Х. Крупински, Испания; **М. Абудавуд,** Великобритания; **Е. Петку,** Австралия; и др.

Цитиколин индуцирует ангиогенез, улучшая выживаемость эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга

Цитиколин – эссенциальный компонент фосфолипидов клеточной мембраны, применяющийся в качестве нейропротектора у пациентов с инсультом. В многочисленных исследованиях у постинсультных больных цитиколин продемонстрировал многообещающие результаты относительно уменьшения размеров инфаркта и улучшения функционального восстановления. Цитиколин (цитидиндифосфат-холин, ЦДФ-холин, цитидин-5'-дифосфохолин) является сложной органической молекулой, состоящей из рибозы, пирофосфата, цитозина и холина. Предполагается, что цитиколин оказывает восстанавливающий и нейропротекторный эффекты при травматических повреждениях головного мозга, инсульте, старении головного мозга и нейродегенеративных заболеваниях, хотя точные механизмы его действия до конца не изучены.

Методы

В эксперименте in vitro эндотелиальные клетки (ЭК) микрососудов головного мозга человека (линия hCMEC/D3) культивировали в эндотелиальной базальной среде 2 (EBM-2) с факторами роста и гидрокортизоном в увлажненной атмосфере с 5% CO_2 при температуре 37°C. После предварительной инкубации с цитиколином (10 мкмоль 4 ч) индуцировали апоптоз с помощью кальциевого ионофора (10 мкмоль 24 ч), стауроспорина (10 мкмоль 4 ч) или кислородного голодания (1% O_2 12 ч), после чего определяли % апоптотических клеток. Ангиогенез оценивали по пролиферации клеток, инкубированных с цитиколином и факторами роста. Экспрессию фосфолипидов, модулируемую цитиколином, подтверждали методом вестерн-блоттинга.

В эксперименте in vivo использовали крыс-самцов линии Wistar, по 4 особи в каждой группе (цитиколин и контроль). Животные содержались в световом режиме 12/12 ч с доступом к пище и воде ad libitum. Ишемическое повреждение индуцировали путем транзиторной (90 мин) окклюзии правой средней мозговой артерии под анестезией изофлураном. Период окклюзии и успешной реперфузии контролировали с помощью ипсилатеральной лазерной допплер-флоуметрии. Животные интраперитонеально получали цитиколин (1000 мг/кг) или физиологический раствор ежедневно в течение 7 дней. Первую дозу вводили за 15 мин до реперфузии. Через 21 день после окклюзии у животных в состоянии наркоза осуществляли перфузию сердца гепаринизированным физиологическим раствором, затем 4% параформальдегидом; образцы головного мозга замораживали в криостате с последующим приготовлением срезов толщиной 8 мкм во фронтальной проекции. На 1-й, 7-й и 21-й день после окклюзии крысам в состоянии наркоза с помощью магнитно-резонансной томографии получали Т2-взвешенные изображения для определения размеров очагов. Относительное количество микрососудов (анти-CD31) и активных сосудов (анти-CD105) оценивали с помощью иммуногистохимического исследования.

Статистическую значимость определяли по методу t-теста Стьюдента, разница считалась значимой при $p \leq 0,05$.

Результаты

При инкубации клеток hCMEC/D3 со стауроспорином на протяжении 4 и 24 ч количество поврежденных/апоптотических клеток составило 40 и 60% соответственно. При предварительной обработке hCMEC/D3 цитиколином этот показатель значительно уменьшался ($p<0,05$).

Наличие цитиколина в питательной среде достоверно защищало ЭК от повреждения и апоптоза, индуцированных гипоксией ($p<0,05$).

Кальциевый ионофор вызывал существенное снижение выживаемости клеток после 24 ч. Однако в присутствии цитиколина этот негативный эффект нивелировался – клетки оставались присоединенными и были морфологически идентичными клеткам, инкубированным с физиологическим раствором ($p<0,05$).

Добавление цитиколина к hCMEC/D3 не оказывало влияния на клеточную пролиферацию после 72 ч по сравнению с контролем.

После 24 ч инкубации FGF-2 индуцировал выраженную миграцию клеток через фильтры. Цитиколин подобного хемотаксического эффекта не оказывал. В то же время под действием данного нейропротектора наблюдалось значительное повышение заживляющего ответа (количества клеток, мигрировавших в рану, и дистанция миграции). Кроме того, добавление цитиколина увеличивало образование и интенсивность сфероидов, а также миграцию клеток кнаружи от центральной массы после 7 дней инкубации ($p<0,05$).

При инкубации клеток в среде Matrigel в присутствии цитиколина значительно повышалось образование капилляроподобных структур по сравнению с контролем ($p<0,05$), причем этот эффект был более выраженным, чем при добавлении FGF-2 – мощного ангиогенного фактора.

Десятиминутная стимуляция цитиколином в различных концентрациях повышала экспрессию ERK1/2 в клетках hCMEC/D3. При этом продемонстрировано существенное (более чем в 2 раза) увеличение фосфорилирования ASK-1, HER2, IRS-1 и Jun, а также ингибирование (более чем на 50%) Hsp-70, интегрина альфа-4, MEK-1 и гистона H2B. Кроме того, в клетках, обработанных цитиколином, повышалась экспрессия P-IRS-1.

По сравнению с контролем, лечение крыс цитиколином, назначаемым в дозе 1000 мг/кг интраперитонеально перед реперфузией и затем ежедневно на протяжении 21 дня после экспериментального ишемического инсульта, приводило к заметному, но статистически не значимому увеличению количества CD31-положительных микрососудов и достоверному увеличению количества CD105-положительных (активных) микрососудов в периинфарктном и инфарктном регионах (рис.). На общий объем инфаркта терапия цитиколином за этот период не влияла.

Иммуногистохимический и иммунофлуоресцентный анализы показали повышение экспрессии p-IRS-1, а также колокализации p-IRS-1 и CD105-положительных микрососудов в инфарктном регионе животных после 21 дня терапии цитиколином. В контрольной группе эти эффекты практически отсутствовали.

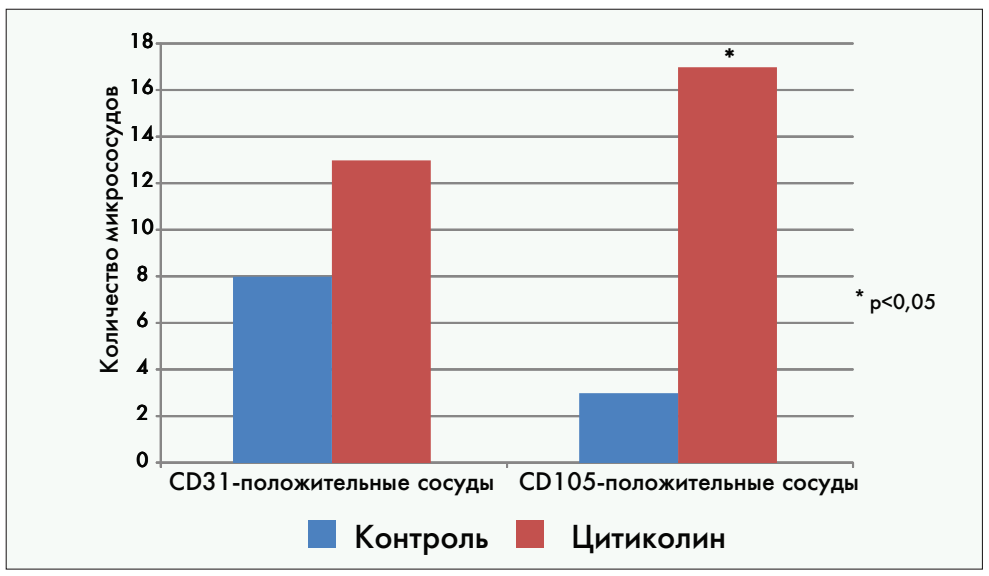

Рис. Количество CD31- и CD105-положительных сосудов после лечения цитиколином и физиологическим раствором (контроль)

Обсуждение

В настоящем исследовании на моделях in vitro и in vivo впервые продемонстрированы вазопротекторные и проангиогенные эффекты цитиколина. Препарат оказывал выраженное протекторное действие на микрососудистые ЭК головного мозга – защищал их от повреждения и апоптоза, индуцированных различными предикторами, в том числе гипоксией, избыточным высвобождением глутамата и ионов кальция (последние, как известно, являются ключевыми патогенетическими факторами при ишемическом инсульте).

Цитиколин не проявлял митогенного и хемотаксического эффектов, однако достоверно ускорял заживление и спраутинг сфероидов и оказывал выраженное индуцирующее действие на формирование капилляроподобных структур in vitro. Эти впервые обнаруженные благоприятные эффекты препарата могут, по крайней мере, частично объяснять улучшение восстановления постинсультных пациентов, получающих цитиколин, поскольку защита ЭК и индукция/поддержание ангиогенеза являются необходимым условием кратко- и долгосрочной реваскуляризации после инсульта, опосредованно влияющей на выживаемость и реинтеграцию нейронов.

ERK1/2 является ключевым ангиогенным и митогенным белком hCMEC/D3. Цитиколин повышал экспрессию pERK1/2, а также ряда других сигнальных молекул, включая HER2. Примечательно, что из более чем 500 проанализированных белков цитиколин оказывал модулирующий эффект всего на несколько из них, что свидетельствует о высокой специфичности действия препарата.

Цитиколин повышал фосфорилирование IRS-1 и HER2. Лишь недавно было установлено, что гиперэкспрессия IRS-1 в сочетании с повышенной экспрессией Akt и VEGFA приводит к активизации ангиогенеза в человеческих ЭК. В то же время в исследованиях in vivo и в клиническом исследовании I фазы назначение антисенсовых последовательностей IRS-1 в виде глазных капель предотвращало неоваскуляризацию при таких заболеваниях, как ретинопатия и неоваскулярная глаукома. Таким образом, IRS-1 является мощным модулятором проангиогенных сигнальных каскадов в сосудистых ЭК. Обнаруженное нами в экспериментах in vitro и in vivo повышение фосфорилирования IRS-1 при одновременных активации и васкуляризации ЭК может быть новым ключевым механизмом действия цитиколина.

Выводы

Цитиколин индуцирует ангиогенез и улучшает выживаемость эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга человека через пути p-ERK1/2 и IRS-1. Возможно участие и других сигнальных путей, включая гистон H2B и HER2. Таким образом, протекторное действие цитиколина при его длительном назначении после инсульта, по крайней мере, частично обеспечивается реваскуляризацией головного мозга. В целом, результаты настоящего исследования позволяют расширить терапевтическую область применения цитиколина на состояния, при которых благоприятного эффекта можно ожидать от регенерации сосудистой ткани.

Список литературы находится в редакции.
Статья печатается в сокращении.

J. Krupinski, M Abudawood, S. Matou-Nasri et al. Citicoline induces angiogenesis improving survival of vascular/human brain microvessel endothelial cells through pathways involving ERK1/2 and insulin receptor substrate-1. Vascular Cell 2012, 4: 20

Перевод с англ. ***Алексея Терещенко***