

Влияние терапии аторвастатином в различных дозах на эндотелиальные прогениторные клетки и факторы ангиогенеза у больных ишемической болезнью сердца

А. Л. Домбровский¹, И. В. Сергиенко², А. В. Рвачева², А. А. Аншелес², А. Е. Семенова², В. В. Кухарчук²

¹ ГБУЗ «ГП № 212» ДЗМ, филиал № 194, Москва

² ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» МЗ РФ, Москва

Абстракт

Цель. Изучение и использование эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) в настоящее время считается перспективным направлением кардиологии и ангиологии, поскольку известно, что они принимают активное участие в репарации эндотелия сосудов и неоангиогенезе. Показано, что снижение содержания ЭПК является независимым предиктором сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности. Цель настоящего исследования – изучить изменение содержания ЭПК и факторов ангиогенеза на фоне терапии аторвастатином в сопоставлении с динамикой липидного профиля у больных ишемической болезнью сердца (ИБС).

Материалы и методы. В основную группу вошло 58 пациентов с ИБС, из них 26 находились на терапии аторвастатином в дозе 10 мг/сут, 32 – в дозе 40 мг/сут. Число ЭПК фенотипа CD34+/CD133+/CD309+ измеряли методом проточной цитофлуориметрии двукратно – до начала терапии и через 3 месяца, также измеряли содержание сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), С-реактивного белка (СРБ), моноцитарного хемотаксического протеина 1 (MCP-1), эндостатина, параметров липидного профиля. Группу контроля составили 10 здоровых добровольцев, у которых указанные анализы проводились однократно.

Результаты. Были показаны достоверные различия некоторых показателей у больных ИБС по сравнению со здоровыми добровольцами: уровень ЭПК у больных ИБС был в 4 раза ниже, уровень VEGF на 52% выше, уровень эндостатина на 13% ниже ($p < 0,05$). Терапия аторвастатином у больных ИБС в течение трех месяцев привела к достоверному (в среднем на 72%) увеличению уровня ЭПК ($p < 0,05$). Прирост ЭПК не зависел от дозы статина, однако он был выше при исходно более низких значениях ЭПК ($p = 0,01$). На фоне терапии отмечено достоверное снижение уровня VEGF на 11% ($p < 0,01$), СРБ – на 26% ($p < 0,01$), общего холестерина (ОХС) – на 30% ($p < 0,01$), холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС ЛНП) – на 35% ($p < 0,01$), триглицеридов – на 18% ($p < 0,01$), уровни эндостатина, MCP-1, холестерина липопротеидов высокой плотности значимо не изменились. Были выявлены корреляционные связи между динамикой ЭПК, ОХС и ХС ЛНП на фоне терапии: большему приросту ЭПК соответствовало большее снижение ОХС ($r = 0,37$, $p < 0,01$) и ХС ЛНП ($r = 0,41$, $p < 0,01$).

Заключение. Нами получено достоверное повышение уровня ЭПК у больных ИБС на фоне приема аторвастатина в течение 3 месяцев, не зависевшее от дозы препарата. Повышение уровня ЭПК было более выраженным при исходно низком количестве ЭПК, а также у больных, у которых прием аторвастатина привел к более сильному снижению уровня ХС ЛНП.

Ключевые слова: эндотелиальные прогениторные клетки, ишемическая болезнь сердца, аторвастатин, факторы ангиогенеза.

Effect of different doses of atorvastatin therapy on endothelial progenitor cells and angiogenic factors in patients with ischemic heart disease

A. L. Dombrovskiy¹, I. V. Sergienko², A. V. Rvacheva², A. A. Ansheles², A. E. Semenova², V. V. Kukharchuk²

¹ City Polyclinic 212 (branch 194) of Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

² Russian Cardologic Research Complex, Moscow, Russia

Abstract

Aim. Research and application of endothelial progenitor cells (EPC) is now considered as a promising trend in cardiology and angiology, since it is known that they are actively involved in the vascular endothelium reparation and angiogenesis. Reduction of EPC levels was demonstrated as an independent predictor of cardiovascular morbidity and mortality. The purpose of current research was to assess changes in EPC and angiogenic factors levels during atorvastatin therapy in ischemic heart disease (IHD) patients, and to compare them with lipid profile dynamics.

Materials and methods. The main group included 58 patients with IHD: 26 patients received 10 mg of atorvastatin and 32 patients received 40 mg of atorvastatin daily. Number of EPC (CD34+/CD133+/CD309+ phenotype) was measured by flow cytometry two times – before treatment and 3 months after. Vascular endothelial growth factor (VEGF), C-reactive protein (CRP), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), endostatin levels and lipid profile were also measured twice. The control group consisted of 10 healthy volunteers with the same analyzes performed once.

Results. The results showed that EPC levels were 4 times lower, VEGF levels were 52% higher and endostatin levels were 13% lower in IHD patients compared to healthy volunteers ($p < 0.05$). Atorvastatin therapy in IHD patients within three months of treatment caused a significant (on average 72%) increase of EPC levels ($p < 0.05$). EPC gain did not depend on statin dose, but it was higher when initial EPC values were low ($p = 0.01$). The therapy showed reliable levels reduction of VEGF – 11% ($p < 0.01$), CRP – 26% ($p < 0.01$), total cholesterol (TC) – 30% ($p < 0.01$), low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) – 35% ($p < 0.01$), triglycerides – 18% ($p < 0.01$), while endostatin, MCP-1 and high-density lipoprotein-cholesterol levels did not change. Correlations between EPC, TC and LDL-C changes during therapy were revealed: higher EPC levels gain was associated with higher TC ($p = 0.37$, $r < 0.01$) and LDL-C ($p = 0.41$, $r < 0.01$) levels decrease.

Conclusion. We found a significant increase of EPC levels in IHD patients treated with atorvastatin for 3 month without any significant difference depending on dosage. The EPC increase was higher in patients with smaller initial EPC levels and when higher TC and LDL-C decrease was achieved.

Keywords: endothelial progenitor cells, ischemic heart disease, atorvastatin, angiogenic factors.

Введение

Прогениторные клетки (стволовые клетки, клетки-предшественники) – это клетки иммунной системы, которые обладают способностью к самообновлению и дифференцировке в различные типы клеток. Эти клетки потенциально способны восстанавливать ткани человека при их повреждении [1, 2]. Эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК) – довольно разнородная популяция клеток, которые дифференцируются в эндотелиальные клетки [3]. Считается, что они участвуют в процессах восстановления эндотелия, формирования новых сосудов, подавлении атеросклеротических процессов [4, 5]. ЭПК участвуют в процессе васкулогенеза in situ как во время эмбрионального развития, так и у взрослых [6–8].

В 1997 году в работе Asahara T. et al. показано, что некоторые клетки, выделенные из костного мозга, могут быть использованы для репарации эндотелия сосудов и восстановления кровоснаб-

жения в ишемизированных тканях [9]. С этого момента выполнено множество экспериментальных работ, доказавших, что ЭПК оказывают влияние на ишемические процессы [10–15]. Тем не менее эти многообещающие данные не вполне подтвердились дальнейшими клиническими исследованиями. Несмотря на то, что низкий уровень циркулирующих ЭПК признается независимым фактором риска сердечно-сосудистых осложнений и может отражать недостаточность репарации эндотелия [16], механизмы участия ростовых факторов и ЭПК в восстановлении поврежденных тканей и формировании новых сосудов не вполне изучены до сих пор. Кроме того, несмотря на выявление множества различных классов ЭПК, из них не вполне определены пригодные терапевтически фенотипы, способные дифференцироваться исключительно в эндотелиальные клетки [17]. Так, все гематopoэтические 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 [18–20]. 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+ [21–25]. Ввиду такого разнообразия классов ЭПК в настоящее время имеется несколько наборов для выявления различных их фенотипов.

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) [26, 27]. VEGF оказывают множество эффектов на эндотелиальные клетки, связанных с ангиогенезом: повышение миграции, увеличение выживаемости клеток, продукция активаторов плазминогена и интерстициальных коллагеназ [28–30].

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 патогенетическую 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 [31–33].

К факторам, ингибирующим ангиогенез, относятся тромбоспондин, ангиостатин и эндостатин. В частности, эндостатин ингибирует пролиферацию эндотелиальных клеток, соответственно подавляя ангиогенез и рост опухолей [34–37].

Множество сердечно-сосудистых факторов риска, приводящих к дисфункции и апоптозу зрелого эндотелия, отрицательно влияют и на ЭПК. Это происходит вследствие механического (например, при артериальной гипертензии) и метаболического (сахарный диабет, гиперлипидемия) повреждения стенок сосудов [38–41]. Имеются данные, что число и активность циркулирующих ЭПК имеют обратную зависимость от наличия различных факторов риска [21, 42].

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 [43–45].

В связи с этим представляется актуальным изучить влияние терапии стандартными и высокими дозами статинов на содержание эндотелиальных прогениторных клеток и соотнести полученные изменения с динамикой факторов ангиогенеза. В нашем исследовании была поставлена задача оценить количество ЭПК и концентрации факторов ангиогенеза в цельной крови больных ИБС на фоне терапии аторвастатином в дозе 10 мг и в дозе 40 мг в сутки, а также у здоровых добровольцев, и сопоставить эти данные с динамикой липидного профиля.

Материалы и методы

В исследование включено 58 больных ИБС старше 18 лет, имеющих показания для приема статинов (холестерин липопротеидов низкой плотности (ХС ЛНП) $\geq 1,8$ ммоль/л) [46]. Исключались пациенты с острым коронарным синдромом (ОКС) или инфарктом миокарда (ИМ) менее чем 6-месячной давности, гемодинамически значимыми пороками сердца, недостаточностью кровоснабжения III–IV класса по NYHA, инфекционными заболеваниями, повышением уровня трансаминаз > 2 верхних границ нормы, а также пациенты после предшествующей (менее 6 месяцев назад) терапии статинами. Пациенты были разделены на две группы по результатам анализа ХС ЛНП: группа 1 включала пациентов с ХС ЛНП $< 4,4$ ммоль/л, которые принимали 10 мг аторвастатина ($n = 26$), группа 2 включала пациентов с ХС ЛНП $\geq 4,4$ ммоль/л, им была назначена доза аторвастатина 40 мг ($n = 32$) [46]. Всем пациентам проводилось стандартное клинико-лабораторное и инструментальное обследование, измерение содержания VEGF, СРБ, MCP-1 и эндостатина. Ключевым анализом в работе было определение ЭПК в цельной крови. 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 недифференцированные («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). Все измерения проводили двукратно – до начала терапии и через 3 месяца. Группу контроля составили 10 здоровых добровольцев, у которых указанные анализы проводились однократно. Клинические характеристики пациентов основной группы, подгрупп доз статина и контрольной группы приведены в табл. 1.

В основной группе 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 ($p > 0,3$).

Статистический анализ

Ввиду отсутствия нормального распределения (по критерию Шапиро–Уилка) в большинстве сравниваемых групп данные анализировались

непараметрическими методами: средние представлены в виде медианы (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 Бокса – Кокса).

Таблица 1. Клиническая характеристика групп больных ИБС и контрольной группы (здоровые добровольцы)

	ИБС (вся группа, n = 58)			Контроль (n = 10)	p
	Группа 1 (10 мг, n = 26)	Группа 2 (40 мг, n = 32)	p		
Мужчины	22 (38 %)			7 (70 %)	0,08**
	12 (46 %)	10 (31 %)	0,29**		
Возраст, лет	66 (55–70)			33 (31–41)	<0,01*
	61 (54–69)	67 (60–72)	0,15*		
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)	0,58*		
Обхват талии, см	97 (92–104)			76 (70–82)	<0,01*
	97 (87–107)	97 (92–103)	0,90*		
САД, мм рт. ст.	130 (120–140)			120 (120–125)	0,08*
	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)	0,53*
	68 (66–70)	70 (66–74)	0,15*		
Отягощенный семейный анамнез	42 (72 %)			1 (10 %)	<0,01**
	19 (73 %)	23 (72 %)	1,00**		
Курение	10 (17 %)			1 (10 %)	1,00**
	7 (27 %)	3 (9 %)	0,09**		
АГ	47 (81 %)			0 (0 %)	<0,01**
	20 (77 %)	27 (84 %)	0,52**		
СД	6 (10 %)			0 (0 %)	0,58**
	1 (4 %)	5 (16 %)	0,21**		
ИМ	7 (12 %)			0 (0 %)	0,58**
	4 (15 %)	3 (9 %)	0,69**		
Сопутствующая терапия	40 (69 %)			0 (0 %)	<0,01**
	20 (77 %)	20 (63 %)	0,27**		

Примечание: ИБС – ишемическая болезнь сердца; ИМТ – индекс массы тела; САД – систолическое артериальное давление; ДАД – диастолическое артериальное давление; ЧСС – частота сердечных сокращений; АГ – артериальная гипертония; СД – сахарный диабет; ИМ – инфаркт миокарда;
* Тест Манна – Уитни, ** точный тест Фишера.

Результаты

Сравнение содержания ЭПК фенотипа CD34+/CD133+/CD309+ на 10 мл цельной крови, числа лейкоцитов, концентрации VEGF, MCP-1, СРБ и эндостатина в группах больных ИБС и в контрольной группе приведено в табл. 2.

Было отмечено, что в группе пациентов с ИБС число ЭПК достоверно ниже, чем у здоровых добровольцев (рис. 1).

Также у больных ИБС по сравнению с добровольцами отмечено достоверно меньшее число лейкоцитов, более низкая концентрация эндостатина и более высокие уровни ОХС, ХС ЛНП, VEGF СРБ, глюкозы, а также СОЭ ($p < 0,05$). Достоверных

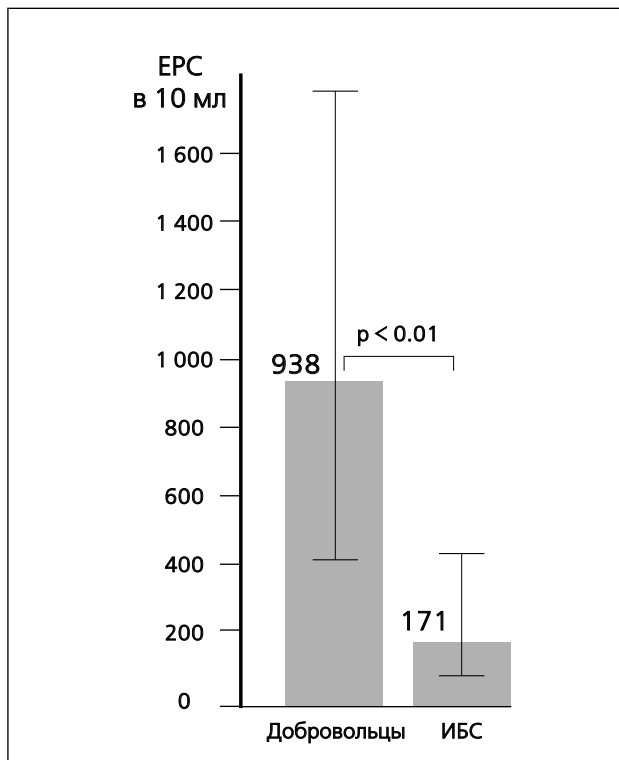
Таблица 2. Сравнение содержания исследуемых показателей в группах больных ИБС и контрольной группе

Показатель	ИБС (вся группа, n = 58)			Контроль (n = 10)	p*
	Группа 1 (10 мг, n = 26)	Группа 2 (40 мг, n = 32)	p*		
ЭПК, количество 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
	6,30 (5,89–6,71)	7,24 (6,88–8,21)	<0,01		
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
	4,24 (3,86–4,33)	5,12 (4,64–5,58)	<0,01		
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		
MCP-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		

Примечание: ИБС – ишемическая болезнь сердца; ЭПК – эндотелиальные прогениторные клетки; ОХС – общий холестерин; ХС ЛНП – холестерин липопротеидов низкой плотности; ХС ЛВП – холестерин липопротеидов высокой плотности; ТГ – триглицериды; VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста; MCP-1 – моноцитарный хемотаксический протеин-1; СРБ – С-реактивный белок; СОЭ – скорость оседания эритроцитов.

* Тест Манна – Уитни.

Рис. 1. Содержание ЭПК на 10 мл цельной крови у больных ИБС и здоровых добровольцев



Примечание: ИБС – ишемическая болезнь сердца; ЭПК – эндотелиальные прогениторные клетки.

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, кроме собственно критерия разделения по группам (ХС ЛНП) и, как следствие, уровня ОХС, ХС ЛНП.

При сравнении уровней ЭПК, VEGF и эндостатина у мужчин и женщин достоверных различий не выявлено. Также не выявлена связь этих факторов с перенесенным ранее ИМ, с выполненными коронарным шунтированием или коронарной ангиопластикой, с наличием отягощенного анамнеза, с индексом массы тела. При этом 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 ($p=0,043$). 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). Сахарный диабет как фактор еще более низкого содержания ЭПК (по сравнению с больными ИБС без СД) также почти достиг критериев достоверности ($p=0,066$). Достоверной взаимосвязи между содержанием ЭПК и общим числом лейкоцитов, концентрацией ОХС, ХС ЛНП, ХС ЛВП, ТГ, VEGF, эндостатина, МСР-1 и СРБ у больных ИБС до терапии статинами и у здоровых добровольцев обнаружено не было (табл. 3).

Таблица 3. Связь уровня ЭПК с изучаемыми параметрами у больных ИБС до терапии статинами и у здоровых добровольцев

Корреляция между ЭПК и показателями	ИБС (n = 58)		Контроль (n = 10)	
	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

Примечание: ИБС – ишемическая болезнь сердца; ЭПК – эндотелиальные прогениторные клетки; ОХС – общий холестерин; ХС ЛВП – холестерин липопротеидов высокой плотности; ХС ЛНП – холестерин липопротеидов низкой плотности; ТГ – триглицериды; СРБ – С-реактивный белок; r – коэффициент ранговой корреляции по Спирмену; p – уровень значимости для r.

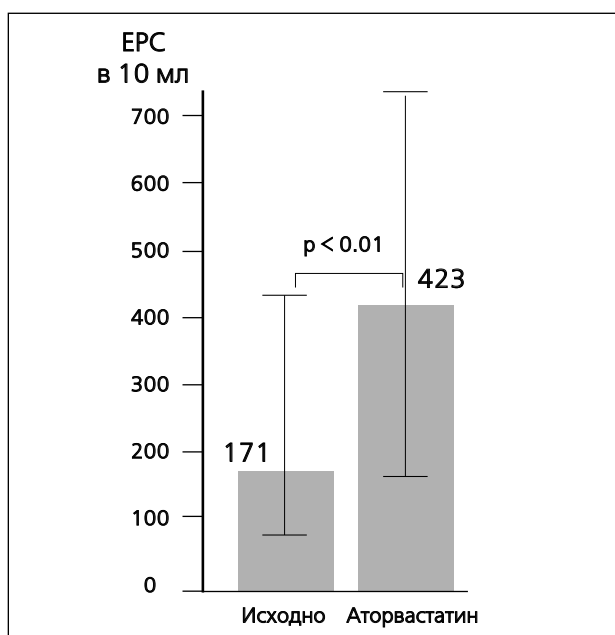
Результаты влияния приема аторвастатина в дозах 10 и 40 мг/сут в течение 3 месяцев на исследуемые параметры приведены в табл. 4.

На фоне терапии аторвастатином было выявлено достоверное увеличение числа ЭПК с 171 (77–435) до 423 (164–739), коэффициент прироста 1,72 (1,24–2,64) (рис. 2) и значимое снижение ОХС, ХС ЛНП, ТГ, VEGF и СРБ.

Не было выявлено достоверных различий в динамике уровней ЭПК, VEGF, эндостатина, МСР-1 и СРБ между группами на фоне приема разных доз аторвастатина. Что касается изменения на фоне терапии значений ОХС и ХС ЛНП, то сравнивать динамику этих показателей при разных дозах статина было бы некорректно в связи с тем, что доза назначалась исходя из значений ЛНП. В таких условиях исходные значения ЛНП могут являться столь же весомым фактором, влияющим на величину его снижения, как и доза статина. Чтобы проверить эту гипотезу, мы выполнили корреляционный анализ зависимости изменения ЛНП (кЛНП) от его исходной величины, отдельно в обеих группах (рис. 3).

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

Рис. 2. Динамика уровня ЭПК у больных ИБС ($n = 58$) на фоне терапии аторвастатином



Примечание: ИБС – ишемическая болезнь сердца; EPC – эндотелиальные прогениторные клетки.

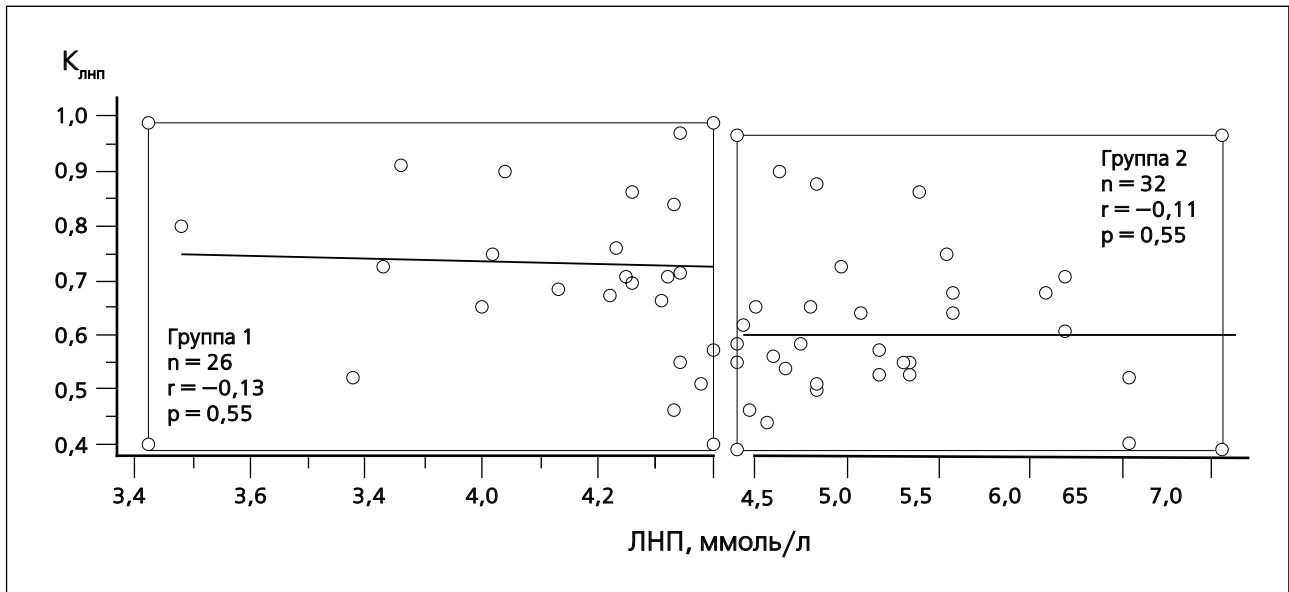
Таблица 4. Динамика изучаемых параметров на фоне приема аторвастатина 10 и 40 мг/сут

	ИБС ($n = 58$)		Группа 1 (10 мг, $n = 26$)		Группа 2 (40 мг, $n = 32$)		1–2
	k^1	p^2	k^1	p^2	k^1	p^2	
ЭПК	1,72 (1,24–2,64)	< 0,01	1,35 (1,14–2,33)	< 0,01	1,98 (1,38–3,50)	< 0,01	0,10
Лейкоциты	0,99 (0,92–1,07)	0,68	1,00 (0,94–1,06)	0,89	0,99 (0,89–1,08)	0,56	0,69
ОХС	0,70 (0,65–0,78)	< 0,01	0,78 (0,70–0,85)	< 0,01	0,66 (0,61–0,71)	< 0,01	–4
ХС ЛНП	0,65 (0,55–0,75)	< 0,01	0,72 (0,66–0,85)	< 0,01	0,58 (0,53–0,66)	< 0,01	–4
ХС ЛВП	0,99 (0,91–1,06)	0,31	1,03 (0,94–1,06)	0,85	0,98 (0,88–1,04)	0,15	0,19
ТГ	0,82 (0,62–0,96)	< 0,01	0,84 (0,74–1,00)	< 0,01	0,76 (0,56–0,92)	< 0,01	0,14
VEGF	0,89 (0,80–1,01)	< 0,01	0,89 (0,83–0,96)	< 0,01	0,88 (0,78–1,03)	0,016	0,99
Эндостатин	0,97 (0,90–1,06)	0,22	1,00 (0,92–1,09)	0,97	0,96 (0,86–1,03)	0,11	0,28
МСР-1	0,99 (0,89–1,10)	0,42	0,97 (0,87–1,08)	0,32	1,01 (0,91–1,10)	0,81	0,45
СРБ	0,74 (0,53–1,00)	< 0,01	0,84 (0,61–1,00)	0,057	0,72 (0,50–0,95)	< 0,01	0,31
Глюкоза	1,00 (0,93–1,05)	0,72	0,99 (0,95–1,10)	0,44	1,00 (0,9–1,04)	0,31	0,21
СОЭ	1,00 (0,80–1,33)	0,70	0,91 (0,75–1,13)	0,37	1,00 (0,81–1,38)	0,91	0,49

Примечание: ИБС – ишемическая болезнь сердца; ЭПК – эндотелиальные прогениторные клетки; ОХС – общий холестерин; ХС ЛВП – холестерин липопротеидов высокой плотности; ХС ЛНП – холестерин липопротеидов низкой плотности; ТГ – триглицериды; СРБ – С-реактивный белок; СОЭ – скорость оседания эритроцитов;

¹ k – коэффициент изменения показателя (1,72 означает увеличение показателя на 72%, 0,63 – снижение на 37% и т.д.); ² тест Уилкоксона; ³ тест Манна – Уитни (сравнение k в группах 1 и 2); ⁴ сравнение неприменимо, так как группы значимо различались по ОХС и ХС ЛНП, см. далее.

Рис. 3. Связь исходных значений ЛНП и его изменения на фоне терапии аторвастатином в дозе 10 мг (группа 1) и 40 мг (группа 2)



Примечание: ЛНП – липопротеиды низкой плотности; n – количество человек в группе; r – коэффициент ранговой корреляции по Спирмену; p – уровень значимости для r .

корреляций. Это дает основания предполагать, 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 исходным значениям ЛНП и ОХС – ниже медианы и выше медианы, после чего провели над

полученными четырьмя группами двухфакторный дисперсионный анализ. Статистическое отсутствие различий групп 1 и 2 по уровню ЭПК ($p = 0,33$, см. табл. 2) могло быть вызвано большим разбросом значений, поэтому аналогичная группировка и анализ были выполнены и для уровня ЭПК. Результаты приведены в табл. 5.

Таблица 5. Влияние дозы статина и исходного уровня ЭПК, ОХС и ЛНП на их динамику

Гипотеза: на динамику параметра влияет	Параметр					
	ОХС		ЛНП		ЭПК	
	p	результат	p	результат	p	результат
Исходное значение параметра	0,99	Ложно	0,43	Ложно	0,01	Истинно
Доза статина	< 0,01	Истинно	< 0,01	Истинно	0,38	Ложно

Примечание: ОХС – общий холестерин; ЛНП – липопротеиды низкой плотности; ЭПК – эндотелиальные прогениторные клетки.

Таким образом, было подтверждено, что исходные значения ОХС и ЛНП не влияли на степень их снижения в результате терапии. Этот результат дает нам право даже в группах, различавшихся по этим двум параметрам, все же оценить независимое влияние на их снижение основного фактора (дозы статина). Результаты теста Манна – Уитни ожидаемо указывали на достоверно большее снижение ОХС и ЛНП в группе 2 (40 мг), чем в группе 1 (10 мг), для

обоих показателей $p < 0,01$. В то же время прирост ЭПК, как следует из табл. 5, 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. Выполнен корреляционный анализ связи между приростом ЭПК и снижением ХС ЛНП и ОХС, а также динамикой

Таблица 6. Связь между повышением уровня ЭПК и динамикой показателей липидного профиля на фоне терапии аторвастатином 10 и 40 мг/сут

Корреляция между повышением уровня ЭПК (кЭПК) и изменением показателей липидного профиля	ИБС (n = 58)		Группа 1 (10 мг, n = 26)		Группа 2 (40 мг, n = 32)	
	r	p	r	p	r	p
ОХС (снижение)	0,37	<0,01	0,52	<0,01	0,21	0,26
ХС ЛНП (снижение)	0,41	<0,01	0,44	0,03	0,26	0,15
ХС ЛВП (изменение недостоверно)	0,00	1,00	0,06	0,78	-0,03	0,87
ТГ (снижение)	0,00	0,98	0,09	0,67	-0,09	0,63

Примечание: ОХС – общий холестерин; ХС ЛВП – холестерин липопротеидов высокой плотности; ХС ЛНП – холестерин липопротеидов низкой плотности; ТГ – триглицериды; ИБС – ишемическая болезнь сердца; n – количество человек в группе; r – коэффициент ранговой корреляции по Спирмену; p – уровень значимости для r.

ХС ЛВП и ТГ в группах 1 и 2 на фоне терапии аторвастатином. Отмечено, что прирост ЭПК прямо пропорционален снижению ХС ЛНП и ОХС, результаты приведены в табл. 6.

Обсуждение и выводы

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, ОХС и ХС ЛНП на фоне терапии: 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. Используемая нами методика позволяла выявлять редкий фенотип «молодых» ЭПК, однако это требовало мероприятий по усилению чувствительности цитометрии. Возможно, этим и можно объяснить

большой разброс полученных значений уровня ЭПК как у добровольцев, так и у больных ИБС – от 100 до 2000 клеток на 10 мл крови. Такой разброс приводил к статистически недостоверным результатам в тех группах, где при других условиях, возможно, были бы выявлены достоверные различия и зависимости. Так, дозозависимость прироста ЭПК на фоне терапии аторвастатином имела уровень достоверности $p = 0,10$, повышенный уровень ЭПК в группе курильщиков – $p = 0,053$, пониженный уровень ЭПК у больных с СД – $p = 0,066$. В группе курящих больных ИБС отмечены более высокие уровни ЭПК и VEGF, а также достоверно более низкие уровни эндостатина. Эти результаты противоречат некоторым литературным данным и требуют дальнейшего исследования. Возможно, такое повышение проангиогенных факторов является временным включением резервов организма, которое возникает в ответ на курение как дополнительный фактор повреждения сосудистой системы.

Повышение уровня ЭПК различных фенотипов на фоне терапии статинами – известный факт, продемонстрированный в ряде работ [43–45]. Однако оставалось неясным, является ли это стимулирующее влияние статинов на прогениторные клетки дозозависимым. 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. Подобные различия отражены и в недавно опубликованном обзоре, показавшем, что у больных с заболеваниями, обусловленными атеросклерозом коронарных артерий, уровень ЭПК снижается [47]. Однако, несмотря на то, что статинотерапия приводит к увеличению уровня

ЭПК [48–50], механизмы, лежащие в основе этого эффекта, до конца не выяснены. Их изучению и была посвящена наша работа.

В клинических исследованиях предпринимаются попытки использовать тот факт, что статинотерапия ведет к повышению уровня ЭПК. Так, в исследовании ARMIDA продемонстрирован положительный эффект от интенсивной статинотерапии перед чрескожным коронарным вмешательством (ЧКВ) [51]. В новом исследовании HIPOCRATES (2015 г.) изучается влияние терапии статинами в высоких дозах на эндотелизацию стента [52]. Авторы подчеркивают, что положительные плейотропные эффекты статинов, улучшающие исходы реваскуляризации миокарда и не связанные с гиполипидемическим их действием, до конца не изучены. Авторы предположили, что повышение ЭПК может нивелировать повреждение эндотелия, происходящее в процессе имплантации стента. В работу включали статин-наивных пациентов или же больных, нерегулярно принимающих малые дозы статинов. Это были пациенты средней возрастной группы со стабильной или нестабильной стенокардией, направленные на эндоваскулярное лечение ($n=23$). Пациенты были рандомизированы на 2 группы – высоких доз статинов (80 мг за день до ЧКВ, 40 мг аторвастатина за 2–4 часа до ЧКВ) и низких доз статина. Уровень ЭПК был измерен непосредственно перед ЧКВ и через 24 часа после. Измерение проводили методом цитофлуориметрии за счет экспрессии VEGFR-2+/CD133+ и VEGFR-2+/CD34+. Количественный анализ проводили после 7 дневного культивирования клеток, составляющих колониобразующий пул – colony forming units (CFUs). Уровень ЭПК-CFUs перед ЧКВ был выше у пациентов группы высоких доз аторвастатина – $165,8 \pm 58,8$ против $111,7 \pm 38,2$ CFUs, $p < 0,001$. Однако через 24 часа уровень ЭПК между группами значимо не отличался – $188,0 \pm 85,3$ и $192,9 \pm 66,5$ CFUs соответственно, $p=0,15$. Авторы затрудняются объяснить полученные результаты и планируют дальнейшие исследования. Результаты нашего исследования подтверждают вторую часть вышеописанной работы – при длительной терапии статинами отсутствует разница в приросте количества ЭПК на фоне интенсивной терапии и терапии статинами в низких дозах. Малое количество пациентов в работе HIPOCRATES (обусловленное, вероятно, трудоемкостью измерения ЭПК) не позволяет достоверно говорить, действительно ли повышение ЭПК носит двухфазный характер – сначала на высоких дозах статинов происходит более выраженное повышение их количества, чем на низких, но затем идет спад прироста – или же это ошибка малой выборки. Не получен ответ на вопрос, за счет каких механизмов происходит снижение количества осложнений при ЧКВ на фоне интенсивной статинотерапии [52]. Результаты нашего исследования также не отвечают на данный во-

прос. Это в какой-то мере соответствует и результатам клинических исследований (TNT, IDEAL), в которых клиническое преимущество высоких доз статинов перед умеренными находилось на грани достоверности [53, 54].

Влияние статинотерапии на количество ЭПК, а также на уровень факторов ангиогенеза изучалось и у пациентов с сахарным диабетом. Так, на 34 больных было показано, что терапия статинами уже в ранний период (пять дней) приводит к увеличению уровня ЭПК, однако не влияет на уровень высокочувствительного СРБ, VEGF, SDF-1, G-CSF [55]. В нашей работе на фоне терапии отмечено снижение уровня СРБ и VEGF. Данное несоответствие, вероятно, связано с длительностью терапии – снижение СРБ и VEGF, по-видимому, происходит при длительной терапии статинами, пяти дней для значимого изменения их уровня оказывается недостаточно. В то же время в компетентном обзоре клинических исследований (Blum, 2014) автор подчеркивает, что влияние статинов на эндотелиальную функцию и факторы воспаления можно выявить даже через несколько часов после терапии. Эти изменения не связаны с липидснижающим действием, а обусловлены другими механизмами, в частности, восстановлением функции эндотелия, которое, скорее всего, обусловлено высвобождением ЭПК из костного мозга [56].

В 2014 г. Antonio N. et al. была выполнена работа, в которой на 100 больных с ИМ изучались различия в повышении уровня ЭПК на фоне терапии статинами в высоких и низких дозах [57]. Проведен анализ прироста уровня данных клеток у пациентов, которые исходно находились на низких дозах статинов (и у статин-наивных пациентов) при переходе на высокие дозы. Измеряли уровень ЭПК (CD45dimCD34+KDR+) через 24 ч. и через 2 месяца после ИМ. У больных, ранее принимавших малые дозы статинов, уровень ЭПК был значимо выше по сравнению со статин-наивными пациентами ($p=0,031$). Кроме того, анализ подгруппы больных с СД ($n=38$) также продемонстрировал, что у пациентов, исходно принимавших статины, выше уровень как CD45dim/CD34+/KDR+/CXCR4+ ($p=0,024$), так и CD45dim/CD34+/KDR+/CD133+ ($p=0,022$), чем у статин-наивных. Через 3 месяца был выявлен более высокий прирост уровня ЭПК в группе интенсивной статинотерапии. Результаты нашего исследования не выявили подобных различий. Это может быть обусловлено как различиями в нозологии (в нашей работе были включены больные со стабильной ИБС, а в работе Antonio N. et al. – с ИМ), так и различиями в методике (мы измеряли уровень ЭПК фенотипа CD34+/CD133+/CD309+). С другой стороны, наши результаты подтверждаются исследованием Pesaro A. E. et al., в котором было показано, что у больных со стабильной ИБС увеличение дозы симвастатина с 20 до 80 мг или добавление к симвастатину эзетимиба не приводит к увеличению количества ЭПК [58].

Несмотря на продолжающееся изучение роли ЭПК и влияния на них статинотерапии, при назначении статинов в первую очередь руководствуются достижениями целевых уровней ХС ЛНП. Для ответа на вопрос о клиническом применении информации о влиянии разных доз статинов на ЭПК требуются дальнейшие исследования.

Конфликт интересов

Конфликт интересов отсутствует.

Список литературы

1. Van Os R, Kamminga LM, de Haan G. Stem cell assays: something old, something new, something borrowed. *Stem Cells*. 2004;22(7):1181-90.
2. Xu Q. Stem cells and transplant arteriosclerosis. *Circ Res*. 2008;102(9):1011-24.
3. Xu Q. The impact of progenitor cells in atherosclerosis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006;3(2):94-101.
4. Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(9):1584-95.
5. Zampetaki A, Kirton JP, Xu Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res*. 2008;78(3):413-21.
6. Tepper OM, Capla JM, Galiano RD, Ceradini DJ, Callaghan MJ, Kleinman ME, Gurtner GC. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood*. 2005;105(3):1068-77.
7. Reyes M, Dudek A, Jabagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest*. 2002;109(3):337-46. PMID: 150857.
8. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Wagner M, Isner JM, Asabara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. 1999;5(4):434-8.
9. Asabara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenzichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275(5302):964-7.
10. Higashi Y, Kimura M, Hara K, Noma K, Jitsuiki D, Nakagawa K, Oshima T, Chayama K, Sueda T, Goto C, Matsubara H, Murohara T, Yoshizumi M. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia. *Circulation*. 2004;109(10):1215-8.
11. Asabara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*. 1999;18(14):3964-72. PMID: 1171472.
12. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asabara T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(7):3422-7. PMID: 16255.
13. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001;103(23):2776-9.
14. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest*. 1994;93(2):662-70. PMID: 293894.
15. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360(9331):427-35.
16. Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U, Dimmeler S, Zeiber AM. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation*. 2005;111(22):2981-7.
17. Werner N, Nickenig G. Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells: limitations for therapy? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(2):257-66.
18. Yoder MC. Defining human endothelial progenitor cells. *J Thromb Haemost*. 2009;7 Suppl 1:49-52.
19. Gallacher L, Murdoch B, Wu DM, Karanu FN, Keeney M, Bhatia M. Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood*. 2000;95(9):2813-20.



20. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003;348(7):593-600.
21. Schmeisser A, Garlichs CD, Zhang H, Eskafi S, Graffy C, Ludwig J, Strasser RH, Daniel WG. Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res.* 2001;49(3):671-80.
22. Fujiyama S, Amano K, Uebira K, Yoshida M, Nishiwaki Y, Nozawa Y, Jin D, Takai S, Miyazaki M, Egashira K, Imada T, Iwasaka T, Matsubara H. Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circ Res.* 2003;93(10):980-9.
23. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood.* 1996;87(1):1-13.
24. Sbalaby F, Ho J, Stanford WL, Fischer KD, Schub AC, Schwartz L, Bernstein A, Rossant J. A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell.* 1997;89(6):981-90.
25. Friedrich EB, Walenta K, Scharlau J, Nickenig G, Werner N. CD34-/CD133+/VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities. *Circ Res.* 2006;98(3):20-5.
26. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ibling C, Technau-Ibling K, Zeiber AM, Dimmeler S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med.* 2003;9(11):1370-6.
27. Zhang Q, Yin H, Liu P, Zhang H, She M. Essential role of HDL on endothelial progenitor cell proliferation with PI3K/Akt/cyclin D1 as the signal pathway. *Exp Biol Med (Maywood).* 2010;235(9):1082-92.
28. Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vladavsky I, Kesbet E, Neufeld G. VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem.* 1997;272(11):7151-8.
29. Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE.* 2001;2001(112):21.
30. Rissanen TT, Markkanen JE, Gruchala M, Heikura T, Puranen A, Kettunen MI, Kholova I, Kauppinen RA, Achen MG, Stacker SA, Alitalo K, Yla-Herttuala S. VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circ Res.* 2003;92(10):1098-106.
31. Lin J, Kakkar V, Lu X. Impact of MCP-1 in atherosclerosis. *Curr Pharm Des.* 2014;20(28):4580-8.
32. Cavallera M, Frangogiannis NG. Targeting the chemokines in cardiac repair. *Curr Pharm Des.* 2014;20(12):1971-9.
33. Yadav A, Saini V, Arora S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin Chim Acta.* 2010;411(21-22):1570-9.
34. Hanaban D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996;86(3):353-64.
35. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell.* 1994;79(2):315-28.
36. Rebn M, Pibljaniemi T. Alpha 1(XVIII), a collagen chain with frequent interruptions in the collagenous sequence, a distinct tissue distribution, and homology with type XV collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(10):4234-8. PMID: 43759.
37. Fu Y, Wu X, Han Q, Liang Y, He Y, Luo Y. Sulfate stabilizes the folding intermediate more than the native structure of endostatin. *Arch Biochem Biophys.* 2008;471(2):232-9.
38. Robde E, Malischuk C, Thaler D, Maierhofer T, Linkesch W, Lanzer G, Guelly C, Strunk D. Blood monocytes mimic endothelial progenitor cells. *Stem Cells.* 2006;24(2):357-67.
39. Руда ММ, Арефьева ТИ, Соколова АВ, Шестакова МВ, Карпов ЮА, Парфенова ЕВ. Циркулирующие предшественники эндотелиальных клеток при нарушенном углеводном обмене у больных ишемической болезнью сердца. Сахарный диабет. 2010;1:13-20. Russian (Ruda MM, Aref'eva TI, Sokolova AV, Shestakov MV, Karpov YA, Parfenova EV. Circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary heart disease and impaired carbohydrate metabolism. *Diabetes mellitus.* 2010; 1: 13-20).
40. Талицкий КА, Булкина ОС, Арефьева ТИ, Воробьева ОН, Левицкий ИВ, Федорович АА, Макаревич ПИ, Парфенова ЕВ, Карпов ЮА. Эффективность терапевтического ангиогенеза у больных с хронической ишемией нижних конечностей. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011;VI(3):1-10. Russian (Talitsky KA, Bulkina OS, Aref'eva TI, Vorobyova ON, Levitsky IV, Fedorovich AA, Makarevich PI, Parfenova EV, Karpov YuA. Efficiency of therapeutic angiogenesis in patients with chronic lower limb ischemia. *Cell transplantation and tissue engineering.* 2011;VI(3):1-10).
41. Сергиенко ИВ, Масенко ВП, Семенова АЕ, Габрусенко СА, Наумов ВГ, Беленков ЮН. Влияние реваскуляризации миокарда на динамику факторов ангиогенеза у больных ишемической болезнью сердца. Кардиология. 2009;49(12):4-10. Russian (Sergienko IV, Masenko VP, Semenova AE, Gabrusenko SA, Naumov VG, Belenkov IuN. Effect of myocardial revascularization on dynamics of factors of angiogenesis in patients with ischemic heart disease. *Kardiologiya.* 2009;49(12):4-10).
42. Petit I, Jin D, Rafii S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol.* 2007;28(7):299-307. PMID: 2952492.

43. Henrich D, Seebach C, Wilhelm K, Marzi I. High dosage of simvastatin reduces TNF-alpha-induced apoptosis of endothelial progenitor cells but fails to prevent apoptosis induced by IL-1beta in vitro. *J Surg Res.* 2007;142(1):13-9.
44. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiber AM, Dimmeler S. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation.* 2001;103(24):2885-90.
45. Mangialardi G, Monopoli A, Ongini E, Spinetti G, Fortunato O, Emanuelli C, Madeddu P. Nitric oxide-donating statin improves multiple functions of circulating angiogenic cells. *Br J Pharmacol.* 2011;164(2b):570-83. PMID: 3188894.
46. Clem JR, Strain JD, Farver DK. Individualized initiation of statin therapy determined by baseline LDL-C: Are you more likely to achieve goal LDL-C? *Risk Manag Healthc Policy.* 2010;3:1-11. PMID: 3270916.
47. Psaltis PJ, Simari RD. Vascular Wall Progenitor Cells in Health and Disease. *Circ Res.* 2015;116(8):1392-412.
48. Ye H, He F, Fei X, Lou Y, Wang S, Yang R, Hu Y, Chen X. High-dose atorvastatin reloading before percutaneous coronary intervention increased circulating endothelial progenitor cells and reduced inflammatory cytokine expression during the perioperative period. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2014;19(3):290-5.
49. Banerjee S, Abu Fadel M, Sarode R, Terada L, Moritz T, Luo P, Hastings J, Brilakis ES, Reda D. Plaque regression and progenitor cell mobilization with intensive lipid elimination regimen (PREMIER) trial design. *J Clin Apher.* 2014;29(2):97-106.
50. Hibbert B, Simard T, Ramirez FD, Pourdjabbar A, Raizman JE, Maze R, Wilson KR, Hawken S, O'Brien ER. The effect of statins on circulating endothelial progenitor cells in humans: a systematic review. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2013;62(5):491-6.
51. Di Sciascio G, Patti G, Pasceri V, Gaspardone A, Colonna G, Montinaro A. Efficacy of atorvastatin reload in patients on chronic statin therapy undergoing percutaneous coronary intervention: results of the ARMYDA-RECAPTURE (Atorvastatin for Reduction of Myocardial Damage During Angioplasty) Randomized Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54(6):558-65.
52. Eisen A, Lesbem-Lev D, Yavin H, Orvin K, Mager A, Rechavia E, Bental T, Dadush O, Battler A, Kornowski R, Lev EI. Effect of High Dose Statin Pretreatment on Endothelial Progenitor Cells After Percutaneous Coronary Intervention (HIPOCRATES Study). *Cardiovasc Drugs Ther.* 2015.
53. Waters DD, Guyton JR, Herrington DM, McGowan MP, Wenger NK, Shear C. Treating to New Targets (TNT) Study: does lowering low-density lipoprotein cholesterol levels below currently recommended guidelines yield incremental clinical benefit? *Am J Cardiol.* 2004;93(2):154-8.
54. Pedersen TR, Faergeman O, Kastelein JJ, Olsson AG, Tikkanen MJ, Holme I, Larsen ML, Bendixsen FS, Lindahl C, Szarek M, Tsai J. High-dose atorvastatin vs usual-dose simvastatin for secondary prevention after myocardial infarction: the IDEAL study: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2005;294(19):2437-45.
55. Fadini GP, Rigato M, Boscari F, Cappellari R, Menegazzo L, Pilutti C, Iori E, Marescotti M, Plebani M, Albiero M, Avogaro A. Short-term statin discontinuation increases endothelial progenitor cells without inflammatory rebound in type 2 diabetic patients. *Vascul Pharmacol.* 2014.
56. Blum A. HMG-CoA reductase inhibitors (statins), inflammation, and endothelial progenitor cells-New mechanistic insights of atherosclerosis. *Biofactors.* 2014;40(3):295-302.
57. Antonio N, Fernandes R, Soares A, Soares F, Lopes A, Carvalheiro T, Paiva A, Pego GM, Providencia LA, Goncalves L, Ribeiro CF. Impact of prior chronic statin therapy and high-intensity statin therapy at discharge on circulating endothelial progenitor cell levels in patients with acute myocardial infarction: a prospective observational study. *Eur J Clin Pharmacol.* 2014;70(10):1181-93.
58. Pesaro AE, Serrano CV, Jr., Katz M, Marti L, Fernandes JL, Parra PR, Campos AH. Increasing doses of simvastatin versus combined ezetimibe/simvastatin: effect on circulating endothelial progenitor cells. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2013;18(5):447-52.