

Patogeneza udaru niedokrwiennego mózgu — możliwości neuroprotekcji i stymulowania plastyczności mózgu

Konrad Rejda¹, Agnieszka Stowik²

¹Katedra i Klinika Neurologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

²Katedra i Klinika Neurologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

STRESZCZENIE

Choroby naczyniowe mózgu są jedną z najczęstszych przyczyn zgonu i kalectwa, a liczba zachorowań w wielu krajach świata stale wzrasta. W ostatnich latach dokonał się duży postęp wiedzy o podstawowych mechanizmach molekularnych odpowiedzialnych za procesy neurodegeneracyjne. Stało się to możliwe dzięki wprowadzeniu zwierzęcych modeli doświadczalnych oraz zastosowaniu nowoczesnych metod obrazowania. W niniejszym artykule przedstawiono kaskadę zmian patofizjologicznych w przebiegu niedokrwienia mózgu oraz najważniejsze przykłady terapii ukierunkowanej na neuroprotekcję i stymulowanie neuroplastyczności ośrodkowego układu nerwowego (OUN).

Na podstawie dotychczasowych badań należy stwierdzić, że mimo dotychczasowych niepowodzeń terapii neuroprotektynowej w chorobach OUN strategia stymulowania neuroregeneracji/neuroplastyczności będzie zajmować coraz ważniejsze miejsce we współczesnej neurologii.

Polski Przegląd Neurologiczny 2018; 14 (4): 230–239

Słowa kluczowe: udar niedokrwienno mózgu, patofizjologia, neuroprotekcja, neuroplastyczność

Wprowadzenie

Choroby naczyniowe mózgu są jedną z najczęstszych przyczyn zgonu i kalectwa, a liczba zachorowań w wielu krajach świata stale wzra-

sta [1]. W ostatnich latach dokonał się duży postęp wiedzy o podstawowych mechanizmach molekularnych odpowiedzialnych za procesy neurodegeneracyjne. Stało się to możliwe dzięki wprowadzeniu zwierzęcych modeli doświadczalnych oraz zastosowaniu nowoczesnych metod obrazowania. Najwięcej uwagi poświęca się stanom niedokrwienia mózgu, które stanowią do 85% przypadków w grupie chorób naczyniowych [2]. Opisano szczegółowo kaskadę zmian, które, jeśli nie zostaną zatrzymane lub przynajmniej ograniczone, to szybko prowadzą do nieodwracalnego uszkodzenia struktur mózgowia. Procesy te różnią się zależnie od stopnia, lokalizacji i rozległości niedokrwienia mózgu. Najogólniej stany te można podzielić na globalne, gdy niedokrwienie dotyczy całego mózgowia, jak to się dzieje w wyniku nagłego zatrzymania akcji serca, oraz ogniskowe, gdy niedokrwienie obejmuje ograniczony obszar po zamknięciu przepływu krwi w poszczególnych tętnicach mózgu. W obrazie histopatologicznym występują istotne różnice w tych dwóch typach schorzenia.

Przejęciowe globalne niedokrwienie mózgu, zależnie od czasu trwania i głębokości deficytu tlenowego, wywołuje selektywne uszkodzenie populacji najbardziej wrażliwych komórek. Należą do nich komórki piramidowe stref CA1, CA3 i CA4 hipokampa, komórki Purkiniego w mózdzku, komórki piramidowe 3, 5, 6 warstwy kory nowej (*neocortex*) oraz średnie neurony kolczyste neostriatum [3]. Najbardziej wrażliwe na niedotlenienie są komórki piramidowe pól CA1 i CA3 hipokampa, ulegające nieodwracalnym zmianom już po 3 min zmniejszonego przepływu, natomiast

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. n. med. Konrad Rejda
Katedra i Klinika Neurologii
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Jaczewskiego 8, 20-954 Lublin
tel. 81 724 47 20, faks 81 724 45 40
e-mail: krejda@europa.com

Polski Przegląd Neurologiczny 2018; 14 (4): 230–239

Wydawca: VM Media sp. z o.o. VM Group sp. k.

Copyright © 2018 Via Medica

niektóre neurony prążkowiec są w stanie przeżyć w tych warunkach nawet 15–30 min. Stwierdzono jednak różną dynamikę zmian degeneracyjnych w tych populacjach neuronów. Otóż po niedokrwieniu trwającym 15–30 min najszybciej obumierają komórki prążkowiec, bo w ciągu 3–12 h. Paradoksalnie neurony strefy CA1 hipokampa giną z dużym opóźnieniem, trwającym nawet do 72 h, co określono jako opóźnioną śmierć neuronów [4].

W obrazie histopatologicznym ogniskowe niedokrwienie ujawnia się jako zawał, czyli obszar pełnej martwicy ze śmiercią wszystkich komórek mózgowych (nerwowych, glejowych i śródbłonka), otoczony obszarem, który mimo braku morfologicznych cech uszkodzenia komórek, wykazuje zaburzenia funkcji i co do którego nie można przewidzieć, czy ulegnie martwicy, czy też powróci do stanu prawidłowego [5]. Obszar ten określa się mianem penumbry (niedokrwienna strefa półcienia), w którym dochodzi do śmierci neuronów w wyniku procesów wtórnych, pośrednio tylko związanych z pierwotnym uszkodzeniem niedokrwieniem. Następują tam dynamiczne zmiany, indukowane zarówno nieprawidłowym przepływem mózgowym, jak i zaburzonymi procesami energetycznymi. Z upływem czasu obejmują one coraz szerszy obszar wokół ogniska martwicy, jednak w korzystnych warunkach szansa powrotu do stanu prawidłowego jest zachowana. Istotny postęp stanowi możliwość obrazowania obszaru penumbry i śledzenie dynamicznych zmian, które w niej zachodzą. Ma to duże znaczenie dla właściwego wytypowania pacjentów, u których obszar penumbry wciąż jeszcze pozostaje obecny, co czyni ich kandydatami do leczenia neuroprotekcijnego. W tym celu stosuje się techniki perfuzyjnego (PWI, *perfusion-weighted imaging*) oraz dyfuzyjnego (DWI, *diffusion-weighted imaging*) rezonansu magnetycznego. Penumbra jest wówczas definiowana jako obszar hipoperfuzji w PWI, przy jednoczesnym braku zmian w badaniu DWI, co określa się jako „niezgodność PWI/DWI” (ang. *PWI/DWI mismatch*) [6]. Obecnie technika ta jest już wystarczająco wystandaryzowana, aby ją stosować w praktyce klinicznej [7].

Patomechanizm niedokrwiennego uszkodzenia mózgu jest bardzo złożony i ma charakter reakcji łańcuchowej.

Zaburzenia energetyczne i ekscytotoksyczność

Pierwszym i kluczowym czynnikiem rozpoczynającym sekwencję zdarzeń jest nagły deficyt energetyczny, spowodowany utratą zdolności

neuronów do syntezy adenosynotrifosforanu (ATP, *adenosine triphosphate*) w wyniku zmniejszenia podaży tlenu w mitochondriach. Do takiej sytuacji dochodzi przy zmniejszeniu przepływu mózgowego poniżej 0,13–0,14 ml/g/min [8]. Już po upływie 15–90 s zmniejsza się aktywność Na^+/K^+ -ATPazy, zwiększa się stężenie zewnątrzkomórkowego K^+ , a do komórki w sposób niekontrolowany napływają jony Na^+ , Ca^{2+} i Cl^- . Błona komórkowa ulega stopniowej depolaryzacji i w 3.–5. min dochodzi do całkowitej utraty potencjału błonowego. Depolaryzacja błony presynaptycznej zwiększa napływ jonów sodu poprzez zależne od potencjału kanały sodowe, co pociąga za sobą bierne wnikanie do wnętrza komórki jonów chloru i wody. Procesy te prowadzą do osmotycznego obrzęku komórek nerwowych. Kolejne fale depolaryzacji błon aktywują zależne od napięcia kanały wapniowe, czego efektem jest nadmierny napływ tych jonów do wnętrza komórki. Dodatkowym źródłem jonów Ca^{2+} jest ich uwalnianie z zasobów zgromadzonych w retikulum endoplazmatycznym. Jest to kluczowy element kaskady zmian, decydujący o dalszym jej postępie, czyli uruchomieniu kaskady procesów biochemicznych, w wyniku których dochodzi do uwolnienia z zakończeń presynaptycznych wielu neuroprzebieżników, w tym także aminokwasów pobudzających, tj. kwasów glutaminowego i asparaginowego. Duże stężenie aminokwasów pobudzających w przestrzeni synaptycznej wynika również z upośledzenia fizjologicznego, zależnego od ATP, mechanizmu ich wychwytu przez pozbawione dopływu tlenu astrocyty. Zmiany te pociągają za sobą zwiększenie stymulacji jonotropowych podtypów receptora glutaminowego, a także aktywację receptorów metabotropowych, co przyczynia się do jeszcze bardziej nasilonego napływu wapnia do komórki. Jony wapnia, pełniące w warunkach fizjologicznych rolę ważnego przebieżnika, w stanach patologicznych aktywują poprzez fosforylację wiele enzymów, takich jak kinaza białkowa, endonukleazy i inne proteiny. Prowadzi to do degradacji białek cytoszkieletu, a zatem do upośledzenia transportu aksoplazmatycznego makrocząstek i organeli oraz przekazu informacji genetycznej [4]. Wynikiem aktywacji kalpajny I jest proteoliza białek strukturalnych komórki, tj. tubuliny, polipeptydów neurofilamentów, spektryny. Innym ważnym skutkiem działania jonów wapnia jest lipoliza. Podwyższone wewnątrzkomórkowe stężenie jonów Ca^{2+} aktywuje błonową fosfolipazę A_2 uwalnającą kwas arachidonowy, który nasila

neurotransmisję glutaminergiczną. Kaskada kwasu arachidonowego stanowi źródło wolnych rodników tlenowych, nasilających peroksydację lipidów i procesy uszkodzenia komórki poprzez degradację DNA i RNA. Kolejnym produktem fosfolipazy A₂, uczestniczącym w mechanizmie niedokrwiennego uszkodzenia mózgu, jest czynnik aktywujący płytki (PAF, *platelet-activating factor*). Istnieją doniesienia wskazujące na to, że związki będące antagonistami PAF hamują aktywowaną w warunkach niedokrwienia fosfolipazę A₂ oraz zmniejszają uszkodzenie wywołane reperfuzyją. Jony wapnia i wolne rodniki tlenowe powodują otwarcie megakanalów w błonie mitochondriów, przez które mogą przechodzić nie tylko jony, lecz także inne substancje małowczątkowe, co powoduje nieodwracalne uszkodzenie mitochondriów i prowadzi do opóźnionej śmierci komórek nerwowych [4].

Stres oksydacyjny i nitrozacyjny

Ważnym następstwem niedokrwienia, a w szczególności późnej reperfuzyji, jest produkcja niszczyielskich wolnych rodników tlenowych. Nadmiar jonów wapnia, sodu i adenosynodifosforanu (ADP, *adenosine diphosphate*) w niedokrwionych komórkach stymuluje nadmierną produkcję rodników przez mitochondria. Dodatkowo są one uwalniane podczas przemiany kwasu arachidonowego w prostanoidy oraz przy degradacji hipoksantyny. Ponadto reakcja zapalna odpowiada za nadprodukcję wolnych rodników. Ważnym ogniwem łańcucha zjawisk składających się na patogenezę niedokrwienia jest tlenek azotu (NO, *nitric oxide*) syntetyzowany w komórkach nerwowych, glejowych, w śródbłonku, okołonaczyniowych zakończeniach nerwowych, makrofagach i leukocytach z L-argininy i tlenu, z udziałem syntazy tlenu azotu (NOS, *nitric oxide synthase*). Występuje ona w postaci trzech izoform — neuronalnej, endotelialnej i indukowalnej [10]. Rola NO w patogenezie niedokrwienia mózgu jest złożona. Z jednej strony cytotoksyczne działanie NO wyraża się uszkodzeniem DNA, hamowaniem oddychania na obwodzie oraz aktywacją reakcji z udziałem wolnych rodników tlenowych, a w szczególności poprzez tworzenie rodnika nadazotynowego (*peroxynitrite*). Z drugiej strony wiadomo, że NO może również działać neuroprotekcynie, indukując intensywne rozszerzenie naczyń mózgowych.

W drugim etapie, rozpoczynającym się już po kilku minutach od niedokrwienia, dochodzi do

następujących po sobie fal aktywacji rozmaitych programów genetycznych z syntezą nowych białek, których znaczenie nie jest jeszcze dostatecznie poznane. Najwcześniej dochodzi do ekspresji genów „natychmiastowej odpowiedzi komórkowej” (*immediate early genes*), do których należą c-fos, fos B, c-jun, jun B, jun D i inne. Produkty ich aktywacji są czynnikami regulującymi ekspresję kolejnych genów, odgrywających rolę zarówno w procesach uszkodzenia, jak i ochrony endogennej. Dokonuje się to poprzez interakcję z czynnikami promotorowymi tych genów, takimi jak AP-1 (*activator protein 1*) i CRE (*cyclic AMP-responsive element binding protein*). Druga fala aktywacji dotyczy genów szoku termicznego (*heat shock proteins genes*), które są czułym markerem uszkodzenia. Największe ilości tych białek stwierdza się w komórkach, które przeżywają epizod niedokrwienia, co może świadczyć o ich ochronnym wpływie [11].

Procesy zapalne

W następnej kolejności, po upływie 24–48 h od momentu ograniczenia przepływu krwi, aktywacji ulegają geny kodujące cytokiny prozapalne, takie jak czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF α , *tumor necrosis factor alpha*), interleukina 1 (IL-1), interleukina 6 (IL-6), białko chemotaktyczne monocytów 1 (MCP-1, *monocyte chemotactic protein 1*) oraz molekuly adhezyjne — międzykomórkowa molekula adhezyjna 1 (ICAM-1, *intercellular cell adhesion molecule 1*), E-selektyna (ELAM-1, *endothelial-leukocyte adhesion molecule 1*) oraz P-selektyna. Rozpoczyna to reakcję zapalną dotyczącą rozległych obszarów mózgu, nawet tych niedotkniętych bezpośrednio uszkodzeniem [12]. Kluczową rolę w modulowaniu reakcji zapalnej pełnią cytokiny. Są to małe cząstki białkowe o masie 8–30 tys. Da wykazujące aktywność biologiczną w bardzo niskich (pikomolowych) stężeniach. Cytokiny są uwalniane z komórek w odpowiedzi na działanie patologicznego bodźca zewnętrznego, natomiast w stanach fizjologicznej homeostazy ich rola pozostaje niewielka. Bezpośrednim sygnałem do zwiększenia produkcji i uwalniania cytokin jest napływ jonów wapnia do komórki oraz wyrzut wolnych kwasów tłuszczowych i innych metabolitów tłuszczowych. Najważniejszą rolę w modulowaniu reakcji zapalnej odgrywają interleukina 1b (IL-1b) oraz TNF α . Cytokiny te są produkowane w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) przez komórki endotelium, makrofagi, mikroglej, astrocyty i neurony. Pełnią one liczne

funkcje, ale głównie pośredniczą w aktywowaniu komórek do produkcji kolejnych cytokin prozapalnych IL-6 i IL-8 oraz takich, które hamują reakcję zapalną, tj. IL-4 i IL-10. Cytokiny prozapalne wywierają bezpośredni efekt uszkodzający neurony, astrocyty i mikroglej oraz zwiększają uwalnianie prostaglandyn. Ich pośrednią rolą jest również aktywacja i zwiększenie migracji leukocytów do obszarów objętych niedokrwieniem. Rola białych krwinek w procesach patologicznych znacznie wzrasta w momencie przywrócenia krążenia po rekanalizacji naczyń. Dochodzi wówczas do zwiększenia adhezji i akumulacji granulocytów obojętnochłonnych, które razem z erytrocytami i płytkami krwi zatrzymują się na sieci fibryny i zamykają światło drobnych naczyń pogłębiając niedokrwienie. Efekt ten jest spotęgowany przez obkurczanie się drobnych naczyń pod wpływem uwalnianych substancji wazoaktywnych. Leukocyty mogą również migrować przez barierę krew–mózg do struktur mózgowia. Odbywa się to dzięki interakcji między neutrofilami a komórkami endotelium za pośrednictwem molekuł adhezyjnych. Opisano trzy główne grupy tych molekuł; **selektyny** (P-selektyna, E-selektyna, L-selektyna), **integryny** (LFA-1, MAC-1, VLA-4) oraz **superrodzinę Ig** (ang. *Ig superfamily*): ICAM-1, molekuła adhezyjna komórek naczyniowych 1 (VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule 1*), molekuła adhezji komórkowej płytkowo-śródbłonkowej 1 (PECAM-1, *platelet-endothelial cell adhesion molecule-1*). Opisano także liczne mechanizmy szkodliwego oddziaływania zaktywowanych leukocytów na tkanki mózgowia, spośród których do najważniejszych należą generowanie wolnych rodników, uwalnianie enzymów cytotoksycznych, zwiększenie przepuszczalności naczyń, ekspozycja antygenów błony podstawnej mikronaczyń oraz zwiększone uwalnianie cytokin [13].

Zaprogramowana śmierć komórki

W późniejszych fazach kaskady zmian rozpoczynających się kilka–kilkanaście godzin po niedokrwieniu ujawniają się cechy selektywnej śmierci populacji komórek w obszarach granicznych ogniska zawałowego. Zmiany molekularne towarzyszące tym procesom mają cechy zaprogramowanej śmierci komórki — apoptozy [14]. Wykazano, że na skutek ogniskowego niedokrwienia mózgu dochodzi do zwiększonej ekspresji genów bezpośrednio związanych z aktywacją apoptozy, tj. p53, bcl-x, Bax. Produkt genu — białko p53 — przemieszcza się z cytozolu do jądra komórko-

wego, gdzie pełni rolę czynnika transkrypcyjnego; wiąże się z DNA i hamuje cykl komórkowy w fazie G1, a jednocześnie stymuluje syntezę białka bax z rodziny bcl-2. Wydaje się, że białko p53 uruchamia proces aktywacji wielu proteaz. Ta rodzina enzymów cysteinowych zwana kaspazami (ang. *caspases*) może być głównym wykonawcą ostatecznej degradacji komórki i jej śmierci [15].

Bardzo ważnym czynnikiem mogącym zwiększyć uszkodzenie jest, paradoksalnie, rekanalizacja i reperfuzja w obszarach dotkniętych niedokrwieniem. Z badań eksperymentalnych wynika, że wczesna rekanalizacja i reperfuzja zmniejsza następstwa niedokrwienia i poprawia rokowanie, ale jeśli zamknięcie naczynia trwa dłużej niż 3 godziny, to skutki reperfuzji są zwykle negatywne (*reperfusion injury*) [16]. Wrażliwość neuronów na uszkodzenie wynikające z reperfuzji jest inna niż na niedokrwienie. Stosunkowo odporne na niedokrwienie komórki prądkowia wykazują objawy nieodwracalnego uszkodzenia już po 3 godzinach od przywrócenia pełnego przepływu krwi, natomiast wrażliwe na niedokrwienie neurony hipokampa przeżywają w tych warunkach znacznie dłużej, bo 48–72 h.

Leczenie przyczynowe

Metody leczenia przyczynowego z zastosowaniem trombolizy dożylnie (*i.v.*, *intravenous*) oraz mechanicznej trombektomii zrewolucjonizowały oblicze współczesnej neurologii [17]. Kwalifikacja pacjentów do takiego leczenia w najkrótszym czasie od wystąpienia udaru (okno terapeutyczne!) powinna być nadrzędnym celem postępowania klinicznego. Szczegółowe omówienie powyższych metod przekracza ramy niniejszego artykułu.

Strategia neuroprotekcji

Szczegółowe poznanie kaskady zmian patofizjologicznych indukowanych niedokrwieniem mózgu stworzyło podstawy do opracowania strategii farmakologicznej służącej ochronie komórek OUN — przede wszystkim neuronów — określanej jako neuroprotekcja. W szerszym znaczeniu neuroprotekcja oznacza każde postępowanie prowadzące do ograniczenia obszaru uszkodzenia mózgu i w konsekwencji poprawiające stan neurologiczny chorego [18].

Opisano wiele „punktów uchwytu” dla leków o działaniu neuroprotekcijnym, w których interwencja farmakologiczna mogłaby zatrzymać lub przynajmniej spowolnić postępujące procesy uszkodzenia [19].

Ekscytotoksyczność

Najwięcej uwagi poświęcono mechanizmom ekscytotoksyczności, w której dominującą rolę odgrywają aminokwasy pobudzające. Istnieje kilka możliwych poziomów w hamowaniu kaskady uszkodzenia ekscytotoksycznego. Presynaptyczne uwalnianie aminokwasów pobudzających można zmniejszyć za pomocą blokerów kanałów jonowych zależnych od napięcia (np. fosfentyoina, BW 619C89, riluzol).

Substancje blokujące receptory *N*-metylo-*D*-asparaginowe (NMDA, *N-methyl-D-aspartate*) można podzielić na podgrupy w związku z ich miejscem uchwytu. Wśród nich są blokery miejsca glicynowego (np. kwas kynureinowy, gawestinel), miejsca poliaminowego (np. eliprotil) oraz miejsca dla kwasu glutaminowego. Należy jednak pamiętać, że globalne zablokowanie przekaźnictwa glutaminergicznego wiąże się z poważnymi efektami niepożądanymi z powodu dysfunkcji wielu czynności fizjologicznych. Jak dotychczas jedynym lekiem modulującym receptory NMDA, który „wszedł” do praktyki klinicznej, jest amantadyna. Jest to trójcykliczna sól aminowa, która wpływa na syntezę, akumulację i uwalnianie katecholamin w OUN. Amantadyna jest w 90% wydalana w postaci niezmienionej, a jej okres półtrwania wynosi 9,7–14,5 h. Dystrybucja obejmuje wszystkie organy, w tym OUN. Amantadyna powoduje uwalnianie dopaminy z neuronów i opóźnia jej wychwyt [20], co wykorzystano w leczeniu zaburzeń świadomości i przytomności oraz w pobudzaniu efektów rehabilitacji pacjentów po ostrym uszkodzeniu mózgu [21].

Możliwa jest również podobna blokada receptorów kwasu alfa-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego (AMPA, *alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) przez ich antagonistów (np. GYKI 52466, NBQX, ZK 200775, YM872). Związki te wykazywały dużą skuteczność neuroprotekcijną w badaniach na zwierzęcych modelach doświadczalnych. W próbach klinicznych stwierdzono jednak, że substancje te w większości przypadków wywołują poważne działania niepożądane, takie jak senność, wymioty, obniżenie ciśnienia tętniczego i zaburzenia psychotyczne, a zastosowanie ich w mniejszych, bezpieczniejszych dawkach nie wpływało na przebieg choroby. Jedynym lekiem z tej grupy, który znalazł zastosowanie w leczeniu stwardnienia zanikowego bocznego (SLA, *sclerosis lateralis amyotrophica*), jest riluzol. Jego skutecz-

ność jest jednak bardzo niewielka i nie stosuje się go w innych wskazaniach [22].

Ważnym elementem w strategii terapeutycznej jest przeciwdziałanie skutkom nadmiernego napływu jonów wapnia do komórki [23]. Nimodypina, pochodna dihydropirydyny, która blokuje zależne od napięcia kanały wapniowe typu L (*L-type VDCC [voltage-dependent calcium channel]*), była pierwszym lekiem z tej grupy szeroko przebadanym pod względem właściwości protekcyjnych. Skuteczność nimodypiny udowodniono jednak tylko w leczeniu krwotoków podpajęczynówkowych. Trwają badania nad selektywnymi antagonistami kanałów wapniowych typu N i P, swoistych dla neuronów. Ich aktywacja powoduje przede wszystkim uwalnianie neurotransmiterów. Duże nadzieje wiąże się z grupą peptydowych pochodnych **konotoksyn**, do których należą; SNX-111 (konotoksyna MVIIA), SNX-230 (konotoksyna MVIIC) oraz gatoksyna IVA. Szczególnie silne działanie wywierał związek SNX-111 zastosowany w zwierzęcym modelu zarówno ogniskowego, jak i globalnego niedokrwienia mózgu z szerokim oknem terapeutycznym (do 24 h). Dużo uwagi poświęca się również substancjom blokującym aktywność enzymów proteolitycznych — **kalpain**, które uszkadzają białka cytoszkieletu komórki. Na uwagę zasługują substancje AK275, AK295 i MDL 28170 cechujące się dużą aktywnością w badaniach na modelach zwierzęcych.

Stres oksydacyjny

Niezwykle istotną strategią terapeutyczną jest przeciwdziałanie procesom ujmowanym ogólnie jako „stres oksydacyjny” [24]. Takimi właściwościami charakteryzują się substancje hamujące utlenianie lipidów. Tirilazad, będący aminosteroidem, wykazywał znaczące działanie neuroprotekcyjne w zwierzęcych modelach ogniskowego niedokrwienia mózgu. Niestety, w przeprowadzonych próbach klinicznych III fazy nie potwierdzono takiego działania u ludzi. Inny inhibitor z tej grupy — ebselen — pozytywnie przeszedł fazę badań na zwierzętach, a wyniki prób klinicznych również są zachęcające. Duże nadzieje wiąże się także ze związkami określanymi jako „wymiatacze wolnych rodników”. Oprócz znanych, naturalnie występujących w organizmie substancji, takich jak witamina E czy melatonina, trwają prace nad nowymi preparatami — pochodnymi lazaroidów, dysmutazy nadtlenkowej i dietyltiomocznika (DMTU, *dimethylthiourea*). Ostatnio duże zainteresowanie wywołuje substancja edarawon,

która, poprzez swoje działanie antyoksydacyjne, wykazała umiarkowaną skuteczność w terapii SLA, uzyskując rejestrację amerykańskiej Agencji ds. Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*) i Europejskiej Agencji Leków (EMA, *European Medicines Agency*). Trwają także badania nad zastosowaniem edarawonu w kontekście ostrego uszkodzenia mózgu.

Apoptoza

Do innych ważnych kierunków w strategii neuroprotekcji należą próby hamowania apoptozy, zwiększanie endogennych mechanizmów ochronnych (zjawisko tolerancji mózgu) oraz przeciwdziałanie reakcji zapalnej. Techniki te są w fazie badań przedklinicznych, a ich przydatność w warunkach klinicznych zostanie zweryfikowana w przyszłości.

Regeneracja/neuroplastyczność mózgu

Innym bardzo ważnym odkryciem ostatnich lat są czynniki wzrostu i ich rola w procesach odbudowy uszkodzonych struktur komórek nerwowych [25]. Istotnym problemem pozostaje słaba przenikalność tych czynników przez barierę krew–mózg (BBB, *blood brain barrier*), co znacznie ogranicza możliwości ich wykorzystania w próbach klinicznych. Zdecydowanie najlepsze pod tym względem właściwości wykazuje podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF, *basic fibroblast growth factor*), który z tego względu najszerzej testowano w badaniach eksperymentalnych. Na podstawie dotychczasowych wyników przedstawiono hipotezę, że ta grupa związków może oddziaływać na uszkodzone komórki nerwowe nie tylko bezpośrednio neuroprotekcynie, ale również poprzez wzmaganie procesów regeneracji i plastyczności mózgu, co ujawnia się dopiero po dłuższym okresie obserwacji. Dobrym przykładem takiego właśnie działania jest cerebrolizyna — związek złożony z neuropeptydów o małej masie cząsteczkowej (< 10 kDa) i wolnych kwasów aminowych otrzymywanych z oczyszczonych białek mózgu świni. Wykazuje ona właściwości podobne do właściwości endogennych neurotrofin. Dzięki małej masie cząsteczkowej może przechodzić przez BBB. Jednocześnie uszczelnia BBB i barierę krew–płyn mózgowo-rdzeniowy (BCSFB, *blood–cerebrospinal fluid barrier*), przeciwdziałając przesiekowi płynu mózgowo-rdzeniowego i zmniejszając tym samym obrzęk mózgu. Cerebrolizyna moduluje aktywność kinaz proteinowych, *in vitro* zmniejsza o około 60%

aktywność naturalnych enzymów komórkowych z grupy kalpajny, które odgrywają kluczową rolę w apoptozie komórek. W ostatnich latach opublikowano wyniki badań, które mogą sugerować neuroprotekcjne i neuroregeneracyjne działanie tego leku [26]. W szczególności interesujące są doniesienia wskazujące na to, że podawanie leku w uzupełnieniu standardowo prowadzonej rehabilitacji u pacjentów z udarem mózgu, znacznie poprawia ich stan funkcjonalny [27].

Cytykolina to kolejny preparat o działaniu neuroprotekcyjnym, którego działanie polega na ochronie i regeneracji fosfolipidów błon komórkowych, zwiększeniu syntezy acetylocholino i dopaminy oraz obniżeniu generacji wolnych rodników [28]. U chorych z udarem mózgu przeprowadzono dwa rodzaje badań, w których testowano skuteczność cytykoliny:

- badania u chorych w ostrym okresie udaru, najpóźniej do 14 dni po zachorowaniu, służące ocenie wpływu preparatu na samodzielność chorych za pomocą zmodyfikowanej skali Rankina (mRS, *modified Rankin Scale*) i na aktywność codziennego życia ocenianą za pomocą indeksu Barthel (BI, *Barthel Index*) w perspektywie krótkoterminowej, tj. do 12 tygodni;
- badania u chorych po ostrym okresie udaru służące ocenie wpływu długoterminowego leczenia cytykolina na funkcje poznawcze i jakość życia w perspektywie odległej, tj. do 2 lat.

Skuteczność cytykoliny u chorych w ostrym okresie udaru mózgu badano po raz pierwszy w latach 80. ubiegłego wieku. Od tego czasu opublikowano wyniki 17 badań klinicznych, w tym 15 badań z udziałem chorych z udarem niedokrwiennym [29–43] i dwóch dotyczących chorych na udar krwotoczny [44, 45]. W 15 badaniach lek podawano najpóźniej do 48 h po zachorowaniu na udar mózgu, w jednym — 10 dni po zachorowaniu [46] i w jednym — do 14 dni [45]. Łącznie w tych badaniach wzięło udział 9175 chorych. Wyniki pierwszego z nich opublikowano w 1980 roku [29], a ostatniego w 2012 roku [42]. Badania te różniły się czasem trwania okna terapeutycznego — od 8 h [38] do 14 dni [45], dawkowaniem — od 500 mg/dobę [34] do 4000 mg/dobę [47], sposobem podawania leku — doustnie [41], *i.v.* [45] lub najpierw *i.v.*, a potem doustnie [42] oraz okresem obserwacji — od 10 dni [29] do 12 tygodni [42]. Warto podkreślić, że w omawianych badaniach analizowano odmienne pierwszorzędowe punkty końcowe, na przykład globalną poprawę [42], poprawę ruchową [30],

samodzielność mierzona za pomocą mRS [45, 48], aktywność życia codziennego mierzona za pomocą BI [33, 34], poziom świadomości [45] czy objętość ogniska niedokrwiennego w rezonansie magnetycznym [35].

Wśród 17 cytowanych wyżej badań pozytywne efekty leczenia w zakresie pierwszorzędowych punktów końcowych zaobserwowano w 6 przypadkach [29, 30, 35, 40, 45, 46], a w analizach podgrup — w kolejnych 4 przypadkach [33, 34, 36, 42].

W 2012 roku w czasopiśmie „Lancet” [42] opublikowano wyniki najważniejszego i największego badania, w którym oceniano skuteczność cytykoliny w ostrym udarze niedokrwinnym (ICTUS, *International Citicoline Trial on acUte Stroke*). Niestety, przerwano je po włączeniu 70% chorych, jeszcze przed osiągnięciem poziomu rekrutacji, który gwarantował odpowiednią moc badania. Przyczyną była analiza cząstkowa, która nie wykazała przewagi cytykoliny nad placebo.

Badanie ICTUS było międzynarodowym, wielośrodkowym badaniem prospektywnym kontrolowanym placebo. Jego celem była ocena wpływu cytykoliny na poprawę neurologiczną 3 miesiące po średnio nasilonym lub ciężkim udarze niedokrwinnym mózgu. Rekrutację przerwano po włączeniu 2298 chorych. Nasilenie udaru niedokrwinnego definiowano za pomocą trzech skal: *National Institute of Health Stroke Scale* (NIHSS), mRS, BI. Punktem końcowym była tak zwana globalna poprawa, zdefiniowana jako wynik w NIHSS nie większy niż 1 punkt, wynik w mRS nie większy niż 1 punkt oraz wynik w BI wynoszący 95 lub więcej punktów łącznie. Uczestnicy badania w grupie leczonej aktywnie otrzymywali cytykolinę w dawce 2000 mg/dobę, początkowo *i.v.*, a potem doustnie. Czas leczenia wynosił 6 tygodni. W każdym przypadku, jeśli były wskazania, chory otrzymywał *i.v.* rekombinowany tkankowy aktywator plazminogenu (rt-PA, *recombinant tissue plasminogen activator*). Wyniki badania ujawniły brak przewagi cytykoliny nad placebo w ocenie zdefiniowanego w odniesieniu do celów tego badania punktu końcowego.

Po szczegółowym przeanalizowaniu uzyskanych wyników wśród potencjalnych źródeł niepowodzenia tego badania wymieniono:

- odstępstwa od protokołu aż u 24% uczestników (267 osób leczonych cytykolina i 294 otrzymujących placebo);
- zastosowanie leczenia trombolitycznego za pomocą rt-PA podawanego *i.v.* u 46% uczestni-

ków badania, które u znacznej liczby chorych spowodowało powrót do zdrowia, zanim włączono cytykolinę;

- wdrożenie kompleksowej opieki poudarowej (identyfikacja i eliminacja modyfikowalnych czynników ryzyka, identyfikacja i leczenie powikłań, intensywne rehabilitacja), która w konsekwencji doprowadziła do mniejszej niż spodziewana liczby niepożądanych punktów końcowych w grupie otrzymującej placebo;
- przerwanie badania po włączeniu 70% zaplanowanej liczby chorych po trzeciej z czterech przewidzianych pośrednich analiz wynikające z braku spodziewanych korzyści;
- niewdrożenie zalecenia komitetu monitorującego bezpieczeństwo w badaniu ICTUS (*The ICTUS Data Safety Monitoring Board*) obligującego do jego kontynuacji aż do osiągnięcia zaplanowanej 80% mocy badania, co w konsekwencji uniemożliwiło sprawdzenie pierwotnej hipotezy;
- zbyt długie, bo 24-godzinne okno terapeutyczne, co uniemożliwiło jak najwcześniejsze rozpoczęcie działania neuroprotektynowego cytykoliny;
- brak analizy wpływu rehabilitacji lub jej intensywności na efekt działania cytykoliny mimo dowodów, że lek ten wzmacnia efekt rehabilitacji [49, 50].

Warto podkreślić, że analiza podgrup w badaniu ICTUS wykazała korzyści z leczenia cytykolina w zakresie niektórych testowanych parametrów lub w niektórych podgrupach chorych, na przykład:

- wyraźnie większą poprawę w skali NIH, mierzona między dobą zachorowania a 90. dobą w grupie leczonej cytykolina w porównaniu z grupą otrzymującą placebo: $-2,18$ w porównaniu z $-0,91$ (wielkość efektu $1,26$; 95-proc. przedział ufności [CI, *confidence interval*] $0,99-2,52$; $p = 0,051$);
- wyraźnie większe korzyści z leczenia cytykolina u osób z udarem o mniejszym nasileniu (8–14 pkt. w NIHSS). Zarówno analiza zgodna z zaplanowanym leczeniem (ITT, *intention-to-treat analysis*), jak i analiza wyników w grupach poddanych interwencji (PPA, *per protocol analysis*) wykazała istotnie większą korzyść dla chorych z mniej nasilonym udarem (ITT: $p = 0,0209$; PPA $0,0043$);
- większa skuteczność cytykoliny u chorych nieleczonych za pomocą rt-PA. W badaniu ICTUS prawie 50% uczestników otrzymywało

rt-PA *i.v.* — zarówno w grupie leczonej cytykoliną, jak i w grupie otrzymującej placebo. Dla porównania w codziennej praktyce klinicznej rt-PA otrzymuje zaledwie około 10% chorych z udarem niedokrwiennym mózgu. Nie można wykluczyć, że już samo podanie rt-PA spowodowało u niektórych chorych maksymalne korzyści z leczenia, co uniemożliwiło ujawnienie się efektów leczenia cytykoliną;

- większa skuteczność cytykoliny u osób po 70. roku życia w porównaniu z osobami młodszymi (ITT: $p = 0,0014$; PPA $< 0,0001$). Nie można wykluczyć, że efekt ten odzwierciedla zależną od wieku modyfikację metabolizmu leków działających na OUN i układ sercowo-naczyniowy. Siedemnaście przedstawionych wyżej badań klinicznych, łącznie z badaniem ICTUS, stało się podstawą sześciu wartościowych metaanaliz obejmujących duże grupy pacjentów — od 1372 do 5687 osób [28, 42, 48, 51–53]. W pięciu z tych analiz udokumentowano skuteczność cytykoliny u chorych z ostrym udarem niedokrwiennym w odniesieniu do poprawy sprawności ocenianej za pomocą mRS i poprawy w zakresie aktywności życia codziennego ocenianego za pomocą BI [28, 42, 48, 51, 53].

Uzyskane wyniki pozwalają na rekomendowanie cytykoliny u chorych w ostrym okresie udaru niedokrwiennego mózgu jako leczenia wspomagającego w celu poprawy sprawności po udarze. Szczególnie korzystnego efektu działania cytykoliny można się spodziewać u chorych ze średnio nasilonym deficytem neurologicznym, u których lek w dawce 2000 mg/dobę będzie włączony do 24 h po zachorowaniu. Należy podkreślić, że większy efekt leczenia uzyskają osoby, u których w trakcie leczenia zostanie wdrożony systematyczny program rehabilitacji. Drugi rodzaj badań u chorych z udarem mózgu, ukierunkowany na ocenę wpływu cytykoliny na funkcje poznawcze i jakość życia w perspektywie obserwacji długoterminowej, wykonano 2-krotnie. W obu badaniach wykazano korzystny wpływ cytykoliny na oceniane punkty końcowe.

Wyniki pierwszego z tych badań opublikowano w 2013 roku [54]. Uczestniczyło w nim 347 chorych z udarem niedokrwiennym mózgu, których 6 tygodni po zachorowaniu przydzielono do dwóch grup — pierwszej, w której cytykolinę podawano w dawce 1 g/dobę przez 12 miesięcy w ramach terapii dodanej do leczenia standardowego i drugiej, poddanej tylko leczeniu standardowemu. U wszystkich chorych po miesiącu,

a następnie po pół roku i po roku od włączenia do badania wykonywano badanie neuropsychologiczne, w którym oceniano pięć domen poznawczych. Stwierdzono, że osoby leczone cytykoliną uzyskały lepsze wyniki w zakresie uwagi i funkcji wykonawczych oraz orientacji już po 6 miesiącach leczenia i ta różnica utrzymała się do zakończenia badania (po roku od rozpoczęcia leczenia).

W drugim badaniu, opublikowanym w 2016 roku [55], uczestniczyło 163 chorych po przebytym udarze niedokrwiennym mózgu, których włączono do badania także 6 tygodni po zachorowaniu. Pacjenci zostali podzieleni na dwie grupy; pierwsza otrzymywała cytykolinę w dawce 1 g/dobę jako leczenie dodane do terapii standardowej, drugą objęto tylko leczeniem standardowym. Badanie trwało 2 lata. Protokół badania neuropsychologicznego był identyczny jak w pierwszym badaniu, a oceny dokonywano po miesiącu, po 6 miesiącach, po roku i po 2 latach. Dodatkowo po 2 latach u wszystkich chorych oceniano jakość życia za pomocą kwestionariusza *EuroQoL-5D*, który służy do analizy mobilności, samoobsługi, codziennej aktywności, bólu/dyskomfortu oraz niepokoju/agresji. W badaniu potwierdzono korzystny wpływ cytykoliny na jakość życia oraz funkcje poznawcze mierzone za pomocą wskaźnika *Global Cognitive Impairment (GCI)*, który definiuje się jako wynik poniżej 40 punktów uzyskanych w ocenie za pomocą wskaźnika całościowej oceny funkcji poznawczych (*Global Cognitive Status*).

Powyższe badania wskazują także na korzystny efekt działania cytykoliny, stosowanej przewlekłe w dawce 1000 mg/dobę nawet do 2 lat, na poprawę niektórych funkcji poznawczych oraz jakości życia chorych po udarze niedokrwiennym mózgu.

Warto podkreślić, że cytykolina charakteryzuje się bardzo dobrym profilem bezpieczeństwa. W 2009 roku Cho i Kim [39] opublikowali wyniki badania obserwacyjnego przeprowadzonego u 4191 chorych z udarem niedokrwiennym mózgu, leczonych cytykoliną w dawce 500–4000 mg/dobę przez co najmniej 6 tygodni. W badanej grupie stwierdzono zaledwie 37 niewielkich objawów niepożądanych u 31 chorych [39].

Podsumowanie

W podsumowaniu należy stwierdzić, że mimo dotychczasowych niepowodzeń terapii neuroprotekcijnej w chorobach OUN strategia stymulowania neuroregeneracji/neuroplastyczności będzie zajmować coraz ważniejsze miejsce we

współczesnej neurologii. Po przeanalizowaniu obszernej literatury dotyczącej tego zagadnienia wydaje się, że w sytuacjach patologicznych o gwałtownym przebiegu (np. udar mózgu, urazy OUN) racjonalnym podejściem będzie terapia skojarzona z zastosowaniem substancji skutecznie działających na różnych poziomach i etapach kaskady uszkodzenia [55]. W przypadku schorzeń o powolnym, ale postępującym przebiegu niezwykle ważne są wczesna diagnostyka i rozpoczęcie leczenia w okresie bezobjawowym, gdy większość neuronów jeszcze nie uległa destrukcji. W przeciwnym razie jedynym racjonalnym podejściem pozostanie leczenie objawowe lub zastosowanie opracowywanych obecnie technik rekonstrukcji tkanek poprzez pobudzanie ich rozwoju.

PIŚMIENNICTWO

1. Thrift AG, Thayabaranathan T, Howard G, et al. Global stroke statistics. *Int J Stroke*. 2017; 12(1): 13–32, doi: [10.1177/1747493016676285](https://doi.org/10.1177/1747493016676285), indexed in Pubmed: [27794138](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27794138/).
2. Hankey GJ. Stroke. *The Lancet*. 2017; 389(10069): 641–654, doi: [10.1016/S0140-6736\(16\)30962-x](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30962-x).
3. Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol*. 1982; 11(5): 491–498, doi: [10.1002/ana.410110509](https://doi.org/10.1002/ana.410110509), indexed in Pubmed: [7103425](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7103425/).
4. Pulsinelli W. Pathophysiology of acute ischemic stroke. *Lancet*. 1992; 339: 533–536, indexed in Pubmed: [1346887](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1346887/).
5. Ginsberg MD, Palesch YY, Hill MD, et al. ALIAS and Neurological Emergencies Treatment Trials (NETT) Investigators. High-dose albumin treatment for acute ischaemic stroke (ALIAS) Part 2: a randomised, double-blind, phase 3, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*. 2013; 12(11): 1049–1058, doi: [10.1016/S1474-4422\(13\)70223-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70223-0), indexed in Pubmed: [24076337](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24076337/).
6. Kane I, Sandercock P, Wardlaw J. Magnetic resonance perfusion diffusion mismatch and thrombolysis in acute ischaemic stroke: a systematic review of the evidence to date. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007; 78(5): 485–491, doi: [10.1136/jnnp.2006.100347](https://doi.org/10.1136/jnnp.2006.100347), indexed in Pubmed: [17056631](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17056631/).
7. Mair G, Wardlaw JM. Imaging of acute stroke prior to treatment: current practice and evolving techniques. *Br J Radiol*. 2014; 87(1040): 20140216, doi: [10.1259/bjr.20140216](https://doi.org/10.1259/bjr.20140216), indexed in Pubmed: [24936980](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24936980/).
8. Naritomi H, Sasaki M, Kanashiro M, et al. Flow thresholds for cerebral energy disturbance and Na⁺ pump failure as studied by in vivo 31P and 23Na nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1988; 8(1): 16–23, doi: [10.1038/jcbfm.1988.3](https://doi.org/10.1038/jcbfm.1988.3), indexed in Pubmed: [2448321](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2448321/).
9. Erecińska M, Nelson D, Wilson DF, et al. Neurotransmitter amino acids in the CNS. I. Regional changes in amino acid levels in rat brain during ischemia and reperfusion. *Brain Res*. 1984; 304(1): 9–22, indexed in Pubmed: [6146383](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6146383/).
10. Attia MS, Lass E, Loch Macdonald R. Nitric oxide synthases: three pieces to the puzzle? *Acta Neurochir Suppl*. 2015; 120: 131–135, doi: [10.1007/978-3-319-04981-6_22](https://doi.org/10.1007/978-3-319-04981-6_22), indexed in Pubmed: [25366612](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25366612/).
11. Franklin TB, Krueger-Naug AM, Clarke DB, et al. The role of heat shock proteins Hsp70 and Hsp27 in cellular protection of the central nervous system. *Int J Hyperthermia*. 2005; 21(5): 379–392, doi: [10.1080/02656730500069955](https://doi.org/10.1080/02656730500069955), indexed in Pubmed: [16048836](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16048836/).
12. Sakai S, Shichita T. Inflammation and neural repair after ischemic brain injury. *Neurochem Int*. 2018 [Epub ahead of print], doi: [10.1016/j.neuint.2018.10.013](https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.10.013), indexed in Pubmed: [30342960](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30342960/).
13. Ao LY, Yan YY, Zhou L, et al. Immune cells after ischemic stroke onset: roles, migration, and target intervention. *J Mol Neurosci*. 2018; 66(3): 342–355, doi: [10.1007/s12031-018-1173-4](https://doi.org/10.1007/s12031-018-1173-4), indexed in Pubmed: [30276612](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30276612/).
14. Ferrer : 2006.
15. Sekerdag E, Solaroglu I, Gursoy-Ozdemir Y. Cell death mechanisms in stroke and novel molecular and cellular treatment options. *Curr Neuropharmacol*. 2018; 16(9): 1396–1415, doi: [10.2174/1570159X16666180302115544](https://doi.org/10.2174/1570159X16666180302115544), indexed in Pubmed: [29512465](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29512465/).
16. Choi JH, Pile-Spellman J. Reperfusion changes after stroke and practical approaches for neuroprotection. *Neuroimaging Clin N Am*. 2018; 28(4): 663–682, doi: [10.1016/j.nic.2018.06.008](https://doi.org/10.1016/j.nic.2018.06.008), indexed in Pubmed: [30322601](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30322601/).
17. Shi L, Rocha M, Leak RK, et al. A new era for stroke therapy: integrating neurovascular protection with optimal reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2018; 38(12): 2073–2091, doi: [10.1177/0271678X18798162](https://doi.org/10.1177/0271678X18798162), indexed in Pubmed: [30191760](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30191760/).
18. Ginsberg MD. Expanding the concept of neuroprotection for acute ischemic stroke: the pivotal roles of reperfusion and the collateral circulation. *Prog Neurobiol*. 2016; 145-146: 46–77, doi: [10.1016/j.pneurobio.2016.09.002](https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.09.002), indexed in Pubmed: [27637159](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27637159/).
19. Ginsberg MD. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology*. 2008; 55(3): 363–389, doi: [10.1016/j.neuropharm.2007.12.007](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.12.007), indexed in Pubmed: [18308347](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18308347/).
20. Spilovska K, Zemek F, Korabecny J, et al. Adamantane — a lead structure for drugs in clinical practice. *Curr Med Chem*. 2016; 23(29): 3245–3266, indexed in Pubmed: [27222266](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27222266/).
21. Giacino JT, Whyte J, Bagiella E, et al. Placebo-controlled trial of amantadine for severe traumatic brain injury. *N Engl J Med*. 2012; 366(9): 819–826, doi: [10.1056/NEJMoa1102609](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1102609), indexed in Pubmed: [22375973](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22375973/).
22. Hinchcliffe M, Smith A. Riluzole: real-world evidence supports significant extension of median survival times in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Degener Neurol Neuromuscul Dis*. 2017; 7: 61–70, doi: [10.2147/DNND.S135748](https://doi.org/10.2147/DNND.S135748), indexed in Pubmed: [30050378](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30050378/).
23. Kobayashi T, Mori Y. Ca²⁺ channel antagonists and neuroprotection from cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol*. 1998; 363(1): 1–15, indexed in Pubmed: [9877076](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9877076/).
24. Chamorro Á, Dirnagl U, Urra X, et al. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *Lancet Neurol*. 2016; 15(8): 869–881, doi: [10.1016/S1474-4422\(16\)00114-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00114-9), indexed in Pubmed: [27180033](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27180033/).
25. Chan SuJ, Love C, Spector M, et al. Endogenous regeneration: Engineering growth factors for stroke. *Neurochem Int*. 2017; 107: 57–65, doi: [10.1016/j.neuint.2017.03.024](https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.03.024), indexed in Pubmed: [28411103](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28411103/).
26. Wiszniewska M, Członkowska A. Rola cerybrolizyny w neuroprotekcji i neuroregeneracji — przegląd piśmiennictwa. *Pol Przegl Neuro*. 2014; 10(3): 114–122.
27. Muresanu DF, Heiss WD, Hoemberg V, et al. Cerebrolysin and recovery after stroke (CARS): a randomized, placebo-controlled, double-blind, multicenter trial. *Stroke*. 2016; 47(1): 151–159, doi: [10.1161/STRO-KEAHA.115.009416](https://doi.org/10.1161/STRO-KEAHA.115.009416), indexed in Pubmed: [26564102](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26564102/).
28. Saver JL. Citicoline: update on a promising and widely available agent for neuroprotection and neurorepair. *Rev Neurol Dis*. 2008; 5(4): 167–177, indexed in Pubmed: [19122569](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19122569/).
29. Boudouresques AB, Michel B. Therapeutic conduct in light of cerebral vascular accident and the use of CDP-choline. Presented at the International Symposium: Brain suffering and precursors of phospholipids. Paris, January 18, 1980.
30. Goyas JY, Bastard J, Missoum A. Results after 90 days of stroke treatment with CDP choline concerning a double blind trial (in French). Presented at: International Symposium: brain suffering and precursors of phospholipids. Paris, January 18, 1980: 123–128.
31. Corso EA, Arena M, Ventimiglia A, et al. [CDP choline in cerebral vasculopathy: clinical evaluation and instrumental semeiology]. *Clin Ter*. 1982; 102(4): 379–386, indexed in Pubmed: [6754218](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6754218/).
32. Tazaki Y, Sakai F, Otomo E, et al. Treatment of acute cerebral infarction with a choline precursor in a multicenter double-blind placebo-controlled study. *Stroke*. 1988; 19(2): 211–216, indexed in Pubmed: [3278412](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3278412/).
33. Clark WM, Warach SJ, Pettigrew LC, et al. A randomized dose-response trial of citicoline in acute ischemic stroke patients. *Citicoline Stroke Study Group*. *Neurology*. 1997; 49(3): 671–678, indexed in Pubmed: [9305321](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9305321/).
34. Clark WM, Williams BJ, Selzer KA, et al. A randomized efficacy trial of citicoline in patients with acute ischemic stroke. *Stroke*. 1999; 30(12): 2592–2597, indexed in Pubmed: [10582983](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10582983/).
35. Warach S, Pettigrew LC, Dashe JF, et al. Effect of citicoline on ischemic lesions as measured by diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Citicoline 010 Investigators*. *Ann Neurol*. 2000; 48(5): 713–722, indexed in Pubmed: [11079534](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11079534/).
36. Clark WM, Wechsler LR, Sabounjian LA, et al. Citicoline Stroke Study Group. A phase III randomized efficacy trial of 2000 mg citicoline in acute ischemic stroke patients. *Neurology*. 2001; 57(9): 1595–1602, indexed in Pubmed: [11706098](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11706098/).

37. Lin WX. The therapeutic effect of edavarone for acute cerebral infarction. *Chin J Integ Med. Cardio/Cerebrovasc Dis (Chinese)*. 2007; 5: 205–207.
38. Alvarez E, Gonzalez M. Effectiveness and tolerability of citicoline in acute ischemic stroke, randomized, double blind study compared with placebo. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. 2007; 26: 127–30.
39. Cho HJ, Kim YJ. Efficacy and safety of oral citicoline in acute ischemic stroke: drug surveillance study in 4,191 cases. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2009; 31(3): 171–176, doi: [10.1358/mf.2009.31.3.1364241](https://doi.org/10.1358/mf.2009.31.3.1364241), indexed in Pubmed: [19536360](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19536360/).
40. Leon-Jimenez E, Chiquete E, Cantu C, et al. Citicoline for acute ischemic stroke in Mexican hospitals: a retrospective post-marketing analysis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2010; 32(5): 325–330, doi: [10.1358/mf.2010.32.5.1465004](https://doi.org/10.1358/mf.2010.32.5.1465004), indexed in Pubmed: [20664823](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20664823/).
41. Mitta M, Goel D, Bansal KK, et al. Edaravone — citicoline comparative study in acute ischemic stroke (ECCS-AIS). *J Assoc Physicians India*. 2012; 60: 36–38, indexed in Pubmed: [23767201](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23767201/).
42. Dávalos A, Alvarez-Sabín J, Castillo J, et al. International Citicoline Trial on acUte Stroke (ICTUS) trial investigators. Citicoline in the treatment of acute ischaemic stroke: an international, randomised, multicentre, placebo-controlled study (ICTUS trial). *Lancet*. 2012; 380(9839): 349–357, doi: [10.1016/S0140-6736\(12\)60813-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60813-7), indexed in Pubmed: [22691567](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22691567/).
43. Grewal N, Sharma G, Mohan G, et al. To study efficacy and safety of citicoline in acute ischemic stroke. *Int J Basic Clin Pharmacol*. 2012; 1(1): 72–76, doi: [10.5455/2319-2003.ijbcp001412](https://doi.org/10.5455/2319-2003.ijbcp001412).
44. Secades JJ, Alvarez-Sabín J, Rubio F, et al. Trial Investigators. Citicoline in intracerebral haemorrhage: a double-blind, randomized, placebo-controlled, multi-centre pilot study. *Cerebrovasc Dis*. 2006; 21(5–6): 380–385, doi: [10.1159/000091547](https://doi.org/10.1159/000091547), indexed in Pubmed: [16490951](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16490951/).
45. Chua R. Role of intravenous citicoline for supratentorial hemorrhage. *Cerebrovasc Dis*. 2007; 23(Suppl 2): 73.
46. Corso EA, Arena M, Ventimiglia A, et al. [CDP choline in cerebral vasculopathy: clinical evaluation and instrumental semeiology]. *Clin Ter*. 1982; 102(4): 379–386, indexed in Pubmed: [6754218](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6754218/).
47. Secades JJ, Alvarez-Sabín J, Castillo J, et al. Citicoline for acute ischemic stroke: a systematic review and formal meta-analysis of randomized, double-blind, and placebo-controlled trials. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2016; 25(8): 1984–1996, doi: [10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.04.010](https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.04.010), indexed in Pubmed: [27234918](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27234918/).
48. Hazama T, Hasegawa T, Ueda S, et al. Evaluation of the effect of CDP-choline on poststroke hemiplegia employing a double-blind controlled trial. Assessed by a new rating scale for recovery in hemiplegia. *Int J Neurosci*. 1980; 11(3): 211–225, indexed in Pubmed: [7002829](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7002829/).
49. Iranmanesh F, Vakilian A. Efficiency of citicoline in increasing muscular strength of patients with nontraumatic cerebral hemorrhage: a double-blind randomized clinical trial. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2008; 17(3): 153–155, doi: [10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2008.01.006](https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2008.01.006), indexed in Pubmed: [18436157](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18436157/).
50. Dávalos A, Castillo J, Alvarez-Sabín J, et al. Oral citicoline in acute ischemic stroke: an individual patient data pooling analysis of clinical trials. *Stroke*. 2002; 33(12): 2850–2857, indexed in Pubmed: [12468781](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12468781/).
51. Shi PY, Zhou XC, Yin XX, et al. Early application of citicoline in the treatment of acute stroke: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2016; 36(2): 270–277, doi: [10.1007/s11596-016-1579-6](https://doi.org/10.1007/s11596-016-1579-6), indexed in Pubmed: [27072975](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27072975/).
52. Agarwal S, Patel BM. Is aura around citicoline fading? A systemic review. *Indian J Pharmacol*. 2017; 49(1): 4–9, doi: [10.4103/0253-7613.201037](https://doi.org/10.4103/0253-7613.201037), indexed in Pubmed: [28458415](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28458415/).
53. Alvarez-Sabín J, Ortega G, Jacas C, et al. Long-term treatment with citicoline may improve poststroke vascular cognitive impairment. *Cerebrovasc Dis*. 2013; 35(2): 146–154, doi: [10.1159/000346602](https://doi.org/10.1159/000346602), indexed in Pubmed: [23406981](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23406981/).
54. Alvarez-Sabín J, Santamarina E, Maisterra O, et al. Long-term treatment with citicoline prevents cognitive decline and predicts a better quality of life after a first ischemic stroke. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(3): 390, doi: [10.3390/ijms17030390](https://doi.org/10.3390/ijms17030390), indexed in Pubmed: [26999113](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26999113/).
55. Knecht T, Story J, Liu J, et al. Adjunctive therapy approaches for ischemic stroke: innovations to expand time window of treatment. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(12): 2756, doi: [10.3390/ijms18122756](https://doi.org/10.3390/ijms18122756), indexed in Pubmed: [29257093](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29257093/).