

Возможные механизмы стабилизации атеросклеротической бляшки на фоне терапии розувастатином

А. Е. Семёнова, И. В. Сергиенко, В. В. Кухарчук.

ФГУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗИСР РФ

Абстракт

В исследование по оценке влияния розувастатина на коронарный ангиогенез включено 30 мужчин, больных ишемической болезнью сердца (ИБС) с уровнем общего холестерина $>5,2$ ммоль/л. В крови пациентов исходно и через 3 месяца терапии розувастатином 10 мг/сут определяли уровни общего холестерина (ХС), холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС ЛНП), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛВП), триглицеридов (ТГ), С-реактивного белка (СРБ), интерлейкина 6 (ИЛ-6), а также сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и фактора роста фибробластов (FGF). Получено значительное снижение уровней ХС, ТГ, ХС ЛНП, а также СРБ и ИЛ-6. Три месяца терапии розувастатином привели к достоверному снижению уровня VEGF, при этом уровень FGF не изменился. Не было выявлено корреляции между исходным уровнем СРБ и уровнем VEGF и между исходным уровнем ИЛ-6 и VEGF. Также не выявлено корреляции между степенью снижения СРБ и VEGF и снижением ИЛ-6 и VEGF. По результатам исследования показано значительное снижение уровня VEGF сыворотки крови на фоне терапии розувастатином, что может рассматриваться как возможный механизм стабилизации атеросклеротической бляшки у пациентов с ИБС.

Ключевые слова: сосудистый эндотелиальный фактор роста, фактор роста фибробластов, статины, ишемическая болезнь сердца.

The influence of rosuvastatin treatment on atherosclerotic plaque stabilization

A. E. Semenova, I. V. Sergienko, V. V. Kukharchuk

Abstract

The aim of our study was to assess the influence of rosuvastatin on coronary angiogenesis. 30 male patients with chronic coronary heart disease and total cholesterol level >5.2 mmol/l were treated with rosuvastatin 10 mg daily during 3 months. The serum level of total cholesterol (TC), LDL-cholesterol (LDL-C), HDL-cholesterol (HDL-C), triglycerides (TG) as well as C-reactive protein (CRP) and interleukin-6 (IL-6), vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) were measured initially and in 3 months. There was the significant decreasing of TC, LDL-C and TG concentrations. IL-6 and CRP serum levels were also decreased after rosuvastatin therapy. Three months of treatment resulted to significant decrease of VEGF with no changes of bFGF levels. The correlation was not found between CRP and VEGF levels and between IL-6 and VEGF levels. Also there was no correlation between the degree of decreasing CRP and VEGF, and IL-6 and VEGF. So we have shown significant decreasing of VEGF serum levels on rosuvastatin therapy. It could be possible mechanism of plaque stabilization in patients with coronary heart disease.

Key words: vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor, statin, coronary heart disease.

В связи с большой распространённостью ишемической болезни сердца (ИБС) среди населения, улучшение качества и продолжительности жизни этих больных является одной из приоритетных задач здравоохранения. Несмотря на постоянное совершенствование методов обследования и лечения, сохраняется высокий уровень смертности от данного заболевания, в связи с чем ведутся поиски и разработки новых подходов к ведению больных ИБС. Перспективным направлением является изучение ангиогенеза. Раскрытие механизмов этого процесса позволит стимулировать формирование новых сосудов и тем самым улучшать кровоснабжение миокарда [1, 2].

Результаты проведённых клинических исследований по введению стимуляторов ангиогенеза про-

тиворечивы и не позволяют чётко определить преимущество и значимую эффективность какого-либо из них. Так, в исследовании FIRST отмечалось повышение толерантности к физической нагрузке после интракоронарного введения белка фактора роста фибробластов (basic fibroblast growth factor – bFGF) у больных старшей возрастной группы (>65 лет) с тяжёлой клиникой стенокардии [3]. В исследовании VIVA через 120 дней после интракоронарного введения белка сосудистого эндотелиального фактора роста (vascular endothelial growth factor – VEGF-1) в группе, получавшей большие дозы, отмечалось уменьшение выраженности стенокардии, однако, не подтверждённое объективными данными при сравнении радиоизотопной перфузии миокарда и коронароангиографии [4]. В исследовании

AGENT через 12 недель после интракоронарного введения гена FGF4 в составе аденовируса с нарушенной репликацией (Ad5-FGF4) детальный анализ подгрупп выявил значимое улучшение показателей тредмил-теста у пациентов с длительностью исходной нагрузочной пробы менее 10 минут [5].

Первым исследованием, продемонстрировавшим неоспоримое клиническое улучшение у пациентов с тяжёлой стенокардией, явилось широкомасштабное рандомизированное исследование генной терапии REVASC [6]. Сравнивались 2 группы больных: в одной посредством миниторакотомии проводилась инъекция в стенку левого желудочка гена VEGF121 в составе аденовируса с нарушенной репликацией (Ad-VEGF121), в другой продолжалась оптимальная медикаментозная терапия. Значительное улучшение по данным тредмил-теста (увеличение времени до появления болей и до возникновения депрессии сегмента более ST 1 мм) было выявлено через 26 недель, а клиническое улучшение наблюдалось уже через 3 месяца после процедуры.

Существуют работы, в которых показано угнетение ангиогенеза на фоне гиперлипидемии, гипергликемии, при развитии эндотелиальной дисфункции [7-9]. Больным с ИБС необходима постоянная комбинированная терапия, которая доказано влияет на липидный спектр крови, эндотелиальную дисфункцию, активность симпатоадреналовой и ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, показатели свёртываемости крови и другие факторы, играющие роль в процессе ангиогенеза.

Представляется интересным изучить влияние терапии статинами на ангиогенез, так как ранее было показано, что препараты этой группы могут влиять на его естественное течение у больных ИБС [10]. Это является актуальным, так как в настоящее время используются методы, стимулирующие коронарный ангиогенез, такие как генетическая терапия [2] и метод усиленной наружной контрпульсации [11].

Целью нашей работы было оценить влияние терапии статинами на уровень факторов роста VEGF, bFGF у больных ишемической болезнью сердца.

Материал и методы.

В исследование включено 30 мужчин с ИБС, стабильной стенокардией II-III функционального класса (ФК), средний возраст 57 ± 9 лет. Критериями включения являлись наличие стабильной стенокардии в сочетании с положительным результатом велоэргометрии, а также уровень общего холестерина крови более 5,2 ммоль/л. Проба на наличие ишемии миокарда считалась положительной при регистрации горизонтальной или косонисходящей депрессии сегмента ST на 1,0 мм и более (0,08 сек после точки J) по сравнению с исходной ЭКГ, либо безболевой горизонтальной или косонисходящей депрессии сегмента ST на 1,5 мм и более (длительность физической нагрузки составляла не менее 3-х

минут). Во всех случаях диагноз был верифицирован методом коронароангиографии (КАГ) – наличие по крайней мере одного стеноза более 50% по диаметру магистральной коронарной артерии или ветви второго порядка.

Критериями исключения служили: сердечная недостаточность, сахарный диабет, острый коронарный синдром, воспалительные заболевания, оперативные вмешательства в последние 3 месяца, гипотиреоз, цирроз печени, нарушение функции почек (креатинин более 150 мкмоль/л), гипертриглицеридемия $>4,5$ ммоль/л, прием гиполипидемических препаратов менее чем за 1 месяц до включения в исследование, повышение уровня печеночных трансаминаз или креатинкиназы более чем в два раза от нормальных значений.

Все больные имели факторы риска ИБС (5 пациентов с тремя, 17 – с двумя и 8 – с одним фактором риска). У 15 (50%) имелась артериальная гипертензия, у 8 (27%) был отягощен семейный анамнез по атеросклерозу, 17 (57%) человек курили в прошлом и 1 продолжал курить во время исследования. Индекс массы тела составил в среднем $29,0 \pm 4,4$ кг/м². У 13 (43%) человек в прошлом имелся документированный инфаркт миокарда, 11 (37%) больных перенесли процедуру эндоваскулярной реваскуляризации, 7 (23%) – операцию коронарного шунтирования. Больные получали следующие группы препаратов: аспирин и статины (более 1 месяца) – 100%, 21 (70%) – β -блокаторы, 23 (77%) – ингибиторы АПФ, 6 (20%) – антагонисты кальция, 6 (20%) – мочегонные.

Методы обследования: врачебный осмотр, ЭКГ, велоэргометрия, эхокардиография, коронарная ангиография. Исследование поток-зависимой вазодилатации (ПЗВД), общего и биохимического анализов крови проводилось исходно и через 3 месяца приёма розувастатина.

Определялся уровень общего холестерина (ХС), триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛВП), аспартатамино-трансаминазы (АСТ), аланинаминотрансаминазы (АЛТ), креатинкиназы (КК), глюкозы, общего билирубина, креатинина. Содержание холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС ЛНП) вычисляли по формуле Фридвальда (1972): $\text{ХС ЛНП} = \text{ОХС} - \text{ХС ЛВП} - \text{ТГ}/2,2$ ммоль/л.

В сыворотке крови с помощью иммуноферментных методов проводили определение уровня С-реактивного белка (СРБ), интерлейкина 6 (ИЛ-6).

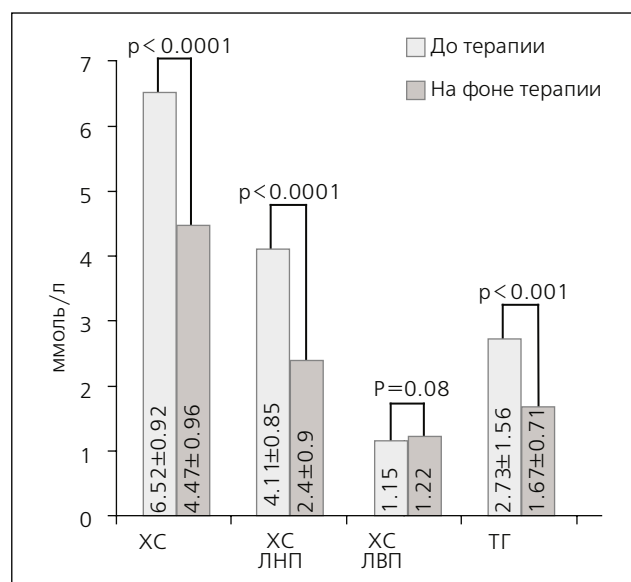
При исследовании поток-зависимой вазодилатации плечевой артерии в режиме двухмерного сканирования фиксировались изменения в диаметре плечевой артерии в ответ на увеличивающийся поток крови (поток-зависимая реакция). Плечевая артерия сканировалась в продольном сечении на 5 см выше локтевого сгиба, изображение фиксировалось последовательно в покое, в течение реактивной гиперемии, снова в покое и на фоне сублингвального приема нитроглицерина. Для каж-

дого из пациентов исследователем рассчитывалась поток-зависимая вазодилатация как характеристика поток-зависимого ответа, равная отношению изменения диаметра плечевой артерии в течение реактивной гиперемии к диаметру артерии в покое. Эти изменения представлены в процентном соотношении относительно исходного диаметра.

В крови пациентов исходно и через 3 месяца приёма розувастатина в дозе 10 мг (Крестор фирмы АстраЗенека) определяли уровень сосудистого эндотелиального фактора роста – VEGF и фактора роста фибробластов – bFGF. С этой целью у пациентов натошак проводился забор 20 мл венозной крови. Далее образцы крови инкубировались 5-10 мин при комнатной температуре, центрифугировались в течение 20 мин при 1500 G и температуре 40°C. После этого образцы хранились при температуре –70°C. Определение уровней VEGF и bFGF производилось методом иммуноферментного анализа с использованием диагностических наборов Human VEGF, фирмы Biosource (Бельгия). Определяемая концентрация 0-1500 пг/мл для VEGF и 0-135 пг/мл для bFGF.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась при помощи программ Excel и Medcalc с использованием критериев t Стьюдента и Вилкоксона, точного теста Фишера для качественных показателей.

Рисунок 1. Динамика липидного профиля на фоне терапии розувастатином.



Результаты

Получено достоверное снижение уровней ХС, ХС ЛНП, ТГ (рисунок 1) на фоне терапии розувастатином. Уровень ХС снизился на 31%, ТГ на 39%, ХС ЛНП на 44%. У 23 больных (77%) достигнут целевой уровень ХС ЛНП < 2,6 ммоль/л. Следует отметить, что не было выявлено каких-либо побочных

явлений, а также существенного изменения в крови уровня печеночных трансаминаз, КК, билирубина и глюкозы на фоне приёма розувастатина.

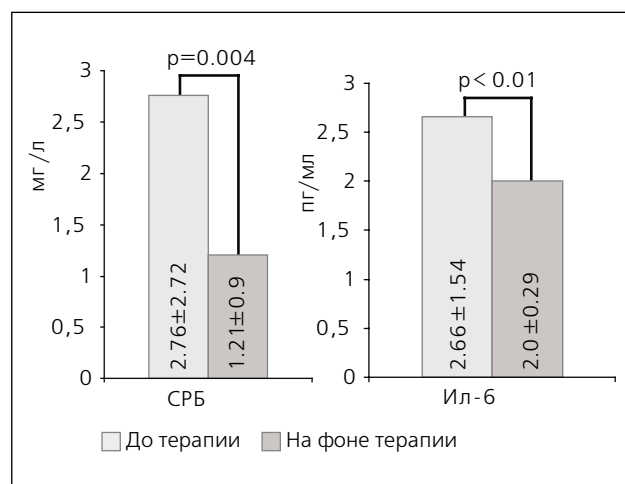
Терапия розувастатином оказала влияние на факторы воспаления – уровень СРБ снизился у 27 больных (90%) и повысился у 3 больных (10%). В среднем по группе уровень СРБ, как и уровень ИЛ-6 достоверно уменьшился. Исходно уровень СРБ составил 2,76 ± 2,72 мг/л, после терапии 1,21 ± 0,9 мг/л (p = 0,004). Уровень ИЛ-6 составил исходно 2,66 ± 1,54 пг/мл, на фоне терапии 2,0 ± 0,29 пг/мл (p < 0,01) (рисунок 2).

Дисфункция эндотелия по данным ПЗВД выявлена у 23 (77%) больных. У 7 больных (23%) функция эндотелия была нормальной (процент поток-зависимой вазодилатации 8-12%). В среднем до начала терапии процент поток-зависимой вазодилатации составил 6,1 ± 1,6%. После проведения терапии отмечено достоверное увеличение данного показателя – 10,4 ± 5,0% (p < 0,05).

Терапия розувастатином привела к снижению уровня VEGF – исходно VEGF 382 ± 249 пг/мл, на фоне терапии 297 ± 220 пг/мл, p = 0,006. Уровень FGF не изменился – исходно 12,2 ± 3,7 пг/мл, на терапии 12,1 ± 4,3 пг/мл, p > 0,05 (рисунок 3).

Не было выявлено корреляции между исходным уровнем СРБ и уровнем VEGF (r = 0,16, p = 0,5) и между исходным уровнем ИЛ-6 и VEGF (r = 0,18, p = 0,5).

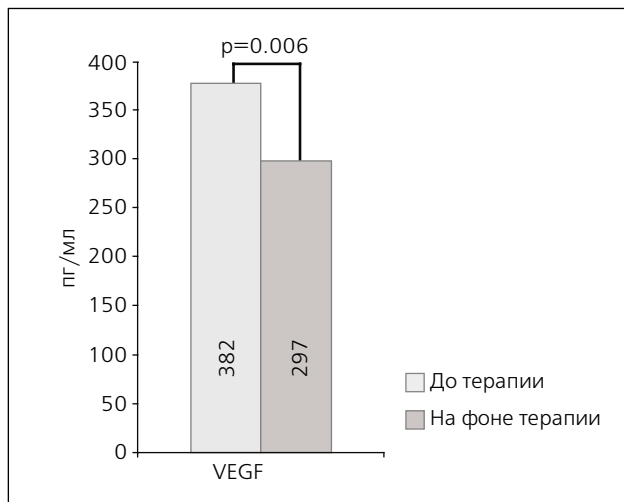
Рисунок 2. Динамика СРБ и ИЛ-6 на фоне терапии розувастатина.



Также не выявлено корреляции между степенью снижения СРБ и VEGF, а также снижением ИЛ-6 и VEGF (r = 0,17, p = 0,4 и r = 0,34, p = 0,12 соответственно).

Таким образом, терапия розувастатином привела не только к снижению атерогенных липидов и факторов воспаления, но и к снижению уровня сосудистого эндотелиального фактора роста – VEGF и не изменила уровень фактора роста фибробластов – FGF. Отсутствие в нашей работе корреляции между факторами воспаления и VEGF позволяет предположить, что снижение VEGF является прямым, а

Рисунок 3. Динамика уровня VEGF и FGF у больных ИБС на фоне приёма розувастатина.



не опосредованным через влияние на липиды крови и факторы воспаления эффектом розувастатина, хотя полученные результаты требуют подтверждения на больших объёмах исследования. Важным является и то, что статины снижают уровень VEGF и не влияют на уровень FGF; данное обстоятельство может быть обусловлено последовательностью каскада факторов ангиогенеза.

Обсуждение.

VEGF играет значимую роль в формировании новых коронарных артериол, но не менее важным является его влияние на состояние атеросклеротической бляшки. Данный фактор роста регулирует не только коронарный ангиогенез в целом, но и неоангиогенез атеросклеротической бляшки, что отражается на её стабильности [12]. Одним из путей стимуляции выработки VEGF является его экспрессия в гладкомышечных клетках под влиянием провоспалительного цитокина ИЛ-6. Использование статинов, по-видимому, имеет двоякий эффект. С одной стороны, они положительно влияют на липидный спектр, оказывают благоприятные плеiotропные эффекты (в том числе улучшение функции эндотелия, увеличение биоактивности оксида азота). С другой – стабилизируют атеросклеротическую бляшку, возможно, за счёт угнетения в ней процессов ангиогенеза. Показано, что терапия статинами ведёт к снижению уровня VEGF, например терапия симvastатином в дозе 20 мг в сутки ($n=52$) или 40 мг в сутки ($n=55$) у больных с исходной гиперхолестеринемией в течение шести недель ведёт к достоверному снижению уровня VEGF на 48% – с $1017,1 \pm 297,8$ пг/мл исходно до $543,5 \pm 317,4$ пг/мл ($p < 0,001$) [13]. Авторы объясняют подобный эффект статинов тем, что они снижают уровень ИЛ-6.

Выработка VEGF в макрофагах и гладкомышечных клетках регулируется гипоксией, цитокинами и холестерином ЛНП. Имеются работы, в которых

продемонстрирована связь уровней VEGF и липидного спектра у больных ИБС. Так, Trappe J. и соавт. изучали соотношение уровня общего холестерина, холестерина ЛНП и триглицеридов с уровнем VEGF и СРБ, а также влияние терапии правастатином (20 мг в сутки в течение 4 месяцев) на факторы роста. Включено 80 пациентов с уровнем холестерина более 6,1 ммоль/л – основная группа и с уровнем холестерина менее 5,1 ммоль/л – контрольная группа. Была выявлена корреляция между уровнем VEGF, липидным спектром и уровнем СРБ. Уровень VEGF достоверно различался в контрольной и основной группах, уровень VEGF и СРБ достоверно снизился на фоне терапии правастатином [14].

В экспериментальных работах показано, что повышенный уровень холестерина и холестерина ЛНП ингибирует стимуляцию ангиогенеза фактором роста VEGF, причём в большей степени, чем гипертриглицеридемия или сахарный диабет [15]. Было выявлено, что введение VEGF свинкам с ишемией миокарда восстанавливает функцию эндотелия у животных с нормальным липидным спектром и не оказывает влияние на функцию эндотелия у животных, находящихся на гиперхолестериновой диете. Аналогичные результаты получены в экспериментальной работе с введением фактора роста FGF [16].

Эффект, который терапия статинами оказывает на ангиогенез, зависит от выраженности нарушения липидного обмена и степени эндотелиальной дисфункции. Это подтверждается исследованием влияния терапии atorvastатином в высоких дозах на эндогенный ангиогенетический ответ у свиннок с хронической ИБС и гиперхолестеринемией (основная группа) или нормальным уровнем холестерина (группа сравнения). В основной группе не отмечено дилатации коронарных артерий в ответ на введение аденозина дифосфата, также в этой группе была значительно снижена коллатеральная коронарная перфузия миокарда. Терапия atorvastатином привела к снижению экспрессии VEGF и увеличению экспрессии эндостатина, фактора, ингибирующего ангиогенез. Таким образом, atorvastатин улучшал функцию эндотелия и существенно не изменял коллатеральную перфузию. Снижение экспрессии VEGF и увеличение экспрессии эндостатина на фоне терапии atorvastатином может свидетельствовать о торможении ангиогенеза при лечении статинами [10, 17].

Очень важен тот факт, что угнетение эндогенного ангиогенеза гиперхолестеринемией, может быть нивелировано введением экзогенного VEGF, что подтверждено в экспериментальной работе на кроликах [17].

В настоящее время доказано, что эффекты статинов многогранны. Они не только оптимизируют липидный спектр, но и положительно влияют на функцию эндотелия, снижают уровень факторов воспаления [12]. Также отмечается, что статины оказывают положительное влияние на рост новообразований, ингибируя развитие данного про-

цесса. Одним из механизмов называют торможение ангиогенеза в опухолях на фоне приёма статинов [12]. По-видимому, статины не обладают избирательным свойством тормозить рост сосудов именно в опухолях, а ингибируют этот процесс на уровне всего организма. Однако нельзя говорить, что статины отрицательно влияют на коронарный ангиогенез. Поскольку факторы роста при гиперхолестеринемии не могут в полной мере стимулировать ангиогенез, то можно сделать вывод, что при высоком уровне холестерина ангиогенез находится в состоянии угнетения. Статины снижают уровень холестерина, что помогает реализовать

стимулирующий эффект факторов ангиогенеза. Но уровень факторов ангиогенеза в крови снижается на фоне терапии статинами. Таким образом, возможно, суммарное влияние статинов на коронарный ангиогенез равно нулю.

Важным является тот факт, что экзогенная стимуляция коронарного ангиогенеза, например, путём введения генов, кодирующих выработку факторов роста, эффективна при нормальном уровне холестерина. Следовательно, стимулировать ангиогенез имеет смысл только при достижении целевых уровней липидов на фоне терапии статинами.

Список литературы

1. Fam N. P., Verma S., Kutryk M. et al. Clinician Guide to Angiogenesis. *Circulation*. 2003; 108:2613-2618
2. Disbart K. L., Work L. M., Denby L., Baker A. H. Gene Therapy for Cardiovascular Disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2003; 2(2003):138-148
3. Kleiman N. S., Califf R. M. Results from late-breaking clinical trials sessions at ACCIS 2000 and ACC 2000. *American College of Cardiology. J Am Coll Cardiol*. 2000; 36:310-325
4. Henry T. D., Annex B. N., Azrin M. A., et al. Final results of the VIVA trial of rbVEGF for human therapeutic angiogenesis. *Circulation*. 1999; 100(suppl 1):1-476. Abstract
5. Grines C. I., Watkins M. W., Helmer G., et al. Angiogenic gene therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation*. 2002; 105:1291-1297
6. Stewart D. J. A phase 2, randomized, multicenter, 26-week study to assess the efficacy and safety of BIOBYPASS (AdGV-VEGF121.10) delivered through minimally invasive surgery versus maximum medical treatment in patients with severe angina, advanced coronary artery disease, and no options for revascularization. *Circulation*. 2002; 106:2986-a. Abstract
7. Voisine P., Bianchi C., Ruel M. Inhibition of the cardiac angiogenic response to exogenous vascular endothelial growth factor. *Surgery*. 2004 Aug; 136(2):407-15
8. Sasso F. C., Torella D., Carbonara O. Increased vascular endothelial growth factor expression but impaired vascular endothelial growth factor receptor signaling in the myocardium of type 2 diabetic patients with chronic coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Sep 6; 46(5):827-34. Comment in: *J Am Coll Cardiol*. 2005 Sep 6; 46(5):835-7
9. Chung A. W., Hsiang Y. N., Matzke L. A. Reduced expression of vascular endothelial growth factor paralleled with the increased angiotensin expression resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human type 2 diabetic arterial vasculature. *Circ Res*. 2006 Jul 21; 99(2):140-8
10. Boodhwani M., Nakai Y., Voisine P., et al. High-dose atorvastatin improves hypercholesterolemic coronary endothelial dysfunction without improving the angiogenic response. *Circulation*. 2006 Jul 4; 114(1 Suppl):I402-8
11. Габрусенко С. А., Малахов В. В., Сергиенко И. В. с соавт. Первый опыт применения в России лечебного метода наружной контрпульсации у больных ишемической болезнью сердца. *Тер. архив*, №9, 2006; стр. 27-33
12. Беленков Ю. Н., Сергиенко И. В., Лякишев А. А., Кухарчук В. В. Статины в современной кардиологической практике. Москва, 2007
13. Giurgea A. G., Margeta C., Maca T. et al. Simvastatin reduces serum level of vascular endothelial growth factor in hypercholesterolemic patients. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006 Jan; 47(1):30-6
14. Trape J., Morales C., Molina R., et al. Vascular endothelial growth factor serum concentrations in hypercholesterolemic patients. *Scand J Clin Lab Invest*. 2006; 66(3):261-7
15. Weel V., Vries M., Vosbol P. J. et al. Hypercholesterolemia Reduces Collateral Artery Growth More Dominantly Than Hyperglycemia or Insulin Resistance in Mice. *Circulation*. 2006; 114:1811-1820
16. Voisine P., Bianchi C., Ruel M., et al. Inhibition of the cardiac angiogenic response to exogenous vascular endothelial growth factor. *Surgery*. 2004 Aug; 136(2):407-15
17. Belle E. V., Rivard A., Chen D. et al. Hypercholesterolemia Attenuates Angiogenesis but Does Not Preclude Augmentation by Angiogenic Cytokines. *Circulation*. 1997; 96:2667-2674