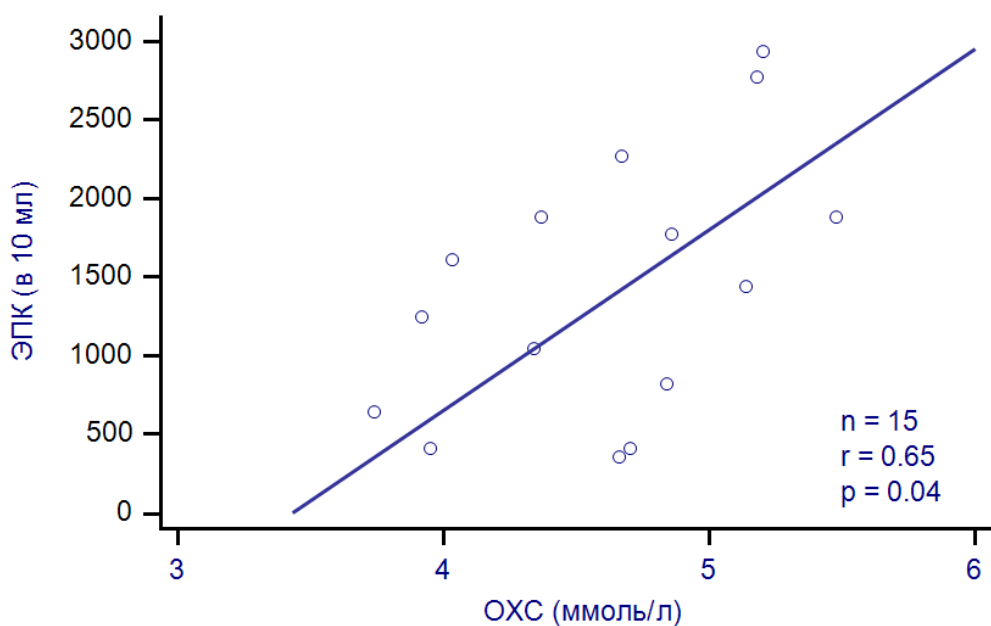


Рис. 6. Связь значений ОХС и уровня ЭПК в группе добровольцев. r – коэффициент ранговой корреляции по Спирмену, p – уровень значимости для r .

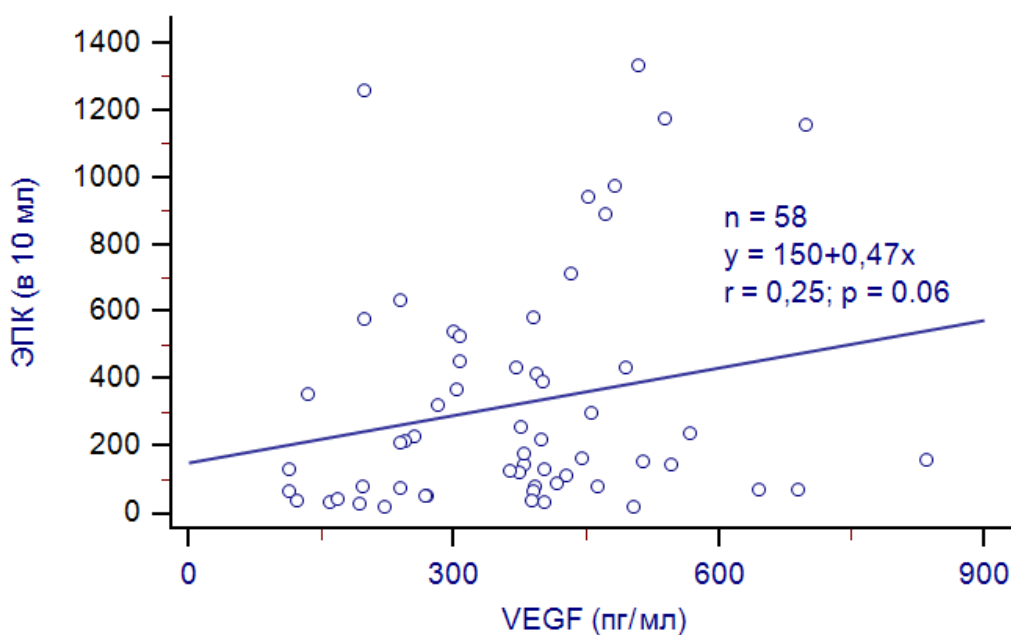


Рис. 7. Связь значений VEGF и уровня ЭПК в группе ИБС. r – коэффициент ранговой корреляции по Спирмену, p – уровень значимости для r .

3.4 Влияние терапии аторвастатином в дозе 10 мг и 40 мг на уровень ЭПК, факторов ангиогенеза и показателей липидного профиля.

На фоне терапии аторвастатином было выявлено достоверное увеличение числа ЭПК со 171 (77-435) до 423 (164-739), коэффициент прироста – 1.72 (1.24-2.64), что соответствует 72%. В группе 1 количество ЭПК возросло с 234 до 466 единиц в 10 мл, в группе 2 – со 142 до 382 единиц в 10 мл (рис. 8).

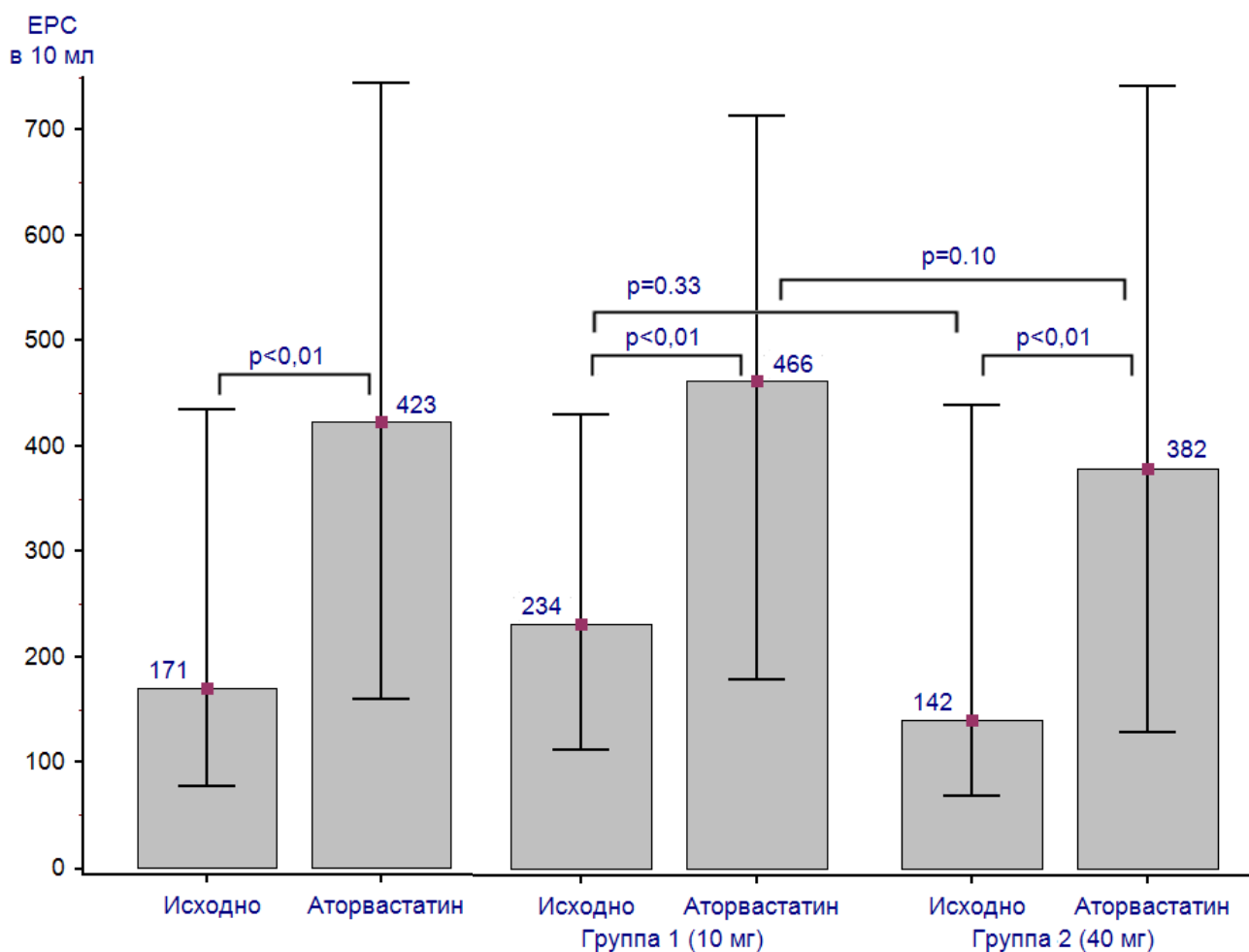
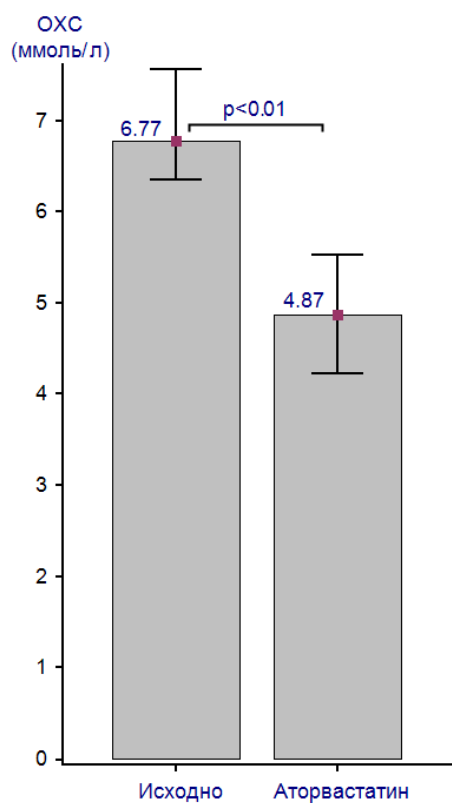
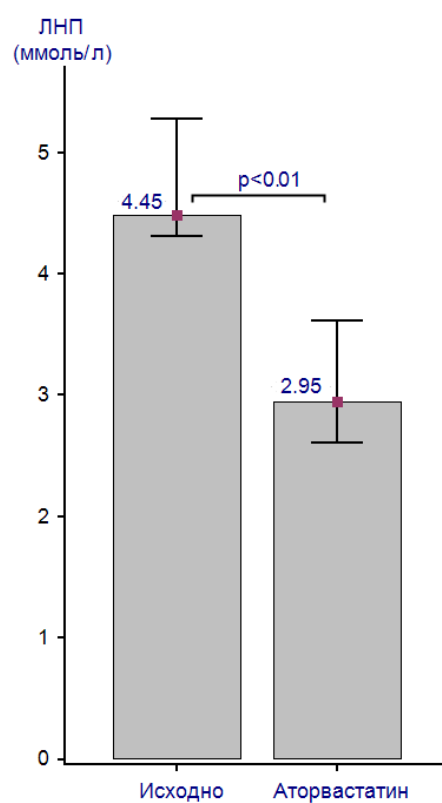


Рис. 8. Динамика содержания ЭПК на фоне терапии аторвастатином.

Также на фоне терапии отмечалось достоверное снижение уровня ОХС (на 30%, рис. 9А), ХС ЛНП (на 35%, рис. 9Б), ТГ (на 18%), VEGF (на 11%, рис. 10А) и СРБ (на 26%, рис. 10Б).

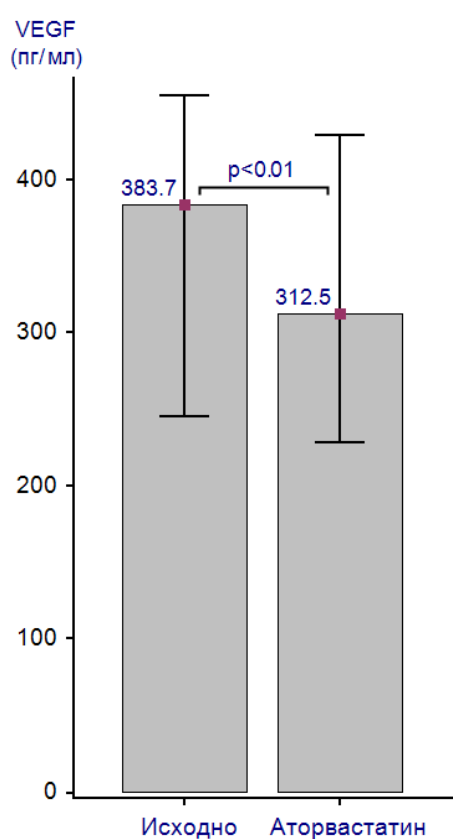


А

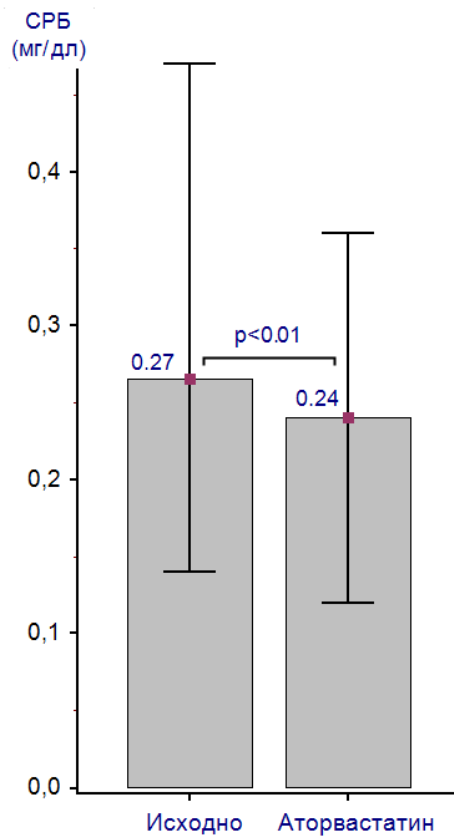


Б

Рис. 9. Динамика содержания ОХС (А) и ЛНП (Б) на фоне терапии аторвастатином.



А



Б

Рис. 10. Динамика содержания VEGF (А) и СРБ (Б) на фоне терапии аторвастатином.

Остальные исследуемые показатели за время терапии не претерпели статистически значимых изменений. Следует отметить, что не было выявлено дозозависимых изменений показателей, т.е. увеличение дозы статина не приводило к достоверным изменениям динамики показателя, наблюдаемой на фоне приема стандартной дозы. Как видно из рисунка 9, рост количества ЭПК происходил как при назначении аторвастатина в дозе 10 мг/сут, так и в дозе 40 мг/сут. Разница между коэффициентами прироста была недостоверной, $p=0.1$.

Также мы провели анализ зависимости динамики значений ОХС и ХС ЛНП на фоне терапии в зависимости от их исходных значений, отдельно в обеих группах. Связь изменения ЛНП (кЛНП) от его исходной величины представлена на рис. 11.

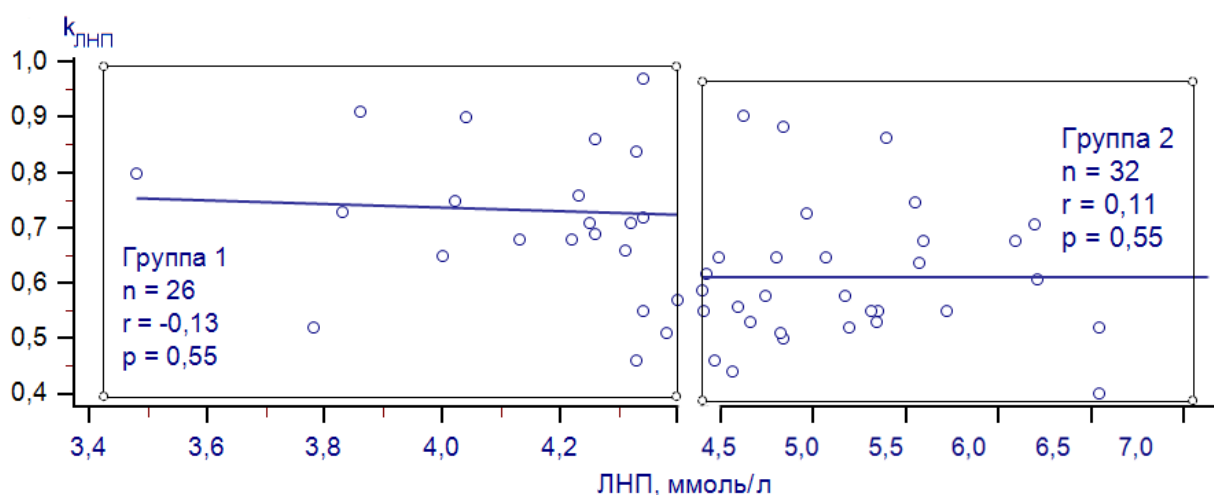


Рис. 11. Связь исходных значений ЛНП и его изменения на фоне терапии аторвастатином в дозе 10 мг (группа 1) и 40 мг (группа 2). r – коэффициент ранговой корреляции по Спирмену, p – уровень значимости для r .

Аналогичные результаты получены и для ОХС: группа 1 – $r = -0.22$, $p = 0.28$, группа 2 – $r = 0.24$, $p = 0.18$, т.е. выявлено практически отсутствие корреляций. Таким образом, было показано, что исходные значения ЛНП и ОХС не влияли на их динамику в результате терапии. Для дополнительной проверки этого утверждения мы разбили каждую из групп 1 и 2 на две равных подгруппы, согласно исходных значений ЛНП – ниже медианы и выше медианы, после чего провели над полученными четырьмя группами двухфакторный дисперсионный анализ. Аналогичная группировка и анализ были выполнены и для исходного ОХС, а также для оценки динамики уровня ЭПК. Результаты приведены в табл. 4.

Таблица 4. Оценка влияния дозы статина и исходного значения параметра на его динамику.

Гипотеза: на динамику параметра влияет:	Параметр		
	ОХС	ЛНП	ЭПК
	р	р	р
Исходное значение параметра	0.99 (ложно)	0.43 (ложно)	0.01 (истинно)
Доза статина	<0.01 (истинно)	<0.01 (истинно)	0.38 (ложно)

Таким образом, было подтверждено, что исходные значения ОХС и ЛНП не влияли на степень их снижения в результате терапии. Результаты теста Манна-Уитни ожидаемо указывали на достоверно большее снижение ОХС и ЛНП в группе 2 (40 мг), чем в группе 1 (10 мг), p для обоих показателей <0.01 . В то же время прирост ЭПК, как следует из табл. 4, от дозы статина, наоборот, не зависит, но зависит от исходного значения ЭПК. Другими словами, чем ниже были исходные значения ЭПК у пациентов перед началом терапии статином, тем более значительный их прирост наблюдался на фоне терапии.

3.5 Сопоставление динамики ЭПК с динамикой показателей липидного профиля у больных ИБС на фоне терапии аторвастатином в различных дозах

В связи с полученными результатами был выполнен корреляционный анализ связи между приростом ЭПК и падением ЛНП и ОХС, а также динамикой ХС ЛВП и ТГ в группах 1 и 2 на фоне терапии аторвастатином. Были выявлены слабые и умеренные связи между динамикой ЭПК, ЛНП и ОХС, результаты приведены на рис. 12, 13 и табл. 5.

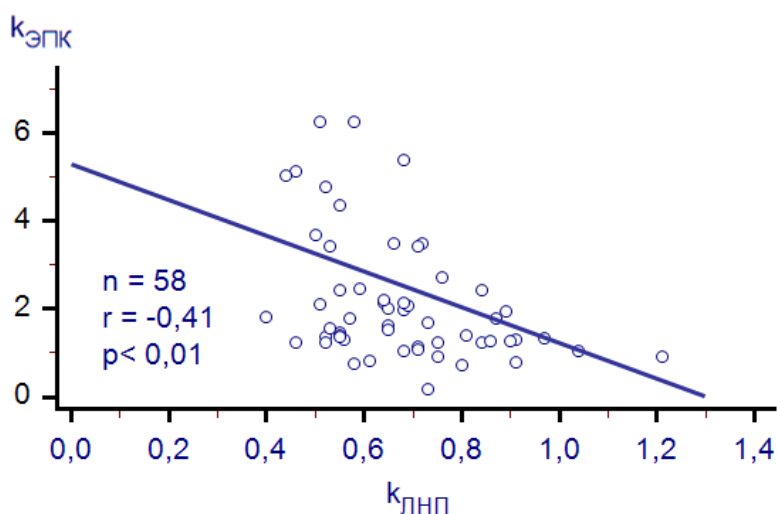


Рис. 12. Связь между приростом ЭПК и снижением ЛНП на фоне терапии аторвастатином у больных ИБС.

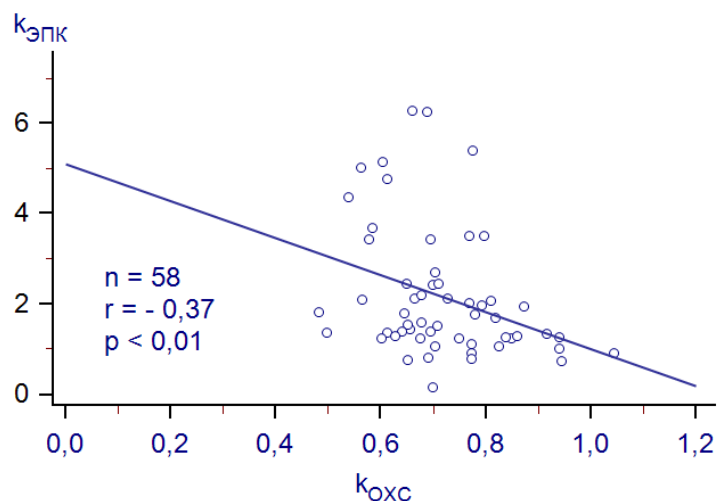


Рис. 13. Связь между приростом ЭПК и снижением ОХС на фоне терапии аторвастатином у больных ИБС.

Таблица 5. Корреляции динамики числа ЭПК и других исследуемых параметров

Корреляция: динамика ЭПК ($k_{ЭПК}$) и динамика..	ИБС (n=58)		Группа 1 (10 мг, n=26)		Группа 2 (40 мг, n=32)	
	r^*	p^{**}	r^*	p^{**}	r^*	p^{**}
ОХС	-0.37	<0.01	-0.52	<0.01	-0.21	0.26
ХС ЛНП	-0.41	<0.01	-0.44	0.03	-0.26	0.15
ХС ЛВП	0.00	1.00	0.06	0.78	-0.03	0.87
ТГ	0.00	0.98	-0.09	0.67	0.09	0.63

* коэффициент ранговой корреляции по Спирмену

** уровень значимости для r

Обсуждение результатов

Таким образом, были показаны достоверные различия ряда показателей у больных ИБС по сравнению со здоровыми добровольцами. Уровень ЭПК у больных ИБС был в среднем в 4 раза ниже ($p < 0,01$), уровень VEGF на 52% выше ($p < 0,01$), уровень эндостатина на 13% ниже ($p < 0,05$), чем в контрольной группе. Терапия аторвастатином у больных ИБС в течение трех месяцев приводила к увеличению уровня ЭПК в среднем на 72% ($p < 0,05$). Прирост ЭПК не зависел от дозы статина ($p = 0,38$), однако он был выше при исходно низких значениях ЭПК ($p = 0,01$). На фоне терапии отмечено снижение (на 11%) уровня VEGF ($p < 0,05$), уровень эндостатина значимо не изменился ($p = 0,22$). Установлена взаимосвязь между динамикой ЭПК, общего холестерина и холестерина липопротеинов низкой плотности на фоне терапии,

то есть большему приросту ЭПК соответствовало большее снижение ОХС ($r = -0,37$, $p < 0,01$) и ХС ЛНП ($r = -0,41$, $p < 0,01$).

В рамках обсуждения полученных результатов, прежде всего, следует отметить важность выбора самой методики измерения уровня ЭПК, так как в зависимости от типа экспрессируемых маркеров определяются разные клетки, или же одни и те же клетки, но на разных стадиях развития.

Повышение уровня ЭПК различных фенотипов на фоне терапии статинами – известный факт, продемонстрированный в ряде работ (Henrich et al, 2007; Vasa et al., 2001). Однако оставалось неясным, является ли это стимулирующее влияние статинов на прогениторные клетки явлением, зависящим от дозы применяемых статинов. Этот вопрос имеет важное научное и практическое значение. Результаты нашего исследования демонстрируют, что количество ЭПК у здоровых лиц достоверно выше, чем у пациентов с ИБС. Можно сделать вывод, что уровень ЭПК оказывает положительное влияние на функцию эндотелия, что подтверждается работами, описывающими влияние статинов на потокзависимую вазодилатацию (Ostad et al., 2009). Вполне вероятно, что в основе нормализации потокзависимой вазодилатации лежит репарация эндотелиальными прогениторными клетками сосудистого эндотелия.

Другой важный вывод из настоящей работы имеет отношение к клинической практике – статины в любых дозах оказывают влияние на уровень ЭПК, следовательно, плейотропные эффекты данной группы препаратов активируются вне зависимости от дозы. Это подтверждает тот известный факт, что при назначении дозы гиполипидемической терапии следует ориентироваться только на целевой уровень холестерина ЛНП. Для ответа на вопрос о клиническом применении информации о влиянии разных доз статинов на ЭПК требуются дальнейшие исследования.

Выводы

1. Уровень эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) фенотипа CD34+/CD133+/CD309+ у больных ИБС был в среднем в 4 раза ниже, уровень VEGF на 52% выше, уровень эндостатина на 13% ниже, чем у здоровых добровольцев ($p < 0.05$). Уровень MCP-1 в указанных группах достоверно не различался.
2. Уровень эндостатина у некурящих больных ИБС достоверно выше, чем у курящих ($p < 0.05$). Других достоверных связей ЭПК, VEGF, MCP-1 и эндостатина с факторами риска ИБС не выявлено.
3. Корреляционных связей уровня ЭПК с показателями липидного профиля, концентрацией VEGF, эндостатина, MCP-1 и СРБ в крови у больных ИБС не выявлено.
4. На фоне терапии аторвастатином выявлено повышение уровня ЭПК в среднем на 72%. Достоверных различий в приросте ЭПК в зависимости от дозы статина не выявлено. Прирост ЭПК был более выражен при исходно низких уровнях ЭПК.
5. На фоне терапии аторвастатином выявлено достоверное снижение уровня VEGF (на 11%, $p < 0.05$), достоверной динамики эндостатина и MCP-1 не выявлено. Все указанные изменения не зависели от дозы применяемых статинов.
6. Выявлены корреляционные связи слабой и средней степени между снижением ОХС и ЛНП и приростом ЭПК, более выраженные в группе стандартной дозы аторвастатина.

Практические рекомендации

Информация о дозозависимом влиянии статинов на количество ЭПК, а также на VEGF и отсутствие их влияния на эндостатин и MCP-1 должна быть использована в дальнейших исследованиях, направленных на изучение не связанных с липидами эффектов данной группы препаратов.

Список работ по теме диссертации

1. А. Е. Семенова, И. В. Сергиенко, А. Л. Домбровский, А. В. Рвачева. Роль эндотелиальных прогениторных клеток при атеросклерозе. Атеросклероз и дислипидемии. 2012 №3 (8), стр. 14-23
2. А.Л. Домбровский, И.В. Сергиенко, А.В. Рвачева, А.А. Аншелес, В.В. Кухарчук. Содержание эндотелиальных прогениторных клеток фенотипа CD34+/CD133+/CD309+, а также факторов ангиогенеза в крови у больных ИБС. Терапевт, 2015, №7, стр. 23-30
3. А.Л. Домбровский, И.В. Сергиенко, А.В. Рвачева, А.А. Аншелес, А.Е. Семенова, В.В. Кухарчук. Влияние терапии аторвастатином в различных дозах на эндотелиальные прогениторные клетки и факторы ангиогенеза у больных ИБС. Атеросклероз и дислипидемии, 2015, №2, стр. 56-69
4. A.E. Semenova, A.L. Dombrovskiy, I.V. Sergienko, A.V. Rvacheva, D.N. Nozadze. The influence of atorvastatin treatment on circulating endothelial progenitor cells in coronary artery disease patients. Atherosclerosis, Vol. 235, Issue 2, e123

Список сокращений

НУНА – Нью-Йоркская Ассоциация сердца

МСР-1 – моноцитарный хемотаксический протеин-1

VEGF – фактор роста сосудистого эндотелия

АГ – артериальная гипертония

ДАД – диастолическое артериальное давление

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ИМ – инфаркт миокарда

ИМТ – индекс массы тела

ЛВП – липопротеиды низкой плотности

ЛНП – липопротеиды высокой плотности

ОХС – общий холестерин

ОКС – острый коронарный синдром

САД – систолическое артериальное давление

СД – сахарный диабет

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

СРБ – С-реактивный белок

ТГ – триглицериды

ЧСС – частота сердечных сокращений

ЭПК – эндотелиальные прогениторные клетки