

С.А. Морозов, Г.В. Томаш, Е.Я. Шевела, Л.В. Сахно, А.В. Смык, Н.М. Старостина, А.А. Останин, Е.Р. Черных

М2-ПОДОБНЫЕ МАКРОФАГИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ КАНДИДАТЫ В ЛЕЧЕНИИ ПОСЛЕДСТВИЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОГО ИНСУЛЬТА

НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

Целью настоящего исследования стала оценка безопасности и эффективности *in vitro* генерированных М2-подобных макрофагов в лечении больных с ишемическим и геморрагическим инсультом в восстановительном и резидуальном периоде. Однократное эндолумбальное введение аутологичных макрофагов в средней дозе $17,9 \times 10^6$ клеток проведено 13 пациентам с ишемическим ($n = 10$) и геморрагическим ($n = 3$) инсультом. Через 6 месяцев после введения клеток у всех пациентов отмечалось клиническое улучшение. Отмечалось достоверное снижение балла NIHSS с $8,6 \pm 1,06$ до $4,4 \pm 0,55$ ($p = 0,0008$), у части пациентов регрессировали нарушения чувствительности, наблюдалось улучшение когнитивных функций и качество жизни. Таким образом, показана возможность генерации М2-подобных макрофагов у пациентов с инсультом, эндолумбальное введение клеток безопасно и не вызывает выраженных побочных реакций и осложнений и, по предварительным данным, позволяет добиться улучшения двигательных и когнитивных функций.

Ключевые слова: инсульт, М2-подобные макрофаги

M2-LIKE MACROPHAGES ARE POTENTIAL CANDIDATES FOR BRAIN STROKE OUTCOMES' TREATMENT

S.A. Morozov, G.V. Tomash, E.Ya. Shevela, L.V. Sakhno, A.V. Smyk, N.M. Starostina, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh

Research Institute of Clinical Immunology SD RAMS, Novosibirsk, Russia

The safety and effectiveness of *in vitro* generated M2-like macrophages for treatment of patients with ischemic and hemorrhagic brain stroke in reparative and residual periods has been evaluated. A single endolumbar administration of autologous M2-like macrophages in the mean dose of $17,9 \times 10^6$ cells was conducted in 13 patients with ischemic ($n = 10$) and hemorrhagic ($n = 3$) brain stroke. At 6 months after cells administration all the patients had clinical improvement. NIHSS score decreased from $8,6 \pm 1,06$ to $4,4 \pm 0,55$ ($p = 0,0008$), several patients showed the decrease of sensitiveness impairments, improvement of cognitive functions and enhanced quality of life. Thus, we demonstrated an ability of generation M2-like macrophages from patients with brain stroke. Endolumbar administration of these cells was safe and didn't cause severe adverse effects and complications and –in preliminary data – improved motional and cognitive functions.

Keywords: brain stroke, M2-like macrophages

Церебральные инсульты в настоящее время являются глобальной медицинской и социальной проблемой в связи с высокими показателями заболеваемости, смертности и инвалидизации во всем мире. Эффективность традиционного медикаментозного и хирургического лечения неврологического дефицита, обусловленного острым нарушением мозгового кровообращения, остается низкой. В связи с этим, в последние годы отмечается значительное повышение внимания к разработке стратегий, направленных на восстановление нарушенных функций в результате стимуляции репаративных процессов, в частности, с помощью клеток иммунной системы и, прежде всего, макрофагов [5, 11]. Активация клеток врожденного иммунитета и их накопление в нервной ткани при патологии долгое время ассоциировалось с исключительно повреждающим действием макрофагов. Действительно, продуцируемые макрофагами воспалительные медиаторы способны в высоких дозах вызывать гибель нервных клеток. Однако недавние исследования в моделях повреждения ЦНС продемонстрировали нейропротективные эффекты макрофагов, в частности, способность этих

клеток стимулировать рост аксонов, их спраутинг и ремиелинизацию [9, 13].

Позитивные эффекты клеток микроглии и макрофагов на репаративные процессы в ЦНС связывают со способностью макрофагов: 1) элиминировать поврежденные клетки и нейро-токсические продукты [5, 6]; 2) продуцировать цитокины и ростовые/трофические факторы с противовоспалительной, нейропротективной и регенераторной активностью [6, 7]; 3) рекрутировать и активировать нейральные СК [14]; 4) стимулировать ангиогенез абсолютно необходимый для процессов репарации.

Оппозитные эффекты макрофагов могут быть обусловлены их функциональной гетерогенностью. Так, классические провоспалительные макрофаги (M1) обладают высокой антиген-презентирующей активностью, усиливают воспаление и активируют Т-хелперные клетки 1-го типа, но при этом вызывают деструкцию тканей. Противовоспалительные (M2) макрофаги, обладая низкой антиген-презентирующей активностью, участвуют в иммунорегуляции, активируют ангиогенез и стимулируют репарацию тканей. Кроме того, M2 макрофаги активируют Th2 ответ, в наибольшей

степени благоприятствующий репарации нервной ткани [8, 10, 12].

Используя дефицитные по ростовым факторам условия культивирования, мы разработали способ генерации М2-подобных макрофагов с низкой провоспалительной активностью и значительным регенеративным потенциалом (в частности, продуцирующих высокие уровни IGF-1 и VEGF) [3]. Проведенные нами клинические исследования показали, что использование М2-подобных макрофагов у детей с детским церебральным параличом является безопасным и по предварительным данным улучшает неврологический статус пациентов [2]. **Целью** настоящей работы стало проведение пилотных исследований по оценке безопасности и эффективности М2-подобных макрофагов в лечении больных с ишемическим и геморрагическим инсультом в восстановительном и резидуальном периоде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинические испытания проводились согласно разработанному протоколу, утвержденному решением ученого совета Института и одобренному локальным этическим комитетом после получения письменного информированного согласия пациента или родственников. Исследования проводились в дизайне нерандомизированного проспективного пилотного испытания с оценкой эффекта «до — после».

Критериями включения пациентов в исследование были: возраст от 18 до 75 лет включительно, наличие ишемического или геморрагического инсульта, подтвержденного данными МРТ, давностью от 3-х месяцев до 1 года, наличие письменного информированного согласия. Критериями исключения являлось наличие выраженной сердечной, дыхательной, печеночной или почечной недостаточности; неконтролируемой инфекции, наличие компрессии или дислокации головного мозга, беременность и период лактации.

В период лечения в стационаре и на амбулаторном этапе все пациенты получали антиагрегантную, вазоактивную и метаболическую терапию, при необходимости назначались гипотензивные и антиаритмические препараты, использовались методы физиотерапии, занятия с инструктором ЛФК.

На фоне проведения базисной терапии всем пациентам было выполнено эндолюмбальное введение аутологичных М2-подобных макрофагальных клеток. Профилактику возможных осложнений люмбальной пункции и цитокиновых реакций проводили введением дексаметазона в дозе 4—12 мг в/в капельно, сульфата магния, кетонала.

Первичной конечной точкой была оценка двигательных функций по шкале Национального института здоровья США (NIHSS). Вторичной конечной точкой была оценка степени функционального восстановления (по индексу Бартел), а также оценка когнитивной сферы с помощью мини-теста оценки когнитивных функций (MMSE). Обследование больных проводилось до начала и через 6 месяцев после проведения клеточной терапии.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 for Windows.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За период с 26.05.2010 по 07.03.2012 г. на базе отделения иммунологии НИИ КИ СО РАМН прошли лечение 13 пациентов (5 женщин и 8 мужчин) в восстановительном периоде ишемического ($n = 10$) или геморрагического ($n = 3$) инсульта. Возраст пациентов варьировал от 41 до 71 года (в среднем 54,1 года). Характеристика больных представлена в таблице 1. Из данных таблицы видно, что из 13 пациентов ишемический инсульт диагностировался в 10 (76,9 %), геморрагический — в 3 (23,1 %) случаях. Во всех случаях церебральный инсульт диагностировался впервые. У всех пациентов с ишемическим инсультом нарушения мозгового кровообращения локализовались в каротидной системе (в 4 (40 %) случаев — поражение левого полушария головного мозга, в 6 (60 %) — правого). У пациентов с геморрагическим инсультом во всех случаях выявлены внутримозговые гематомы с локализацией в левом полушарии головного мозга. Двое из этих пациентов получили оперативное лечение в виде трепанации черепа и дренирования внутримозговой гематомы. Время от манифестации инсульта до проведения клеточной терапии в среднем составило 225 дней.

Таблица 1
Характеристика пациентов

Параметры	
Количество	13
Средний возраст пациентов, годы	54,1
Пол (мужчины/женщины)	8 (61,5 %) / 5 (38,5 %)
Форма инсульта (ишемический/геморрагический)	10 (76,9 %) / 3 (23,1 %)
Локализация (левое/правое полушарие)	7 (53,8 %) / 6 (46,2 %)
Давность инсульта	225 дней
Клинические симптомы:	
- гемипарез	13 (100 %)
- гемигипестезия	10 (100 %)
- речевые нарушения	6 (46,1 %)
- деменция	2 (15,3 %)
Факторы риска церебральных заболеваний:	
- артериальная гипертензия	13 (100 %)
- мерцательная аритмия	2 (15,3 %)
- сахарный диабет	1 (7,6 %)
- гиперхолестеринемия	5 (38,4 %)

Тяжесть инсульта по шкале NIHSS варьировала от 18 до 3 баллов и составляла в среднем 8,7 балла. При анализе распределения пациентов по тяжести состояния по шкале NIHSS 5 пациентов имели более 10 баллов. Основные неврологические симптомы были представлены двигательными на-

рушениями. Во всех наблюдениях до лечения был выявлен гемипарез разной степени выраженности, достигающий у 4 больных степени гемиплегии (4 балла по субшкале двигательной функции верхней конечности шкалы NIHSS, 2–3 балла по субшкале двигательной функции нижней конечности). У 10 (76,9 %) пациентов отмечалась гемигипестезия различной степени выраженности. Функциональный дефицит по шкале Бартела до лечения составил в среднем 64,6 балла.

У большинства пациентов (11 из 13, или 84,6 %) наблюдалось отсутствие когнитивных нарушений (по результатам теста MMSE), в то же время у 2 пациентов (15,3 %) выявлялась деменция умеренной степени выраженности (11–19 баллов). У 6 больных имели место речевые нарушения различной степени выраженности.

Клетки вводили однократно эндолумбально в средней дозе $17,9 \times 10^6$ (от 5 до 42×10^6). Жизнеспособность полученных клеток во всех случаях превышала 90 %. Неврологическое обследование проводили до и через 6 месяцев после терапии. Как видно из данных таблицы 2, введение клеток вызывало системные реакции в виде головной боли (53,8 %), озноба (15,3 %), субфебрильной и фебрильной лихорадки (38,4 %). Других осложнений в виде каких-либо локальных или системных воспалительных или аллергических реакций, а также развития менингеальных реакций или инфекционных осложнений зарегистрировано не было (табл. 2).

Таблица 2
Переносимость эндолумбального введения аутологических макрофагов

Симптом	Кол-во (%)
Головная боль	7 (53,8 %)
Субфебрильная и фебрильная лихорадка	5 (38,4 %)
Озноб	2 (15,3 %)
Тошнота	1 (7,6 %)
Рвота	1 (7,6 %)
Боль в ногах	1 (7,6 %)
Боль в спине	1 (7,6 %)
Диарея	1 (7,6 %)
Явления менингизма	0
Локальные и системные инфекционные осложнения	0

Через 6 месяцев после введения клеток у всех пациентов отмечалось клиническое улучшение. В целом отмечалось достоверное снижение балла NIHSS с $8,6 \pm 1,06$ до $4,4 \pm 0,55$ ($p = 0,0008$).

По субшкалам двигательной функций верхней и нижней конечностей шкалы NIHSS отмечена положительная динамика у всех пациентов, в среднем с 2,0 до 1,0 ($p = 0,00012$) и с 0,84 до 0,30 соответственно. Нарушения чувствительности полностью регрессировали у 5 пациентов. Проводимая терапия позитивно сказывалась на способности к общению и восприятию. Так, у 4 из 6 пациентов наблюдалось

улучшение речи. Больные смогли выговорить предложенные фразы в субтесте по определению речи шкалы MMSE.

Улучшение качества жизни проявлялось достоверным возрастанием балла по шкале Бартела с 64,6 до лечения до 79,9 после ($p = 0,013$).

Важно отметить, что эндолумбальное введение M2-подобных макрофагов не сопровождалось возрастанием уровня воспалительных медиаторов в сыворотке крови. Так, сравнительный анализ сывороток крови до и через 5–7 дней после введения клеток не выявил возрастания уровней СРБ ($5 \pm 1,7$ и $3,6 \pm 1,23$), ИФН-гамма (36 ± 13 и 51 ± 13) и ИЛ-17 ($13 \pm 1,2$ и $14 \pm 1,2$) (табл. 3).

Таблица 3
Эффективность эндолумбального введения аутологических макрофагов

Показатель	До	После	p
NIHSS	8,6	4,4	0,0008
Субшкала двигательной функции верхней конечности	2,0	1,0	0,004
Субшкала двигательной функции нижней конечности	0,84	0,3	0,023
Субшкала чувствительность	1,23	0,23	0,023
Barthel	64,61	79,23	0,013

Таким образом, результаты пилотного исследования свидетельствуют о возможности успешной генерации M2-подобных макрофагов у пациентов с инсультом. Эндолумбальное введение этих клеток безопасно, не вызывает выраженных побочных реакций и осложнений и по предварительным данным, позволяет добиться улучшения двигательных и когнитивных функций. Однако для более детальной характеристики M2-подобных макрофагов необходимы дальнейшие проспективные рандомизированные исследования на большей выборке и с продолжительным ретроспективным наблюдением.

ЛИТЕРАТУРА

1. Asher R.A., Morgenstern D.A., Moon L.D., Fawcett J.W. Chondroitin sulphate proteoglycans: inhibitory components of the glial scar // Prog Brain Res. — 2001. — Vol. 132. — P. 611–619.
2. Chernykh E.R., Kafanova M.Yu., Shevela E.Ya., Adonina E.I. et al. Autologous M2-like macrophage applications in children with cerebral palsy // Cell Ther. Transplant. — 2011. — Vol. 3. — P. 12–14.
3. Chernykh E.R., Shevela E.Y., Sakhno L.V., Tikhonova M.A. et al. The generation and properties of human M2-like macrophages: potential candidates for CNS repair? // Cellular Therapy and Transplantation. — 2010. — Vol. 2. — P. 20–23.
4. Domeniconi M., Cao Z., Spencer T., Sivasankaran R. et al. Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth // Neuron. — 2002. — Vol. 35. — P. 283–290.
5. Fitch M.T., Silver J. Activated macrophages and the blood-brain barrier: inflammation after CNS injury

leads to increases in putative inhibitory molecules // Exp Neurol. — 1997. — Vol. 148. — P. 587—603.

6. Freire-de-Lima C.G., Xiao Y.Q., Gardai S.J., Bratton D.L. et al. Apoptotic cells, through transforming growth factor- β , coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages // J Biol Chem. — 2006. — Vol. 281. — P. 38376—38384.

7. Golpon H.A., Fadok V.A., Taraseviciene-Stewart L. Life after corpse engulfment: phagocytosis of apoptotic cells leads to VEGF secretion and cell growth // The FASEB Journal. — 2004. — Vol. 18. — P. 1716—1718.

8. Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity // Nat. Rev. Immunol. — 2005. — Vol. 5. — P. 953—964.

9. Kigerl K.A., Gensel J.C., Ankeny D.P., Alexander J.K. et al. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord // J. Neurosci. — 2009. — Vol. 29. — P. 13435—13444.

10. Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization // Trends Immunol. — 2004. — Vol. 25. — P. 677—686.

11. McPhail L.T., Stirling D.P., Tetzlaff W., Kwiecien J.M. et al. The contribution of activated phagocytes and myelin degeneration to axonal retraction/dieback following spinal cord injury // Eur. J. Neurosci. — 2004. — Vol. 20. — P. 1984—1994.

12. Mosser D.M. The many faces of macrophage activation // J. Leukocyte Biol. — 2003. — Vol. 73. — P. 209—212.

13. Shechter R., London A., Varol C., Raposo C. et al. Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice // PLoS Medicine. — 2009. — Vol. 6. — P. 1—16.

14. Ziv Y., Avidan H., Pluchino S., Martino G. et al. Synergy between immune cells and adult neural stem/progenitor cells promotes functional recovery from spinal cord injury // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2006. — Vol. 103. — P. 13174—13179.

Сведения об авторах

Морозов Сергей Александрович — врач аллерголог-иммунолог отделение иммунологии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, ассистент кафедры клинической иммунологии ГБОУ ВПО НГМУ Росздрава (630000, г. Новосибирск, ул. Залесского, 6; тел.: +7-913-893-69-70; e-mail: El-gorra@rambler.ru)

Томаш Галина Владимировна — врач-невролог отделения неврологии ГКБ № 1 г. Новосибирска

Шевела Екатерина Яковлевна — старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии НИИ Клинической иммунологии СО РАМН, кандидат медицинских наук (г. Новосибирск; тел. раб.: 236-03-29; e-mail: shevelak@mail.ru)

Сахно Людмила Васильевна — старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, кандидат биологических наук

Смык Анна Владимировна — младший научный сотрудник лаборатории нейроиммунологии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14; тел.: (383) 222-06-72; e-mail: anna-v-smyk@mail.ru)

Старостина Наталья Михайловна — заведующая отделением иммунологии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, кандидат медицинских наук

Останин Александр Анатольевич — ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор

Черных Елена Рэмовна — заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, чл.-корр. РАМН, доктор медицинских наук, профессор (630110, г. Новосибирск, ул. Б. Хмельницкого, 62, кв. 4; тел.: 8-(383)-228-57-49; e-mail: bmt-novosibirsk@mail.ru)