

Применение мезенхимальных стволовых клеток в лечении тяжелых форм новой коронавирусной инфекции COVID-19: проспективное наблюдательное исследование

А.М. Дзядзько¹*, С.И. Кривенко¹, А.В. Сырадоуев¹,
Н.И. Дедюля¹, П.С. Прилуцкий¹, Е.А. Примакова¹,
А.А. Сыманович¹, Е.А. Назарова¹, Е.Г. Петровская¹,
В.В. Смольникова¹, И.А. Романова¹

ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии», Минск, Республика Беларусь

Реферат

АКТУАЛЬНОСТЬ: Одним из перспективных методов лечения COVID-19, направленных на коррекцию иммунного ответа и снижение уровня провоспалительных цитокинов, является применение мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Есть данные, что МСК благодаря различным механизмам способны подавлять цитокиновый шторм у пациентов с COVID-19. Таким образом, применение МСК может способствовать подавлению воспаления и регуляции иммунного гомеостаза у пациентов с тяжелым течением COVID-19. **ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ:** Оценка влияния клеточной терапии МСК на течение тяжелых форм коронавирусной инфекции, сопровождающихся «цитокиновым штормом». **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ:** В проспективное одноцентровое исследование включено 39 пациентов, проходивших терапию коронавирусной инфекции на базе реанимационного отделения и после проведения рандомизации случайно разделенных на контрольную ($n = 16$) и исследуемую группы ($n = 23$). Проведена оценка клинических, лабораторных параметров в обеих группах и цитокинового профиля в исследуемой группе. Выполнено сравнение исходов, частоты возникающих осложнений, клинических и лабораторных параметров в обеих группах и профиля цитокинов в исследуемой группе. **РЕЗУЛЬТАТЫ:** Применение МСК у пациентов с тяжелыми формами COVID-19 (COroNaVirus Disease 2019) повлияло на исходы заболевания, длительность нахождения на ИВЛ, на течение острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) (рост индекса оксигенации у пациентов исследуемой группы к 5-м, 7-м суткам от введения в сравнении с группой контроля). **ВЫВОДЫ:** У пациентов

The use of mesenchymal stem cells in the treatment of severe forms of new coronavirus infection COVID-19: a prospective observational study

A.M. Dzyadzko¹*, S.I. Krivenko¹, A.V. Syradouey¹,
N.I. Dedylya¹, P.S. Prylutski¹, E.A. Prymakova¹,
A.A. Symanovich¹, E.A. Nazarova¹, K.H. Petrovskaya¹,
V.V. Smolnikova¹, I.A. Romanova¹

Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology, Minsk, Belarus

Abstract

INTRODUCTION: One of the promising treatments for COVID-19 aimed at correcting the immune response and reducing the level of pro-inflammatory cytokines is the use of mesenchymal stem cells (MSCs). There is evidence that MSCs, due to various mechanisms, are able to suppress the cytokine storm in patients with COVID-19. Thus, the use of MSCs can contribute to the suppression of inflammation and the regulation of immune homeostasis in patients with severe COVID-19. **OBJECTIVE:** Evaluation of the effect of mesenchymal stem cell (MSC) therapy on the course of severe forms of novel coronavirus infection, accompanied by "cytokine storm". **MATERIALS AND METHODS:** A prospective single-center study included 39 patients treated for coronavirus infection on the basis of the intensive care unit and, after randomization, randomly divided into control ($n = 16$) and study groups ($n = 23$). An assessment of clinical, laboratory parameters in both groups and a cytokine profile in the study group was carried out. Outcomes were compared, the incidence of complications and clinical and laboratory parameters in both groups, and the cytokine profile in the study group. **RESULTS:** The use of MSCs in patients with severe forms of COVID-19 affected the outcomes of the disease, the duration of stay on mechanical ventilation, the course of acute respiratory distress syndrome (ARDS) (an increase in the oxygenation index in patients of the study group by 5, 7 days from administration in comparison with the control group). **CONCLUSIONS:** In patients treated with MSCs, there was a significant decrease in a number of pro-inflammatory cytokines.

на фоне введения МСК отмечалось достоверное снижение ряда провоспалительных цитокинов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: коронавирусная инфекция, COVID-19, SARS-CoV-2, мезенхимальные стволовые клетки, цитокиновый шторм

* *Для корреспонденции:* Дзядзько Александр Михайлович — д-р мед. наук, доцент, заведующий отделом анестезиологии и реанимации ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии», Минск, Республика Беларусь; e-mail: 2726996@gmail.com

✉ *Для цитирования:* Дзядзько А.М., Кривенко С.И., Сырадовое А.В., Дедюля Н.И., Прилуцкий П.С., Примакова Е.А., Сыманович А.А., Назарова Е.А., Петровская Е.Г., Смольникова В.В., Романова И.А. Применение мезенхимальных стволовых клеток в лечении тяжелых форм новой коронавирусной инфекции COVID-19: проспективное наблюдательное исследование. Вестник интенсивной терапии им. А.И. Салтанова. 2023;1:71–82. <https://doi.org/10.21320/1818-474X-2023-1-71-82>

✉ *Поступила:* 30.05.2022

✉ *Принята к печати:* 03.12.2022

✉ *Published online:* 31.01.2023

KEYWORDS: coronavirus infection, COVID-19, SARS-CoV-2, mesenchymal stem cells, cytokine storm

* *For correspondence:* Aleksandr M. Dzyadko — MD, PhD, Assistant Professor, Chief Anesthesiology and Intensive care department, Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology Minsk, Belarus; e-mail: 2726996@gmail.com

✉ *For citation:* Dzyadko A.M., Krivenko S.I., Syradouey A.V., Dedylya N.I., Prylutski P.S., Prymakova E.A., Symanovich A.A., Nazarova E.A., Petrovskaya K.H., Smolnikova V.V., Romanova I.A. The use of mesenchymal stem cells in the treatment of severe forms of new coronavirus infection COVID-19: a prospective observational study. Annals of Critical Care. 2023;1:71–82. <https://doi.org/10.21320/1818-474X-2023-1-71-82>

✉ *Received:* 30.05.2022

✉ *Accepted:* 03.12.2022

✉ *Дата онлайн-публикации:* 31.01.2023

DOI: 10.21320/1818-474X-2023-1-71-82

Введение

Новый вирус SARS-CoV-2 появился в конце 2019 г. и привел к одной из самых разрушительных глобальных пандемий в современной истории. Около 20 % от всех инфицированных пациентов переносят COVID-19 (COGonaVirus Disease 2019) в среднетяжелой или тяжелой форме [1]. Тяжелая форма COVID-19 проявляется в виде острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), который обусловлен повреждением альвеол и нарушением оксигенации крови в легких [2]. Основным патогенетическим звеном в развитии ОРДС является гиперактивация и дисрегуляция иммунной системы, которая связана с чрезмерной продукцией ряда провоспалительных цитокинов и хемокинов (интерлейкин (IL)-6, IL-8, фактор некроза опухоли α (TNF- α), интерферон-индуцируемый белок 10 (IP-10), моноцитарный хемотаксический протеин 1 (MCP-1)), а также с изменением субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови [3]. Гиперактивация иммунной системы в значительной степени является причиной тяжелого течения COVID-19 [4]. Поэтому в настоящее время актуальна разработка методов лечения COVID-19,

направленных на коррекцию иммунного ответа и снижение уровня провоспалительных цитокинов. Одним из таких методов может быть использование мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в комплексной терапии ОРДС при COVID-19 [5]. Теоретическими предпосылками для применения клеточной терапии в лечении тяжелых форм инфекции COVID-19 явились обнадеживающие данные об успешном использовании МСК в ряде патологических сценариев, включающих неконтролируемую иммунную активацию с последующим повреждением тканей, таких как вызванное вирусом «птичьего гриппа» H9N2 острое повреждение легких, ОРДС, аутоиммунные заболевания и реакция «трансплантат против хозяина» [6–12]. Уже в одном из первых исследований в серии из семи пациентов, которым применили терапию МСК при тяжелом течении инфекции COVID-19, были получены положительные клинические результаты (выздоровление или значительное улучшение функциональных данных) без наблюдаемых побочных эффектов.

Уникальная способность МСК регулировать как иммунный ответ, так и регенерацию тканей делает их привлекательным терапевтическим средством в лечении тяжелых

форм COVID-19. Примечательно, что недавнее исследование показало, что МСК не экспрессируют рецептор ангиотензин-превращающего фермента 2 (ACE2) и, таким образом, должны быть невосприимчивыми к проникновению вируса SARS-CoV-2 в клетку [13].

Результаты некоторых клинических испытаний показывают, что МСК благодаря различным механизмам способны подавлять цитокиновый шторм у пациентов с COVID-19, регулируя баланс провоспалительных и противовоспалительных цитокинов [14]. Кроме того, введение МСК способствует восстановлению субпопуляций CD4+ и CD8+ Т-клеток, которые истощаются при COVID-19 [15]. Таким образом, применение МСК может способствовать подавлению воспаления и регуляции иммунного гомеостаза у пациентов с тяжелым течением COVID-19.

Цель исследования — оценка влияния применения МСК на течение тяжелых форм коронавирусной инфекции, протекающих с ОРДС, и течение «цитокинового шторма», вызванного гиперактивацией иммунной системы, длительность нахождения на ИВЛ и выживаемость пациентов.

Материалы и методы

В проспективное одноцентровое исследование были включены 39 пациентов с тяжелыми формами коронавирусной инфекции, проходивших терапию на базе отделения анестезиологии и реанимации № 2 (ОАР № 2) ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии» на протяжении II квартала 2020 г. — II квартала 2021 г. Тяжесть состояния этих пациентов была обусловлена гипоксией на фоне коронавирусной инфекции и развивающимися осложнениями. Пациенты были разделены на 2 группы случайной рандомизацией: контрольную ($n = 16$) и основную ($n = 23$). Исследование было одобрено этическим комитетом ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии» (протокол заседания № 5 от 12.06.2020). От всех пациентов получено письменное согласие на участие в исследовании либо иной заменяющий его, согласно нормативно-правовым актам Республики Беларусь, документ.

Критерии включения в исследование:

- А. ПЦР-тест SARS-CoV-2 и/или картина компьютерной томографии (КТ), типичная для коронавирусной инфекции («матовые стекла») и положительный результат иммуноферментного анализа (ИФА) на антитела к SARS-CoV-2.
- Б. Соответствие Берлинским критериям ОРДС [6]:
 1. Временной интервал: возникновение синдрома — не более 7 суток от начала заболевания.
 2. Данные КТ/рентгенографии органов грудной клетки: двусторонние затемнения, ко-

торые нельзя объяснить выпотом, ателектазом, узлами.

3. Отсутствие сердечной недостаточности и/или перегрузки жидкостью.
4. Индекс Горовица ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) < 150 мм рт. ст.

Критерии невключения в исследование:

- А. Несоответствие одному из критериев включения.
- Б. Значительное нарушение функции сердечно-сосудистой системы (III класс и выше по NYHA).
- В. Наличие у пациента исходного иммунологически скомпрометированного состояния (иммуносупрессия, заболевания кроветворной системы и др.).
- Г. Предшествующая терапия моноклональными антителами (тоцилизумаб).
- Д. Предшествующее применение экстракорпоральной мембранной оксигенации (ЭКМО).
- Е. Наличие сопутствующих заболеваний или травмы (острый инфаркт миокарда (III–IV класс по Killip), черепно-мозговые травмы и внутричерепные кровоизлияния (< 9 баллов по Шкале комы Глазго) и др.), обуславливающих тяжесть состояния пациента.
- Ж. Отсутствие лабораторных или неполнота клинических данных, доступных для анализа на момент сбора информации для исследования.

Все пациенты при поступлении в ОАР оценивались по шкалам Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) [16], Acute Physiology And Chronic Health Evaluation (APACHE) II [17], Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) grade [18], учитывались их физикальные параметры: пол, возраст, индекс массы тела (ИМТ) (табл. 1).

Относительно низкий медианный возраст пациентов в обеих группах обусловлен, вероятно, преимущественной госпитализацией в данный стационар и ОАР № 2, в частности, пациентов с возрастным цензом до 65 лет. Лечение пациентов в контрольной и основной группах исследования проводилось по действующим протоколам диагностики и лечения новой коронавирусной инфекции Минздрава Республики Беларусь, которые существенно не отличаются от клинических рекомендаций по лечению коронавирусной инфекции, принятых на территории Российской Федерации и стран Европейского Союза. На момент включения в исследование пациенты обеих групп получали респираторную поддержку в виде кислородотерапии (O_2), высокопоточной кислородотерапии (HFNC), неинвазивной вентиляции легких (NIV) и инвазивной ИВЛ. Соотношение видов респираторной поддержки в основной группе и группе контроля (O_2 , HFNC, NIV, ИВЛ инвазивная) составило соответственно 2/6/2/13 и 2/3/2/9. Пациентам в основной группе дополнительно проводилась клеточная терапия МСК.

Для клеточной терапии пациентов основной группы использовали биомедицинский клеточный продукт производства ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии» —

Таблица 1. Характеристика параметров в группах исследования

Table 1. Main and control groups specifications

Параметры	Основная группа	Группа контроля	<i>p</i>
Возраст, лет	49,5 (34–76)	48,5 (37,75–63,75)	0,647
Мужской пол, <i>n</i> (%)	18 (78%)	8 (50%)	—
ИМТ, кг/м ²	28,5 (27,7–31,95)	30,0 (25,7–33,1)	0,484
SOFA, баллы	6,4 (4–10)	7,5 (5–8,25)	0,943
APACHE II, баллы	11 (9–17)	14 (11–15,25)	0,519
ОРДС, стадия	3 (2–3)	3 (2–3)	0,859
Соотношение типов респираторной поддержки (O ₂ / HFNC/ NIV/ ИВЛ инвазивная), <i>n</i> (%)	2 (8,7%) / 6 (26%) / 2 (8,7%) / 13 (56,5%)	2 (12,5%) / 3 (18,75%) / 2 (12,5%) / 9 (56,25%)	—
APACHE II — шкала оценки острых физиологических расстройств и хронических функциональных изменений II; HFNC — высокопоточная оксигенотерапия; NIV — неинвазивная вентиляция легких; SOFA — шкала оценки органной недостаточности, связанной с сепсисом; ИВЛ — искусственная вентиляция легких; ИМТ — индекс массы тела; ОРДС — острый респираторный дистресс-синдром.			

«Клетки мезенхимальные человека, ТУ ВУ 100660677.001-2014, изм. 1», регистрационный № БК-7.3/7.003-2007 в Государственном реестре изделий медицинского назначения и медицинской техники Республики Беларусь. Применение биомедицинского клеточного продукта на основе МСК регламентировано нормативно-правовыми актами РБ, одобрено решением этического комитета. Биоматериалом для получения МСК являлась жировая ткань, полученная в процессе мультиорганного забора от умершего донора. Липоаспират обрабатывали равным объемом раствора коллагеназы I типа и инкубировали в течение 60 мин при температуре 37,0 °С. Подсчет мононуклеарных клеток производили по стандартной методике с уксусной кислотой, подкрашенной метиленовым синим. Оценка жизнеспособности клеток проводили по исключению трипанового синего. Клетки культивировали при 37,0 °С, 5% CO₂, 90% влажности. Морфологический анализ культур проводили на универсальном инвертированном микроскопе (Micos, Австрия; Nikon, Япония) с применением методов фазового контраста. Принадлежность выделенных клеток к МСК подтверждали методом проточной цитофлуориметрии с использованием следующей панели моноклональных антител (МКАТ): CD45 PC7, CD34 APC, CD105 PE, CD90 FITC, CD13 PE, CD31 FITC (Beckman Coulter, США) и CD90 FITC, CD105 PE, CD13 PE, CD44 FITC, CD45 PC7, CD106 FITC, CD73 PE, CD34 APC, CD54 APC, CD29 APC, CD9 Percp Cy 5.5 (BD Bioscience, США) соответственно. Учет проводился в рабочей программе FACSDiva. Клеточный продукт вводили внутривенно в 20–40 мл стерильного раствора 0,9% NaCl. Инфузию МСК начинали сразу же после доставки клеточного продукта в отделение и выполняли в течение 10–20 мин через венозный катетер 16G со скоростью 2 мл/мин.

Для проведения иммунологического контроля до и после проведения клеточной терапии проводилось иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови пациентов с коронавирусной инфекцией (день 0, день 7) с использованием следующих меченных флюорохромами МКАТ: CD3-Pacific Blue (BeckmanCoulter, США), CD8-Krome Orange (BeckmanCoulter, США), CD25-APC (BeckmanCoulter, США), CD4-APC-Cy7 (ExBio, Чехия), CD38-FITC (BeckmanCoulter, США), CD 28 FITC (BeckmanCoulter, США).

Концентрацию провоспалительных цитокинов в плазме крови пациентов с COVID-19 до и после проведения клеточной терапии (дни 0, 3, 7) определяли методом мультиплексного анализа на анализаторе Luminex 200 (Luminex, США) с использованием магнитных панелей Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel HCYTOMAG-60K (EMD Millipore Corporation, Германия) в составе коммерческой тест-системы, состоящей из 6 аналитов: IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, MCP-1, IP-10.

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов исследований выполняли с помощью непараметрических методов: для сравнения двух зависимых групп по одной количественной переменной использовали Wilcoxon Matched Pairs Test, для сравнения двух независимых групп по одной количественной переменной — *U*-тест Манна—Уитни. Параметры распределения количественных переменных представляли в виде медианы с 25%-м и 75%-м квартилями — *Me* (Q1–Q3). Различия считали достоверными при значении *p* < 0,05. Для решения поставленных

задач выполнялся статистический анализ с использованием программного обеспечения SPSS Statistic 26.0 и Statsoft Statistica 10.0.

Обсуждение и результаты

Эффективность использования клеточной терапии МСК в комплексном лечении тяжелых форм коронавирусной инфекции, сопровождающихся развитием ОРДС, оценивали на основании анализа динамики следующих лабораторных показателей: С-реактивный белок (СРБ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), аспаратаминотрансфераза

(АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), прокальцитонин (ПКТ), D-димеры (ДД) и концентрации цитокинов (IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , MCP-1, IP-10) в плазме крови, а также на основании сравнения течения и исходов заболевания (выживаемость, длительность пребывания в ОАР, длительность пребывания на ИВЛ) у пациентов основной и контрольной групп.

Все пациенты из основной группы ($n = 23$) получали клеточную терапию МСК в количестве $172,4 (95,5-302,9) \times 10^6$ клеток, что эквивалентно дозе $1,93 (0,96-2,87) \times 10^6/\text{кг}$ веса пациента.

Данные лабораторных показателей на 0, 3, 5, 7-е сутки в двух исследуемых группах пациентов представлены в табл. 2.

Таблица 2. Динамика лабораторных параметров пациентов в основной и контрольной группах

Table 2. Laboratory markers dynamic in main and control groups

Параметр	Сутки	Основная группа, $n = 23$, Ме (Q1-Q3)	Контрольная группа, $n = 16$, Ме (Q1-Q3)	p
ЛДГ, ЕД/л	0	550 (417-616,5)	621 (362-941,5)	0,509
	3	475 (358,5-577,5)	519 (383-670,5)	0,340
	5	388 (326,5-584,5)	560 (426,5-718)	0,017
	7	376 (292,5-588)	529 (381,5-811,5)	0,038
СРБ, мг/л	0	61 (32,5-152)	34,8 (14,9-99,7)	0,291
	3	30 (11,8-109,5)	75,6 (23,7-124)	0,291
	5	20,9 (7,35-56)	101,6 (23,3-165)	0,363
	7	21,4 (7,95-92,7)	164 (39,5-212,3)	0,062
ДД, мкг/мл	0	1512 (556-3129)	940 (403-2468)	0,371
	3	1263 (628-2787)	535 (398-1276)	0,009
	5	1192 (684-2468)	794 (381-1358)	0,163
	7	997 (565-2649)	915 (463-1328)	0,428
АСТ, ЕД/л	0	43,7 (30,7-115,3)	66,5 (21-130)	0,953
	3	42,4 (33,1-94,4)	66,8 (43,2-198)	0,211
	5	42 (30-65,6)	55,1 (37,5-117)	0,293
	7	40,6 (40,6-60,7)	53,1 (35,3-193)	0,108
АЛТ, ЕД/л	0	59,6 (33-111,8)	51,3 (45-90,2)	0,921
	3	49,9 (33,3-122,4)	63,3 (51,1-155,1)	0,211
	5	49 (31,9-96,6)	53,9 (43,6-194)	0,293
	7	47,3 (27-77,1)	63,7 (32,6-77,5)	0,692
ПКТ, нг/мл	0	0,52 (0,07-1,87)	0,28 (0,09-1,49)	0,706
	3	0,3 (0,11-1,91)	0,25 (0,13-0,72)	0,858
	5	0,46 (0,07-2,64)	0,165 (0,06-1,69)	0,713
	7	0,41 (0,06-3,46)	0,305 (0,125-4,18)	0,843

АЛТ — аланинаминотрансфераза; АСТ — аспаратаминотрансфераза; ДД — D-димеры; ЛДГ — лактатдегидрогеназа; ПКТ — прокальцитонин; СРБ — С-реактивный белок.

Для сравнения двух независимых групп применялся U-тест Манна—Уитни.

На момент начала лечения в обеих группах не было статистических различий по представленным выше лабораторным параметрам: ЛДГ, СРБ, ДД, АСТ, АЛТ, ПКТ. Повышение данных провоспалительных биохимических маркеров характерно для тяжелого течения COVID-19 и соответствует данным мировой литературы [23].

На фоне применения клеточной терапии МСК в основной группе регистрировалось статистически достоверное снижение уровня ЛДГ по сравнению с контрольной группой на 5-е сутки (соответственно 388 (326,5–584,5) ЕД/л и 560 (426,5–718) ЕД/л ($p = 0,017$; $n = 39$) и на 7-е сутки (соответственно 376 (292,5–588) ЕД/л и 529 (381,5–811,5) ЕД/л ($p = 0,038$; $n = 39$), что может являться следствием уменьшения повреждения тканей организма вследствие воспаления и запуска процессов регенерации. Отсутствие достоверных различий в концентрации печеночных трансаминаз в группах на этапах исследования, их значения косвенно свидетельствуют о преимущественно «легочном» происхождении ЛДГ как универсального маркера клеточного повреждения, а статистически значимое снижение активности данного энзима на 5-е и 7-е сутки после введения МСК может указывать на восстановление легочной ткани.

Показатели СРБ в основной группе были несколько выше, чем в контрольной, хотя и не достигали статистических различий. В основной группе на фоне введения МСК наблюдалось снижение значений показателя СРБ с 61 (32,5–152) мг/л на 0-е сутки до 21,4 (7,95–92,7) мг/л на 7-е сутки. В контрольной группе, наоборот, регистрировалось нарастание данного показателя с 34,8 (14,9–99,7) мг/л на 0-е сутки до 164 (39,5–212,3) мг/л на 7-е сутки. СРБ является основным лабораторным предиктором тяжелого течения и объема поражения легких [24]. Его уровень коррелирует с тяжестью течения и является основанием для начала противовоспалительной терапии. Полученная динамика значений показателя СРБ свидетельствует об уменьшении проявлений воспаления у пациентов с тяжелой коронавирусной инфекцией в основной группе в ответ на введение МСК по сравнению с группой контроля на 5-е и 7-е сутки, однако разница оказалась статистически недостоверной. При этом в течение времени исследования отмечается отчетливая тенденция к снижению концентрации СРБ в основной группе в отличие от динамики этого показателя в группе контроля. Возможно, отсутствие достоверных различий в показателях двух исследуемых групп обусловлено достаточно длительным сохранением признаков воспаления на фоне терапии, медленным снижением концентрации маркеров воспаления (период полувыведения СРБ составляет 19 ч) и ограничением времени исследования (7 сут). Положительная динамика значений показателя СРБ у пациентов с тяжелой коронавирусной инфекцией после введения МСК в нашем исследовании свидетельствует об уменьшении проявлений воспаления и может

быть связана с реализацией противовоспалительного действия МСК. Эти результаты во многом совпадают с имеющимися клиническими данными других исследователей [3, 22].

Для оценки противовоспалительного действия МСК при их применении в комплексном лечении ОРДС при коронавирусной инфекции исследовали в образцах плазмы крови пациентов основной группы содержание цитокинов, играющих важную роль в развитии острого воспаления и «цитокинового шторма». У пациентов с ОРДС, получавших клеточную терапию, на 3-и сутки наблюдалось статистически значимое снижение уровня IL-6 в плазме крови по сравнению с исходным показателем (43,69 (1,74–336,91) пг/мл и 4,78 (0–388,09) пг/мл, соответственно ($p = 0,029$, Wilcoxon Matched Pairs Test) (рис. 1). Данная динамика уровня IL-6 в плазме крови в дальнейшем сохранялась и на 7-е сутки ($p = 0,048$, Wilcoxon Matched Pairs Test), что, вероятно, является следствием реализации противовоспалительного действия МСК.

Также к 3-м суткам наблюдалась тенденция к снижению концентрации IL-8, которая к 7-м суткам приобрела статистически значимый характер: с 11,62 (0,98–117,11) пг/мл до введения МСК до 8,96 (0–83,62) пг/мл и 4,81 (0–49,94) пг/мл на 3-и и 7-е сутки соответственно ($p = 0,049$, Wilcoxon Matched Pairs Test) (рис. 2).

Кроме того, введение МСК способствовало статистически достоверному снижению уровня IL-10 и TNF α на 7-е сутки ($p = 0,019$ и $p = 0,006$ соответственно, Wilcoxon Matched Pairs Test). Динамика уровня данных цитокинов отражена на рис. 3.

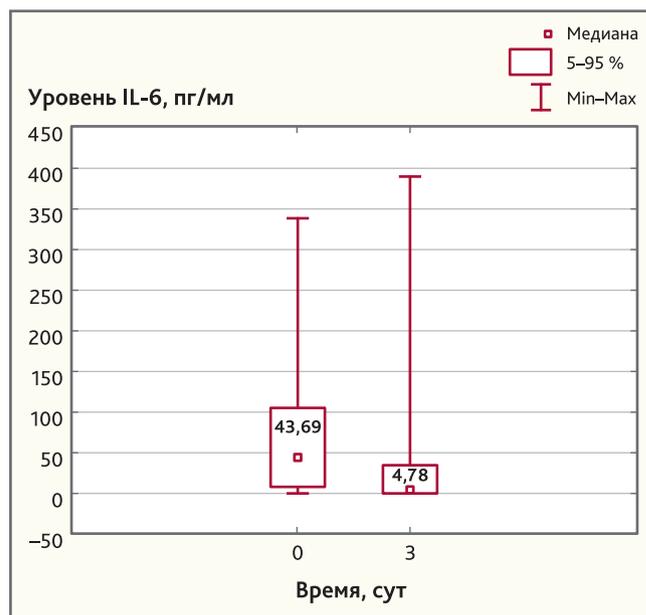


Рис. 1. Динамика уровня IL-6 до и после введения МСК ($n = 21$, $p = 0,029$)

Fig. 1. IL-6 levels before and after MSC application ($n = 21$, $p = 0,029$)

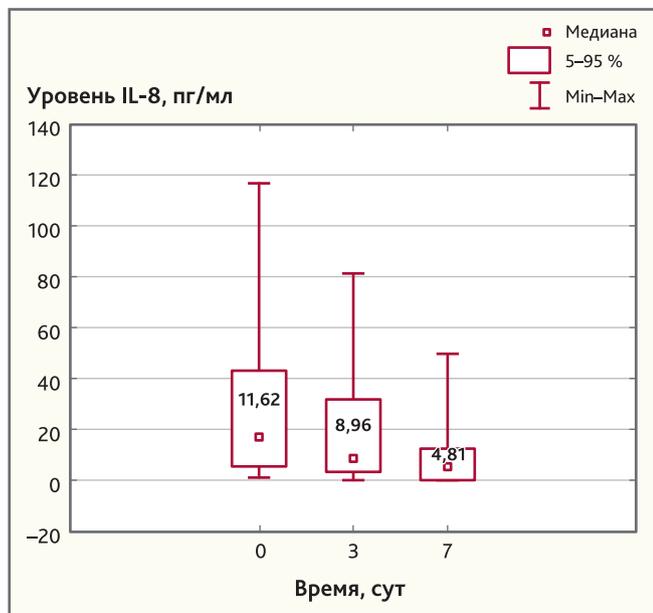


Рис. 2. Динамика уровня IL-8 до и после введения МСК ($n = 17$, $p = 0,049$)

Fig. 2. IL-8 levels before and after MSC application ($n = 17$, $p = 0.049$)

Также на 3-и сутки после введения МСК регистрировалось статистически значимое уменьшение концентрации хемокинов IP-10 ($p = 0,017$; $n = 16$) и MCP-1 ($p = 0,019$; $n = 20$), однако к 7-м суткам данная законо-

мерность сохранялась лишь для IP-10 ($p = 0,0004$; $n = 16$, Wilcoxon Matched Pairs Test) (рис. 4).

Для оценки иммуномодулирующего действия МСК при ОРДС были проанализированы иммунограммы пациентов с COVID-19 до проведения клеточной терапии и на 7-й день после введения БМКП на основе МСК. Иммунный статус пациентов оценивался по следующим показателям: CD3+ (Т-лимфоциты); CD19+ (В-лимфоциты); CD3+ CD4+ (Т-хелперы); CD3+ CD4+ CD28+; CD3+ CD4+ CD28+/CD3+ CD4+; CD3+ CD8+ цитотоксические Т-клетки; CD3+ CD8+ CD28+; CD3+ CD8+ CD28+/CD3+ CD8+; CD3+ CD4+ CD25brightCD127- регуляторные Т-клетки; CD3- CD16+56+ (ЕК-клетки); CD3+ CD16+56+ Т-лимфоциты с фенотипом ЕК-клеток; CD3+ HLA-DR+ активированные Т-лимфоциты; CD3+ CD25+ активированные Т-лимфоциты по IL-2R; CD3+ CD38+ активированные Т-лимфоциты; CD3+ CD4+/CD3+ CD8+; CD3+CD38+/CD3+.

У пациентов обеих групп на момент включения по данным общего анализа крови наблюдалась выраженная абсолютная и относительная лимфопения. Так, в основной группе исходно данный показатель составил $0,763 (0,294-1,008) \times 10^9$ клеток/л. На 7-е сутки после введения МСК наблюдалась тенденция к повышению абсолютного числа лимфоцитов периферической крови ($1,421 (0,911-1,869) \times 10^9$ клеток/л), однако данный показатель оставался ниже нормы. Данные многочисленных исследований по оценке иммуномодулирующего действия МСК при ОРДС, ассоциированного с COVID-19, свидетельствуют о том, что наиболее

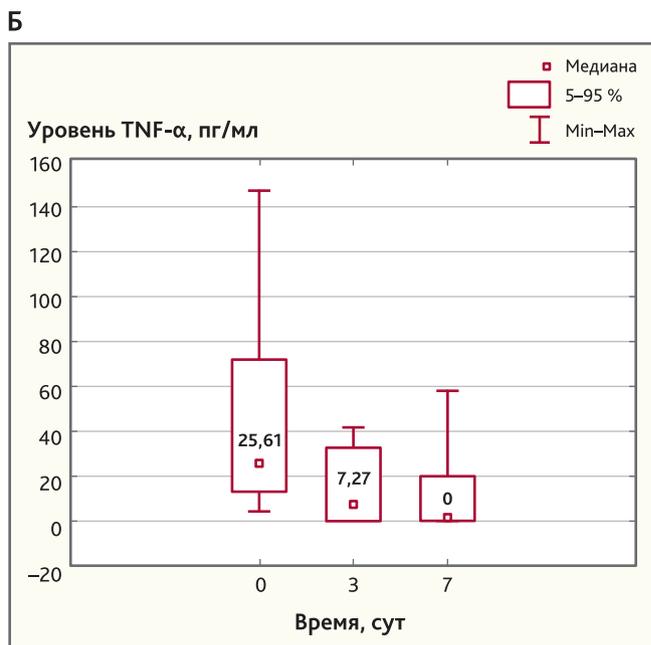
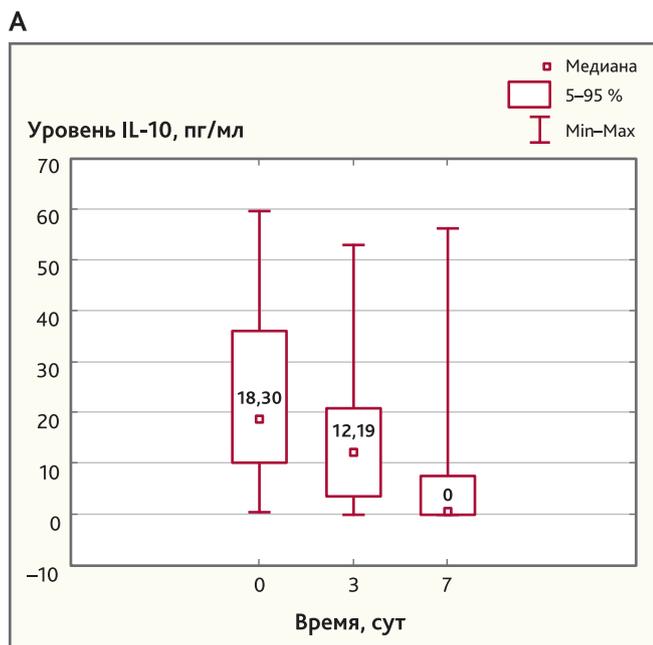


Рис. 3. Динамика уровня IL-10 и TNF α до и после введения МСК ($n = 13$). А — изменение уровня IL-10, пг/мл; Б — изменение уровня TNF α , пг/мл

Fig. 3. IL-10 and TNF α levels before and after MSC application ($n = 13$). А — IL-10 levels dynamic, pg/ml; Б — TNF-alpha levels dynamic, pg/ml

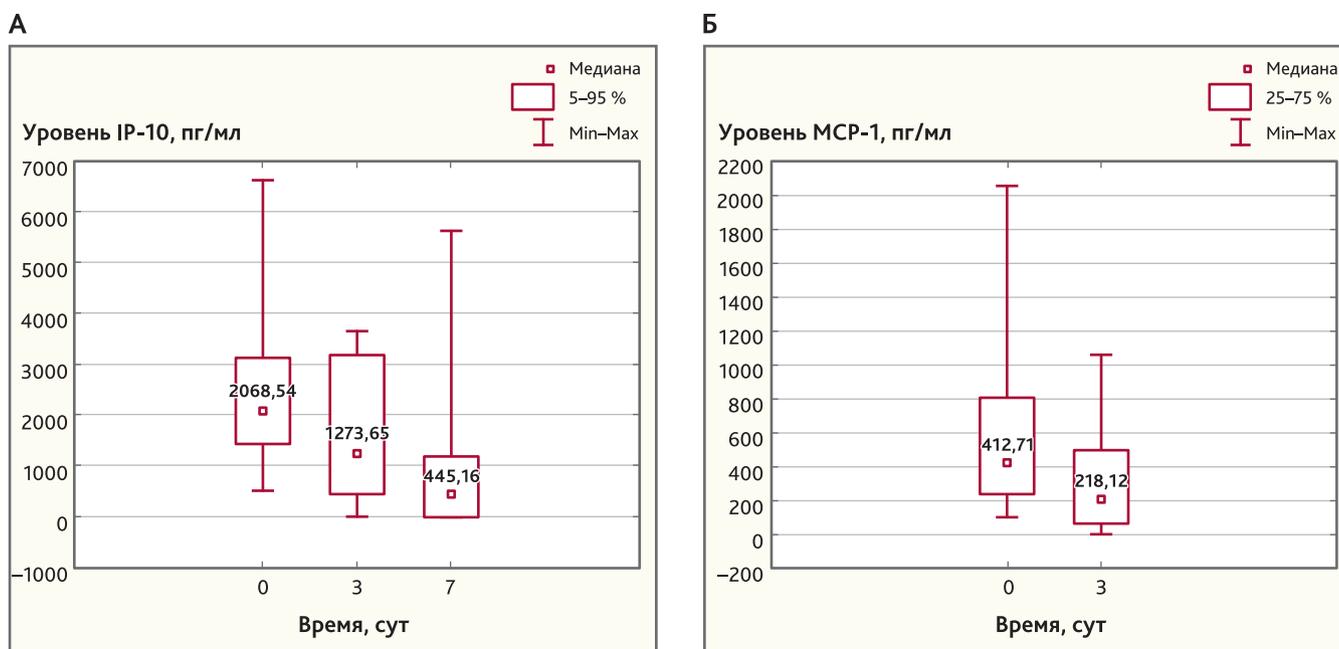


Рис. 4. Динамика уровня IP-10 ($n = 16$) и MCP-1 ($n = 20$) до и после введения МСК. А — изменение уровня IP-10, пг/мл; Б — изменение уровня MCP-1, пг/мл

Fig. 4. IP-10 ($n = 16$) and MCP-1 ($n = 20$) levels before and after MSC application. A — IP-10 levels dynamic, pg/ml; Б — MCP-1 levels dynamic, pg/ml

информативными иммунологическими маркерами являются CD3+-лимфоциты и их субпопуляции [19–21]. У пациентов с COVID-19 в основной группе до введения МСК наблюдалось статистически достоверное снижение

как общего количества лимфоцитов в периферической крови, так и отдельных их субпопуляций по сравнению с нормальными показателями ($p < 0,05$; $n = 18$, U -тест Манна—Уитни) (табл. 3, рис. 5).

Таблица 3. Сравнительная характеристика субпопуляций Т-лимфоцитов в норме и при COVID-19

Table 3. Specification of T-lymphocyte subpopulations in COVID-19 patients in comparison with normal

Субпопуляция лимфоцитов	Норма (нижняя граница), $\times 10^9/\text{л}$	Значение у пациентов с COVID-19, $\times 10^9/\text{л}$	Уровень значимости
CD3+	1,1	0,47	0,0001
CD3+ CD4+	0,7	0,3	0,0008
CD3+ CD8+	0,5	0,15	0,0008
CD3+ CD25+ акт. по IL-2R	0,1	0,09	0,009
CD3 + CD38+ акт.	0,5	0,26	0,0005

При сравнительном анализе показателей иммунного статуса у пациентов основной группы до и после введения МСК не было выявлено статистически значимых различий по исследуемым параметрам ($p > 0,05$; $n = 18$, Wilcoxon Matched Pairs Test) (табл. 4). Отсутствие динамики на 7-е сутки после введения МСК, по-видимому, обусловлено недостаточным периодом наблюдения, т. к. у всех пациентов на момент включения в исследование

наблюдалась выраженная лимфопения. Возможно, для получения статистически достоверных различий необходим более длительный период наблюдения после введения МСК.

Динамика клинических данных в группах исследования была сопоставимой, однако выявлены четкие различия в темпах изменения индекса оксигенации от 0-х суток 117,5 (117,5–182,0) на 3-и сутки — 159,0

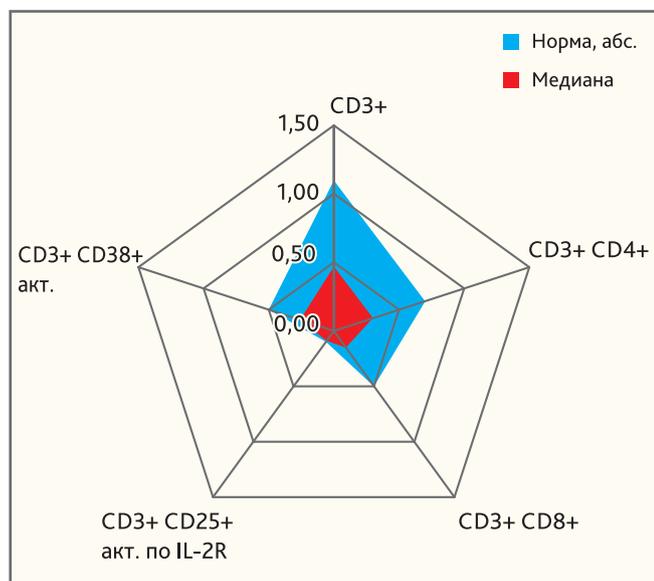


Рис. 5. Уровень иммунологических маркеров у пациентов в основной группе до введения МСК по сравнению с нормальными значениями

Fig. 5. Immunological marker levels before MCS application in comparison with normal levels

(110,0–200,0) ($p = 0,159$; $n = 23$, Wilcoxon Matched Pairs Test), на 5-е сутки — 198,0 (137,5–250,0) ($p = 0,003$; $n = 23$, Wilcoxon Matched Pairs Test), 7-е сутки — 217,0 (150,5–280,0) ($p = 0,001$; $n = 23$, Wilcoxon Matched Pairs Test) в основной группе.

В группе контроля не было достоверного повышения индекса оксигенации в динамике: 0-е сутки — 130 (78,0–153,0), 3-е сутки — 129,0 (101,0–190,0) ($p = 0,139$; $n = 16$, Wilcoxon Matched Pairs Test), 5-е сутки — 126 (97,0–214,0) ($p = 0,091$; $n = 16$, Wilcoxon Matched Pairs Test), 7-е сутки — 142 (99,0–235,0) ($p = 0,062$; $n = 16$, Wilcoxon Matched Pairs Test) (рис. 6).

Общая продолжительность пребывания в ОАР была сопоставима для пациентов обеих исследуемых групп. Однако при анализе примененных видов респираторной поддержки было установлено статистическое снижение

количества дней без ИВЛ в основной группе пациентов, получавших терапию МСК. Выживаемость пациентов в основной группе также была на 16 % выше, чем в группе контроля (60 и 44 % соответственно), однако установленные различия не являлись статистически значимыми ($p > 0,05$) (табл. 5).

Центральную роль в патогенезе ОРДС, ассоциированного с COVID-19, играет «цитокиновый шторм», сопровождающийся продукцией большого количества провоспалительных факторов, которые и являются причиной повреждения тканей и органов. Благодаря иммуномодулирующим, паракринным и регенераторным свойствам МСК способны опосредованно восстанавливать баланс между провоспалительными и противовоспалительными цитокинами [15].

Развитие системного воспалительного ответа и, как следствие, повышение провоспалительных биохимических маркеров крови типично для тяжелого течения COVID-19 [23]. Положительная динамика значений показателя СРБ у пациентов с тяжелой коронавирусной инфекцией после введения МСК в нашем исследовании также указывает на снижение проявлений воспаления и может быть связана с реализацией противовоспалительного действия МСК. Полученные нами данные о снижении концентрации IL-6, IL-10, TNF α , а также IP-10 и MCP-1 в плазме крови пациентов с ОРДС, ассоциированным с COVID-19, на 3-и и 7-е сутки после клеточной терапии подтверждают тот факт, что аллогенные МСК у пациентов с тяжелым течением COVID-19 уменьшают продукцию провоспалительных цитокинов и препятствуют их повреждающему действию на ткани организма пациента. Эти результаты во многом совпадают с имеющимися клиническими данными других исследователей [3, 22]. Кроме того, Waterman et al. (2010) показали, что активация TLR (Toll-like receptor) компонентами патогена, такими как вирусная РНК, обеспечивает увеличение противовоспалительного действия МСК [6].

Установленное в нашем исследовании статистически достоверное снижение уровня ЛДГ на фоне применения клеточной терапии МСК в основной группе на 5-е сутки может свидетельствовать о снижении интенсивности

Таблица 4. Сравнительная характеристика субпопуляций Т-лимфоцитов у пациентов основной группы до и после введения МСК

Table 4. Comparative specification of T-lymphocyte subpopulation in main group before and after MSC application

Субпопуляция лимфоцитов	До введения МСК, $\times 10^9/\text{л}$	После введения МСК, $\times 10^9/\text{л}$	Уровень значимости
CD3+	0,48	0,58	0,45
CD3+ CD4+	0,3	0,31	0,47
CD3+ CD8+	0,15	0,19	0,33
CD3+ CD25+ акт. по IL-2R	0,09	0,13	0,77
CD3 + CD38+ акт.	0,26	0,21	0,95

Таблица 5. Исходы в группах исследования

Table 5. Outcomes in main and control group

	Основная группа, n = 23	Группа контроля, n = 16	p
Выживаемость, n (%)	14 (60 %)	7 (44 %)	0,339
Дни без ИВЛ, сут	9 (5–11)	5,5 (2,75–10,25)	0,037
Длительность нахождения в ОАР, сут	22,7	23,2	0,360

повреждения легких вследствие воспаления и индукции процессов регенерации. Подобные результаты были получены в исследовании Sánchez-Guijo F. et al. (2020) [14]. В целом эти данные укладываются в текущую парадигму представлений о МСК как об «идеальном» участнике процесса репарации тканей за счет активации клеточной пролиферации и направленной дифференцировки [26–31].

Реализация противовоспалительного действия МСК у пациентов с тяжелым течением коронавирусной инфекции оказывает влияние на течение ОРДС, что подтверждается статистически значимым увеличением индекса оксигенации на 5–7-е сутки в основной группе пациентов по сравнению с группой контроля. Что касается возможного влияния терапии МСК на исходы лечения ОРДС, ассоциированного с COVID-19, следует отметить, что в нашем исследовании статистически значимое снижение установлено по параметру «дни без ИВЛ у пациентов, получивших терапию МСК». Как уже указывалось выше, выживаемость в группе МСК была на 16 % выше, чем в группе контроля, но эти различия были недостоверными. Не было выявлено статистически значимых различий и в показателе времени пребывания пациентов обеих групп в отделении реанимации.

В значительной степени это можно объяснить гетерогенностью причин, влияющих на течение тяжелых форм инфекции COVID-19, что затрудняет интерпретацию клинических данных для определения вклада терапии МСК в показатели исходов лечения и сроков пребывания пациентов на реанимационной койке.

К ограничениям проведенного нами исследования следует отнести низкий объем выборки пациентов.

До настоящего времени использование МСК в комплексной терапии тяжелых форм коронавирусной инфекции носит характер клинического исследования. Время начала терапии МСК у пациентов с ОРДС, ассоциированным с COVID-19, продолжительность курса и кратность введения, лабораторные маркеры и комплексные критерии оценки эффективности клеточной терапии, в том числе сроки наблюдения, также требуют уточнения. Таким образом, для определения места применения МСК в интенсивной терапии тяжелого повреждения легких необходимо проведение дальнейших исследований.

Вместе с тем полученные нами результаты в совокупности показывают на положительную роль МСК в улучшении результатов лечения пациентов с COVID-19 за счет поддержания иммунного гомеостаза, уменьшения проявлений

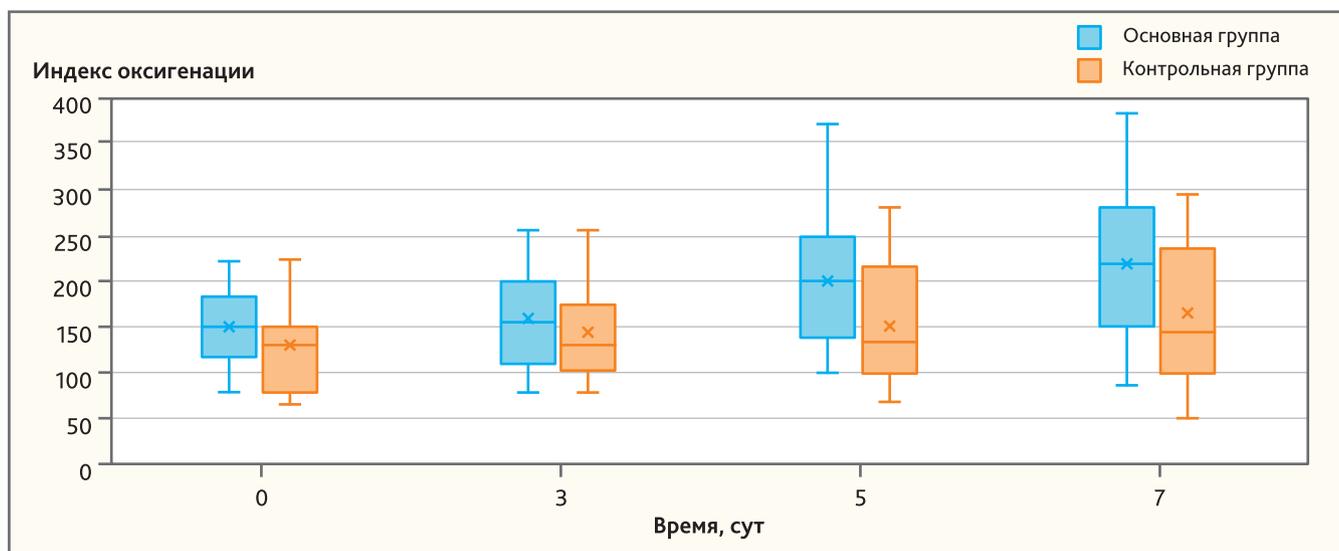


Рис. 6. Динамика индекса оксигенации у пациентов с ОРДС в группе контроля и основной группе

Fig. 6. Dynamics of Oxygenation index in main and control groups of patients with ARDS

воспаления и улучшения функции легких, которая может косвенно указывать на регенерацию легочной ткани.

Заключение

Применение биомедицинского клеточного продукта на основе МСК является перспективным способом коррекции нерегулируемого иммунного ответа при ОРДС, ассоциированного с COVID-19, посредством снижения уровня провоспалительных Th1-поляризованных цитокинов.

Использование МСК в комплексной терапии пациентов, находящихся в отделении реанимации, сокращает длительность пребывания на ИВЛ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare that they have no competing interests.

Вклад авторов. Все авторы в равной степени участвовали в разработке концепции статьи, получении

ORCID авторов:

Дзядзько А.М. — 0000-0003-1965-1850
Кривенко С.И. — 0000-0002-6813-4465
Сырадов А.В. — 0000-0003-2504-0618
Дедюля Н.И. — 0000-0001-9807-2093
Прилуцкий П.С. — 0000-0002-5274-2714
Примакова Е.А. — 0000-0002-3011-2287

и анализе фактических данных, написании и редактировании текста статьи, проверке и утверждении текста статьи.

Author contribution. All authors according to the ICMJE criteria participated in the development of the concept of the article, obtaining and analyzing factual data, writing and editing the text of the article, checking and approving the text of the article.

Этическое утверждение. Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии», протокол заседания № 5 от 12.06.2020.

Ethics approval. This study was approved by the local Ethical Committee of Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology Minsk, Belarus (reference number: 5-12.06.2020).

Информация о финансировании. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Сыманович А.А. — 0000-0003-1521-1620
Назарова Е.А. — 0000-0001-7147-4834
Петровская Е.Г. — 0000-0002-0966-7456
Смольникова В.В. — 0000-0001-5947-8285
Романова И.А. — 0000-0001-6577-9738

Литература/References

- [1] Ramasamy S., Subbian S. Critical Determinants of Cytokine Storm and Type I Interferon Response in COVID-19 Pathogenesis. *Clinical microbiology reviews*. 2021; 34(3). DOI: 10.1128/CMR.00299-20
- [2] Tsatsakis A., Calina D., Falzone L., et al. SARS-CoV-2 pathophysiology and its clinical implications: An integrative overview of the pharmacotherapeutic management of COVID-19. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2020; 146: 111769. DOI: 10.1016/j.fct.2020.111769
- [3] Wang J., Jiang M., Chen X., et al. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. *J Leukoc Biol*. 2020; 108(1): 17–41. DOI: 10.1002/JLB.3COVR0520-272R
- [4] Fajgenbaum D.C., June C.H. Cytokine Storm. *N Engl J Med*. 2020; 383(23): 2255–73. DOI: 10.1056/NEJMr2026131
- [5] Zhu R., Yan T., Feng Y., et al. Mesenchymal stem cell treatment improves outcome of COVID-19 patients via multiple immunomodulatory mechanisms. *Cell Res*. 2021; 31(12): 1244–62. DOI: 10.1038/s41422-021-00573-y
- [6] Waterman R.S., Tomchuck S.L., Henkle S.L., et al. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One*. 2010; 5: e10088. DOI: 10.1371/journal.pone.0010088
- [7] Elgaz S., Kuci Z., Kuci S., et al. Clinical use of mesenchymal stromal cells in the treatment of acute graft-versus-host disease. *Transfus Med Hemother*. 2019; 46: 27–34. DOI: 10.1159/000496809
- [8] Coelho A., Alvites R.D., Branquinho M.V., et al. Mesenchymal stem cells (MSCs) as a potential therapeutic strategy in COVID-19 patients: literature research. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8: 602647. DOI: 10.3389/fcell.2020.602647
- [9] Yen B.L., Yen M.L., Wang L.T., et al. Current status of mesenchymal stem cell therapy for immune/inflammatory lung disorders: gleanings insights for possible use in COVID-19. *Stem Cells Transl Med*. 2020; 9: 1163–73. DOI: 10.1002/sctm.20-0186
- [10] Barros I., Silva A., de Almeida L.P., et al. Mesenchymal stromal cells to fight SARS-CoV-2: Taking advantage of a pleiotropic therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2021; 58: 114–33. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2020.12.002

- [11] *Musial C., Gorska-Ponikowska M.* Medical progress: stem cells as a new therapeutic strategy for COVID-19. *Stem Cell Res.* 2021; 52: 102239. DOI: 10.1016/j.scr.2021.102239
- [12] *Su Y., Guo H., Liu Q.* Effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles in acute respiratory distress syndrome (ARDS): current understanding and future perspectives. *J Leukoc Biol.* 2021; 110: 27–38. DOI: 10.1002/JLB.3MR0321-545RR
- [13] *Leng Z., Zhu R., Hou W., et al.* Transplantation of ACE2- Mesenchymal Stem Cells Improves the Outcome of Patients with COVID-19 Pneumonia. *Aging Dis.* 2020; 11(2): 216–28. DOI: 10.14336/AD.2020.0228
- [14] *Shu L., Niu C., Li R., et al.* Treatment of severe COVID-19 with human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2020; 11(1): 361.
- [15] *Kaffash Farkhad N., Reihani H., Sedaghat A., et al.* Are mesenchymal stem cells able to manage cytokine storm in COVID-19 patients? A review of recent studies. *Regen Ther.* 2021: 152–60. DOI: 10.1016/j.reth.2021.05.007
- [16] *Vincent J.L., Moreno R., Takala J., et al.* The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.* 1996 ;22(7): 707–10. DOI: 10.1007/BF01709751
- [17] *Knaus W.A., Draper E.A., Wagner D.P., et al.* APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med.* 1985; 13(10): 818–29.
- [18] The ARDS Definition Task Force. Acute Respiratory Distress Syndrome: The Berlin Definition. *JAMA.* 2012; 307(23): 2526–33. DOI: 10.1001/jama.2012.5669
- [19] *Qin C., Zhou L., Hu Z., et al.* Dysregulation of Immune Response in Patients with Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis.* 2020; 71(15): 762–68. DOI: 10.1093/cid/ciaa248
- [20] *Tan L., Wang Q., Zhang D., et al.* Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. *Signal Transduct Target Ther.* 2020; 5: 33.
- [21] *Wan S.X., Yi Q.J., Fan S.B., et al.* Characteristics of lymphocyte subsets and cytokines in peripheral blood of 123 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus pneumonia (NCP). *MedRxiv.* 2020. DOI: 10.1101/2020.02.10.20021832. 2020.02.10.20021832
- [22] *Matthay M.A., Calfee C.S., Zhuo H., et al.* Treatment with allogeneic mesenchymal stromal cells for moderate to severe acute respiratory distress syndrome (START study): a randomised phase 2a safety trial. *The Lancet Respiratory Medicine.* 2019; 7(2): 154–62. DOI: 10.1016/s2213-2600(18)30418-1
- [23] *Goudouris E.S.* Laboratory diagnosis of COVID-19. *Jornal de Pediatria.* 2020. DOI: 10.1016/j.jped.2020.08.001
- [24] *Bivona G., Agnello L., Ciacco M.* Biomarkers for Prognosis and Treatment Response in COVID-19 Patients. *Ann Lab Med.* 2021; 41(6): 540–8. DOI: 10/3343/alm.2021.41.6.540
- [25] *Sánchez-Guijo F., García-Arranz M., López-Parra M., et al.* Adipose-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of patients with severe SARS-CoV-2 pneumonia requiring mechanical ventilation. A proof of concept study. *EClinicalMedicine.* 2020; 6(30): 100454. DOI: 10.1016/j.eclinm.2020.100454
- [26] *Blaber S.P., Webster R.A., Hill C.J., et al.* Analysis of in vitro secretion profiles from adipose-derived cell populations. *J Transl Med.* 2012; 10: 172. DOI: 10.1186/1479-5876-10-172
- [27] *Kallmeyer K., Pepper M.S.* Homing properties of mesenchymal stromal cells. *Expert Opin Biol Ther.* 2015; 15: 477–9. DOI: 10.1517/14712598.2015.997204
- [28] *Copcu H.E.* Potential using of fat-derived stromal cells in the treatment of active disease, and also, in both pre- and post-periods in COVID-19. *Aging Dis.* 2020; 11: 730–6. DOI: 10.14336/AD.2020.0621
- [29] *Jeyaraman M., Ranjan R., Kumar R., et al.* Cellular therapy: shafts of light emerging for COVID-19. *Stem Cell Investig.* 2020; 7: 11. DOI: 10.21037/sci-2020-022
- [30] *Juárez-Navarro K.J., Padilla-Camberos E., Díaz N.F., et al.* Human Mesenchymal stem cells: the present alternative for high-incidence diseases, even SARS-Cov-2. *Stem Cells Int.* 2020: 8892189. DOI: 10.1155/2020/8892189
- [31] *Rogers C.J., Harman R.J., Bunnell B.A., et al.* Rationale for the clinical use of adipose-derived mesenchymal stem cells for COVID-19 patients. *J Transl Med.* 2020; 18: 203. DOI: 10.1186/s12967-020-02380-2