

# Лечение цитиколином увеличивает содержание циркулирующих предшественников эндотелиальных клеток при остром ишемическом инсульте

## Введение

Принято считать, что циркулирующие предшественники эндотелиальных клеток (ЦПЭК) являются маркерами сердечно-сосудистого риска и отражают состояние функции эндотелия (J. Hill et al., 2003; N. Werner et al., 2005). У пациентов с цереброваскулярной патологией описано снижение количества ЦПЭК (U. Ghani et al., 2005). С другой стороны, увеличение числа ЦПЭК после острого ишемического инсульта (ОИИ) ассоциируется с меньшими размерами инфарктной зоны, хорошей неврологической динамикой и восстановлением функций (T. Sobrino et al., 2007; H. Yip et al., 2008; K. Chu et al., 2008). Кроме того, результаты экспериментальных и клинических исследований свидетельствуют о том, что ЦПЭК могут опосредовать регенерацию эндотелиальных клеток и образование новых кровеносных сосудов (T. Asahara et al., 1997; N. Werner et al., 2003; D. Kong et al., 2004; N. Werner et al., 2006), в частности участвовать в церебральном неангиогенезе у взрослых пациентов, перенесших ишемию головного мозга (Z. Zhang et al., 2002). Это вазопротекторное действие обусловлено пролиферацией ЦПЭК.

CDP-холин (цитиколин, Цераксон) – нейротропный, который, помимо прочих эффектов, обладает также способностью повышать содержание фосфатидилхолина и сфингомиелина в клеточной мембране нейронов в 1-е сутки постинсультной реперфузии (R. Adibhatla et al., 2001). Согласно экспериментальным данным, длительная терапия CDP-холином, начатая в 1-е сутки после развития ОИИ, улучшает пластические свойства головного мозга и стимулирует его функциональное восстановление (O. Hurtado et al., 2007). Назначение пероральной формы цитиколина в первые 24 ч от момента возникновения среднетяжелого и тяжелого ОИИ повышает вероятность полного восстановления пациента через 3 мес (A. Davalos et al., 2002).

Цель настоящего исследования состояла в изучении влияния цитиколина на концентрацию ЦПЭК у больных, пребывающих в острой фазе ОИИ.

## Методы

Данное проспективное исследование было организовано для того, чтобы выяснить прогностическую значимость ЦПЭК для оценки функциональных исходов у пациентов, пребывающих в острой фазе ОИИ (T. Sobrino et al., 2007). Вторичный анализ, результаты которого приведены в настоящей публикации, посвящен способности цитиколина увеличивать концентрацию ЦПЭК.

## Дизайн исследования

В период между сентябрем 2005 г. и июнем 2006 г. проспективно оценивали 100 пациентов с ОИИ на предмет включения их в настоящее исследование.

Больные должны были удовлетворять следующим критериям: развитие в течение последних 12 ч первого в жизни нелакунарного мозгового инфаркта с поражением только одного полушария в бассейне среднемозговой артерии; неограниченная повседневная активность на момент возникновения ОИИ. Исключали пациентов с хроническими воспалительными процессами (n=6), тяжелым поражением печени и почек (n=1), болезнями крови (n=4), онкологической патологией (n=3) и инфекционными заболеваниями, имевшими место за ≤15 дней до включения (n=22). Восемь больных не дали согласия на участие в исследовании, шесть пациентов выбыли из-под наблюдения. Таким образом, окончательно в исследование вошли 48 больных (50% – лица мужского пола, средний возраст – 70,7±10,1 года).

Все исследования, проводившиеся с участием людей, выполнялись в соответствии с Хельсинской декларацией. Протокол испытания был одобрен этическим комитетом. Больные или их родственники давали информированное согласие на участие в исследовании.

## Терапия цитиколином

Цитиколин (Цераксон) назначали перорально (или через назогастральный зонд) в суточной дозе 2000 мг. Терапию начинали в первые 24 ч от развития ОИИ. При выписке всем больным был рекомендован прием цитиколина в дозе 2000 мг/сут. Длительность лечения цитиколином составляла 6 нед.

## Клинические особенности

Все пациенты поступали в отделение терапии ОИИ, где инсультная команда специалистов оказывала медицинскую помощь в соответствии с рекомендациями Группы по изучению цереброваскулярной патологии при Испанском обществе неврологов (E. Diez Tejedor, 2004).

В историю болезни пациента вносились данные о наличии факторов сосудистого риска, результаты лабораторного исследования крови и коагулограммы, вкладывались электрокардиограмма; снятая в 12 отведениях, рентгенограмма органов грудной клетки и сонограмма сонных артерий. ОИИ, согласно критериям TOAST (H. Adams et al., 1993), подразделяли на атеротромботический (n=8), кардиоэмболический (n=21) и неопределенный (n=19). Четырнадцать пациентам, соответствующим критериям SITS-MOST, проводили тромболитическую терапию с помощью рекомбинантного активатора тканевого плазминогена (rt-PA).

Тяжесть ОИИ оценивал квалифицированный невролог, используя для этого шкалу NIHSS. Оценку осуществляли при поступлении, через 72±24 ч, 7±1 и 90±7 сут. Функциональные исходы определяли спустя 3 мес посредством

модифицированной шкалы Rankin (mRS). Хороший функциональный исход констатировали при mRS ≤2.

## Нейровизуализация

Всем больным при поступлении, а также на 4-7-е сутки проводили магнитно-резонансную томографию. Объем поражения вычисляли с помощью сегментарного метода. Периметр площади аномальной интенсивности сигнала переводился на диффузионно-взвешенное изображение либо карту восстановления. Специальная волюметрическая программа, используя толщину и переведенную площадь каждого среза, оценивала общий объем поражения. Выбирались такие уровень и ширина окна, которые обеспечивали наиболее оптимальный контраст зоны повреждения по отношению к окружающей его здоровой ткани. Каждый из расчетов объема проводился трижды. В качестве окончательного результата принимали среднеарифметическое значение для трех величин.

Все нейровизуализирующие исследования выполнялись одним и тем же специалистом-рентгенологом, которому не были известны особенности клинического статуса пациента и результаты его лабораторного обследования.

## Изоляция, культивирование и изучение ЦПЭК

Изучение ЦПЭК проводили с помощью методов, описанных ранее (T. Sobrino et al., 2007). В общем виде данный протокол можно представить следующим образом. Для изоляции колоний ЦПЭК производили забор 14 мл венозной крови. Кровь подвергалась исследованию не позднее 1 ч от момента забора. Исследование проводил специалист, которому не были известны клинические и рентгенологические данные пациента. Вначале из образца крови посредством равновесного центрифугирования клеток в градиенте плотности фикола изолировали мононуклеары. Далее в имеющую 6 отверстий и покрытую фибронектином

Таблица 1. Исходные клинические особенности, факторы сосудистого риска, тип инсульта, биохимические показатели и данные магнитно-резонансной томографии головного мозга у больных, получавших различную терапию

Показатель	Без цитиколина и rt-PA (n=22)	Цитиколин (n=26)		P	
		без rt-PA (n=12)	с rt-PA (n=14)		
Возраст, лет	71,5±10,7	71,4±14,9	69,8±10,1	0,875	
Мужской пол, %	45,5	56,7	42,9	0,406	
Время от момента развития ОИИ, мин	297,3±50,9	263,5±68,7	154,3±13,8	<0,0001	
Факторы сосудистого риска	Артериальная гипертензия, %	68,2	66,7	74,2	0,618
	Сахарный диабет, %	31,8	33,3	31,4	0,748
	Дислипидемия, %	36,4	33,3	35,7	0,703
	Курение, %	9,1	7,1	16,7	0,334
	Фибрилляция предсердий, %	27,3	25,0	50,0	0,288
Основные физиологические показатели и биохимические тесты	Температура тела, °C	36,7±0,5	36,5±0,8	36,4±0,2	0,106
	Систолическое АД, мм рт. ст.	142,5±23,4	140,3±17,8	142,8±19,9	0,177
	Диастолическое АД, мм рт. ст.	83,3±13,3	83,1±9,2	81,1±14,4	0,870
	Глюкоза, мг/дл	130,7±45,4	127,4±26,5	120,9±30,6	0,157
	Фибриноген, мг/дл	457,8±134,2	411,3±120,6	375,3±117,5	0,164
Клинические особенности	NIHSS при поступлении, баллов	9 (6, 18)	6 (4, 14)	8 (6, 17)	0,109
	NIHSS через 3 мес, баллов	8 (2, 16)	4 (1, 13)	0 (0, 4)	0,003
	mRS через 3 мес, баллов	2 (2, 4)	1 (0, 3)	0 (0, 2)	0,012
	Атеротромботический ОИИ, %	11,1	15,4	13,1	0,813
	Кардиоэмболический ОИИ, %	44,4	38,5	43,8	
	Неопределенный ОИИ, %	44,4	46,2	50,0	
Данные нейровизуализации	Объем поражения при поступлении, см <sup>3</sup>	27,4±16,8	27,6±34,9	20,7±25,3	0,581
	Объем поражения на 4-7-е сутки, см <sup>3</sup>	56,5±30,0	37,9±48,9	22,4±26,9	0,048
Характеристики ЦПЭК	Количество CFU-EC при поступлении	9,1±7,3	7,7±6,1	8,9±4,2	0,819
	Прирост CFU-EC за 1-ю неделю наблюдения	0,9±10,2	8,4±8,1	35,4±15,9	<0,0001
	Количество CFU-EC через 3 мес	12,3±9,2	29,5±21,8	45,5±24,2	<0,0001

Примечание. АД – артериальное давление.

чашку Петри со средой EndoCult, содержащей пенициллин (100 ед/мл) и стрептомицин (100 мг/мл), помещали 5 млн/отв. мононуклеаров. Благодаря этому происходила элиминация прилипших клеток (зрелых эндотелиоцитов и моноцитов). Через 2 сут 1 млн неприлипших клеток (в т. ч. ЦПЭК) помещали на имеющую 24 отверстия и покрытую фибронектином тарелку со средой EndoCult. Спустя 3 сут подсчитывали количество выросших колоний и выделяли колониеобразующие эндотелиоцитарные единицы с ранним наружным ростом (CFU-EC), которые состоят из округлых клеток, расположенных по центру, и продолговатых отростчатых клеток, находящихся на периферии (рис.). Количество CFU-EC определяли при поступлении, а также на 7±1-е и 9±7-е сутки. Прирост колоний ЦПЭК за 1-ю неделю наблюдения рассчитывали как разницу между количеством CFU-EC на 7-е сутки и при поступлении. Генез эндотелиальных клеток подтверждали с помощью методики, описанной ранее (T. Asahara et al., 1997; J. Hill et al., 2003; U. Ghani et al., 2005). Коэффициент корреляции между результатами, полученными одним исследователем в 2 разных образцах крови, принадлежащих одному пациенту, составил 0,96.

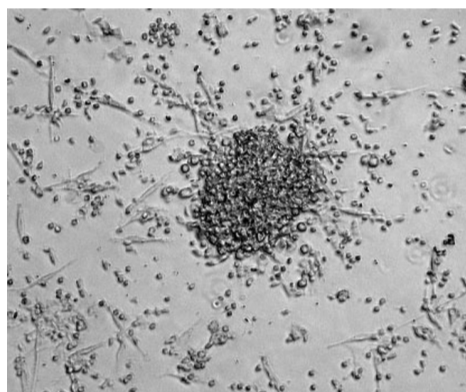


Рис. Микрофотография CFU-EC (фазово-контрастная микроскопия, ×100)

### Основной показатель

В качестве первичной конечной точки был выбран прирост ЦПЭК за 1-ю неделю наблюдения (в CFU-EC).

### Статистический анализ

Результаты представляли в виде процентов для качественных показателей и  $M \pm SD$  либо  $Me$  (квартили) для непрерывных показателей (в зависимости от нормальности распределения их значений). Качественные показатели разных групп сопоставляли посредством критерия  $\chi^2$ , непрерывные — с помощью критерия Стьюдента либо Манна-Уитни.

Влияние терапии цитиколином на прирост ЦПЭК за 1-ю неделю наблюдения оценивали, создавая модели логистической регрессии, с учетом поправок на основные показатели, связанные с приростом ЦПЭК (по данным однофакторного анализа). Поскольку для отношений шансов (ОШ) линейность не была характерна, прирост ЦПЭК оценивали в связи с наиболее отчетливыми предикторами хорошего функционального исхода. Полученные результаты выражали как ОШ с 95% доверительными интервалами (ДИ). Статистический анализ проводили, используя программу SPSS 16.0 для Windows XP.

### Результаты

#### Основные характеристики больных

В таблице 1 представлены основные характеристики больных, входивших в разные группы. Все группы оказались

сопоставимыми по основным факторам сосудистого риска, клиническим особенностям и типу ОИИ. Межгрупповых отличий исходного количества CFU-EC не было. В то же время у пациентов, получавших цитиколин + rt-PA, продемонстрирован более высокий прирост колоний ЦПЭК за 1-ю неделю наблюдения ( $35,4 \pm 15,9$  для цитиколина + rt-PA vs  $8,4 \pm 8,1$  для цитиколина без rt-PA vs  $0,9 \pm 10,2$  для отсутствия цитиколина и rt-PA;  $p < 0,0001$ ). Аналогичные результаты были получены при сопоставлении количества ЦПЭК через 3 мес наблюдения ( $45,5 \pm 24,2$  vs  $29,5 \pm 21,8$  vs  $12,3 \pm 9,2$  соответственно;  $p < 0,0001$ ). Кроме того, у больных, леченных цитиколином и rt-PA, спустя 3 мес отмечались лучшие функциональные исходы и менее выраженный неврологический дефицит, а в период между 4-ми и 7-ми сутками — еще и меньший объем поражения головного мозга по данным магнитно-резонансной томографии.

#### Первичная конечная точка — прирост ЦПЭК за 1-ю неделю наблюдения

Согласно результатам анализа операционных характеристик, прирост ЦПЭК  $\geq 4$  за 1-ю неделю наблюдения как предиктор хорошего исхода (площадь под характеристической кривой 0,903; 95% ДИ 0,811–0,995;  $p < 0,0001$ ) обладал наиболее высокими чувствительностью (88%) и специфичностью (92%). Поэтому в последующем анализировались те факторы, которым была присуща прямая связь с приростом ЦПЭК  $\geq 4$  за 1-ю неделю наблюдения.

Прирост ЦПЭК  $\geq 4$  за 1-ю неделю после развития ОИИ отмечался у 22 больных (45,8%). В таблице 2 представлены основные характеристики пациентов в зависимости от величины прироста ЦПЭК за 1-ю неделю наблюдения. У больных с величиной данного показателя  $\geq 4$  на момент поступления в стационар время от начала ОИИ было достоверно меньше, а концентрация глюкозы — ниже. Кроме того, у этих пациентов оказались не столь выражены тяжесть ОИИ и объем поражения головного мозга на 4–7-е сутки, а функциональные исходы к 3-му месяцу наблюдения были лучше ( $p < 0,0001$  для всех сопоставлений). Наконец, больным с большим приростом ЦПЭК чаще назначали цитиколин и цитиколин + rt-PA ( $p < 0,0001$ ).

В логистической модели после введения поправки на объем поражения и время, прошедшее с момента развития ОИИ, терапия цитиколином (ОШ 17,6; 95% ДИ 2,3–137,5;  $p = 0,006$ ) и цитиколином + rt-PA (ОШ 108,5; 95% ДИ 2,9–1094,2;  $p = 0,001$ ) была независимо связана с приростом ЦПЭК  $\geq 4$  (табл. 3).

### Обсуждение

В проспективном исследовании, результаты которого приведены выше, оценивалось влияние терапии цитиколином на прирост ЦПЭК после развития ОИИ. Примечательно, что назначение цитиколина, как и цитиколина совместно с rt-PA, было независимой причиной более выраженного прироста ЦПЭК в течение 1-й недели после развития ОИИ. Благоприятное воздействие на первичную

конечную точку подтверждалось способностью терапии уменьшать зону инфаркта, приводить к положительной неврологической и функциональной динамике через 3 мес наблюдения.

Назначение пероральной формы цитиколина повышает вероятность полного функционального восстановления спустя 3 мес после развития ОИИ (W. Clark et al., 1999; W. Clark et al., 2001; O. Hurtado et al., 2007). Результаты экспериментальных работ свидетельствуют также о том, что длительная терапия цитиколином, начатая в течение 1-х суток от момента возникновения ОИИ, стимулирует пластические свойства головного мозга и способствует восстановлению его функций (O. Hurtado et al., 2007). Установлено, что фосфолипиды клеточной мембраны, в частности фосфатидилхолин, являются необходимым условием роста и восстановления клеток. Способность цитиколина повышать ЦПЭК после ОИИ позволила высказать гипотезу, согласно которой положительное влияние данного препарата на восстановление функций у этих больных опосредуется именно ЦПЭК. Действительно, увеличение ЦПЭК в постинсультном периоде ассоциируется с хорошими функциональными исходами, ограничением зоны инфаркта и позитивной неврологической динамикой (T. Sobrino et al., 2007; H. Yip et al., 2008; K. Chu et al., 2008). В то же время механизмы, благодаря которым цитиколин увеличивает ЦПЭК, до сих пор неизвестны и нуждаются в дальнейшем изучении.

Требуется уточнения и факт более выраженного прироста ЦПЭК в малочисленной группе больных, леченных цитиколином и rt-PA. Введение последнего вызывает повышенную экспрессию матриксной металлопротеазы-9 (M. Ning et al., 2006) — мощного стимулятора ЦПЭК (B. Heissig et al., 2002). Указанное свойство rt-PA в сочетании со способностью цитиколина активировать клеточный рост может служить объяснением того, почему у больных, получавших комбинацию этих препаратов, отмечались более отчетливое повышение ЦПЭК, а также лучшие неврологические и функциональные исходы спустя 3 мес от развития ОИИ. Полученные результаты соответствуют экспериментальным данным, показавшим, что цитиколин, назначаемый после проведения системного тромболитика с помощью rt-PA, обеспечивает лучший эффект, чем каждый из этих препаратов в отдельности или прием цитиколина до введения rt-PA (M. Alonso De Lecinana et al., 2006).

Настоящее исследование имеет ограничение. Так, работа представляет собой вторичный анализ, проводимый в рамках проспективного исследования, главной целью которого служило изучение прогностической ценности ЦПЭК в отношении функциональных исходов у больных, перенесших ОИИ (T. Sobrino et al., 2007). Соответственно, небольшой объем выборки снижает убедительность выводов.

Таким образом, назначение цитиколина, а также цитиколина в сочетании с rt-PA является достоверной причиной более выраженного увеличения ЦПЭК в течение 1-й недели после развития ОИИ. Молекулярные механизмы этого эффекта требуют уточнения.

Перевел с англ. Глеб Данин



Таблица 2. Исходные клинические особенности, факторы сосудистого риска, тип инсульта, биохимические показатели и данные магнитно-резонансной томографии головного мозга у больных с различным приростом ЦПЭК

Показатель	Прирост ЦПЭК, CFU-EC		p	
	$\geq 4$ (n=22)	$< 4$ (n=26)		
Возраст, лет	$69,7 \pm 12,6$	$72,2 \pm 6,7$	0,796	
Мужской пол, %	45,5	53,8	0,386	
Время от момента развития ОИИ, мин	$206,1 \pm 70,4$	$288,2 \pm 63,5$	$< 0,0001$	
Факторы сосудистого риска	Артериальная гипертензия, %	58,7	69,2	0,110
	Сахарный диабет, %	22,7	34,6	0,281
	Дислипидемия, %	20,8	33,3	0,259
	Курение, %	4,5	15,4	0,230
	Фибрилляция предсердий, %	33,3	33,3	0,620
Основные физиологические показатели и биохимические тесты	Температура тела, °C	$36,6 \pm 0,3$	$36,7 \pm 0,5$	0,103
	Систолическое АД, мм рт. ст.	$154,5 \pm 21,5$	$157,9 \pm 23,4$	0,245
	Диастолическое АД, мм рт. ст.	$81,3 \pm 12,3$	$83,8 \pm 12,9$	0,336
	Глюкоза, мг/дл	$117,5 \pm 27,8$	$148,7 \pm 44,8$	0,016
	Фибриноген, мг/дл	$476,8 \pm 101,6$	$467,4 \pm 138,6$	0,218
Особенности терапии	Без цитиколина и rt-PA, %	13,6	73,1	$< 0,0001$
	Цитиколин, %	36,4	15,4	
	Цитиколин + rt-PA, %	50,0	11,5	
Клинические особенности	NIHSS при поступлении, баллов	8 [5, 12]	10 [6, 20]	0,104
	NIHSS через 3 мес, баллов	8 [2, 16]	4 [1, 13]	$< 0,0001$
	mRS через 3 мес, баллов	1 [0, 2]	4 [3, 4]	$< 0,0001$
	Атеротромботический ОИИ, %	13,7	11,8	0,888
	Кардиоэмболический ОИИ, %	41,7	45,8	
	Неопределенный ОИИ, %	37,5	41,7	
Данные нейровизуализации	Объем поражения при поступлении, см <sup>3</sup>	$21,5 \pm 20,1$	$27,6 \pm 26,4$	0,189
	Объем поражения на 4–7-е сутки, см <sup>3</sup>	$29,1 \pm 28,4$	$52,3 \pm 38,7$	$< 0,0001$

Таблица 3. Корректированные ОШ для прироста ЦПЭК  $\geq 4$  CFU-EC на фоне терапии

Показатель	ОШ	95% ДИ	p
Время от начала развития ОИИ	0,9	0,9–1,0	0,083
Объем поражения головного мозга на 4–7-е сутки	0,9	0,9–0,9	0,035
Терапия цитиколином	17,6	2,3–137,5	0,006
Терапия цитиколином + rt-PA	108,5	2,9–1094,2	0,001