

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Букреєва Тетяна Василівна

УДК 576+612.017+602+606:61

ДИСЕРТАЦІЯ

**ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ
МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ПУПОВИНИ
НА ІМУННУ СИСТЕМУ ХВОРИХ НА ПНЕВМОНІЮ, СПРИЧИНЕНУ
КОРОНАВІРУСОМ SARS-COV-2**

091 – Біологія

09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі біологія

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідні джерела

_____ (Букреєва Т.В.)

Науковий керівник

Шаблій Володимир Анатолійович

Кандидат біологічних наук, старший
науковий співробітник

Київ – 2024

АНОТАЦІЯ

Букресва Т.В. «Особливості впливу мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин пуповини на імунну систему хворих на пневмонію, спричинену коронавірусом SARS-CoV-2» – кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія (09 – Біологія) – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2024.

Дисертація присвячена характеристиці динамічних змін в субпопуляціях імунних клітин в периферичній крові пацієнтів з гострим респіраторним дистрес-синдромом (ГРДС), спричиненим важкою пневмонією COVID-19, опису змін ступеню пошкодження легень, рівнів цитокінів, хемокінів та мікроРНК після трансплантації кріоконсервованих аlogenних МСК пуповини та пошуку мішеней дії і можливих механізмів імудомодуючого впливу МСК.

На ранній стадії інфекції реплікація SARS-CoV-2, збуднику коронавірусної хвороби COVID-19, призводить до прямого пошкодження тканин легень і розвитку ГРДС. На пізній фазі інфіковані вірусом клітини викликають імунну відповідь шляхом рекрутування з периферичної крові та кісткового мозку Т-лімфоцитів, моноцитів і нейтрофілів, які в свою чергу вивільняють низку цитокінів, що веде до ураження інших органів людини, такі як серце, судини, печінка, кишківник та нирок. При цьому змінюється представленість та фенотип клітин імунної системи в крові хворих, що може бути діагностичним і прогностичним критерієм для протікання і лікування коронавірусної хвороби. При важкій формі захворювання спостерігається «цитокіновий шторм» – синдром понаднормованого вивільнення цитокінів – білків та пептидів, що регулюють міжклітинні взаємодії в організмі, зокрема в імунній системі, включаючи проліферативну активність клітин, їх диференціювання, функціональну активність. У найгіршому випадку системна

гіперактивація призводить до поліорганної недостатності та навіть смерті. Крім того, у хворих також змінюються рівні мікроРНК, які відповідають за регуляцію експресії багатьох генів, залучених до відповіді на запалення. Таким чином, патогенез розвитку ГРДС при COVID-19, у тому числі, є результатом абнормальної відповіді організму або надмірної реакції імунної системи господаря. Дослідження тонких змін у функціонування імунної системи хворих на різних стадіях захворювання важливе для розуміння патофізіології коронавірусної хвороби і стратегії лікування, а нормалізація спричиненого COVID-19 дисбалансу імунної системи та подолання наслідків ГРДС є перспективним завданням для ефективного лікування цього захворювання.

Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (МСК) широко застосовують у клітинній терапії. Безпека та ефективність їх застосування були чітко зафіксовані у багатьох клінічних випробуваннях, особливо при імуноопосередкованих запальних захворюваннях. МСК можуть регулювати як вроджений, так і набутий імунітет через прямі міжклітинні взаємодії з імунними клітинами, включаючи Т-клітини, В-клітини, макрофаги, моноцити, дендритні клітини і нейтрофіли, або паракринно через секрецію хемокінів, факторів росту та цитокінів. Окрім імуномодуючих, МСК також притаманні регенеративні властивості, які проявляються як у відновленні пошкоджень шляхом замісного вбудовування в орган (наприклад, судини та легені), так і у запобіганні пошкодженням шляхом ремоделювання позаклітинного матриксу (наприклад, перешкоджання фіброзу). Завдяки своїм унікальним властивостям МСК, їх трансплантація є перспективним напрямком в лікуванні пацієнтів із ГРДС внаслідок COVID-19 пневмонії, а мішенню їхнього впливу є клітини імунної системи та легень.

В данній роботі охарактеризовані мезенхімальні клітини пуповини людини (МСКПЛ) в розрізі їхнього застосування для терапії ГРДС при коронавірусній хворобі внаслідок інфікування SARS-CoV-2. Описані спосіб отримання МСК з пуповини методом експлантів, охарактеризовано поверхневий фенотип, каріотип, внутрішньоклітинні маркери, здатність до спрямованого диференціювання

кріоконсервованих МСКПЛ, а також такі критерії якості препарату алогенних МСК для внутрішньовенної трансфузії як життєздатність та колоніє-утворююча активність залежно від часу інкубації. Дисертаційне дослідження виконувалось в рамках проведення клінічного випробування, до якого були залучені 28 пацієнтів з вперше діагностованим COVID-19, в яких розвинувся ГРДС середнього ступеню тяжкості та 17 здорових волонтерів, які не були інфіковані SARS-CoV-2.

Спочатку для кращого розуміння патогенезу коронавірусної хвороби були охарактеризовані зміни в субпопуляціях лімфоцитів хворих з ГРДС впродовж 28 днів з моменту госпіталізації у порівнянні з здоровими волонтерами. Показано, що на початку хвороби присутні мієлоцитоз, лейко- та лімфопенія, які з початком лікування змінюються лейкоцитозом. При чому, спостерігалось достовірне зростання вмісту В-клітин у крові хворих з ГРДС у порівнянні з здоровими волонтерами. Вперше описано підвищений вміст $CD4^+$ і $CD8^+$ регуляторних, активованих, виснажених та старіючих клітин пам'яті з 14 доби від початку госпіталізації. Вперше описано зростання вмісту подвійно позитивних Т клітин, $CD127^-$ та $CD25^-$ експресуючих Т-клітин, $CD3^+PD-1^{low}$ і $CD3^-PD-1^{low}$ Т-клітин, моноцитів та дендритних клітин протягом 28 діб, що свідчить про активацію природньої імунної відповіді. Популяція мієлоїдних клітин на ранньому етапі хвороби характеризується високим вмістом моноцитів, та низьким вмістом дендритних субпопуляцій. Протягом лікування спостерігалось поступове зниження вмісту моноцитів з одночасним зростанням відсотку дендритних клітин, що свідчить про розвиток набутого імунітету. Вперше виявлено достовірно вищі відносні рівні експресії $miR-221-3p$, $miR-27a-3p$, $miR-133a-3p$ і $miR-126-3p$ на початку госпіталізації пацієнтів із ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2. Також нами було вперше показано, що ступінь фіброзу легень через 1 рік спостереження позитивно корелює з концентраціями MCP-1, RAGE, вмістом старіючих Т-клітин пам'яті і $CD57^+$ Т-клітин та негативно корелює з вмістом $CD127^+$ клітин, рівнями експресії $miR-92a-3p$, $miR-21a-5p$ і $miR424-5p$ в плазмі крові хворих з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2.

Далі в роботі проведено порівняння клінічних та молекулярних показників у хворих з ГРДС при коронавірусній хворобі внаслідок інфікування SARS-CoV-2, які проходили традиційну терапію (Контрольна група) з хворими, як отримували стандартну терапію разом з трьома послідовними інфузіями МСКПЛ (група МСК). Для виявлення короткострокового і довгострокового ефектів терапії МСК, спостереження за станом хворих і вимірювання показників у пацієнтів з вперше діагностованим COVID-19 та здорових волонтерів, не хворівших на COVID-19, проводили в день включення в дослідження/госпіталізації (день 0), на 7-й, 14-й, 28-й день та через 8, 24 та 48 тижнів після дня 0. Перш за все, було показано, що повторні трансфузії МСКПЛ є безпечними і не мали істотних побічних ефектів. Доведено, що терапія МСК має довгострокове (до одного року) покращення стану легенів пацієнтів з ГРДС за даними КТ. В короткостроковому періоді аналіз гематологічних показників хворих показав, що терапія МСК стимулює відновлення рівня лімфоцитів та прискорює зниження таких маркерів запалення, як С-реактивного білка, швидкості осідання еритроцитів та паличкоядерних нейтрофілів.

Молекулярними показниками запалення та ефекту терапії МСК були обрані низка про- та протизапальних цитокінів та хемокінів (С-реактивний білок, G-CSF, IL-2, IL-6, IL-10, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , TNF- α , AngII, TnI, SP-D, NT-proBNP і RAGE) і певні мікроРНК, асоційовані з запаленням (hsa-miR-21-5p, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-124-3p та hsa-miR-424a-5p). Встановлено, що трансплантація МСК призводить до достовірного зростання в плазмі хворих вмісту протизапального цитокіну IL-10 та прозапальних хемокінів IP-10, MIP-1 α та G-CSF. Виявлено, що терапія МСК не має достовірного впливу на відносний рівень експресії мікроРНК, що асоційовані з функціональним станом легенів та запаленням (miR-27a-3p, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-126-3p, miRNA-133a-3p і miR-221-3p, miR-92a-3p, miR-124-3p і miR-424a-5p) в плазмі крові хворих з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2. Також МСКПЛ сприяли більш швидкому зниженню С-реактивного білку вже протягом першого тижня спостереження, на відміну від Контрольної групи, де

спостерігалася 7-денна затримка у зниженні рівня СРБ. Проте не було виявлено впливу терапії МСК на рівні інтерлейкінів (IL-2, -6) та хемокіну MCP-1 в плазмі хворих. Таким чином, трансплантація МСКПЛ може слугувати в якості імуномодулятора при розвитку цитокінового шторму.

У даному дослідженні рівень експресії мікроРНК, що асоційовані з функціональним станом легенів та запаленням miR-27a-3p, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-126-3p, miRNA-133a-3p і miR-221-3p, miR-92a-3p, miR-124-3p і miR-424-5p у плазмі хворих з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2 не відрізнявся між групами МСК та Контролю та знижувався (за винятком miR-92a-3p і miR424-5p) протягом усього періоду спостереження. Після закінчення курсу традиційного лікування відбулося значне підвищення miR-92a-3p і miR424-5p у пацієнтів як в МСК, так і в Контрольній групі. Виявлена в цій роботі достовірна негативна середня кореляція між відносними рівнями miR-92a-3p і miR-424-5p в плазмі пацієнтів і рівнями СРБ, SP-D та IP-10, може вказувати на їхню компенсаторну роль у зменшенні запалення, що узгоджується з раніше встановленими даними інших авторів, що miR-92a-3p негативно регулює імунну відповідь опосередковану TLR.

Підбір панелі мікроРНК для данного дослідження ґрунтувався на попередніх дослідженнях інших авторів, які показали, що miR-27a-3p, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-126-3p і miR-221-3p і miRNA-133a-3p є потенційними біомаркерами запалення при ГРДС. В той же час miR-92a-3p, miR-424-5p та miR-124-3p є перспективними біомаркерами ендотеліальної дисфункції та гострого загострення хронічного обструктивного захворювання легень.

Для з'ясування активації сигнальних шляхів-мішеней імунних клітин та механізмів імуномодулюючої дії МСКПЛ було проведено їх спільне культивування з моноклеарними клітинами периферичної крові (МКПК), отриманих від хворих з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2, з МСКПЛ та досліджено іммофенотип Т-клітин та секрецію низки цитокінів та хемокінів. Окрім того, для визначення змін в експресії генів було проведено секвенування нового покоління мРНК та порівняно профілі транскриптомів МКПК, культивованих у присутності та без МСКПЛ. Було продемонстровано збільшення експресії CD69 як маркерів ранніх Т-клітин і CD25

як маркерів середньої стадії серед субпопуляцій CD3⁺ після спільного культивування та зменшення відсотку ефektorних, старіючих ефektorних CD8 і CD4 Т-клітин і CD8 Т-клітин пам'яті. Спільне культивування з МСКПЛ значно зменшувало проліферацію МКПК, що співвідноситься зі зниженою експресією генів, залучених до поділу клітин, за даними аналізу транскриптому. Також було показано, що кондиціоноване середовище після спільного культивування МСКПЛ і МКПК мають підвищений вміст IL-6, MCP-1 і G-CSF і знижений MIP-1 α та IL-12, що відповідає рівням експресії відповідних генів у МКПК за даними аналізу транскриптому. В результаті аналізу транскриптому МКПК були виявлені 4172 гени з диференціальною експресією; з них 2993 гени мали підвищений рівень експресії в МСК групі, а 1179 – знижений. Аналіз біологічних процесів генів з підвищеною регуляцією показав активацію генів, які задіяні в організації позаклітинного матриксу, ангіогенезі, імунному захисті (особливо в імунітеті, опосередкованому нейтрофілами), і міграції лейкоцитів та знижену регуляцію генів, які беруть участь у поділі клітин, включали гени, пов'язані з реплікацією ДНК, клітинним циклом і репаративним механізмом. Анотація метаболічних шляхів серед збагачених категорій в базі даних KEGG виявила, що МСКПЛ індукують асоційовані із запаленням сигнальні шляхи (від рецепторів В-клітин та NF-каппа В сигналінг) в МКПК хворих. Таким чином, дані експериментів *in vitro* демонструють, що під впливом МСКПЛ в МКПК хворих з ГРДС внаслідок коронавірусної пневмонії посилюється експресія генів, залучених до розвитку імунної відповіді, зокрема активації нейтрофілів, міграції лейкоцитів і фагоцитозу, і знижується експресія генів, пов'язаних з апоптозом.

В результаті виконання даної дисертаційної роботи було охарактеризовано динамічні зміни рівнів про- та протизапальних цитокінів, хемокінів та рівнів мікроРНК протягом 28 діб у хворих з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2, після трансплантації МСКПЛ та порівняно дані з групами контролю та відносно здорових донорів. Встановлено, що трьохкратна внутрішньовенна трансплантація МСКП з інтервалом в 3 доби в дозі 1×10^6 клітин/кг маси тіла на ранній/ середній стадії захворювання на ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2, є безпечною, не

викликає суттєвих побічних негативних ефектів, має імуномодулюючий вплив на перебіг запального процесу та призводить до суттєвого зниження рівня фіброзу легень (в 12 разів) через 1 рік спостереження.

Ключові слова: МСК, мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини, мікроРНК, цитокіни, гострий респіраторний дистрес-синдром, запалення, фіброз, транскриптом, секвенування нового покоління, клітини імунної системи, диференціальна експресія генів, COVID-19, SARS-CoV-2.

Список публікацій здобувача за темою дисертації

Статті у наукових фахових виданнях:

- 1) Dynamic changes in radiological parameters, immune cells, selected miRNAs, and cytokine levels in peripheral blood of patients with severe COVID 19 / **Bukreieva, T.**, Kyryk, V., Nikulina, V., Svitina, H., Vega, A., Chybisov, O., Shablii, I., Mankovska, O., Lobyntseva, G., Nemtinov, P., Skrypkina, I., & Shablii, V. // Biomedical reports, 2023, 18(5), 33. DOI:10.3892/br.2023.1615. IF 2.3 Q2. *Особистий внесок здобувача – розробка та планування дослідження, розробка методик, ІФА, аналіз даних, підготовка рукопису.*
- 2) Treatment of Acute Respiratory Distress Syndrome Caused by COVID-19 with Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells / **Bukreieva, T.**, Svitina, H., Nikulina, V., Vega, A., Chybisov, O., Shablii, I., Ustylenko, A., Nemtinov, P., Lobyntseva, G., Skrypkina, I., & Shablii, V. // International journal of molecular sciences, 2023, 24(5), 4435. DOI:10.3390/ijms24054435. IF 4.9 Q1 *Особистий внесок здобувача – розробка та планування дослідження, розробка методик, отримання, тестування, і підготовка МСКПЛ для трансплантації та експерименти зі спільним культивуванням МКПК/МСКПЛ, ІФА, аналіз даних, підготовка рукопису.*
- 3) Effects of human placenta cryopreservation on molecular characteristics of placental mesenchymal stromal cells”. / Navakauskienė, R., Žukauskaitė, D., Borutinskaitė, V.

V., **Bukreieva, T.**, Skliutė, G., Valatkaitė, E., Zentelytė, A., Piešinienė, L., & Shablii, V. // *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 2023, 11, 1140781. DOI:10.3389/fbioe.2023.1140781. IF 4.53 Q2 *Особистий внесок здобувача – розробка дослідження, отримання, характеристика МСК, аналіз даних, підготовка рукопису.*

Тези наукових доповідей:

- 1) **Bukreieva T. V.**, Nikulina V. V., Skrypkina I. Ya., Kyryk V. M., Vega A. R., Chybisov O. L., Duda O. V., Shablii V. A. / Dynamic alterations of immunophenotype, C reactive protein and interleukine-6 levels in peripheral blood of severe COVID-19 patients // XV Всеукраїнська конференція молодих вчених з міжнародною участю. *Biopolymers and Cell*. 2021. Vol. 37. N 3. (Київ, 26-27 травня 2021) – P. 231.
- 2) **Bukreieva T.V.**, Kyryk V.M., Svitina H.M., Nikulina V.V., Shablii Iu.M., Chybisov O.L., Nemtinov P.I., Ustymenko A.M., Lobyntseva G.S., Skrypkina I.Ia., Shablii, V. A. / T cell response is associated with cytokine and miRNA levels in patients with COVID-19 // Всеукраїнська конференція з молекулярної і клітинної біології з міжнародною участю // All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation. Збірник тез (Київ, 15-17 червня 2022) – P. 70.
- 3) **Bukreieva T.V.**, Kyryk V.M., Nikulina V.V., Svitina H.M., Vega A.R., Chybisov O.L., Shablii Iu.M., Mankovska O.O., Ustymenko A.M., Lobyntseva G.S., Nemtinov P.I., Skrypkina I.Ia., Shablii, V. A. / Treatment for COVID-19 with intravenous administration of umbilical cord-derived MSCs // CLINICAL TRANSLATION OF PERINATAL DERIVATIVES: WHERE DO WE STAND? Joint Meeting: 6th International Placenta Stem Cell Society (IPLASS) Meeting and Final Meeting of the COST Action (CA17116) “International Network for Translating Research on Perinatal Derivatives into Therapeutic Approaches” Abstract book. (Брешия, Італія, 02-03 вересня 2022)
- 4) **Букресєва Т.В.**, Світїна Г.М., Нікуліна В.В., Вега А.Р., Чибісов О.Л., Шаблій Ю.М., Устименко А.М., Немтінов П.І., Лобинцева Г.С., Скрипкіна І.Я., Шаблій

В.А. / Лікування гострого респіраторного дистрес-синдрому, викликаного COVID-19, мезенхімальними стовбуровими клітинами пуповини людини// Конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики (Київ, 21.02.2023)

- 5) **Bukreieva T.V.**, Svitina H.M., Nikulina V.V., Vega A.R., Chybisov O.L., Shablii Iu.M., Kyryk V.M., Ustymenko A.M., Nemtinov P.I., Lobyntseva G.S., Skrypkina I.Ya., Shablii V.A. / Multifunctional response of PBMC from patients with COVID-19 to the immunomodulatory capability of hUC-MSC // Конференція молодих вчених ІМБГ у рамках XVIII Міжнародної наукової конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» присвяченої 50-річчю ІМБГ НАНУ і 70-річчю відкриття подвійної спіралі ДНК. Збірник тез. (Київ, 27 вересня 2023 року) – Р.71.
- 6) Shablii V. A., **Bukreieva T. V.**, Svitina H. M., Nikulina V. V., Vega A. R., Chybisov O. L., Shablii Iu. M., Ustymenko A. M., Nemtinov P. I., Lobyntseva G. S., Skrypkina I. Ya. // ISSCR São Paulo International Symposium 2023, Ribeirão Preto, São Paulo, (Бразилія, 22-24 вересня 2023)
- 7) **Bukreieva T. V.**, Svitina H. M., Nikulina V. V., Kyryk V.M., Vega A. R., Chybisov O. L., Shablii Iu. M., Ustymenko A. M., Nemtinov P. I., Lobyntseva G. S., Skrypkina I. Ya., Shablii V. A. / Effects of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Therapy on Immune Response and Lung Fibrosis in Severe COVID-19 // XVIII Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Київ, 21-22 травня 2024)

ABSTRACT

Bukreieva T.V. Peculiarities of the effect of umbilical cord-derived multipotent mesenchymal stromal cells on the immune system of patients with pneumonia caused by the SARS-CoV-2 coronavirus – qualifying scientific work on the right of a manuscript.

The thesis for a scientific degree of Doctor of Philosophy by speciality 091 – Biology (09 – Biology) – Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, 2024.

The dissertation is devoted to the characterization of dynamic changes in the subpopulations of immune cells in the peripheral blood of patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS) caused by severe COVID-19 pneumonia, the description of changes in the degree of lung damage, levels of cytokines, chemokines and miRNAs after transplantation of cryopreserved allogeneic umbilical cord MSCs, and the search for MSC action targets.

At an early stage of infection, the replication of SARS-CoV-2, the causative agent of the coronavirus disease COVID-19, leads to direct damage to lung tissue. In the late phase, cells infected with the virus cause an immune response by recruiting T-lymphocytes, monocytes, and neutrophils from the peripheral blood and bone marrow, which in turn release many cytokines, which leads to damage to other human organs, such as the heart, blood vessels, liver, intestines and kidney. At the same time, the representation and phenotype of cells of the immune system in the blood of patients changes, which can be a diagnostic and prognostic criterion for the course and treatment of coronavirus disease. With a severe form of the disease, a "cytokine storm" is observed – a syndrome of excessive release of cytokines - markers that can be detected in the peripheral blood of patients. In the worst case, systemic hyperactivation leads to multiple organ failure and even death. In addition, the levels of miRNAs, which are responsible for regulating the expression of many genes involved in the response to inflammation, also change in patients. Thus, the pathogenesis of COVID-19 results from an abnormal body response or an overreaction of the host's immune system. The study of subtle

changes in the functioning of the immune system of patients at different stages of the disease is essential for understanding the pathophysiology of the coronavirus disease and the treatment strategy, and the normalization of the imbalance of the immune system caused by COVID-19 is a promising task for the effective treatment of this disease.

Mesenchymal stromal cells (MSCs) are widely used in cell therapy. The safety and effectiveness of their use have been established in many clinical trials, especially in immune-mediated inflammatory diseases. MSCs can regulate both innate and acquired immunity through direct intercellular interactions with immune cells, including T cells, B cells, macrophages, monocytes, dendritic cells, and neutrophils, or paracrine through the secretion of chemokines, growth factors, and cytokines. In addition to immunomodulatory, MSCs also have regenerative properties, which are manifested both in the restoration of damage by replacement incorporation into the organ (for example, blood vessels and lungs), and in the prevention of damage by remodeling the extracellular matrix (for example, preventing fibrosis). Due to the unique properties of MSCs, their transplantation is a promising direction in treating patients with severe COVID-19 pneumonia, and the target of their influence is cells of the immune system and lungs.

In this work, mesenchymal cells of the human umbilical cord (UC-MSCs) are characterized in terms of their use for the therapy of ARDS during COVID-19 caused by SARS-CoV-2. The method of obtaining MSCs from the umbilical cord by the explant method, growth rates of cell culture, surface phenotype, intracellular markers, the ability to differentiate cryopreserved MSCs, and quality criteria (viability and colony forming ability depending on exposure time) for the preparation of allogeneic MSCs for intravenous transfusion are described. This work was carried out as part of a clinical trial in which 28 patients with newly diagnosed COVID-19 and 17 healthy volunteers who did not have COVID-19 were involved.

First, to better understand the pathogenesis of the coronavirus disease, changes in lymphocyte subpopulations of patients with COVID-19 were characterized within 28 days from the moment of hospitalization compared with healthy volunteers. In this work, we showed that myelocytosis, leuko-, and lymphopenia are present at the beginning of the disease, which change to leukocytosis with the beginning of treatment. Moreover, the

most represented type of cells are B-cells. For the first time, CD4⁺ and CD8⁺ regulatory, activated, exhausted, and mature memory cells predominate among T cells on day 14, indicating activation of the innate immune response. For the first time, we described an increase in the content of double-positive T cells, CD127⁻ and CD25-expressing T cells, CD3⁺PD-1^{low} and CD3⁻PD-1^{low} T cells, monocytes and dendritic cells during 28 days, which indicates the activation of the natural immune response. The population of myeloid cells in the early stage of the disease is characterized by a high content of monocytes, which gradually decreases with a simultaneous increase in the percentage of dendritic cells, which indicates the development of acquired immunity already from the 14th day of observation. For the first time, significantly higher relative expression levels of miR-221-3p, miR-27a-3p, miR-133a-3p, and miR-126-3p were detected at the beginning of hospitalization of patients with ARDS caused by SARS-CoV-2. We also showed for the first time that the degree of lung fibrosis after 1 year of observation is positively correlated with the concentrations of MCP-1, RAGE, the content of senescent memory T cells and CD57⁺ T cells, and negatively correlated with the content of CD127⁺ cells, levels expression of miR-92a-3p, miR-21a-5p and miR424-5p in blood plasma of patients with ARDS caused by SARS-CoV-2.

Further, we compared the clinical and molecular parameters of patients with COVID-19 who underwent convection therapy (the Control group) with patients who received standard therapy with three consecutive UC-MSC infusions (the MSC group). To identify the short-term and long-term effects of MSC therapy, observation of the patient's condition and measurement of indicators in patients with newly diagnosed COVID-19 and healthy volunteers who did not suffer from COVID-19 were carried out on the day of inclusion/hospitalization (day 0), on days 7, 14, 28, and weeks 8, 24, and 48 after day 0. First of all, repeated UC-MSC transfusions were shown to be safe and without serious adverse effects. We proved that MSC therapy has a long-term (up to one year) improvement in the lung's injuries of patients with ARDS according to CT scans. In the short term, the analysis of hematological indicators of patients with COVID-19 showed that MSC therapy leads to a faster normalization in the neutrophils and

lymphocytes counts and a decrease in ESR, CRP and banded neutrophils during two weeks of observation.

Specific cytokines, chemokines (CRP, G-CSF, IL-2, IL-6, IL-10, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , TNF- α , AngII, TnI, SP-D, NT-proBNP i RAGE), and miRNAs hsa-miR-21-5p, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-92a-3p, has-miR-124-3p ta hsa-miR-424a-5p) were chosen as molecular indicators of inflammation and the effect of MSC therapy. For the first time, we showed that MSC therapy increases the content of anti-inflammatory cytokine IL-10 and pro-inflammatory G-CSF and IP-10 in the plasma of patients. It was found that MSC therapy has no significant effect on the relative expression level of miRNAs associated with the functional state of the lungs and inflammation (miR-27a-3p, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-126-3p, miRNA- 133a-3p and miR-221-3p, miR-92a-3p, miR-124-3p and miR-424-5p) in blood plasma of patients with ARDS caused by SARS-CoV-2. Also, UC-MSCs caused a faster reduction of C-reactive protein level during the first week of observation, in contrast to the COVID-19 group, where a 7-day delay in the reduction of CRP levels was observed. However, the influence of MSC therapy on the level of interleukins (IL-2, -6, and -10) in the plasma of patients was not detected. Thus, MSC transplantation can act as an immunomodulator during the development of a cytokine storm.

In this study, the levels of pro-inflammatory miR-146a, miR-27a, miR-126, miR-221, miR-21, and miR-133 in the plasma of patients did not differ between groups and decreased throughout the observation period. However, after the end of conventional treatment, there was a significant increase in miR-92a-3p and miR424-5p in patients in both the MSC and the COVID-19 groups. Plasma levels of miR-424-5p and miR-92a-3p were also found to be negatively correlated with CT lung injury. Interestingly, miR-92a-3p negatively regulates the TLR-mediated immune response. In addition, the relative levels of miR-92a-3p and miR-424-5p in patients' plasma correlated negatively with CRP, SP-D, and IP-10, which may indicate their compensatory role in reducing inflammation.

The selection of the miRNA panel for this study was based on previous studies by other authors, which showed that miR-146, miR-221, miR-27, and miR-126 are potential

biomarkers of inflammation in ARDS. At the same time, miR-92a-3p, miR-424-5p and miR-124-3p are promising biomarkers of endothelial dysfunction and acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease.

In order to find out the activation of target signaling pathways and the mechanisms of action of UC-MSCs, the co-cultivation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) obtained from patients with ARDS caused by SARS-CoV-2 with mesenchymal stromal cells of the human umbilical cord was carried out and T-cell immunophenotype and secretion of a number of cytokines and chemokines were investigated. In addition, transcriptome profiles of PBMC were compared by NGS to determine changes in gene expression. Here we demonstrated increased expression of CD69 as an early T-cell marker and CD25 as an intermediate-stage marker among CD3⁺ subpopulations after co-culture and a decrease in the percentage of effector, senescent effector CD8 and CD4 T cells, and memory CD8 T cells. According to our transcriptome analysis, co-cultivation with UC-MSCs significantly reduced the proliferation of PBMC, which correlates with reduced expression of genes involved in cell division. We also showed that the conditioned medium after co-cultivation of PBMC with UC-MSCs has increased content of IL-6, MCP-1, and G-CSF and decreased MIP-1 α and IL-12, which corresponds to the expression levels of the corresponding genes in PBMC according to the transcriptome data. As a result of the analysis of the PBMC transcriptome, 4172 genes were differentially expressed; of them, 2993 genes had an increased expression level in the MSC group, and 1179 – decreased. Analysis of the biological processes of upregulated genes showed activation of genes involved in an extracellular matrix organization, angiogenesis, immune defense (especially in neutrophil-mediated immunity), and leukocyte migration, and downregulation of genes involved in cell division, including genes related associated with DNA replication, cell cycle, and repair mechanism. Annotation of metabolic pathways revealed that UC-MSCs induce inflammation-associated signaling pathways (from B-cell receptors and NF-kappa B signaling) in PBMC of patients with COVID-19. Thus, the data of *in vitro* experiments demonstrate that under the influence of UC-MSC, the expression of genes involved in the development of the immune response, in particular neutrophil activation, leukocyte migration, and

phagocytosis, increases in the PBMC of patients with coronavirus pneumonia, and the expression of genes related to apoptosis decreases.

As a result of this dissertation, dynamic changes in the levels of pro- and anti-inflammatory cytokines, chemokines, and miRNA levels were characterized within 28 days in patients with ARDS caused by SARS-CoV-2 after UC-MSC transplantation and the data were compared with Control groups and relatively healthy donors. We proved that triple intravenous transplantation of MSCs with an interval of 3 days at a dose of 1×10^6 cells/kg of body weight in the early/middle stage of ARDS caused by SARS-CoV-2 is safe, does not cause significant side effects, and has an immunomodulatory effect on the course of the inflammatory process and leads to a significant decrease in the level of pulmonary fibrosis (by 12 times) after 1 year of observation.

Keywords: MSC, multipotent mesenchymal stromal cells, microRNA, cytokine, acute respiratory distress syndrome, inflammation, fibrosis, transcriptome, next-generation sequencing, immune cells, differential gene expression, COVID-19, SARS-CoV-2.

List of publications

Articles:

- 1) Dynamic changes in radiological parameters, immune cells, selected miRNAs, and cytokine levels in peripheral blood of patients with severe COVID 19 / **Bukreieva, T.**, Kyryk, V., Nikulina, V., Svitina, H., Vega, A., Chybisov, O., Shablii, I., Mankovska, O., Lobyntseva, G., Nemtinov, P., Skrypkina, I., & Shablii, V. // Biomedical reports, 2023, 18(5), 33. DOI:10.3892/br.2023.1615. IF 2.3 Q2.
- 2) Treatment of Acute Respiratory Distress Syndrome Caused by COVID-19 with Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells / **Bukreieva, T.**, Svitina, H., Nikulina, V., Vega, A., Chybisov, O., Shablii, I., Ustymenko, A., Nemtinov, P., Lobyntseva, G., Skrypkina, I., & Shablii, V. // International journal of molecular sciences, 2023, 24(5), 4435. DOI:10.3390/ijms24054435. IF 4.9 Q1

- 3) Effects of human placenta cryopreservation on molecular characteristics of placental mesenchymal stromal cells”. / Navakauskienė, R., Žukauskaitė, D., Borutinskaitė, V. V., **Bukreieva, T.**, Skliutė, G., Valatkaitė, E., Zentelytė, A., Piešinienė, L., & Shablii, V. // *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 2023, 11, 1140781. DOI:10.3389/fbioe.2023.1140781. IF 4.53 Q2

Conference abstracts:

- 1) **Bukreieva T. V.**, Nikulina V. V., Skrypkina I. Ya., Kyryk V. M., Vega A. R., Chybisov O. L., Duda O. V., Shablii V. A. / Dynamic alterations of immunophenotype, C reactive protein and interleukine-6 levels in peripheral blood of severe COVID-19 patients // XV Всеукраїнська конференція молодих вчених з міжнародною участю. *Biopolymers and Cell*. 2021. Vol. 37. N 3. (Київ, 26-27 травня 2021) – P. 231.
- 2) **Bukreieva T.V.**, Kyryk V.M., Svitina H.M., Nikulina V.V., Shablii Iu.M., Chybisov O.L., Nemtinov P.I., Ustymenko A.M., Lobyntseva G.S., Skrypkina I.Ia., Shablii, V. A. / T cell response is associated with cytokine and miRNA levels in patients with COVID-19 // Всеукраїнська конференція з молекулярної і клітинної біології з міжнародною участю // All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation. Збірник тез (Київ, 15-17 червня 2022) – P. 70.
- 3) **Bukreieva T.V.**, Kyryk V.M., Nikulina V.V., Svitina H.M., Vega A.R., Chybisov O.L., Shablii Iu.M., Mankovska O.O., Ustymenko A.M., Lobyntseva G.S., Nemtinov P.I., Skrypkina I.Ia., Shablii, V. A. / Treatment for COVID-19 with intravenous administration of umbilical cord-derived MSCs // CLINICAL TRANSLATION OF PERINATAL DERIVATIVES: WHERE DO WE STAND? Joint Meeting: 6th International Placenta Stem Cell Society (IPLASS) Meeting and Final Meeting of the COST Action (CA17116) “International Network for Translating Research on Perinatal Derivatives into Therapeutic Approaches” Abstract book. (Брешия, Італія, 02-03 вересня 2022)
- 4) **Букресєва Т.В.**, Світїна Г.М., Нікуліна В.В., Вега А.Р., Чибісов О.Л., Шаблій Ю.М., Устименко А.М., Немтінов П.І., Лобинцева Г.С., Скрипкіна І.Я., Шаблій

- В.А. / Лікування гострого респіраторного дистрес-синдрому, викликаного COVID-19, мезенхімальними стовбуровими клітинами пуповини людини// Конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики (Київ, 21.02.2023)
- 5) **Bukreieva T.V.**, Svitina H.M., Nikulina V.V., Vega A.R., Chybisov O.L., Shablii Iu.M., Kyryk V.M., Ustymenko A.M., Nemtinov P.I., Lobyntseva G.S., Skrypkina I.Ya., Shablii V.A. / Multifunctional response of PBMC from patients with COVID-19 to the immunomodulatory capability of hUC-MSC // Конференція молодих вчених ІМБГ у рамках XVIII Міжнародної наукової конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» присвяченої 50-річчю ІМБГ НАНУ і 70-річчю відкриття подвійної спіралі ДНК. Збірник тез. (Київ, 27 вересня 2023 року) – Р.71.
- 6) Shablii V. A., **Bukreieva T. V.**, Svitina H. M., Nikulina V. V., Vega A. R., Chybisov O. L., Shablii Iu. M., Ustymenko A. M., Nemtinov P. I., Lobyntseva G. S., Skrypkina I. Ya. // ISSCR São Paulo International Symposium 2023, Ribeirão Preto, São Paulo, (Бразилія, 22-24 вересня 2023)
- 7) **Bukreieva T. V.**, Svitina H. M., Nikulina V. V., Kyryk V.M., Vega A. R., Chybisov O. L., Shablii Iu. M., Ustymenko A. M., Nemtinov P. I., Lobyntseva G. S., Skrypkina I. Ya., Shablii V. A. / Effects of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Therapy on Immune Response and Lung Fibrosis in Severe COVID-19 // XVIII Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Київ, 21-22 травня 2024)

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ABSTRACT	10
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	22
ВСТУП	24
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	31
1.1. Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини	31
1.1.1. Походження МСК.....	31
1.1.2. МСК в дорослому організмі людини, тканина пуповини людини як джерело МСК	33
1.1.3. Імуномодуючі властивості МСК	35
1.2. Коронавірусна хвороба COVID-19	40
1.2.1. Класифікація збудника SARS-CoV-2	40
1.2.2. Патофізіологічні аспекти розвитку коронавірусної хвороби та ГРДС.	41
1.3. Терапія гострого ураження легень, викликаного вірусними інфекціями, із застосуванням МСК.....	44
1.3.1. Доклінічні дослідження впливу МСК на розвиток гострого та хронічного пошкодження легеневої тканини	47
1.3.2. Результати клінічних досліджень впливу трансплантації МСК на перебіг ГРДС у пацієнтів з коронавірусною хворобою	50
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	59
2.1. Учасники та дизайн дослідження	59
2.2. Виявлення респіраторних патогенів.....	63
2.3. Виділення та культивування мезенхімальних стромальних клітин з пуповини людини.....	63

2.4. Спрямоване диференціювання МСКПЛ in vitro.....	64
2.5. Трансплантація МСКПЛ.....	65
2.6. Оцінка КТ та підрахунок балів.....	66
2.7. Збір та підготовка периферичної крові до досліджень.....	67
2.8. Імуноферментний аналіз.....	68
2.9. Кількісна ЗТ-ПЛР для визначення рівня експресії мікроРНК.....	69
2.10. Виділення моноклеарних клітин периферичної крові пацієнтів.....	71
2.11. Кріоконсервування клітин.....	72
2.12. Розморожування клітин.....	72
2.13. Проточна цитофлуориметрія.....	73
2.14. Спільне культивування МКПК з МСКПЛ.....	79
2.15. РНК-секвенування та біоінформатичний аналіз.....	80
2.16. Статистичний аналіз.....	81
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	82
РОЗДІЛ 3 Характеристика мск пуповини людини	82
РОЗДІЛ 4 Динамічні зміни імунофенотипу хворих/здорових в розрізі характеристики протікання хвороби	86
4.1. Профіль субпопуляцій лімфоцитів.	86
4.2. Динамічний профіль змін субпопуляцій Т клітин.	91
4.3. Динамічний профіль змін субпопуляцій міелоїдних моноклеарів.....	94
РОЗДІЛ 5 Трансплантація мск пуповини хворим	97
5.1. Основні результати безпеки	97
5.2. Динаміка змін ступеню пошкодження легень пацієнтів	97
5.3. Динаміка змін гематологічних параметрів пацієнтів	99
5.4. Динаміка змін рівнів цитокінів та хемокінів в плазмі пацієнтів	107

5.5. Динаміка змін рівнів мікроРНК в плазмі хворих	119
5.6. Кореляція між гематологічними параметрами, цитокінами, мікроРНК і показниками КТ легень в групі МСК.....	126
РОЗДІЛ 6..... Вплив МСКПЛ на моноклеарні клітини периферичної крові пацієнтів з ГРДС <i>in vitro</i>	129
6.1. Зміни імунофенотипу моноклеарних клітин хворих, рівнів цитокінів та кількості клітин при співкультивуванні з МСКПЛ	129
6.2. Визначення змін в експресії генів моноклеарних клітин периферичної крові пацієнтів до та після співкультивування з МСКПЛ	133
РОЗДІЛ 7 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	140
ВИСНОВКИ	146
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	148
Додатки	182

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГРДС – гострий респіраторний дистрес-синдром

ГУЛ – гостре ураження легень

ІФА – імуноферментний аналіз

КТ – комп’ютерна томографія

МСК – мезенхімальні стромальні клітини

МСКПЛ – мезенхімальні стромальні клітини пуповини людини

СРБ – С-реактивний білок

ФБС – фетальна бичача сироватка

ХОЗЛ – хронічне обструктивне захворювання легень

ШОЕ – швидкість осідання еритроцитів

CD – cluster of differentiation, кластер диференціювання

COVID-19 – коронавірусна хвороба людини, викликана збудником SARS-CoV-2

CXCR – C-X-C chemokine receptor, рецептор до C-X-C хемокіну

IP-10 – interferon gamma-induced protein 10, білок 10, що індукується інтерфероном гамма

FA/BRCA – Fanconi anemia/BReast Cancer

G-CSF – granulocyte colony-stimulating factor, гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор

GO – Gene Ontology, база даних із класифікації генів

IDO – indoleamine 2,3-dioxygenase, індоламін-2,3-диоксигеназа

IFN – interferon, інтерферон

IL-10 – interleukin 10, інтерлейкін 10

IL-2 – interleukin 2, інтерлейкін 2

IL-6 – interleukin 6, інтерлейкін 6

KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Кіотська енциклопедія генів і геномів

MCP-1 – monocyte chemoattractant protein-1, білок хемоаттрактанта моноцитів СС-хемокіну 1

MIP-1 α – macrophage inflammatory protein-1 alpha, білок запалення макрофагів 1 альфа

NT-proBNP – N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide, N-кінцевий пропептид натрійуретичного гормону

PD-1 – programmed cell death 1, білок програмованої клітинної загибелі 1

PGE2 – prostaglandin E2, простагландин E2

PTGES – prostaglandin E synthase, простагландин E синтаза

(s)RAGE – (soluble) receptor for advanced glycation endproducts, (розчинна форма) рецептора кінцевих продуктів посиленого глікування

SARS-CoV-2 – Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, перекладається «Тяжкий Гострий Респіраторний Синдром Коронавірус 2

scRNA-seq – single-cell RNA sequence, РНК секвенування по одній клітині

SP-D – surfactant D, сурфактант D

TnI – troponin I, тропонін I

ВСТУП

Актуальність теми. Нині багато досліджень описують клінічні характеристики пацієнтів з коронавірусною хворобою внаслідок інфікування SARS-CoV-2, включаючи епідеміологічні, клінічні, лабораторні, радіологічні та дані про лікування. Більшість цих результатів стосуються лише відмінностей між показниками пацієнтів з тяжкою та легкою формами перебігу захворювання. Але все ще недостатньо даних щодо динамічних змін параметрів клітин крові та факторів запалення для оцінки розвитку гострого респіраторного дистрес-синдрому (ГРДС) і прогресування COVID-19. Імунні клітини з периферичної крові пацієнта можуть бути використані як діагностичні маркери захворювання COVID-19, які легко охарактеризувати підчас швидкого та доступного аналізу крові. Але їх впровадження в клінічну практику обмежене невизначеністю механізмів, що призводять до зміни характеристик клітин крові та компонентів запалення. Як наслідок гіперактивації в системі вродженого імунітету при інфікуванні SARS-CoV-2 різко зростають рівні прозапальних цитокінів у плазмі периферичної крові, що призводить до понаднормованого вивільнення цитокінів, відомого як «цитокіновий шторм», і розвитку ГРДС, пов'язаного із пошкодженням легень і фіброзом тканини. Цей синдром «цитокінового шторму» супроводжується зниженням загальної кількості Т-клітин, Т-хелперів (CD4+) і цитотоксичних (CD8+) Т-клітин, природних кілерів (NK) і регуляторних Т-клітин, що порушує імунну систему. Тому нормалізація спричиненого COVID-19 дисбалансу імунної системи є перспективним завданням для ефективного лікування цього захворювання. Крім того, рівень та роль мікро РНК, ключових регуляторів експресії більшості генів геному людини, також недостатньо досліджені у пацієнтів з ГРДС внаслідок інфікування SARS-CoV-2. За попередніми даними, певні мікро РНК беруть участь у зменшенні запального процесу при гострій травмі легень та поляризації макрофагів в M2 стан, а також, було показано, що експресія мікро-РНК підвищується в нейтрофілах та макрофагах на тваринних моделях.

МСК широко застосовують у клітинній терапії. Безпека та ефективність їх застосування були чітко зафіксовані у багатьох клінічних випробуваннях, особливо при імуноопосередкованих запальних захворюваннях, таких як реакція “трансплантат проти господаря” та системний червоний вовчак. В основі імуномодуючого та регенеративного ефекту МСК лежать паракринний механізм дії та пряма клітина-клітинна взаємодія. У пацієнтів з COVID-19 уникнення надпотужного «цитокінового шторму» в легенях за рахунок вивільнення цитокінів з подальшим набряком, дисфункцією повітрообміну, виникненням ГРДС, гострою серцевою недостатністю, поліорганим ураженням та вторинною інфекцією може бути ключовим аспектом в лікуванні хворих на COVID-19 із застосування МСК. Однак, нині клінічні дані, які відображають зміни в імунній системі після трансплантації МСК хворим з COVID-19, досить обмежені.

В даній роботі ми зосередилися на характеристиці динамічних змін в субпопуляціях імунних клітин в периферичній крові пацієнтів з важкою пневмонією COVID-19, опису змін ступеню пошкодження легень, аналізі рівнів цитокінів та мікроРНК в периферичній крові після трансплантації кріоконсервованих алогенних МСК пуповини та пошуку мішеней дії МСКПЛ.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт лабораторії Біосинтезу нуклеїнових кислот відділу Функціональної геноміки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України «Зміни транскрипційного профілю та фенотипу клітин під впливом терапевтичних агентів при онкогенній трансформації чи запаленні», шифр 2.2.4.12, відомча тематика, код 6541030 (фундаментальні дослідження) та виконана в рамках гранту Національного Фонду Фундаментальних Досліджень, реєстраційний номер проекту: 2020.01/0246 «Вивчення стану дихальної, серцево-судинної та імунної систем у хворих з пневмонією COVID-19 після трансплантації кріоконсервованих алогенних мезенхімальних стовбурових клітин» (2020 – 2021 рр.).

Об'єкт дослідження. Гострий респіраторний дистрес синдром середнього ступеню тяжкості у хворих на пневмонію, викликану коронавірусом SARS-CoV-2.

Предмет дослідження. Вплив трансплантації МСКП на перебіг ГРДС, ступінь пошкодження легень, рівні цитокінів та мікроРНК, як біомаркерів стану імунної, серцевої та дихальної системи, в периферичній крові пацієнтів з важкою пневмонією, викликаною SARS-CoV-2.

Мета і завдання.

Метою роботи є охарактеризувати динамічні зміни в ступені пошкодження легень, субпопуляціях імунних клітин, рівнях цитокінів, хемокінів та мікроРНК, асоційованих із запаленням в периферичній крові пацієнтів з ГРДС внаслідок COVID-19 пневмонії після трансплантації кріоконсервованих алогенних МСК пуповини людини протягом коротко- та довготривалого терміну.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Отримати та охарактеризувати мезенхімальні стромальні клітини з пуповини людини;
2. Дослідити зміну субпопуляцій імунних клітин в крові хворих з ГРДС протягом раннього етапу перебігу хвороби;
3. Провести аналіз даних КТ легень хворих з ГРДС за консервативного лікування та клітинної терапії протягом одного року;
4. Дослідити динаміку змін рівнів С-реактивного білку, про- та протизапальних цитокінів та хемокінів (G-CSF, IL-2, IL-6, IL-10, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , TNF- α) в плазмі крові хворих з ГРДС з та без клітинної терапії протягом 28 днів;
5. Дослідити динаміку змін біомаркерів гострого ушкодження легенів та серця (AngII, TnI, SP-D, NT-proBNP і RAGE) в сироватці крові хворих з ГРДС з та без клітинної терапії протягом 28 днів;
6. Провести дизайн праймерів, оптимізувати умови кількісного ЗТ-ПЛР та дослідити відносний рівень експресії і мікроРНК, асоційованих з запаленням та функціональним станом легенів та серця (hsa-miR-21-5p, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-92a-3p, has-miR-124-3p та hsa-miR-424a-5p) в плазмі крові хворих з ГРДС з та без клітинної терапії протягом 28 днів;

7. Порівняти отримані дані функціонального стану імунної, легеневої та серцево-судинної систем з загальноклінічними даними, що характеризують перебіг пневмонії, спричиненої COVID-19;
8. Провести співкультивування моноклеарних клітин, отриманих з периферичної крові хворих з ГРДС, з МСК пуповини людини та проаналізувати зміни в розподілі субпопуляцій лімфоцитів та транскриптомі на рівні мРНК під впливом МСКПЛ.

Методи дослідження. У роботі використані наступні методи дослідження: виділення МСК з тканини пуповини людини, культивування МСК пуповини, світлова та флуоресцентна мікроскопія, проточна цитофлуориметрія, спрямоване диференціювання МСКПЛ *in vitro*, імуноферментний аналіз, виділення моноклеарних клітин з периферичної крові людини, співкультивування МСКПЛ з МКПК, виділення тотальної РНК, виділення мікроРНК, синтез кДНК, електрофорез продуктів ПЛР, кількісна ЗТ-ПЛР в реальному часі, секвенування нового покоління, загальний аналіз крові, компютерна томографія, статистична обробка результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше описано підвищений вміст CD4⁺ і CD8⁺ регуляторних, активованих, виснажених та старіючих клітин пам'яті з 14 дня спостереження. Вперше зростання вмісту подвійно позитивних Т клітин, CD127⁻ та CD25-експресуючих Т-клітин, CD3+PD-1^{low} і CD3-PD-1^{low} Т-клітин, моноцитів та дендритних клітин протягом 28 діб. Вперше виявлено достовірно вищі відносні рівні експресії miR-221-3p, miR-27a-3p, miR-133a-3p і miR-126-3p на початку госпіталізації пацієнтів із ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2. 1.

Вперше виявлено, що ступінь фіброзу легень через 1 рік спостереження позитивно корелює з концентраціями MCP-1, SP-D, RAGE, вмістом старіючих Т-клітин пам'яті і CD57⁺ Т-клітин та негативно корелює з вмістом CD127⁺ клітин, рівнями експресії miR-92a-3p, miR-21a-5p і miR424-5p в плазмі крові хворих з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2. . Встановлено, що трьохкратна внутрішньовенна трансплантація МСКП хворим на ГРДС, що спричинений SARS-

CoV-2, є безпечною, не викликає суттєвих побічних негативних ефектів, має імуномодулюючий вплив на перебіг запального процесу та призводить до зниження рівня фіброзу легень через 1 рік спостереження. . Виявлено, що трансплантація МСК стимулює відновлення рівня лімфоцитів та прискорює зниження таких маркерів запалення, як СРБ, ШОЕ та паличкоядерних нейтрофілів. Встановлено, що трансплантація МСК призводить до достовірного зростання в плазмі хворих вмісту протизапального цитокіну IL-10 та прозапальних хемокінів IP-10, MIP-1 α та G-CSF. Виявлено, що терапія МСК не має достовірного впливу на відносний рівень експресії мікроРНК, що асоційовані з функціональним станом легень та запаленням (miR-27a-3p, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-126-3p, miRNA-133a-3p і miR-221-3p, miR-92a-3p, miR-124-3p і miR-424-5p) в плазмі крові хворих з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2. Встановлено мішені дії МСКПЛ в організмі людини після введення. Досліджено транскриптом мононуклеарних клітин периферичної крові пацієнтів з важкою пневмонією COVID-19 після співкультивування з МСКПЛ. Встановлено, що МСКПЛ пригнічують проліферацію МКПК хворих з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2, підвищують на МКПК рівні експресії таких маркерів ранньої активації Т клітин як CD69 і CD25 та зменшують відсоток ефektorних CD8⁺ і CD4⁺ Т-клітин. МСКПЛ посилюють в МКПК експресію генів, асоційованих із запаленням, активацією нейтрофілів та міграцією лейкоцитів та пригнічують експресію генів, пов'язаних з реплікацією ДНК, клітинним циклом і репаративним механізмом, що було показано при розподілі диференційно експресованих генів МКПК відносно біологічних процесів і метаболічних шляхів згідно з GO та KEGG класифікацією. Запропоновано можливий механізм дії МСКПЛ на різні ланки імунної системи людини.

Практичне значення одержаних результатів. На сьогодні механізм терапевтичного впливу МСК на перебіг ГРДС, гострого ушкодження міокарду, та стан імунної системи, у хворих з COVID-19 на достатньому рівні не встановлено. Тож вивчення зміни в крові різноманітних біологічних молекул, що відображають патофізіологічні процеси, дозволить встановити мішені впливу МСК і розширити

наше розуміння їх терапевтичного впливу і вдосконалити протоколи лікування. Також отримані результати досліджень розширюють наше розуміння механізму впливу МСК на імунну систему, а саме на диференціювання Т-, NK-, дендритних клітин, їх активування, динаміку змін цих процесів за різних сценаріїв перебігу COVID-19 пневмонії та, зокрема, у пацієнтів з різним функціональним станом міокарду. Вивчення стану імунної системи дозволить оцінити ризик виникнення ГРДС з гіпоактивним станом імунної системи без синдрому “цитокінового шторму” у пацієнтів з тяжкою COVID-19 пневмонією а також ефективність її лікування методом трансплантації алогенних МСК.

Особистий внесок здобувача. Основний обсяг експериментальних даних, які викладені у дисертації, отримані за безпосередньої участі її автора. Автором самостійно отримані та охарактеризовані МСКПЛ, проведено їх підготовку до трансплантації, проаналізовано результати ПЛР, проточної цитофлуориметрії та КТ. Синтез кДНК та ЗТ-ПЛР проведено у співпраці з к.б.н. І.Я. Скрипкіною, к.б.н. О.О. Маньківською та Ю.М. Шаблій. Дослідження імунофенотипу МСК та субпопуляцій клітин периферичної крові здійснено спільно з д.м.н. В.М. Кириком. Процесинг периферичної крові від пацієнтів та ІФА проведено спільно з к.б.н. В.В. Нікуліною та к.б.н. Г.М. Світінною на базі Банку пуповинної крові та інших клітин та тканин людини ТОВ «Інститут клітинної терапії» з дозволу директора С.І. Мартиненка та к.б.н. Г.С. Лобинцевої. Збір анамнезу та клінічних даних було проведено у співпраці з персоналом КМКЛ №4, а саме к.м.н. О.Л. Чибісовим та А.Р. Вегою. Дані по КТ легень отримані у співпраці з к.м.н. П.І. Немтіновим та к.б.н. А.М. Устименко. Для секвенування і первинного біоінформатичного аналізу зразки тотальної РНК з МКПК передавали компанії Novogene Co., LTD (Пекін, Китай).

Планування роботи, узагальнення отриманих даних та оформлення результатів здійснено разом із науковим керівником к.б.н. В.А. Шаблієм.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертаційної роботи доповідалися на конференціях: XV Всеукраїнська конференція молодих вчених з міжнародною участю (Київ, 26-27 травня 2021); Всеукраїнська конференція з

молекулярної і клітинної біології з міжнародною участю // All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation (Київ, 15-17 червня 2022); CLINICAL TRANSLATION OF PERINATAL DERIVATIVES: WHERE DO WE STAND? Joint Meeting: 6th International Placenta Stem Cell Society (IPLASS) Meeting and Final Meeting of the COST Action (CA17116) “International Network for Translating Research on Perinatal Derivatives into Therapeutic Approaches” (Бреція, Італія, 02-03 вересня 2022); Конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики (Київ, 21.02.2023); Конференція молодих вчених ІМБГ у рамках XVIII Міжнародної наукової конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» присвяченої 50-річчю ІМБГ НАНУ і 70-річчю відкриття подвійної спіралі ДНК. Збірник тез. (Київ, 27 вересня 2023 року); ISSCR São Paulo International Symposium 2023, Ribeirão Preto, São Paulo, (Бразилія, 22-24 вересня 2023) та XVIII Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Київ, 21-22 травня 2024).

Публікації. Результати дисертаційної роботи опубліковано у 3 статтях у наукових фахових журналах, а також представлено на 7 наукових конференціях у вигляді усних доповідей і стендових презентацій

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, огляду літератури (розділ 1), матеріали і методи (розділ 2), обговорення отриманих результатів (розділи 3, 4, 5 і 6), аналізу та узагальнення результатів (розділ 7), висновків, списку використаних джерел та трьох додатків (Додатки А, Б і В). Роботу викладено на 198 сторінках стандартного друкованого тексту, містить 49 рисунків та 4 таблиці, у переліку використаних джерел 283 посилання.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини

У 2006 році Міжнародне товариство клітинної терапії (ISCT) опублікувало критерії для ідентифікації популяції МСК, які включають ріст *in vitro* прикріпленої до субстрату популяції клітин та визначення їхнього фенотипу за допомогою специфічних маркерів. Для МСК людини такі маркери включають кластери диференціювання CD73, CD90, та CD105, а також відсутність таких поверхневих антигенів, як CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19, та антигенів комплексу гістосумісності класу II (HLA-DR). Крім того, МСК повинні мати здатність диференціюватися в остеогенному, адипогенному та хондрогенному напрямках [1]. ISCT рекомендує використовувати термін «мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини», але загалом загальноприйнятим і найбільш вживаним досі вживається термін «мезенхімальні стовбурові клітини».

Додатково до маркерів, зазначених у рекомендаціях ISCT, для ідентифікації МСК з кісткового мозку людини також використовують такі антигени, як STRO-1, молекула адгезії судинних клітин 1 (CD106), та молекула адгезії клітин меланом (CD146). Ці антигени характеризують МСК, які ростуть *in vitro* в адгезивній формі, мають високу клоногенність, та можуть диференціюватися в різні типи клітин [2–4].

1.1.1. Походження МСК. МСК людини беруть своє походження у мезенхімі, що є частиною мезодерми ембріональних шарів. Процес формування та специфікації МСК відбувається під час ембріонального розвитку за участю комплексних молекулярних механізмів, які включають у себе сигнальні молекули

та фактори транскрипції. Під час гермінації та розвитку, ці клітини утворюються та мігрують по всьому ембріону. Вони є попередниками клітин, що формують різноманітні сполучні тканини в організмі дорослих, зокрема кістки, хрящі, сухожилля, зв'язки та кістковий мозок. Походження МСК під час ембріонального розвитку з мезенхімальних клітин також підтверджується експресією таких маркерів, як віментин, ламінін $\beta 1$, фібронектин і остеопонтін, які є типовими для клітин ембріональної мезодерми, а також детектуються в адгезивних клітинах строми кісткового мозку, культивованих *in vitro* [5,6]. Окрім того, є дані, що МСК онтогенетично пов'язані з групою клітин, отриманих з ектодерми, які походять від клітин Sox1⁺ (область визначення статі Y), які з'являються під час розвитку ембріональної нейроектодерми та нервового гребня. Ці клітини перебувають у кістковому мозку новонароджених і відповідають критеріям МСК. Проте з розвитком організму популяція цих клітин зникає і замінюється клітинами іншого, неідентифікованого походження [7]. Також було показано, що в кістковому мозку ембріона миші, що розвивається, можна розрізнити дві популяції МСК: клітини з інтенсивним поділом та клітини з чіткою експресією білка нестину. Перший тип клітин походить від мезодерми, яка не експресує нестин, і характеризується інтенсивною проліферацією та бере участь у процесі формування скелету ембріона. Другий тип походить від клітин нервового гребня, який експресує нестин, не ділиться і залишається пасивним під час формування кістки, тоді як у дорослому організмі бере участь у формуванні ніші гемопоетичних клітин [8]. Таким чином, онтогенез МСК пов'язаний з клітинами, що належать до різних зародкових листків, а джерело їх походження визначає роль і функції, які вони відіграють у дорослому організмі.

В роботі Crisan та ін. [9] було встановлено, що периваскулярні клітини, переважно перицити, у багатьох органах людини, включаючи скелетні м'язи, підшлункову залозу, жирову тканину та плаценту, експресують CD146, NG2 та PDGF-R β і в них відсутня експресія маркерів гемопоетичних, ендотеліальних та міогенних клітин. Периваскулярні клітини, виділені зі скелетних м'язів або нем'язових тканин, мали потенціал до міогенного диференціювання як в культурі

клітин так й *in vivo*. Незалежно від їх тканинного походження довгостроково культивовані периваскулярні клітини зберігали міогенність, демонстрували на клональному рівні остеогенний, хондрогенний та адипогенний потенціали та зберігали експресію маркерів МСК. Експресію маркерів МСК також було виявлено на поверхні нативних некультивованих периваскулярних клітин. Таким чином, стінки кровоносних судин містять клітини-попередники, від яких можуть походити МСК.

Незважаючи на те, що перицити людини, які оточують капіляри та мікросудини, дають початок у культурі справжнім МСК, виникає питання про те, чи всі МСК є похідними від перицитів. Перицити та інші клітини, визначені за диференціальною експресією CD34, CD31 і CD146, були відсортовані з фракції стромальних судин білої жирової тканини людини. Крім перицитів, клітини CD34⁺CD31⁻CD146⁻CD45⁻, які знаходяться у зовнішньому шарі кровоносних судин, оболонки адвентицію, нативно експресували маркери МСК і давали початок у культурі клоногенним мультипотентним попередникам, ідентичним стандартним МСК, отриманим із кісткового мозку. Незважаючи на загальні ознаки МСК та властивості розвитку, адвентиціальні клітини та перицити зберігають різні фенотипи та генотипи в процесі культивування. Однак у присутності факторів росту, які беруть участь у ремоделюванні судин, адвентиціальні клітини набувають перицитоподібного фенотипу. Таким чином, було показано співіснування двох окремих периваскулярних попередників МСК: перицитів у капілярах і мікросудинах і адвентиціальних клітин навколо більших судин [10].

1.1.2. МСК в дорослому організмі людини, тканина пуповини людини як джерело МСК. Кістковий мозок людини був історично першим джерелом, з якого отримали та культивували МСК [5]. Іншими осередками МСК можуть бути як тканини, так і виділення дорослого організму людини, такі як, жирова тканина, периферична кров, пульпа зуба, синовіальна рідина, легені, м'язи, ендометрій, менструальна кров, молоко матері, а також тканини фетоплацентарного комплексу, включаючи амніотичну рідину та оболонку, гладкий та ворсинчатий хоріон, тканини плаценти і пуповини, а також пуповинна кров [11–33]. Периваскулярний

простір кровоносних судин в скелетних м'язах, підшлунковій залозі та жировій тканині також є нішою для клітин-попередників МСК. Ці клітини, описані як перицити, експересують CD146, NG2 (нейроглікан-2), PDGF-R β (рецептор фактора росту тромбоцитів β -типу), лужну фосфатазу (ALP), а також маркери ендотеліальних, гемопоетичних і м'язових клітин [9,34].

Хоча клітини, що відповідають критеріям МСК, можна зібрати з різних тканин на всіх стадіях розвитку (фетальна, ювенільна, доросла і старіюча), існують глибокі відмінності між отриманими популяціями МСК. МСК фетального походження порівняно з клітинами, виділеними з тканин дорослих організмів, зокрема кісткового мозку, характеризуються більшою швидкістю проліферації, а також більшою кількістю пасажів, які вони проходять *in vitro* до старіння [35–37]. Окрім цього, плацентарні МСК демонструють краще приживлення, міграційний та диференційний потенціал порівняно з МСК кісткового мозку [38]. Окрім того, беззаперечними перевагами перинатальних тканин є доступність, уникнення інвазивних процедур і етичних проблем, що дозволяє широко використовувати їхні похідні, включаючи МСК, в доклінічних і клінічних дослідженнях.

МСК, виділені з пуповини людини, ростуть *in vitro* як адгезивна культура клітин з мезенхімальною морфологією, і демонструють типовий для МСК набір маркерів клітинної поверхні: вони позитивні на CD29, CD73, CD90 і CD105 і негативні на CD14, CD11b, CD19, CD34, CD45, CD79 α і HLA-DR та можуть диференціюватися *in vitro* в різні лінії клітин, включаючи кісткову, хрящову та жирову тканину. Згідно з опублікованими результатами *in vitro* досліджень, МСК пуповини мають здатність утворювати нейрони та глію [39], а також можуть бути успішно трансдиференційовані в кардіоміоцити [40]. Як і інші стромальні клітини, МСК, отримані з пуповини, підтримують розмноження інших стовбурових клітин, таких як гемопоетичні стовбурові клітини, і не атакуються імунною системою [20].

На даний момент немає відомих обмежень щодо використання МСК, отриманих з пуповини. Перший звіт про клінічне застосування МСК пуповини у людей при гострій реакції «трансплантат проти хазяїна» опублікували Wu та ін [41]. Вони виявили, що МСК пуповини мають кращий проліферативний потенціал

і супресивний ефект на проліферацію мононуклеарних клітин периферичної крові пацієнтів, порівняно з МСК кісткового мозку. Також було відмічено відсутність будь-яких побічних ефектів. Позитивний результат був отриманий і в клінічних дослідженнях для аутоімунних захворювань, включаючи хворобу Крона і системний червоний вовчак [42,43]. Подібним чином терапевтичний потенціал МСК досліджували для лікування або подолання наслідків різних захворювань, включаючи інсульт, інфаркт міокарда, цироз печінки, розсіяний склероз, діабет, травми легенів і рак, як у доклінічних дослідженнях, так і в трансляційних дослідженнях на людях [44–47]. Нещодавно у звіті про клінічне випробування було виявлено, що внутрішньовенне введення МСКПЛ пацієнтам із помірною та важкою формою коронавірусної хвороби 2019 (COVID-19) є безпечним і добре переноситься, що можна розглядати як багатообіцяючу терапію для лікування аномальної імунної відповіді на фоні основного захворювання [21].

1.1.3. Імуномодулюючі властивості МСК. Раніше МСК були схвалені для використання в клінічних дослідженнях для аутоімунних захворювань, включаючи хворобу Крона, системний червоний вовчак і реакцію «трансплантат проти хазяїна» (РТПХ) [42,43]. МСК як потенційний спосіб лікування мають імуномодулюючі функції, які вони здійснюють через прямий міжклітинний контакт або шляхом секреції факторів, які стимулюють імунні клітини (Т клітини, В клітини, нейтрофіли, моноцити, макрофаги, дендритні клітини та натуральні кілери) при вродженій та набутій імунній відповіді [48–50]. Схематичний огляд імуномодулюючої дії МСК на імунні клітини показано на рис. 1.1.

Вплив МСК на Т клітини. На даний момент, імуномодулююча функція МСК різного походження вважається добре відтвореною та клінічно значущою [51]. Добре відомо, що МСК пригнічують активацію та проліферацію ефекторних Т-клітин. У той же час МСК сприяють розвитку Т регуляторних клітин (Tregs), зберігаючи макрофаги, моноцити та дендритні клітини (ДК) у незрілому або протизапальному стані [52]. МСК можуть безпосередньо впливати на Т-клітини шляхом секреції імуносупресивних молекул, таких як фактор росту гепатоцитів (HGF), галектини, гемоксигеназа 1 (HO1), індоламін-2,3-диоксигенази (IDO),

фактора інгібування лейкемії (LIF), оксиду азота (NO), ліганда програмованої клітинної смерті 1 (PD-L1), простагландину E2 (PGE2) і трансформуючого фактору β (TGF- β). Було показано, що секреція TGF- β необхідна як для індукції Tregs MCK, так і для регуляції активації Т-лімфоцитів [53–55].

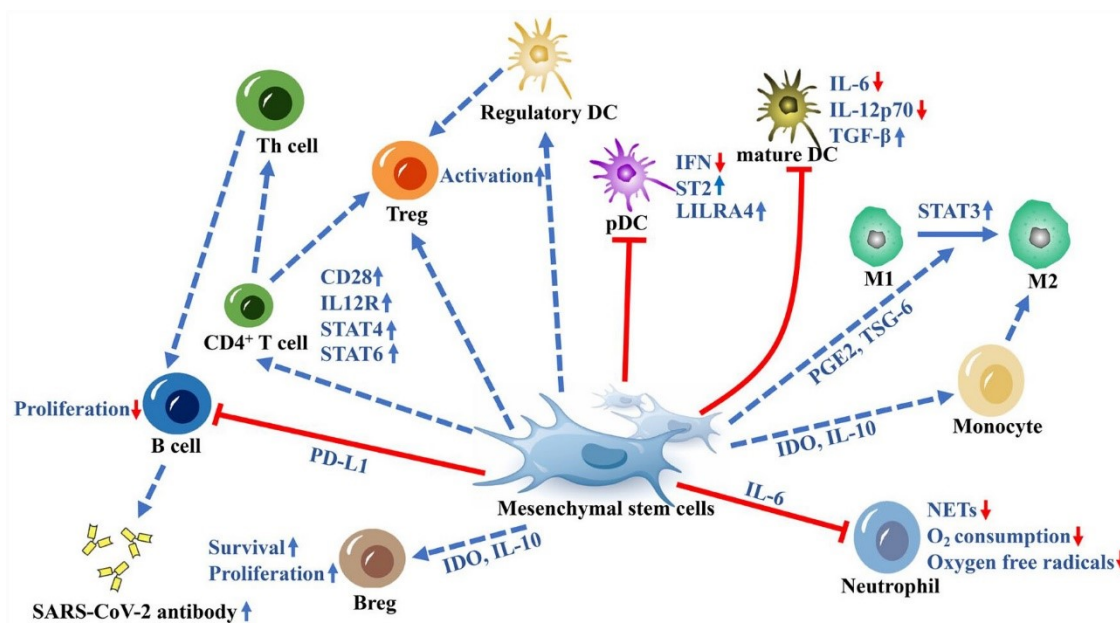


Рис. 1.1. Схематичне представлення імуномодулюючого впливу МСК на імунні клітини (адаптовано за Fang та ін. [56])

Крім того, МСК можуть також пригнічувати активацію та проліферацію Т-клітин через прямий міжклітинний контакт, що зменшує секрецію факторів запалення. МСК мігрують у ділянку запалення та беруть участь у регенерації через селектин та інтегрин, регулюючи кількість запальних цитокінів, що секретуються Т-клітинами, і в такий спосіб можуть регулювати запальну активність у пошкодженому місці [57].

Складні процеси розвитку, активації та диференціації Т-клітин включають кінази з родини мітоген-активованих протеїнкіназ (МАРК) [58]. МСК можуть регулювати сигнальний шлях МАРК-ERK/JNK, який, у свою чергу, контролює відсоток CD28⁺ Т-клітин у людей, стримуючи активацію МАРК та зменшуючи фосфорилування ERK/JNK [59]. МСК кісткового мозку фізично перешкоджають асоціації Т-клітин пам'яті з антигенпрезентуючими клітинами, демонструючи

імуносупресивний ефект, який опосередковується через посилення експресії молекул адгезії VCAM-1 та ICAM-1, що сприяє активації Т-клітин і рекрутуванню лейкоцитів в місці запалення [60,61].

Для МСК, отриманих з пульпи зуба, також було показано імунорегуляторний ефект на відповідь Т- і В-лімфоцитів: зниження проліферації CD4⁺ Т-лімфоцитів, а також зниження вмісту внутрішньоклітинного інтерферону-гамма (IFN- γ) та секреції IL-17 при первинному синдромі Шегрена [62]. Окрім того, МСК здійснюють імуномодулюючу активність, пов'язану з моноцитами та регуляторними Т-клітинами (Tregs) через спеціальний цитокін-незалежний механізм [63,64]. Серед всіх клітин різного походження МСКПЛ продемонстрували мінімальну відповідь на алогенний імунний ризик *in vivo*, що робить їх провідним терапевтичним кандидатом для застосування при аутоімунних та гострих інекційних захворюваннях [65].

Активация шляху Notch1/FOXP3 у CD4⁺ Т-клітинах, культивованих спільно з МСК, призводить до індукції регуляторних Т-клітин. На імуносупресивну здатність МСК впливають такі фактори, як експресія TGF- β , IL-10 і галектину-1, в той час як нокдаун галектину-1 зменшує імуномодулюючі властивості МСК [66,67].

Вплив МСК на моноцити. У своїй роботі Song та ін. [64] показали, що МСК потрапляють в організм і ненадовго залишаються в легенях, перш ніж швидко поглинаються моноцитами та мігрують в інші частини тіла. Залишаючись в легенях або інших органах МСК можуть не тільки рекрутувати тканинні чи периферичні макрофаги, але й пригнічувати їх прозапальну активність [68]. Також МСК можуть змінювати фенотип і функцію моноцитів після того як останні фагоцитують МСК, що вказує на те, що фагоцитовані МСК здатні регулювати клітини набутої імунної системи [69]. Крім того, МСК продукують імуносупресивні компоненти, такі як PGE2, TNF-стимульований протеїн гена 6 (TSG-6), лактат, кінуренову кислоту та спермідин, які допомагають макрофагам M1 переключатися з прозапального на протизапальний фенотип M2 [69–71]. На додачу МСК продукуютьIDO, який регулює клітини вродженого імунітету, змушуючи моноцити поляризуватися в M2-

подібні макрофаги. Ці M2-подібні макрофаги пов'язані з регуляцією проліферації Т-клітин незалежним від IL-10 шляхом, зменшують запалення та підтверджують імуномодулюючу роль МСК [72]. Ще одним механізмом впливу МСК на моноцити є апоптоз МСК. Так, апоптотичні МСК також змінюють фенотип макрофагів у бік регуляторного та протизапального фенотипу, підвищуючи експресію IL-10 і зменшувати виробництво TNF- α та NO у макрофагах [72,73].

Вплив МСК на нейтрофіли. У відповідь на інфекцію, нейтрофіли рекрутуються до місця запалення під впливом запальних хемокінів, що викликає гостре пошкодження тканини легенів [74]. Завдяки своїм регенеративним та імуномодулюючим властивостям МСК можуть зменшити надмірне рекрутування нейтрофілів і запобігти інфільтрації легень. МСК продукують IL-6, який може перешкоджати нейтрофілам споживати значну кількість кисню та генерувати радикали вільного кисню, що може спричинити ГРДС [75]. Крім того, нейтрофіли можуть вивільняти нейтрофільні ловушки (NET), що складаються переважно з бактерицидних гранульованих білків і волокон хроматину, які розщеплюють компоненти вірулентності та знищують бактерії. Це в свою чергу сприяє поширенню запалення та мікросудинному тромбозу, зокрема у пацієнтів з COVID-19 [76]. Окрім того, Zhu та ін. [59] виявили, що МСК ефективні у сприянні продукції специфічних антитіл до SARS-CoV-2 на додаток до зниження рівня NET у плазмі пацієнтів з COVID-19.

Вплив МСК на антигенпрезентуючі клітини. МСК можуть впливати на диференціювання та перешкоджати дозріванню незрілих дендритних клітин (ДК) у зрілі, що впливає на здатність ДК до ендоцитозу. При цьому секреція IL-6 та IL-12p70 в ДК знижується, а продукція TGF- β зростає. Отже, ДК не можуть ефективно активувати наївні Т-клітини або сприяти проліферації Т-лімфоцитів [77]. Особливим типом клітин вродженої імунної системи є плазмоцитоїдні дендритні клітини (пДК), що продукують IFN. Під час контакту з вірусом, Toll-подібні рецептори (TLR) 7 і 9 на поверхні пДК дозволяють їм ідентифікувати вірусну РНК і ДНК і швидко виробляти велику кількість IFN I типу. Продукція IFN I типу призводить до дозрівання пДК у спеціалізовані антигенпрезентуючі клітини

(АПК), які можуть стимулювати Т-клітини при набутій імунній відповіді. Збільшуючи на пДК експресію LILRA4 (ILT7, найважливішого інгібіторного рецептора пДК) і ST2 (активатора LILRA4), МСК можуть зменшувати продукцію цими клітинами IFN і прозапальних цитокінів [78].

Дендритні клітини, окрім мієлоїдного походження, також можуть утворюватися з моноцитів (мДК) і у відповідь на високі рівні IFN при гострій інфекції накопичуватися у вторинних лімфоїдних органах. Вони посилюють диференціювання CD8⁺ Т-клітин пам'яті порівняно з диференціюванням, праймованим класичними дендритними клітинами (кДК) за допомогою регуляції експресії еомезодерміну (Eomes) і Т-клітинного фактора-1 (TCF-1) у CD8⁺ Т-клітинах. При цьому зменшення сигналіngu від інтерлейкіну-2 (IL-2) у CD8⁺ Т-клітинах, праймованих мДК, відповідає за посилене програмування CD8⁺ Т-клітин пам'яті [79]. Таким чином, субпопуляція АПК у визначенні долі CD8⁺ Т-клітин під час інфекції регулюється багатьма способами.

Вплив МСК на В клітини. МСК здійснюють імуномодулюючі функції на В-клітини як через міжклітинний контакт, так і через паракринні ефекти [64]. По-перше, МСК можуть спричинити апоптоз В-клітин шляхом зв'язування ліганду Fas (Fas-L) на МСК з рецепторами Fas на В-клітинах, що призведе до активації Fas-асоційованих доменів і каспаз. Крім того, PD-L1 на МСК буде взаємодіяти з рецептором PD-1 на В-клітинах, запобігаючи проліферації В-клітин [80]. МСК можуть опосередковано через Т-клітини також запобігати проліферації В-клітин, проте не впливають на секрецію IFN- γ , TNF- α , IL-4, and IL-10 активованими В клітинами. Зокрема при COVID-19, МСК посилює диференціацію CD4⁺ Т-клітин у Т хелперні-клітини (Th), які сприяють активації В-клітин, що призводить до вироблення специфічних до SARS-CoV-2 антитіл [59]. По-друге, при контактній взаємодії з В-клітинами МСК підвищують їх виживаність. Цей ефект опосередкований активацією р-АКТ у В-клітинах, що призводить до секреції VEGF та інгібування індукованого каспазою 3 апоптозу [81]. Крім того, МСК пригнічують диференціацію і блокують проліферацію В-клітин, модулюючи фази клітинного циклу через шляхи р-ERK і p38 [82].

1.2. Коронавірусна хвороба COVID-19

Захворювання, спричинене коронавірусом 2 важкого гострого респіраторного синдрому (SARS-CoV-2), було визнано Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ) коронавірусною хворобою 2019 (COVID-19). COVID-19 поширився по всьому світу, що призвело до пандемії, яка станом на березень 2024 року заразила понад 775 мільйонів людей і спричинила понад 6,8 мільйонів смертей у понад 200 країнах (<https://covid19.who.int/>). COVID-19 клінічно характеризується лихоманкою, втомою, болем у м'язах, діареєю та пневмонією та може спричинити смерть у важких випадках.

1.2.1. Класифікація збудника SARS-CoV-2. Коронавіруси (Coronaviridae) — це родина одноланцюгових (+) РНК вірусів, нуклеокапсид яких оточений ліповмісною зовнішньою оболонкою, від якої відходять глікопротеїнові шипоподібні відростки, що нагадують сонячну корону, за що родина і отримала свою назву.

Підродина *Orthocoronavirinae* включає чотири роди:

Альфакоронавіруси (*Alphacoronavirus*): Вони здатні інфікувати ссавців, включаючи людей і призводять до легших захворювань. Бетакоронавіруси (*Betacoronavirus*) включає коронавіруси, які здатні інфікувати ссавців, у тому числі людей. Гаммакоронавіруси (*Gammacoronavirus*) інфікують в основному інфікує птахів. Дельтакоронавіруси (*Deltacoronavirus*) мають тенденцію інфікувати тварин, зокрема птахів.

SARS-CoV-2 належить до роду *Betacoronavirus* [83]. Офіційна назва вірусу, що викликає хворобу COVID-19, визначена ВООЗ, є "Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2" (SARS-CoV-2). Він належить до того ж підроду, що й коронавірус важкого гострого респіраторного синдрому (SARS-CoV) і коронавірус близькосхідного респіраторного синдрому (MERS-CoV), які раніше були причетні до SARS-CoV і MERS-CoV епідемій зі смертністю до 10% і 35% відповідно [84].

Хоча походження SARS-CoV-2 наразі невідоме, широко припускають, що він має зоонозну передачу [85]. Аналіз геномів показує, що SARS-CoV-2, ймовірно,

походить від штаму, виявленого у кажанів. Порівняння геномних послідовностей SARS-CoV-2 людини та відомими коронавірусами тварин виявило високу гомологію (96%) між SARS-CoV-2 та betaCoV RaTG13 кажанів (*Rhinolophus affinis*) [86]. Існує гіпотеза, що SARS-CoV-2, подібно до SARS і MERS, перейшов від кажанів до проміжних хазяїв, таких як панголін та норка, а потім до людей [87,88]. Як і інші РНК-віруси, SARS-CoV-2 адаптується за допомогою генетичної еволюції та розвитку мутацій. Це призводить до появи мутантних варіантів, які можуть мати відмінні характеристики від їхніх родових штамів. Під час пандемії COVID-19 було описано кілька варіантів SARS-CoV-2, серед яких лише деякі вважаються варіантами, що викликають занепокоєння. Згідно з епідеміологічними даними ВООЗ, з початку пандемії було ідентифіковано 5 варіантів SARS-CoV-2: Альфа (B.1.1.7), вперше описаний у Сполученому Королівстві (Великобританія) наприкінці грудня 2020 року; Бета (B.1.351), вперше повідомлений в Південній Африці в грудні 2020 року; Гамма (P.1), вперше повідомлено в Бразилії на початку січня 2021 року; Дельта (B.1.617.2), вперше був зареєстрований в Індії в грудні 2020 року та Omicron (B.1.1.529), вперше зареєстрований в Південній Африці в листопаді 2021 року [89].

Під час виконання данної роботи в Україні (м.Київ) переважав Дельта варіант SARS-CoV-2.

1.2.2. Патофізіологічні аспекти розвитку коронавірусної хвороби та ГРДС. Механізм, за допомогою якого SARS-CoV-2 інфікує клітини господаря обумовлений його чотирма основними структурними білками: білком шипа (S), глікопротеїном оболонки (E), білком нуклеокапсиду (N) і мембранним білком (M). SARS-CoV-2 також містить 16 неструктурних білків і 5-8 додаткових білків [90].

Шипиковий глікопротеїн (S), розташований на зовнішній поверхні віріона розщеплюється на аміно(N)-кінцеву субодиницю S1, яка полегшує вбудовування вірусу в клітину-хазяїна, і карбоксильну (C)-кінцеву субодиницю S2, яка містить пептид злиття, трансмембранний і цитоплазматичний домени, відповідальні за злиття вірусної та клітинної мембран [91]. Субодиниця S1 має в своєму складі рецептор-зв'язуючий домен (RBD) і N-кінцевий домен (NTD), який сприяє

проникненню вірусу в клітину-хазяїна і служить потенційною мішенню для нейтралізації у відповідь на антисироватку або вакцини [92].

RBD домен є фундаментальним пептидом у патогенезі інфекції, оскільки він зв'язується з рецепторами ангіотензинперетворюючого ферменту 2 (ACE2) людини в респіраторному епітелії. Інші органи також експресують рецептори ACE2, наприклад, клітини стравоходу, міокарда, ентероцити клубової кишки, проксимальні тубулярні клітини нирок і уротеліальні клітини сечового міхура [93]. Процес приєднання вірусу супроводжується праймуванням спайкової субодиниці протеїну S2 за допомогою трансмембранної серинової протеази 2 (TMPRSS2), яка полегшує проникнення вірусу в клітину та його подальшу реплікацію. Після потрапляння в клітини-мішені вірусна РНК інкапсулюється та поліаденілюється та кодує різні структурні та неструктурні поліпептидні гени. Ці поліпротеїни розщеплюються протеазами, які виявляють хімотрипсиноподібну активність [94].

На ранній стадії інфекції реплікація вірусу призводить до прямого пошкодження тканин. На пізній фазі інфіковані клітини-господарі викликають імунну відповідь шляхом рекрутування Т-лімфоцитів, моноцитів і нейтрофілів, які в свою чергу вивільняють ряд цитокінів, такі як: фактор некрозу пухлини α (TNF- α), гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (GM-CSF), ряд інтерлейкінів (IL-1, IL-6, IL-1 β , IL-8, IL-12) та інтерферон (IFN)- γ . Окрім цього, також зростає кількість таких маркерів запалення як С-реактивний білок (СРБ) та лактатна дегідрогеназа [95]. При важкій формі захворювання спостерігається «цитокіновий шторм» – синдром понаднормованого вивільнення цитокінів. Це пов'язано з надмірною активацією імунної системи та високим рівнем цитокінів, що циркулюють у крові. Згідно з клінічними дослідженнями, кількість нейтрофілів корелює з рівнем інфікування SARS-CoV-2. Також важкий перебіг COVID-19 характеризується появою попередників нейтрофілів, що свідчить про екстрений мієлопоез, дисфункціональних зрілих нейтрофілів і моноцитів [96,97]. Це призводить до місцевої та системної запальної відповіді [98]. Внаслідок утворення цитокінового шторму розвивається гострий респіраторний дистрес-синдром (ГРДС), який є основною причиною смерті від COVID-19 [99]. У легенях пацієнтів,

інфікованих SARS-CoV-2, також спостерігається набряк і білкові ексудати, застійні явища в судинах і запальні кластери з фібриноїдним матеріалом і багатоядерними гігантськими клітинами [100].

Таким чином, патогенез COVID-19 є результатом абнормальної відповіді організму або надмірної реакції імунної системи господаря. Це призводить до локального вироблення надзвичайно високого рівня великої кількості запальних цитокінів, хемокінів і вільних радикалів, які викликають ГРДС, серйозне пошкодження легенів та інших органів. У найгіршому випадку системна гіперактивація призводить до поліорганної недостатності та навіть смерті [101,102].

Як вже було згадано, тяжкий перебіг COVID-19 призводить до порушень в роботі легень, серця, нирок та печінки. Серед загиблих пацієнтів від COVID-19 в Ухані 40 % мали пошкодження міокарду та серцеву недостатність [103].

Починаючи з початку пандемії COVID-19, механізм патогенезу у хворих пацієнтів різного ступеня важкості детально вивчається і вже накопичено немало даних, що дозволяють окреслити низку прогностичних і діагностичних маркерів для передбачення перебігу захворювання. Високий рівень сурфактанту-D, ангіопойтину-2 (Ang-2) та RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts) можуть бути використані для діагностики ГРДС різної етіології [104,105]. Рівень смертності COVID-19 пацієнтів асоційований з гострим ушкодженням міокарду, і він стає достовірно вищим з віком та при наявності в анамнезі у пацієнтів діабета, хронічного фіброзу легень та серцево-судинних захворювань [106,107]. Хоч механізм ушкодження міокарду не достатньо вивчений, скоріш за все він пов'язаний з розвитком стресу через легеневу недостатність та гіпоксію, інфекційний міокардит, спричинений SARS-CoV-2 та системне запалення [108]. Таким чином, рання діагностика серцевої недостатності може допомогти призначати адекватну терапію з метою попередження тяжких ускладнень і смерті пацієнтів. Так, на патологію серця вказує зростання рівня тропоніну I (TnI) та BNP (Brain-type natriuretic peptide) у хворих, що перебувають на штучній вентиляції легень (ШВЛ) [109,110]. Однак, рівень тропоніну може зростати за умови

порушень ниркової функції [111]. Отже пошук високоспецифічних біомаркерів, що точно будуть відображати розвиток патології серця, особливо на ранніх етапах, в хворих з гострими респіраторними вірусними інфекціями, є актуальним завданням, що має як фундаментальне, так і суто практичне значення.

Підвищений рівень miR-146a, miR-27a, miR-126, та miR-155 спостерігався в пацієнтів з ГРДС у порівнянні з пацієнтами з пневмонією, але без ГРДС. Зміна вмісту міРНК (підвищений рівень експресії miR-499, miR-133a, miR-21, miR-1, miR-208b, та знижений рівень miR-197, miR-106, miR-223) в плазмі пацієнтів з гострим інфарктом міокарду може бути використана, як маркер розвитку важких ускладнень [112]. Рівень miR-221-3p [113] та miR-21 [114] у пацієнтів з гострим інфарктом міокарду корелював з концентрацією тропоніну, фракцією викиду (негативно) та розміром зони ураження. Було виявлено високу кореляцію між miR-1 та miR-133, що відіграють важливу роль в проліферації та диференціюванні серцевих м'язових клітин та розміром зони ішемічного некрозу при інфаркті міокарду [115]. Widera та ін. [116] встановили зв'язок між зростанням рівня miR-208 та великими негативними наслідками протягом 6 місяців, в тому числі смерть пацієнта та серцеву недостатність. Більш того, підвищений рівень нового потужного біомаркеру miR-499 в крові пацієнта є кращим прогностичним показником, чим традиційні біомаркери при гострому інфаркті міокарду [117].

1.3. Терапія гострого ураження легень, викликаного вірусними інфекціями, із застосуванням МСК

SARS-CoV-2 викликає ГРДС та серцеву недостатність, що дуже часто призводить до смерті. Завдяки унікальним імуномодулюючим властивостям МСК, їх трансплантація є перспективним напрямком в лікуванні пацієнтів із важкою COVID-19 пневмонією. Безпека та ефективність їх застосування були чітко зафіксовані у багатьох клінічних випробуваннях, особливо при імуноопосередкованих запальних захворюваннях, таких як РТПХ [118] та системний червоний вовчак [119]. Дія МСК опосередковується двома шляхами:

імуномодуючим ефектом та здатністю до диференціювання в клітини тканин ушкодженого органу [42]. МСК можуть впливати на патофізіологічні процеси шляхом своєї протизапальної, імуномодуючої, протимікробної та регенеративної активності. МСК після інфузії можуть мігрувати в різні тканини, причому більшість спочатку накопичується в легенях, перш ніж невелика частина поширюється в інші органи та тканини, що є перевагою для оптимізації їх ролі в імунній відповіді організму [120].

МСК можуть регулювати як вроджений імунітет, так і набутий імунітет через прямі міжклітинні взаємодії з імунними клітинами, включаючи Т-клітини, В-клітини, макрофаги, моноцити, ДК, нейтрофіли, або через секрецію хемокінів, факторів росту, цитокінів [49]. Ці молекули є паракринними факторами, які також інкапсульовані в позаклітинних везикулах (EV). МСК-EV демонструють подібні імунорегуляторні функції до материнських МСК [64,121]. МСК регулюють імунну відповідь через позаклітинні везикули та екзосоми, які несуть фактори активації експресії FOXP3 та IL-10 [122–124]. Субпопуляція Th17 може бути причиною гіперактивної імунної відповіді і, отже, є важливою мішенню для терапії МСК [122,123,125,126]. МСК виділяють імуносупресивні фактори, такі як TGF- β 1, що спричиняє трансформацію клітин Th17 у протизапальні FOXP3⁺ Т-регуляторні клітини [122]. МСК стимулюють поляризацію фенотипу прозапальних M1 до протизапальних макрофагів M2 і знижують експресію прозапальних хемокінів і цитокінів, таких як CXCL1/2, IL-6 і TNF- α [123]. Крім того, імуномодуючий ефект МСК може проявлятися незалежно від гіперактивної імунної відповіді.

МСК мають на поверхні Toll-подібні рецептори (TLR), включаючи TLR-3 і TLR-4, ліганди яких впливають на активність ядерного фактора каппаВ (NF- κ B) і секрецію прозапальних цитокінів. Активація TLR на МСК призводить до утворення локального запального осередку, який рекрутує клітини вродженого імунітету і посилює імунну відповідь. Баланс експресії TLR має вирішальне значення для підтримки імуномодуючої активності МСК, що впливає на реакцію на небезпечні інфекції [127]. Після зараження SARS-CoV-2 велика кількість

антигенів сприяє різкому підвищенню рівня ДК в організмі, що посилює цитокіновий шторм і викликає у пацієнтів ГРДС, важке руйнування легеневої тканини та поліорганну недостатність, і зрештою смерть. Дослідження показали, що тяжкість захворювання корелює зі значною кількістю В-клітин у пацієнтів з COVID-19 [128]. В своєму дослідженні Zhu та ін. [59] встановили, що мононуклеарні клітини периферичної крові (МКПК) пацієнтів з COVID-19, які отримували МСК, містили меншу частку В-клітин на відміну від пацієнтів з COVID-19, які отримували плацебо. МСК можуть контролювати активацію В-клітин до рівня, достатнього для блокування COVID-19, збільшуючи коstimуляторні та коінгібіторні рецептори у В-клітинах пацієнтів.

Мішенню дії МСК при пошкодженні тканини легень при коронавірусній хворобі можуть бути запалення та фіброз легень, пошкодження і апоптоз альвеолярних клітин, гіпоксія та порушення газообміну. Прямі регенеративні здатності МСК у відновленні пошкодженої тканини легень були показані у експериментальних дослідженнях. Так, при введенні МСК до культури легневих клітин-попередників, МСК сприяли розвитку органоподібних клітин з дистальних легневих епітеліальних клітин з характерним $\text{Epcam}^+\text{Sca-1}^+$ фенотипом. Клітини $\text{Epcam}^+\text{Sca-1}^+$, стимульовані МСК, утворювали органи зі схожими на легеневі клітини, які нагадували бронхіолярні та альвеолярні клітини [129]. МСК також можуть секретувати відповідні сигнальні фактори для рекрутування легневих клітин-попередників, які можуть відновлювати пошкодження легень. Відповідні дослідження показали, що позаклітинні везикули (EV), що виділяються МСК в культуральне середовище, є корисними для відновлення легенів [130]. Окрім цього, кондиціоноване середовище від МСК може запобігати утворенню набряку легенів, шляхом поляризації макрофагів в M2 протизапальний фенотип через секрецію інсуліноподібного фактора росту I. МСК також секретують низку розчинних факторів в ураженій легеневій тканині, щоб зменшити запалення та захистити альвеолярні епітеліальні клітини [131]. Внутрішньовенне введення МСК сприяє відновленню мікрооточення легенів та захисту клітин альвеолярного епітелію, зменшуючи легеневу дисфункцію [129,132].

Хоча використання МСК в лікуванні COVID-19 є предметом активних досліджень, існує перспектива, що їхні унікальні властивості можуть призвести до розробки нових терапевтичних стратегій для подолання патологічних процесів, пов'язаних з цією хворобою.

1.3.1. Доклінічні дослідження впливу МСК на розвиток гострого та хронічного пошкодження легеневої тканини. Мета-аналіз проведених досліджень, зокрема 17-ти [133] та 57-ми [134] досліджень, щодо впливу препаратів на основі МСК (ПМСК), а саме кондиційного середовища та позаклітинних везикул на перебіг гострого ураження легенів (ГУЛ), викликаного ліпополісахаридом або бактеріями у дослідних тварин, встановив суттєве зниження показників травмування легенів та покращення виживаності. Трансплантація ПМСК знижувала співвідношення вологої та сухої маси легенів, активність мієлопероксидази у легенях, вміст загального білку в бронхо-альвеолярному лаважі (БАВЛ) і зменшувала інфільтрацію нейтрофілів в альвеолах. Важливо відзначити, що ПМСК знижують концентрацію таких прозапальних медіаторів, як IL-1, IL-6 і TNF- α , і підвищують вміст IL-10, відомого як протизапальний медіатор [133–135].

Інтратрахеальна трансплантація МСК пуповинної крові людини (МСК-ПК) пом'якшує перебіг ГУЛ, викликаного *E. coli*, головним чином через зниження запалення та підвищення бактеріального кліренсу у мишей [136]. Співкультивування з МСК-ПК або з їхнім кондиційним середовищем достовірно пригнічувало ріст *E. coli in vitro* на відміну від співкультивування з фібробластами та їх кондиційним середовищем. Антибактеріальний ефект МСК-ПК пов'язаний із підвищенням експресії Toll-подібних рецепторів (TLR)-2 і TLR-4, а також β -дефензину 2 (BD2) після експозиції з *E. coli*.

Терапевтична здатність МСК відновлювати транспорт альвеолярної епітеліальної рідини та баланс рідини в легенях після ГУЛ була досліджена на моделі перфузійного препарату легенів людини *ex vivo*, уражених ендотоксином *E. coli*. В своєму дослідженні Lee та ін. [137] виявили, що у ЛПС-індукованому ГУЛ в *ex vivo* перфузованих легенях людини, кондиціонованого середовища від МСК,

через 1 годину після травми зменшувало запалення, запобігало притоку нейтрофілів і запобігало набряку легенів шляхом відновлення проникності легеневих білків і збільшення абсорбції альвеолярної рідини в ушкодженій альвеолі. При цьому секреція фактора росту кератиноцитів виявляється важливою для терапевтичного впливу МСК на транспорт альвеолярної епітеліальної рідини, частково шляхом відновлення амілорид-залежного транспорту натрію. Таким чином, лікування алогенними МСК людини або кондиціонованим середовищем відновлює нормальний баланс рідини в перфузованих легенях людини *ex vivo*, уражених ендотоксином *E. coli*.

Інше дослідження показало вплив легеневих МСК (МСК-Л) на дисбаланс T-reg і Th17-клітин, який асоційований зі смертністю тварин з ГУЛ/ ГРДС [138]. МСК-Л виявили не лише здатність покращувати гістопатологічний стан легеневої тканини, але й регулювати співвідношення вологої та сухої маси легенів. Крім того, вони сприяли збільшенню кількості T-регуляторних клітин і зниженню Th17-клітин, а також підвищенню співвідношення T-reg до Th17-клітин. Внутрішньовенна інфузія МСК-Л призводила до зниження концентрацій запальних цитокінів в БАВЛ і плазмі крові, а також до підвищення експресії KGF-2 і сурфактанту С у легенях. Окрім того, МСК-Л мігрували до ушкодженої області та залишалися в ній, як було показано за допомогою системи візуалізації в реальному часі. Таким чином, введення МСК-Л виявилось спроможним послаблювати ГУЛ, індукований ліпополісахаридом, через підвищення балансу клітин T-reg і Th17 [138].

Внутрішньолегеневе введення МСК з кісткового мозку (МСК-КМ) призводило до зменшення вираженості клінічних симптомів, кількості лейкоцитів і нейтрофілів у крові, загальної кількості клітин, кількості нейтрофілів і макрофагів у БАВЛ [135]. Також після терапії МСК були збалансовані показники газів артеріальної крові (підвищення парціального тиску кисню і насичення O_2 і зниження парціального тиску CO_2) у кроликів з ЛПС-індукованим ГУЛ. Терапевтичні властивості МСК на ГУЛ, що спричинено ендотоксинами, бактеріальною та вірусною інфекцією були доведені різними інструментальними

(КТ, УЗД, газометрія, гістологія) та молекулярно-біологічними методами. Окрім цього, встановлено, що різні методи доставки препаратів МСК (інтратрахеальне, внутрішньовенне) мають безпечність та ефективність в лікуванні ГУЛ [135].

Введення МСК-КМ призвело до значного покращення стану легеневої тканини, а саме зменшення інфільтрації імунними клітинами, легеневої кровотечі та набряку у тварин з ЛПС-індукованим ГУЛ за результатами гістопатологічного дослідження [75]. МСК-КМ людини також знижували рівні активності NF-κB і матриксної металопротеїнази-9 у нейтрофілах пацієнтів із ГРДС. Більше того, фосфорильований і загальний рівні ядерного фактора (NF)-κB p65 були знижені в легневих тканинах мишей з ГУЛ після лікування МСК-КМ. Також МСК терапія призвела до зниження експресії інтерлейкіну-6 і макрофагального запального білка 2, а також накопичення нейтрофілів у легневих тканинах миші з ГУЛ. Крім того, терапія МСК-КМ посилювала апоптоз нейтрофілів у БАВЛ і знижувала експресію анти-апоптотичних молекул, Bcl-xL і Mcl-1, як в експериментах *in vivo*, так і *in vitro*. Таким чином, результати досліджень свідчать про потенційні терапевтичні властивості МСК-Л і МСК-КМ у контексті ураження легень, викликаних ліпополісахаридами, бактеріальними та вірусними інфекціями, а вплив МСК на перебіг захворювання ГУЛ/ГРДС виявляється також на КТ, УЗД та патофізіологічному дослідженні легеневої тканини та параметрах оксигенації крові.

Дослідження, проведене Лі та ін. [139], демонструє, що внутрішньовенне введення МСК значно полегшувало легеневе запалення, викликане вірусом грипу птахів (H9N2 AIV), шляхом зниження рівня хемокінів і прозапальних цитокінів, а також знижувало рекрутування запальних клітин у легені. Також було показано, що терапія МСК значно зменшує тяжкість пневмонії, викликаної *E. coli* у щурів. Це виражається в покращенні виживаності тварин, зменшенні пошкодження легень, зниженні бактеріального навантаження та запалення в легенях, посиленні фагоцитарної здатності макрофагів і збільшенні легеневої та системної концентрації антимікробного пептиду LL37 [140]. Цікаво, що інтратрахеальна терапія МСК була такою ж ефективною, як і внутрішньовенна. Кріоконсервовані

МСК також були ефективними, тоді як секретом цих клітин був менш ефективний у цій моделі.

Окрім антибактеріального ефекту, МСК демонструють ще імунотерапевтичні властивості. Так було встановлено, що моноцити $\text{Ly6C}^{\text{hi}}\text{CD38}^+$ в пошкоджених легенях при введенні мишам ліпополісахариду диференціювалися в макрофаги M1 на 3-й день, а на 7-й – в CD38^+ моноцит-похідні дендритні клітини (мДК), тоді як моноцити $\text{Ly6C}^{\text{low}}\text{CD38}^+$ диференціювалися на 7-й день в $\text{CD11b}^+\text{CD38}^+$ ДК. Коли мишей з ГУЛ лікували МСК, значно знизилася смертність. Окрім того, на 3-й день МСК зменшили кількість макрофагів M1, нейтрофілів і секрецію хемокінів, а на 7-й день МСК зменшили кількість CD38^+ мДК і $\text{CD11b}^+\text{CD38}^+$ ДК, пригнічуючи процес презентації антигену [141].

Таким чином було встановлено, що МСК проявляють свої імуномодуючі властивості через вплив на T-reg, Th17, диференціювання моноцитів, дендритних клітин та життєздатність нейтрофілів, а також впливаючи на секрецію різними популяціями імунних клітин цитокінів та хемокінів. Терапія МСК може бути багатообіцяючим методом лікування ГУЛ, оскільки вона може пом'якшити тяжкість ураження легенів, модулювати імунний баланс і покращити проникність легеневих судин, полегшуючи регенерацію та відновлення легенів.

1.3.2. Результати клінічних досліджень впливу трансплантації МСК на перебіг ГРДС у пацієнтів з коронавірусною хворобою. Безпечність та ефективність трансплантації МСК в рамках лікування хронічного обструктивного захворювання легень була вивчена раніше [142–144]. Ці дослідження встановили обмежену ефективність та здатність МСК знижувати С-реактивний білок в крові пацієнтів з сильним запальним процесом. Ризик смертності був нижчим у пацієнтів, яким застосовували терапію МСК в порівнянні з пацієнтами, які отримували конвекційну терапію. Вагомим доказом безпечності застосування МСК, є відсутність зв'язку побічних ефектів з трансфузією МСК, як було встановлено при проведенні мета-аналізу [145,146].

Станом на червень 2022 року в міжнародній базі даних <https://clinicaltrials.gov/> зареєстровано 97 клінічних випробувань із застосуванням МСК для лікування COVID-19 і ще 9 клінічних випробувань зареєстровано на <https://www.clinicaltrialsregister.eu/>. У більшості випадків пацієнтам вводили 1×10^6 клітин/кг ваги тіла; однак дози суттєво відрізнялися від дослідження до дослідження. Що стосується способу введення, то МСК вводили внутрішньовенно в усіх випадках, а частота введення (один, два, три або чотири рази) варіювалася залежно від походження МСК, дослідження та клінічного стану пацієнта [147].

В іншому огляді літератури [148] зазначається, що клінічні випробування з застосуванням МСК включають пневмонію COVID-19, важку пневмонію, дихальну недостатність, ГРДС і легеневий фіброз. Більшість досліджень спрямовані на лікування пацієнтів із «COVID-19 пневмонією» (19 із 88 випадків) та «важкою пневмонією» (37 із 88 випадків). Серед 88 досліджень 24 досліджували лікування пацієнтів з ГРДС. Хоча у пацієнтів з ГРДС часто виявляють легеневий фіброз після виписки, із 88 досліджень лише 2 були зареєстровані для вивчення лікувального ефекту МСК терапії легеневого фіброзу. Більшість із цих клінічних випробувань (63 з 88) перевіряли доцільність, толерантність і безпечність (виникнення важких побічних ефектів) трансфузії МСК (19 випробувань у фазі I, 24 випробування у фазі I/II і 20 випробувань у фазі II). Кілька клінічних випробувань просунулися далі другої стадії (3,4%), лише два випробування знаходяться на другій/третій стадії, і лише одне випробування знаходиться на третій стадії.

МСК, введені внутрішньовенно, найчастіше накопичуються в легенях, де вони можуть проявляти протизапальну, протимікробну та тканинозамінну дію через паракринний шлях чи міжклітинні контакти, не приживаючись до тканини [149]. Але тривалість їхнього існування в легенях надзвичайно коротка. Дослідження, проведене Galleu та ін. [150] підтверджує терапевтичну ефективність МСК, застосованих у лікуванні РТПХ, навіть без приживлення до тканини. Встановлено, що механізм відновлення ґрунтується на імуносупресії, викликаній апоптозом МСК.

Цікаве дослідження віддалених ефектів трансплантації МСК на стан пацієнтів з важким перебігом COVID-19 провели Лі та ін [151]. Автори не спостерігали суттєвої різниці у ступені фіброзних змін в легенях, параметрах КТ, та у частці КТ без патологічних змін між групами МСК і плацебо на 24-й місяць. Можливо, що покращення патологічних змін на КТ в легенях, які спостерігалися в обох групах у цьому дослідженні, були наслідком спонтанного одужання, яке відбувалося з часом. Таким чином, тривалість МСК-опосередкованого впливу на ураження легень, як видається, спостерігалася протягом одного року, а не двох. Крім того, метод оцінки КТ-зображень частково відрізнявся від попереднього дослідження, що могло призвести до нейтральних результатів. Пацієнти в групі МСК також показали вищу оцінку по критеріям якості життя (GH за SF-36) порівняно з групою плацебо. В іншому дослідженні з 1-річним спостереженням автори відмічають значне зниження рівня втоми після лікування МСК порівняно з контрольною групою, і припускають, що причиною є зниження виробництва малонового діальдегіду та регуляції окисного стресу [152]. Також можливо, що механізм(и), що опосередковує полегшення симптомів і покращує якість життя, включає зменшення нейрозапалення та сприяння регенерації в таких органах, як легені, мозок і серце. Загальна оцінка пошкодження легень на КТ і титр нейтралізуючих антитіл були подібними між двома групами на 18 і 24 місяці. Не було різниці в рівні побічних ефектів або пухлинних маркерах під час 2-річного спостереження між двома групами [151].

Інші результати були отримані в клінічному дослідженні при лікуванні ГРДС у пацієнтів хворих на COVID-19, що перебували на системі ШВЛ. Дослідження встановило відсутність токсичності, пов'язаної з інфузією МСК, і різниці в частоті виникнення серйозних побічних ефектів протягом 30 днів. Було встановлено, що хоча трансплантація МСК була безпечною, вона не покращила 30-денну виживаність та не зменшила кількість днів без вентиляції протягом 60 днів пацієнтів із помірним та/або важким ГРДС, пов'язаним із COVID-19 [153].

Потрібно відмітити, що клінічне дослідження впливу МСК на критично тяжких пацієнтів хворих на COVID-19 з метою контролювання цитокінового

шторму встановило їх позитивний вплив та достовірні зміни в багатьох імунологічних параметрах [154]. Пацієнти з помірними та критичними клінічними проявами COVID-19 були розділені на Групу 1 (випадки середньої тяжкості, $n = 10$, лікування традиційним способом), Групу 2 (критичні випадки $n = 10$, лікування традиційним способом) і Групу 3 (критичні випадки, $n = 10$, які отримували традиційне лікування плюс терапія МСК у вигляді трьох послідовних внутрішньовенних трансфузій у дні лікування 0, 3 та 6 з дозуванням 3×10^6 клітин/кг). Механізм дії досліджували за допомогою маркерів цитокінового шторму, рівнів прозапальних та протизапальних цитокінів, факторів росту, маркерів апоптозу, хемокінів, матриксних металопротеїназ і гранзиму-В. При оцінці загальної смертності всіх випадків померли шість пацієнтів у групі 2 і три пацієнти у групі 3, а в групі 1 втрат не було. Рівні прозапальних цитокінів IFN γ , IL-6, IL-17A, IL-2, IL-12, протизапальних цитокінів IL-10, IL-13, IL-1Ra в Групі 3 достовірно відрізнялися від Групи 2. Рівень феритину, фібриногену та СРБ у сироватці пацієнтів Групи 3 значно знизився у порівнянні з Групою 2. При оцінці вмісту CD45⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, HLA-DR⁺ і CD16⁺/CD56⁺ клітин достовірне зниження виявили лише щодо нейтрофілів у Групі 3.

Переходячи до досліджень із більшою кількістю пацієнтів, Shi et al., провели клінічне випробування (2 фаза) для оцінки ефективності та безпеки МСКПЛ для лікування важких пацієнтів із COVID-19 [155]. Вони досліджували 100 пацієнтів із COVID-19 із пошкодженням легенів, які отримували 3 внутрішньовенні інфузії МСКПЛ у дозуванні 4×10^7 у 0, 3 та 6 дні. Порівняно з плацебо, введення МСКПЛ призвело до значного покращення об'єму ураження легенів на 28 день (кінцева точка дослідження). Загалом ці та інші результати свідчать про те, що застосування МСКПЛ в лікуванні COVID-19 пацієнтів є безпечним та ефективним [156]. Крім того, довготривалу безпеку та ефективність лікування вивчали протягом 1 року спостереження, збираючи дані з інтервалом у 3 місяці. Результати показали, що через 3 місяці у пацієнтів, які отримували МСКПЛ, все ще спостерігається покращення ураження цілої легені, а частота симптомів була нижчою [21].

У багатоцентровому, подвійному сліпому, рандомізованому, плацебо-контрольованому дослідженні пацієнти з легким або важким ГРДС отримували три внутрішньовенні інфузії 10^6 МСКПЛ/кг або плацебо (0,9% NaCl) протягом 5 днів після включення в дослідження. Критерієм оцінювання ефективності МСК терапії було співвідношення парціального тиску кисню до фракційного вдихуваного кисню (PaO_2/FiO_2) між базовим рівнем (день 0) і днем 7. Зміни PaO_2/FiO_2 між днями 0 та 7 істотно не відрізнялися між групами. Повторні інфузії МСКПЛ не були пов'язані з будь-якими серйозними побічними ефектами під час лікування або після нього при спотереженні протяго 28 днів [157].

Відомо, що розвиток COVID-19 супроводжується лімфопенією [158] та мієлоцитозом, зокрема зростанням вмісту паличкоядерних нейтрофілів [159]. Трансплантація МСК призводила до зростання вмісту лімфоцитів [160] та до зниження вмісту нейтрофілів в периферичній крові [161]. МСК стимулюють як вроджену, так і адаптивну імунну систему, впливаючи на фізіологію дендритних клітин, Т-клітин, В-клітин і макрофагів [124]. У клінічному дослідженні Liang та ін. [162] показали, що МСК пригнічують накопичення макрофагів в інфікованій SARS-CoV-2 легеневої тканині та стимулюють проліферацію регуляторних дендритних клітин. МСК також пригнічують міграцію нейтрофілів до інфікованої легеневої тканини та через секрецію IL-10 знижують секрецію прозапального цитокіну TNF- α . Ще одним наслідком терапії МСК є зниження рівня «нейтрофільних ловушок» (NET) в плазмі хворих на COVID-19 пневмонію. Було встановлено, що CX3CR1 сильно експресувався на дендритних клітинах і моноцитах/макрофагах пацієнтів, які отримували МСК, що вказує на те, що міграція ДК і моноцитів/макрофагів може бути опосередкована CX3CR1. Важливо, що МСК терапія може стимулювати продукцію $\beta 2$ -інтегринів та активаторів інтегринів (talin-1, kindlin-3) в імунних клітинах хворих [59]. Таким чином, всі ці дані вказують, що МСК проявляють імуномодулючі властивості при застосуванні у хворих на COVID-19 пневмонію.

scRNA-seq аналіз МКПК хворих з COVID-19, які отримували терапію МСК показав, що МСК терапія стимулює експресію CSF3R і PTPRE в субпопуляції

МКПК, таким чином підвищуючи мобілізацію гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) [59]. Цікаво, що VNN2, який є критичним для функціонування ГСК протягом ембріонального розвитку, був також підвищений в популяції клітин, що за своїм транскриптомом відповідають ГСК. Окрім того, було відмічено зростання вмісту CD16⁺ моноцитів у крові хворих на COVID-19 після трансфузії МСК. Подібне підвищення моноцитів/ макрофагів також було показано у мишей з ЛПС-індукованим пошкодженням легень, яким вводили МСК [163]. Таким чином, автори припускають, що для оптимальної імунної відповіді на інфекцію трансфузія МСК хворим на COVID-19 пневмонію може індукувати виникнення тимчасової ніші, що підтримує самовідновлення та диференціювання ГСК, поза кістковим мозком.

Однак, на сьогодні клінічні дані, які відображають зміни в імунній системі після трансплантації МСК хворим на COVID-19, досить обмежені. Так, в роботі Leng та ін. [124], було встановлено, що на 3-6 добу після трансплантації МСК вміст лімфоцитів у периферичній крові зростав, знижувалась концентрація С-реактивного білку, знижувався відсоток популяції “гіперактивних” імунних клітин, які секретують прозапальні цитокіни, а саме CXCR3⁺CD4⁺ Т-клітин, CXCR3⁺CD8⁺ Т-клітин та CXCR3⁺ NK-клітин. Крім того, популяція CD14⁺CD11c⁺CD11b^{mid} регуляторних дендритних клітин значно зросла. Також було відмічено значне зниження рівня в крові прозапального цитокіну TNF-α, тоді як концентрація протизапального цитокіну IL-10 зросла у групі з використанням МСК у порівнянні з контрольною групою плацебо [124].

Kouroupis та ін. [164] завершили випробування з 24 учасниками, розділеними на дві групи. Пацієнти Групи 1 отримували МСКПЛ і гепарин. Група 2 отримувала плацебо разом із підтримуючим лікуванням. Учасникам дослідження вводили дві дози або МСКПЛ, або плацебо. МСК вводили у кількості 100×10^6 клітин/інфузію внутрішньовенно через 24 та 72 години після включення в дослідження. Дослідники відзначили значні відмінності у виживанні, серйозних побічних ефектах і часу до одужання порівняно з контрольною групою. Через 6 днів рівні sTNFR2 були значно вищими, а рівні TNF були значно нижчими. Ці результати

важливі, оскільки було показано, що зростання рівня sTNFR2 призводило до підвищення вмісту FOXP3⁺ регуляторних Т-клітин. Дворазові інфузії МСКПЛ не були пов'язані з будь-якими важкими побічними ефектами під час лікування або після нього протягом чотирьох тижнів спостереження [164]. Dilogio та ін. [165] провели дослідження, у якому вивчали зміни у 40 важкохворих пацієнтів із ГРДС внаслідок COVID-19, рівнями PaO₂/FiO₂ нижче 300 мм рт. ст., шоком та/або поліорганною недостатністю. Пацієнти були випадковим чином розподілені до групи МСК або контрольної групи зі стандартним лікуванням. З 40 пацієнтів 26 померли від COVID-19, а 10 з групи МСК і четверо з контрольної одужали. Тривалість перебування пацієнтів у групі МСК була вищою порівняно з контрольною групою. Рівні IL-6 у групі МСК були значно нижчими у пацієнтів, які одужали. Аналіз СРБ, D-димерів, феритину, VEGF, IL-10 і CXCR3 у двох групах не показав істотної різниці [165].

Виникнення гіперімунної реакції організму у вигляді «цитокінового шторму» у хворих на COVID-19 є одним з важливих факторів, що впливає на тяжкість протікання захворювання та виживаність хворих. Підвищений рівень СРБ, прозапальних цитокінів та показника швидкості осідання еритроцитів властиві цитокіновому шторму [101]. В багатьох дослідженнях було встановлено, що трансплантація МСК призводить до зниження рівня СРБ в сироватці пацієнтів хворих на COVID-19 [166,167]. Однак, поряд з цим низка клінічних досліджень та мета-аналізів не виявили зниження СРБ у хворих на COVID-19 пневмонію при лікуванні МСК [145,168]. Подібно до даних по впливу МСК на СРБ, в літературі також присутні досить неоднозначні дані щодо змін концентрації прозапальних цитокінів в плазмі крові пацієнтів після клітинної терапії. Потрібно відмітити, що більшість авторів описують зміни в рівнях цитокінів при терапії МСК відносно початку лікування, і не вказують різницю в рівнях відповідних цитокінів у порівнянні з контрольною групою [168]. Всі клінічні дослідження по вивченню впливу МСК на перебіг COVID-19 проводилися на фоні стандартної терапії, що містила різноманітні противірусні, протибактеральні, протизапальні препарати та антикоагулянти. Тому не можна зробити висновки щодо специфічного впливу

МСК маючи лише статистичні відмінності в МСК групі, потрібні адекватні статистичні порівняння з контрольною групою.

У відкритому дослідженні Ху та ін. [169] нерандомізовано вводили 26 пацієнтам МСК, отримані з менструальної крові. Використання МСК, отриманих із менструальної крові, дозволяє уникнути етичних проблем, які виникають з іншими типами МСК. Вживаність в дослідній групі становила 91,31 % проти 66,67 % у контрольній групі. Не було суттєвих відмінностей у рівнях СРБ та ІЛ-6 до та після інфузії МСК, отриманих із менструальної крові [169]. Shu та ін. [160] розділили 28 пацієнтів на контрольну групу (стандартне лікування) і МСК групу, пацієнти якої отримували стандартне лікування, що супроводжувалося трансфузією МСКПЛ (2×10^6 клітин/кг протягом 1 години). Час одужання для групи МСК був коротшим, ніж для контрольної групи. Дослідники виявили, що рівні СРБ та ІЛ-6 були значно нижчими в групі МСК через 7 днів після інфузії. Крім того, в пацієнтів з МСК групи кількість лімфоцитів повертається до норми швидше ніж в контрольній. Комп'ютерна томографія грудної клітини показала зменшення запалених часток. Цікаво, що Shu та ін. також виявили, що пацієнти з діабетом використовували менше екзогенного інсуліну після інфузії МСКПЛ [160]. В іншому дослідженні період спостереження становив 3 місяця і протягом цього періоду спостереження не було виявлено істотної різниці в СРБ і функціях печінки, нирок і легенів [147].

Так, вплив МСК на рівень ІЛ-6 в сироватці пацієнтів з ГРДС є контроверсійним, три клінічних дослідження свідчать про відсутність достовірної різниці, в той же час чотири інші встановили, що МСК можуть знизити концентрацію ІЛ-6 [146]. Також, три дослідження не встановили значного впливу МСК на рівень ІЛ-8 в пацієнтів з ГРДС [146]. Мета-аналіз встановив, що рівень ІЛ-6 в крові пацієнтів контрольної та МСК груп не мав достовірних відмінностей. Таким чином, здатність МСК до зниження запального процесу в хворих на COVID-19 не була встановлена [145]. Тим не менш, інший мета-аналіз встановив, що трансплантація МСК має значний позитивний вплив на видужування пацієнтів

хворих на COVID-19 без фіксації значних достовірних змін в концентраціях СРБ, IL-6 та IL-2 [170].

Ще одним прогностичним маркером COVID-19 є IP-10 [171], підвищення його рівня в плазмі хворих свідчить про тяжкість перебігу захворювання [172,173]. Трансплантація МСК не впливала на концентрацію IP-10 в плазмі критично хворих пацієнтів [154,155]. Також трансплантація МСК не призводила до значних змін рівня MIP-1 α в плазмі крові [161]. Проте рівень прозапального хемокіна MCP-1 в плазмі крові хворих на COVID-19 пневмонію значно знизився після трьох інфузій МСКПЛ [161,174].

Таким чином, клінічні дослідження встановили безпечність внутрішньовенної трансфузії МСК, як однократної так, і багатократних. Не було встановлено виникнення серйозних побічних ефектів у пацієнтів різної ступеня тяжкості з COVID-19. Застосування МСК може призводити до зниження маркерів запалення в периферичній крові хворих. Вірогідним є зниження прозапальних та зростання протизапальних цитокінів у пацієнтів з вираженим синдромом цитокінового шторму, що супроводжується важким перебігом захворювання. В той же час у пацієнтів з середньою важкістю перебігу COVID-19 МСК можуть не впливати на рівні прозапальних цитокінів у периферичній крові. Також, потрібно відмітити, що МСК могли знижувати запалення в легенях протягом перших діб після трансплантації, коли дослідники, зазвичай, не проводили дослідження сироватки крові. Однак, незважаючи на контрверсійність даних щодо показників запалення в крові пацієнтів, МСК покращують перебіг захворювання, зменшують час госпіталізації, знижують запалення легень та фіброзні зміни в легенях протягом 1 року спостереження у пацієнтів з COVID-19, що не потребують ШВЛ.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Учасники та дизайн дослідження

Загалом 28 пацієнтів з вперше діагностованим COVID-19 та підтвердженим ГРДС середнього ступеню тяжкості, які були ушпиталені до Київської міської клінічної лікарні №4, були включені до одноцентрового, нерандомізованого відкритого дослідження, зареєстрованого на <https://clinicaltrials.gov/> (NCT04461925) [175]. П'ятнадцять пацієнтів, які пройшли звичайне лікування, були включені в Контрольну групу, а в групі МСК було 13 пацієнтів, які, на додаток до традиційної терапії, отримали три послідовні дози МСКПЛ. Деякі супутні захворювання та основні характеристики обох груп наведені в табл.2.1. Протокол дослідження було розроблено відповідно до Гельсінської декларації та схвалено етичним комітетом Київської міської клінічної лікарні №4 (протокол № 280 від 23 квітня 2020 р.). Усі учасники підписали інформовану згоду на участь у дослідженні. Усі пацієнти відповідали критеріям середнього ступеня тяжкості відповідно до тимчасових рекомендацій ВООЗ та Плану діагностики та лікування нової коронавірусної пневмонії, виданого Національною комісією охорони здоров'я Китайської Народної Республіки (Тимчасове 7-е видання) [176]. Стан пацієнтів обох груп включав такі симптоми: гострий респіраторний дистрес синдром, ЧД ≥ 30 разів/хвилину; киснева сатурація (SpO_2) $\leq 93\%$ у спокої; двостороння пневмонія. У цьому дослідженні брали участь пацієнти з важкими симптомами COVID-19, що зберігалися після 7–11 днів стандартного лікування. Основне медикаментозне

лікування пацієнтів включало антибіотикотерапію та стандартне лікування дексаметазоном для пригнічення запальної реакції механічна вентиляція легень не застосовувалася, але, в разі індивідуальної непереносимості гіпоксії, пацієнти отримували кисень через маску на обличчі. Дані від кожного пацієнта збирали протягом року для КТ досліджень та протягом 28 днів для виявлення впливу трансплантації МСКПЛ (рис. 2.1).

Таблиця 2.1.

Клінічні характеристики пацієнтів з COVID-19, включених у дослідження

Параметр	Контрольна група (n=15)	МСК група (n=13)	р-значення
Вік, повних років (медіана, інтервал)	62 (32-73)	58 (32-71)	0.25
Стать			0.61
Чоловіча	11/15 (73.33%)	8/13 (61.5%)	
Жіноча	4/15 (26.67%)	5/13 (38.5%)	
Інтервал від початку захворювання до госпіталізації (дні)	11.0 (8.5-12.8)	12.3 (9-14.5)	0.29
Супутні захворювання – кількість пацієнтів (%)			
Гіпертензія	9/15 (60.0%)	5/13 (38.5%)	0.34
Діабети	1/15 (6.67%)	1/13 (7.7%)	0.91
Серцево-судинні захворювання	6/15 (40.0%)	4/13 (30.7%)	0.68

Продовж. табл. 2.1

Симптоми – кількість пацієнтів (%)			
Лихоманка	11/15 (73.33%)	11/13 (84.6%)	0.61
Кашель	15/15 (100.0%)	13/13 (100%)	1.0
Утруднене дихання	12/15 (80.0%)	9/13 (69.2%)	0.65
Діарея	1/15 (6.67%)	0/14 (0%)	0.78
Слабкість	15/15 (100.0%)	13/13 (100%)	1.0
Міалгія	3/15 (20.0%)	6/13 (46.1%)	0.25
Клінічний результат – кількість пацієнтів (%)			
Одужали або виписані	14/15 (93.33%)	13/13 (100%)	0.78
Смерть	1/15 (6.67%)	0/13 (0%)	0.79

Виключенню з дослідження підлягали учасники за наступними критеріями: перехід на інші методи лікування (згідно з лікуючим лікарем), вагітність, годування груддю, злоякісні пухлини, інші системні важкі захворювання та психози, участь в інших клінічних дослідженнях, ко-інфекція ВІЛ або сифіліс, нездатність надати інформовану згоду або відповідати вимогам тестування, інвазивна вентиляція легенів тривалістю понад 48 год та наявність іншої органної недостатності (потреба штучної підтримки життєдіяльності органів).

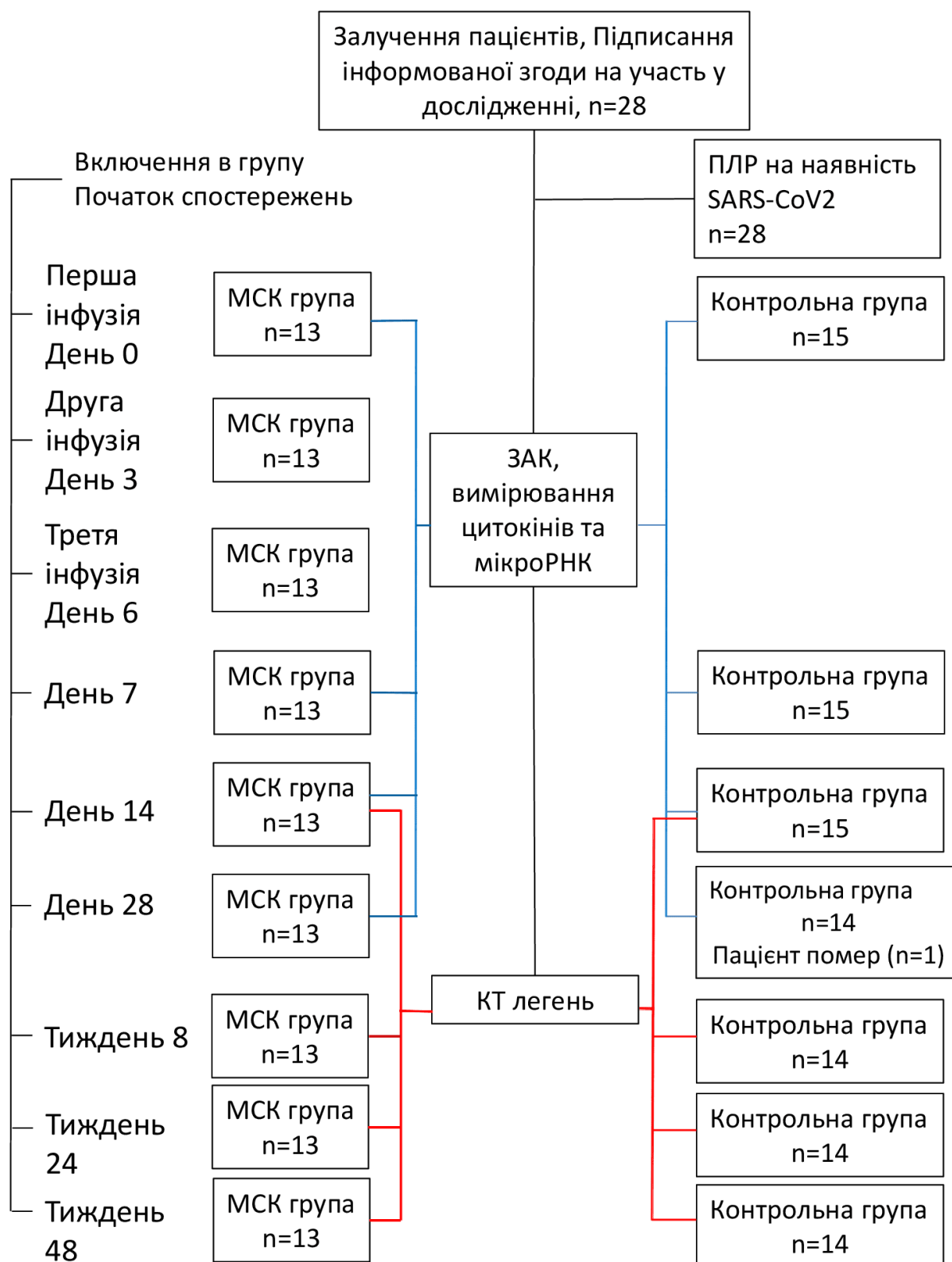


Рис.2.1. Блок-схема реєстрації пацієнтів в дослідженні, проведення втручання та подальшого спостереження. ЗАК – загальний аналіз крові, КТ – комп’ютерна томографія, ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція, МСК – мезенхімальні стромальні клітини

2.2. Виявлення респіраторних патогенів

Наявність в організмі пацієнтів коронавірусу SARS-CoV-2, що є збудником COVID-19, проводили шляхом виявлення його генетичного матеріалу (РНК) в Київській міській клінічній лікарні №4 за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. Для цього брали зішкріб зі слизової оболонки носових пазух і глотки і одразу переносили в середовище для транспортування вірусів. Після екстракції тотальної РНК проводили ЗТ-ПЛР в реальному часі для ідентифікації вірусу. Генотипування вірусу SARS-CoV-2 не проводилося, але на той час в Україні та м.Києві домінуючим був дельта-штам [177,178].

2.3. Виділення та культивування мезенхімальних стромальних клітин з пуповини людини

Зразки пуповини людини після кесаревого розтину збирали у Київському міському пологовому будинку № 3 у донорів віком від 23 до 36 років у терміні вагітності 39–41. Усі донори (n=19) надали письмову інформовану згоду на збір і використання їхнього біологічного матеріалу для затвердженого клінічного дослідження. За тиждень до збору пуповини умовно здорові донори пройшли скринінг на інфекційні захворювання за допомогою серології (анти-ВІЛ1/2, анти-НСV, анти-НВV, анти-*Treponema pallidum* та анти-CMV IgG та IgM) та методом кількісної ПЛР в реальному часі (наявність нуклеїнових кислот ВІЛ1/2, вірусів гепатиту В і С).

Використовуючи валідовані набори для ПЛР, тканина пуповини була протестована на наявність вірусу герпесу людини 1, 2 та 6 типу, *Ureaplasma spp.* і *Mycoplasma genitalium*. Далі пуповину подрібнювали ножицями на фрагменти розмірами 1–3 мм та інтенсивно промивали на шейкері у збалансованому сольовому розчині Хенкса (HBSS) (Sigma, Великобританія) з додаванням 100

ОД/мл пеніциліну (Артеріум, Україна) та 50 мг/мл. мл стрептоміцину (Артеріум, Україна) до знебарвлення промивочного розчину. Фрагменти тканини пуповини розміщували в культуральні флакони з обробленої для клітин поверхнею (Sarstedt, Німеччина) в повному культуральному середовищі, яке складалося з середовища МЕМ альфа-модифікації (Sigma, Великобританія), доповненому 15% ФБС (Sigma, Великобританія), 1 × розчином амінокислот RPMI (Sigma, Великобританія) і 1 × розчином суміші стрептоміцин/пеніцилін (Sigma, Великобританія). Експланти тканини пуповини інкубували при +37 °С у присутності 5 % CO₂ протягом 10 діб з подальшою зміною середовища двічі на тиждень. Коли ріст клітин досягав 80–90% конфлюентності в моношарі, їх дисоціювали з поверхні культуральних флаконів за допомогою розчину 0,05% трипсину та 0,02% EDTA (Sigma, Великобританія), промивали, підраховували та пасажували при щільності посіву 5×10^3 клітин/см² в культуральні флакони, що відповідало пасажу 1 (P1). МСКПЛ на P3 збирали та кріоконсервували у збалансованому сольовому розчині Хенкса при кінцевій концентрації 5% диметилсульфоксиду (Sigma, Великобританія) в програмному заморожувачі з контрольованою швидкістю охолодження. Аліквоти з усіх зразків були зібрані для контролю якості. Це включало визначення життєздатності за допомогою методу прижиттєвого виключення трипанового синього та експресію клітинних поверхневих маркерів за допомогою проточної цитометрії, цитогенетичний аналіз за допомогою методу GTG-banding, мікробіологічні тести (Bact/Alert 3D, Biomerieux, Durham, США) і виявлення *Mycoplasma* spp (Набір для детекції MycoAlert™ PLUS Mycoplasma Detection, Lonza, Rockland, Miami, FL, USA), відповідно до інструкцій виробника. Ці тести контролю якості проводилися перед випуском кожної партії клітин.

2.4. Спрямоване диференціювання МСКПЛ in vitro

Для визначення здатності МСКПЛ до спрямованого диференціювання культуру клітин на третьому пасажі культивували протягом 21 доби в середовищі

α MEM+10%FBS з додаванням остеогенних (10 мкМ дексаметазон, 10 мМ β -гліцерофосфат і 0,1 мМ аскорбат-2-фосфат) та адіпогенних (1 мкМ дексаметазон, 0,5 мМ ізобутил-метилксантин, 0,1 мМ індометацин і 10 нг/мл інсулін) факторів диференціювання. Мінералізований матрикс виявляли фарбуванням 1 % розчином алізаринового червоного (Sigma, США). Жирові включення виявляли фарбуванням масляним червоним (Sigma, США).

Контролем слугували МСКПЛ, культивовані протягом того ж терміну в повному культуральному середовищі без факторів диференціювання.

2.5. Трансплантація МСКПЛ

Критерії випуску для клінічного використання МСКПЛ включали відсутність контамінації патогенними мікроорганізмами (бактеріями, мікоплазмами та грибами), нормальний каріотип, ідентичність і відповідність поверхневому фенотипу МСК, що характеризуються як позитивна ($\geq 95\%$) експресія для CD73, CD90 і CD105 і негативна ($\leq 2\%$) експресія для CD45 і CD34 маркерів клітинної поверхні відповідно до мінімальних критеріїв мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин, виданих ISCT [1]. Під час трансплантації було досліджено та оцінено частоту та характер кожного побічного ефекту, щоб з'ясувати, чи були вони пов'язані з введенням МСКПЛ.

Для приготування терапевтичної дози для інфузії кріоконсервовані МСКПЛ на РЗ розморожували на водяній бані, попередньо встановленій на $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$, до появи рідкої фази в 2/3 об'єму. Далі клітини центрифугували при 300 g протягом 5 хв при кімнатній температурі, видаляли супернатант та ресуспендували осад в кінцевому об'ємі 50 мл розчину для трансфузії, що складався з фізіологічного розчину (Дарниця, Україна) і 5% людського сироваткового альбуміну (Biopharma, Україна). Середні показники життєздатності клітин становили $87,8 \pm 5,1\%$ перед початком інфузії. Клітини вводили внутрішньовенно трьома послідовними дозами в 0-й, 3-й

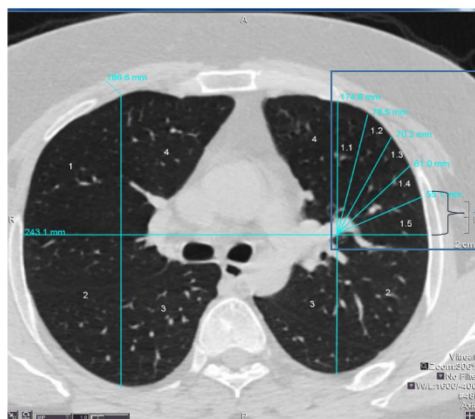
і 6-й дні лікування у дозі 1×10^6 клітин/кг маси тіла. Для інфузії використовували стандартну систему переливання крові з розміром пор фільтра 100 мкм. МСКПЛ вводили крапельно протягом 20 хвилин із одночасним спостереженням за станом пацієнта за допомогою електрокардіографу. Під час інфузії та протягом наступних 30 хвилин постійно перевіряли артеріальний тиск, температуру тіла, пульс і колір шкіри пацієнта.

2.6. Оцінка КТ та підрахунок балів

Після госпіталізації всі пацієнти проходили обстеження грудної клітини методом комп'ютерної томографії з високою роздільною здатністю за допомогою сканера Philips Brilliance CT 64 (Philips Medical Systems Technologies Ltd., Ізраїль), із товщиною зріза 1 мм при 120 кВ і 335 мА. КТ-зображення були проаналізовані на 2, 8, 24 і 48-му тижнях. Обробка та класифікація КТ-зображень враховували такі радіологічні характеристики, як непрозорість за типом матового скла, ретикуляцію та стільникову структуру тканини легенів. Для кількісного визначення ураженої ділянки легені використовували підхід, як описано Büttner et al. [179] з деякими змінами. А саме: площа ураженої легені вимірювалася в полігональних областях на одному зображенні на трьох рівнях (верхня точка — вище дуги аорти, нижня точка — нижче найвищої точки правого купола діафрагми та середня точка — посередині між двома попередніми). Кожне зображення було поділено на чотири квадранти та далі на п'ять підквадрантів, що охоплювали 5% загальної площі зображення (рис. 2.2). Шкала, застосована для оцінювання і виражена в умовних одиницях, включала сім значень: 0 (немає уражень), 1 ($\leq 10\%$ уражено), 2 (11–20% уражено), 3 (21–30% уражено), 4 (31–40 % уражено), 5 (41–50% уражено), 6 ($> 50\%$ уражено). Загальна оцінка тяжкості ступеню ураження була сумою балів п'яти часток легені.

Область легені для аналізу:

- Верхня область: завжди вище рівня каріни
- Середня область: посередині між першою і третьою областю
- Нижня область: завжди нижче найвищої точки правого купола діафрагми



Квадрант (4 квадранти на кожену область)

Субквадрант (по 5 в кожному квадранті)

Типи ураження:

- Соти (Honeycombing)
- Ретикулярність (Reticulation)
- “Матове скло” (Ground glass opacities)
- Порушена архітектура легень (Distortion)
- Тракційні бронхоектази (Traction bronchiectasis)
- Емфізема (Emphysema)
- Грубі лінійні нерегулярні потовщення, участки консолідації

Шкала:

- 0 (ураження відсутнє)
- 1 ($\leq 10\%$ ураження)
- 2 (11-20%)
- 3 (21-30%)
- 4 (31-40%)
- 5 (41-50%)
- 6 ($> 50\%$)

Часові проміжки:

- 2 тижні
- 4 тижні
- 8 тижнів
- 24 тижні
- 48 тижнів

Рис.2.2. Принцип оцінки КТ на прикладі репрезентативного зображення КТ легень пацієнту з COVID-19

2.7. Збір та підготовка периферичної крові до досліджень

Зразки крові (12–20 мл) 28 пацієнтів із COVID-19 відбирали в день госпіталізації (день 0) і на 7-й, 14-й та 28-й дні після госпіталізації. Із загального об'єму 5 мл було використано для загального клінічного аналізу крові, проведеного за допомогою гематологічного аналізатора Swelab Alfa Basic (Boule Medical AB, Spånga, Швеція) у Київській міській клінічній лікарні №4. Решту об'єму зразків крові негайно транспортували до Інституту клітинної терапії при температурі від 18°C до 25°C , де вони зберігались до виділення плазми та моноклеарних клітин не більше 24 годин при $+4^{\circ}\text{C}$. Забір, зберігання і процесинг крові здорових донорів (20 мл, $n=17$) здійснювали в Клініко-діагностичній лабораторії Інституту клітинної терапії. Для отримання плазми і сироватки пробірки з периферичною кров'ю

центрифугували при 1600 об/хв протягом 20 хв, після чого відбирали плазму та сироватку в кроіампули і зберігали при -80°C для подальшого виявлення цитокінів та аналізу мікроРНК.

2.8. Імуноферментний аналіз

Кількісний вміст білкових біомаркерів в плазмі та сироватці визначали методом імуноферментного аналізу. Вміст С-реактивного білка в сироватці пацієнтів визначали за допомогою набору AccuBind (Monobind, Лейк-Форест, Каліфорнія, США) відповідно до інструкцій виробника. Межа виявлення становила 0,014 мкг/мл. Для визначення концентрації цитокінів і хемокінів в плазмі та сироватці пацієнтів проводили імуноферментний аналіз (ІФА), використовуючи набори для діагностики відповідно до інструкцій виробника. Наступні набори для ІФА були використані для вимірювання кожного параметра та побудови стандартних кривих: G-CSF (BMS2001INST), IL-2 (BMS221INST), IL-6 (BMS213INST), IP-10 (BMS284INST), MIP-1 α (KAC2201) IL-10 (BMS215INST), IL-12p70 (KAC1568), TnI (EHTNNI3) і MCP-1 (BMS281INST) від Instant ELISA (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Австрія), RAGE (RAB0007) від Sigma (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Німеччина), а також SP-D (DSFPD0) і NT-proBNP (DY3604-05) від R&D Systems (Bio-Techne Ltd., Великобританія). Рівні чутливості становили 11 пг/мл для G-CSF, 2,3 пг/мл для IL-2, 0,92 пг/мл для IL-6, 1 пг/мл для IP-10, 2 пг/мл для MIP-1 α , 0,66 пг/мл для IL-10, 0,2 пг/мл для IL-12p70, 100 пг/мл для TnI, 2,31 пг/мл для MCP-1, 0,11 нг/мл для SP-D і 3 пг/мл для RAGE. Виробник не вказав рівень чутливості для набору для визначення NT-proBNP. Усі вимірювання абсорбції проводили за допомогою HumaReader HS (Human GmbH, Вісбаден, Німеччина). Усі вимірювання проводили у двох повторах.

2.9. Кількісна ЗТ-ПЛР для визначення відносного рівня експресії мікроРНК

Виділення мікроРНК та оцінка її якості. МікроРНК екстрагували з плазми пацієнтів з COVID-19 та здорових волонтерів відповідно до інструкцій до набору NucleoSpin miRNA Kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Отриману мікро РНК розчиняли у 50 мкл води, вільної від нуклеаз і зберігали при -80°C . Концентрацію виділеної мікроРНК вимірювали за допомогою спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США).

Реакція поліаденілювання. Після виділення мікроРНК проводили реакцію поліаденілювання з використанням набору High-Specificity miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, США). Спочатку в пробірки об'ємом 200 мкл додавали вільну від РНКаз воду таким чином, щоб фінальний об'єм реакції становив 20 мкл (оскільки додавались різні об'єми проб з тотальною РНК в залежності від їх концентрації). Далі, по черзі додавали реактиви з набору: 5x poly A polymerase buffer – 4 мкл.; rATP (10 mM) – 1 мкл. Наступним до суміші додавали 10 мкл мікроРНК. В кінці додавали 1 мкл *E.coli* poly A polymerase та обережно перемішували вміст пробірок. Інкубували зразки 30 хв при $+37^{\circ}\text{C}$ для активного поліаденілювання та зупиняли процес підвищуючи температуру до $+95^{\circ}\text{C}$ протягом 5 хв. Одразу після цього переносили пробірки на лід. Отримані зразки одразу використовувались для синтезу кДНК або зберігались в низькотемпературному холодильнику за температури -80°C .

Зворотно-транскрипційна реакція. МікроРНК зворотно транскрибували в кДНК за допомогою набору для синтезу першого ланцюга High-Specificity miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis (Agilent Technologies, Лексінгтон, Массачусетс, США) з універсальним зворотним праймером з набору для синтезу. Спочатку в пробірки (200 мкл) додавали 11,2 мкл вільної від РНКаз води, далі – 2 мкл реактиву 10x AffinityScript RT buffer, 4 мкл поліаденільованої мікро РНК, 0,8 мкл. dNTP mix (100

мМ), 1 мкл RT adaptor primer (10 мкМ) та 1 мкл AffinityScript RT/RNase Block enzyme mixture. Обережно перемішували вміст пробірок. Інкубували проби за такою схемою: 5 хв при 55 °С, 15 хв при 25 °С, 30 хв при 42 °С для проходження процесу зворотної транскрипції та 5 хв при 95 °С для зупинки реакції. Отриману кДНК-міРНК розчиняли додатково у 100 мкл вільної від РНКаз води та зберігали при -20 °С до проведення у ПЛР у реальному часі.

Таблиця 2.2.

Послідовності праймерів, які використовували для визначення відносного рівня експресії мікроРНК в плазмі пацієнтів з COVID-19

Назва	Послідовність forward праймеру	Послідовність reverse праймеру
hsa-miR-21-5p	5'-TAGCTTATCAGACTGATGTTGA-3'	Універсальний reverse праймер (надається в комплекті з набором для синтезу)
hsa-miR-27a-3p	5'-TTCACAGTGGCTAAGTTCCGC-3'	
hsa-miR-126-3p	5'-TCGTACCGTGAGTAATAATGCG-3'	
hsa-miR-133a-3p	5'-TTTGGTCCCCTTCAACCAGCTG-3'	
hsa-miR-146a-5p	5'-TGAGAACTGAATTCCATGGGTT-3'	
hsa-miR-221-3p	5'-AGCTACATTGTCTGCTGGGTTTC-3'	
hsa-miR-92a-3p	5'-TATTGCACTTGTCCTCGGCCTGT-3'	
has-miR-124-3p	5'-TAAGGCACGCGGTGAATGCCAA-3'	
hsa-miR-424a-5p	5'-CAGCAGCAATTCATGTTTTGAA-3'	
U6	5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'	5'-AACGCTTCACGAAT TTGCGT-3'

Кількісний аналіз вмісту мікроРНК. ЗТ-кПЛР проводили для виявлення рівнів мікроРНК за допомогою набору 5× HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (без ROX) (Solis BioDyne, Тарту, Естонія) із використанням системи реєстрації

ПЛР у реальному часі CFX96™ (BIO-RAD Laboratories, Inc., Сінгапур). Для кожного зразка реакцію qRT-PCR, яка складалася з 15-хвилинного «гарячого старту» при 95 °С для активації полімерази, з наступними 44 циклами по 15 с при 95 °С і 20 с при 60 °С, проводили в трьох повторях. Метод $^{-2\Delta Cq}$ [180] використовувався для кількісного аналізу вмісту мікроРНК, у порівнянні з *U6* як референтним значенням. Послідовності праймерів наведено в табл.2.2.

2.10. Виділення моноклеарних клітин периферичної крові пацієнтів

МКПК із зразків периферичної крові пацієнтів з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2 сепаративно розділяли на градієнті щільності фікола ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$) (Cytiva, Global Life Sciences Solutions, США). Для цього спочатку до периферичної крові (4,5 мл) з антикоагулянтом (К₃ЕДТА) додавали рівний об'єм (4,5 мл) фосфатно-сольового буферу в модифікації Дюльбекко (DPBS, Gibco) з 2% вмістом фетальної бичачої сироватки (FBS, Sigma) та обережно перемішували. Для формування градієнту щільності до двох центрифужних пробірок об'ємом 15 мл вносили по 3 мл фіколу в кожную. На фікол в кожную пробірку поступово наносили кров з DPBS та центрифугували в свінг-бакет роторі (5702R, Eppendorf) без гальмування при 400 g та 20 °С протягом 30 хвилин для відокремлення плазми, еритроцитів та фракції моноклеарів. Після центрифугування видаляли плазму, залишаючи 5-10 мм над рівнем білої інтерфази з клітинами. За допомогою піпетки Пастера збирали всі клітини з поверхні сепаративного середовища і переносили їх до центрифужної пробірки об'ємом 15 мл, що містила 10 мл DPBS + 2% FBS. Клітини осаджували центрифугуванням при 300 g та 20 °С протягом 10 хвилин, потім видаляли надосад і до осаду додавали 4 мл буферу для лізису еритроцитів (LysingBuffer, BD PharmLyse™), клітини перемішували та інкубували 5 хвилин при 20 °С. Для припинення реакції додавали 10 мл DPBS + 2% FBS та осаджували клітини при 300 g та 20 °С протягом 10 хвилин. Надосад видаляли та МКПК

ресуспендували в 1 мл DPBS та проводили підрахунок кількості та життєздатності клітин.

2.11. Кріоконсервування клітин

Кріоконсервування МКПК пацієнтів проводили в середовищі, що містило 90% ФБС та 10% диметилсульфоксиду (DMSO, Sigma), в кріоампулах по 1 мл (10×10^6 клітин) на програмному заморозувачі (ЗП6, СКТБ з ДППК та К НАНУ) з поступовим зниженням температури ($1^\circ\text{C}/\text{хв}$) до -6°C , потім із зниженням $0,5^\circ\text{C}/\text{хв}$ до -15°C , потім із зниженням $1^\circ\text{C}/\text{хв}$ до -32°C , потім із зниженням $10^\circ\text{C}/\text{хв}$ до -140°C , після чого розміщували кріоампули на постійне місце зберігання до сховища (ХБ-05) в середовищі рідкого азоту при температурі -196°C .

2.11. Розморожування клітин

Для кожного зразка клітин, який потрібно розморозити, готували по одній центрифужній пробірці об'ємом 15 мл з теплим середовищем RPMI-1640 (Gibco), що містило 10% інактивованої теплою FBS (cRPMI). Кріоампулу з рідкого азоту або сухого льоду переносили до водяної бані з температурою 37°C на 2 хвилини. Коли в кріоампулі залишався шматочок льоду $1/3$ від загального об'єму, переносили кріоампулу до ламінарного боксу 2-го класу біобезпеки. Кріоампулу обробляли зовні дезінфікуючим засобом перед відкриттям, щоб запобігти контамінації. Повільно протягом 30 секунд додавали по краплях 1 мл теплового cRPMI до кріоампули, що містила 1 мл суспензії клітин. Переносили розведену суспензію клітин у 15 мл поліпропіленову центрифужну пробірку, яка вже містила теплий cRPMI, та центрифугували при 200 g протягом 7 хв. Видаляли надосад і обережно струшували пробірку пальцем, щоб розбити гранулу осаду. Осад ресуспендували в 1 мл теплового cRPMI та підраховували кількість клітин в гемоцитометрі Нойбауера. Життєздатність клітин визначали методом виключення трипанового синього.

2.12. Проточна цитофлуориметрія

Метод проточної цитофлуориметрії використовували для детекції субпопуляцій імунних клітин. Кріоконсервовані моноклеарні клітини периферичної крові розморожували на водяній бані при 37 °C і промивали RPMI-1640 (Sigma, США) з 2% фетальної бичачої сироватки (Sigma, США) та центрифугували при 350 g протягом 5 хв. Осад клітин ресуспендували за допомогою RPMI-1640, фільтрували через нейлонові клітинні фільтри 40 мкм (Corning, США) і аліквотили по 50 мкл у полістерінові пробірки (до 3×10^5 клітин на пробірку). Клітини інкубували у захищеному від світла середовищі з відповідними флуорохром-кон'югованими моноклональними антитілами протягом 30 хв при +4 °C, у відповідному розведенні 0,5 мкг на 10^6 клітин. Після інкубації незв'язані антитіла відмивали за допомогою 2 мл буфера для промивання клітин (BD Biosciences, США) та послідовним центрифугуванням при 350 g протягом 5 хв при +4 °C. Перед аналізом клітини обережно ресуспендували в 300 мкл буфера для промивання клітин. Антитіла, що використовувалися для проточної цитометрії для визначення субпопуляцій лімфоцитів, перераховані в табл.2.3.

Таблиця 2.3.

Антитіла, використані для проточної цитофлуориметрії

Назва	Флуорохром	Клон	Кат. №	Лот	Субпопуляція клітин
CD1c	PE	F10/21A3	564900	0162405	Мієлоїдні дендритні клітини
CD3	FITC	HIT3a	555339	0064351	T клітини
CD4	PE	RPA-T4	555347	0128475	T хелпери
CD8	APC-Cy7	SK1	557834	0247872	T клітини

продовження табл.2.3

Назва	Флуорохром	Клон	Кат. №	Лот	Субпопуляція клітин
CD11b	APC	ICRF44	550019	0128389	Дендритні клітини
CD11c	PE-CF594	B-ly6	562393	0108833	Дендритні клітини
CD14	FITC	M5E2	555397	9315119	Моноцити
CD16	PE	B73.1	561313	0073839	NK
CD19	PE-CF594	H1B19	562294	0230909	B клітини
CD25	APC	M-A251	555434	0064948	Регуляторні Т клітини
CD45	PerCP-Cy™5.5	HI30	564105	0216944	Мононуклеарні клітини
CD45RO	PE-CF594	UCHL1	562299	0293276	T клітини пам'яті
CD56	PE	B159	555516	0160477	NK
CD57	APC	NK-1	560845	0212460	Зрілі клітини
CD127 (IL-7Rα)	PerCP-Cy™5.5	HIL-7R-M21	560551	0142744	Ефекторні клітини та клітини пам'яті
CD183 (CXCR3)	PerCP-Cy™5.5	1C6/CXCR3	560832	0279904	Ефекторні Т клітини
CD279 (PD-1)	PerCP-Cy™5.5	EH12.1	561273	0300813	Старіючі клітини
CD303 (BDCA-2)	BV510	V24-785	748005	0323865	Плазмоцитоїдні дендритні клітини
HLA-DR	APC	G46-6	559866	0028348	Активовані клітини

Для регулювання параметрів компенсації флуорохромів, що перекриваються, для багатопараметричного аналізу використовували зразки клітин без забарвлення, пофарбовані поодинокими антитілами та групою антитіл мінус одне антитіло. Принаймні від 1×10^5 до 3×10^5 клітин на зразок реєстрували за допомогою проточного цитофлюориметру BD FACSAria (Becton Dickinson, США). Дані були проаналізовані за допомогою програмного забезпечення BD FACSDiva 6.1.2 (Becton Dickinson, США). Панелі для аналізу окремих популяцій лейкоцитів перелічені в табл.2.4.

Було використано 7 панелей для визначення субпопуляцій лейкоцитів: CD45/CD14/CD1c/CD11b/CD11c, CD45/CD14/CD1c/CD303/HLA-DR, CD45/CD3/CD19/CD16+CD56, CD3/CD4/CD8/CXCR3/HLA-DR/CD45RO, CD3/CD4/CD8/PD1/CD57/CD45RO, CD3/CD4/CD8/PD1/HLA-DR, CD3/CD4/CD8/CD25/CD127. Гейтування (відокремлення) CD45-позитивних мононуклеарних клітин проводили за прямим та бічним розсіюванням з наступним синглетним порогом для виключення з аналізу гранулоцитів та клітинного дебрису. Стратегія гейтування клітинних субпопуляцій серед CD45⁺ клітин на основі експресії відповідних поверхневих маркерів представлена на **Ошибка! Источник ссылки не найден**. Відсоток Т-клітин (CD45⁺CD3⁺), В-клітин (CD45⁺CD19⁺), NK (CD45⁺CD16/56⁺) та моноцитів (CD45⁺CD14⁺) був перерахований на кількість CD45⁺ клітин. Подальші субпопуляції клітин були оцінені серед відповідних описаних вище популяцій. Серед популяцій CD4⁺ та CD8⁺ клітини були оцінені регуляторні (CD25⁺), Т клітини пам'яті (CD45RO⁺), ефекторні (CD127⁺) та активовані (HLA-DR⁺), а також зрілі CD57⁺ або CD279⁺ клітини. Стратегія гейтування Т- клітин представлена на рис. 2.4. Серед дендритних клітин були визначені наступні субпопуляції CD1c, CD11b, CD11c та CD303. Стратегія гейтування дендритних клітин зображена на рис. 2.5.

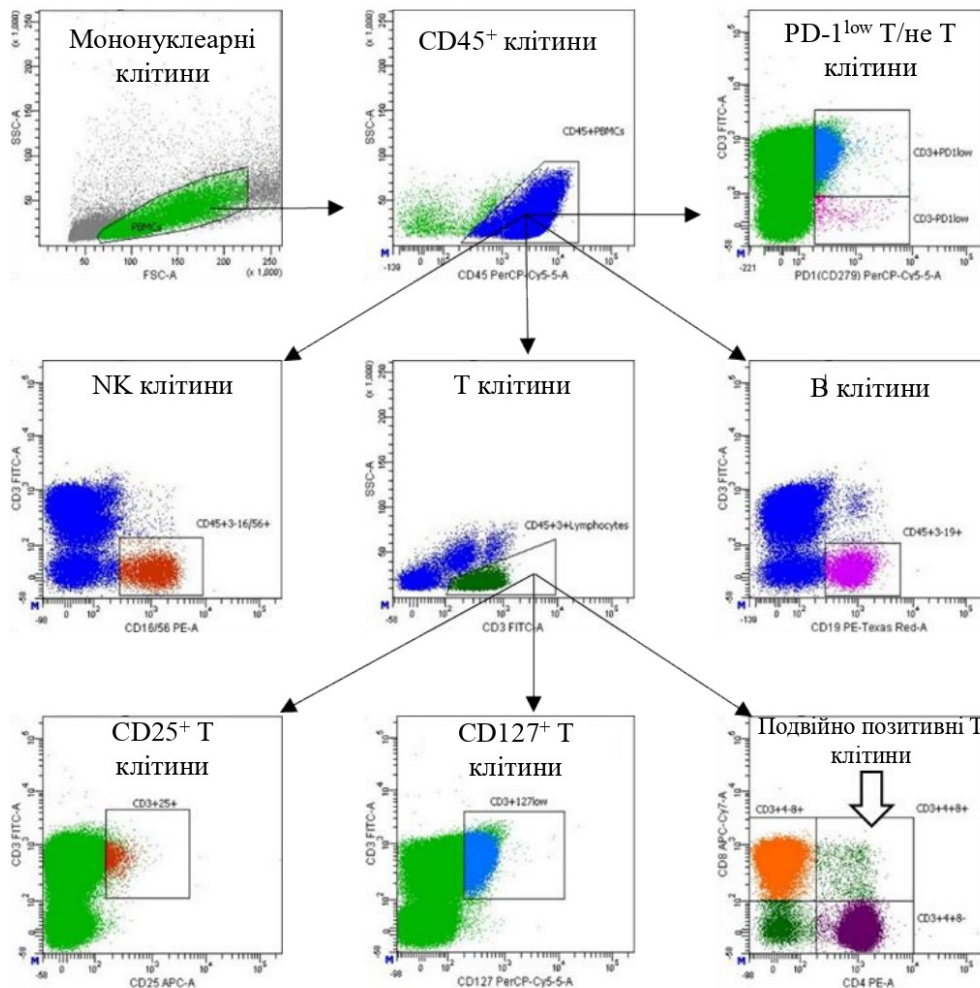
Таблиця 2.4.

Послідовність відділення відповідних субпопуляцій імунних клітин

Субпопуляція клітин	Клас клітин
CD45 ⁺ /SSC	CD45 ⁺ мононуклеари
CD45 ⁺ 14 ⁺	моноцити
CD45 ⁺ CD3 ⁺	Т-клітини
CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺	В-клітини
CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD16/56 ⁺	NK-клітини
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	Th клітини
CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺	цитотоксичні Т лімфоцити
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	Подвійно-позитивні Т-клітини
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	CD25 ⁺ Т клітини
CXCR3 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	Ефекторні CD4 ⁺ Т клітини
CXCR3 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺	Ефекторні CD8 ⁺ Т клітини
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ HLA-DR ⁺	Активовані CD4 ⁺ Т клітини
CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺ HLA-DR ⁺	Активовані CD8 ⁺ Т клітини
CD4 ⁺ CD45RO ⁺	Т-клітини пам'яті
CD45 ⁺ CD1c ⁺ HLA-DR ⁺	Класичні дендритні клітини
CD45 ⁺ CD303 ⁺ HLA-DR ⁺	Плазмоцитарні дендритні клітини
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD57 ⁺ PD-1 ^{+/-}	Старіючі CD4 ⁺ Т клітини
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD57 ⁺ PD-1 ^{+/-}	Старіючі CD8 ⁺ Т клітини
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD57 ⁺ PD-1 ⁺ CD45RO ^{+/-}	Старіючі CD4 ⁺ Т клітини пам'яті

Продовження табл. 2.4.

Субпопуляція клітин	Клас клітин
$CD3^+CD8^+CD57^+PD-1^+CD45RO^{+/-}$	Старіючі $CD8^+$ Т клітини пам'яті
$CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{low}$	Регуляторні $CD4^+$ Т клітини
$CD3^+CD8^+CD25^+CD127^{low}$	Регуляторні $CD8^+$ Т клітини
$CD45^+CD14^+CD11c^+CD11b^{mid}$	Регуляторні дендритні клітини
$CD3^+CD4^+HLA-DR^{+/-}PD-1^{+/-}$	Виснажені $CD4^+$ Т клітини пам'яті
$CD3^+CD8^+HLA-DR^{+/-}PD1^{+/-}$	Виснажені $CD8^+$ Т клітини пам'яті

Рис. 2.3. Стратегія гейтування $CD45^+$ клітин

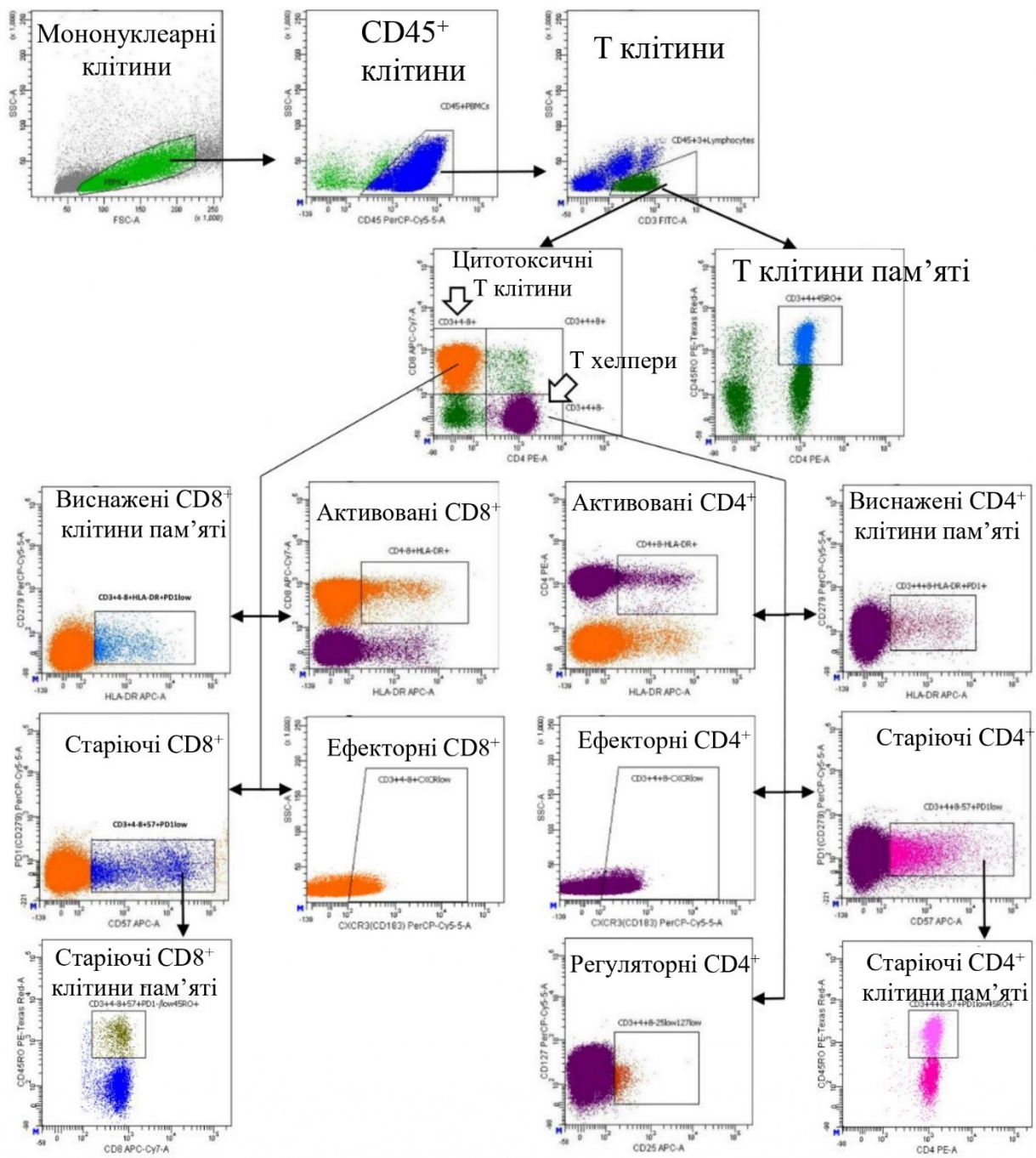


Рис. 2.4. Стратегія гейтування Т- клітин

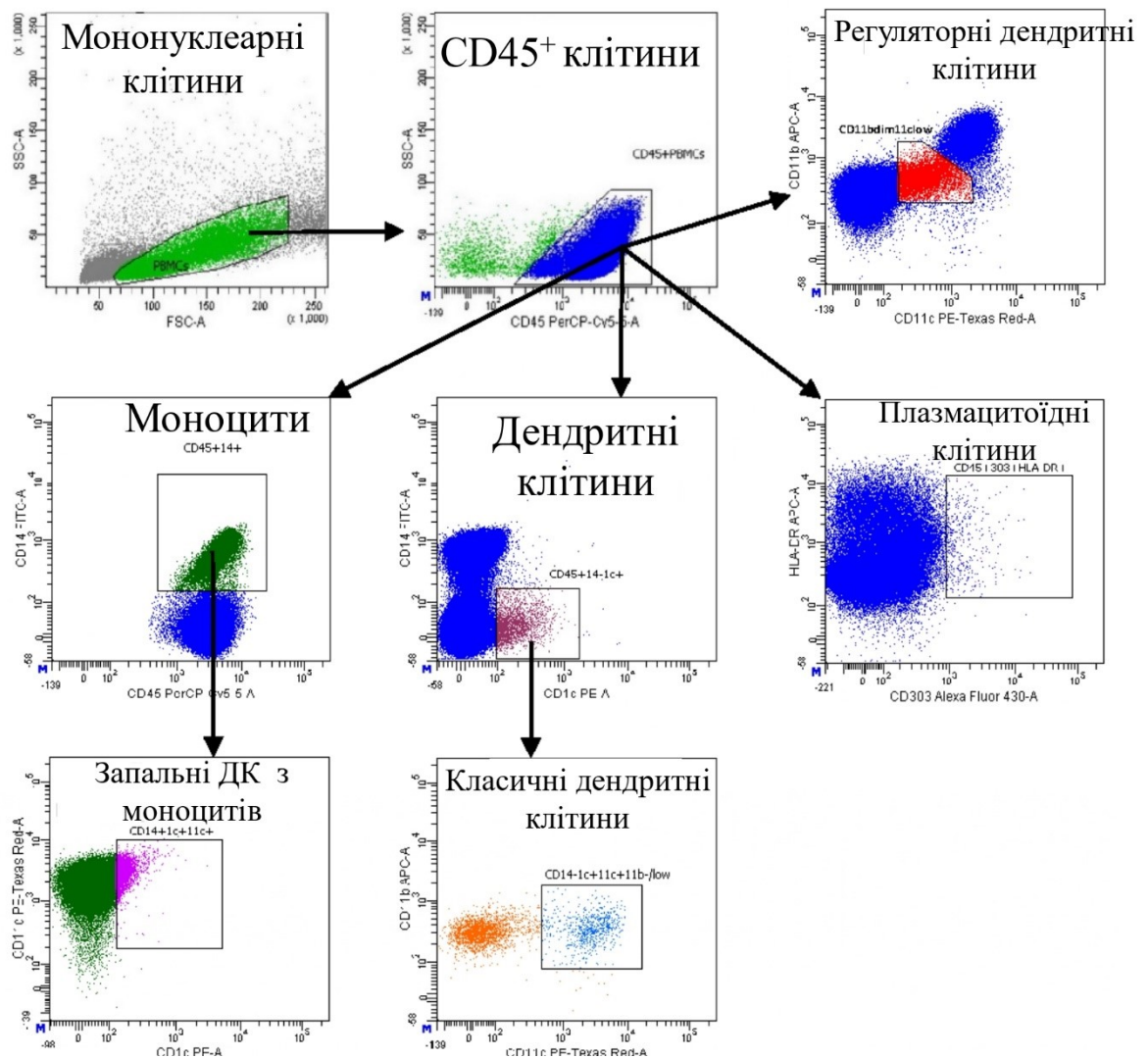


Рис. 2.5. Стратегія гейтування дендритних клітин

2.14. Спільне культивування МКПК з МСКПЛ

Мононуклеарні клітини периферичної крові (МКПК) від пацієнтів з COVID-19 ($n=6$) ресуспендували в RPMI-1640 (Gibco, США) з 10% термоінактивованої ФБС. МКПК (5×10^5) поміщали у вкладиш ThinCerts™-TC (Greiner Bio-One, США) з діаметром пор 0,4 мкм у загальному об'ємі 500 мкл у присутності Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28 (Life Technologies AS, Норвегія) у співвідношенні кулька/клітина 1:5. Вкладиш з МКПК розміщували в лунці 24-лункового планшету, на дно якої висівали пул МСКПЛ. Пул МСКПЛ від трьох донорів формували для

уникнення донор-залежної гетерогенності і готували наступним чином. МСКПЛ, культивували, як описано вище (п.0), інкубували з 20 мкг/мл мітоміцину С у повному культуральному середовищі протягом 2 годин для перешкоджання їх подальшої проліферації, дисоціювали з поверхні за допомогою розчину 0,05 % трипсину та 0,02 % EDTA (Sigma, Великобританія), промивали, підраховували, змішували в рівних пропорціях (1:1:1) і пасажували при щільності інокуляції 1×10^5 на одну лунку 24-лункового планшета. Культури МКПК/МСКПЛ у співвідношенні 5:1 інкубували при 37 °С протягом 6 днів і збирали для подальших аналізів методами проточної цитофлуориметрії та секвенування РНК. Кондиціоноване середовище від культури МКПК/МСКПЛ збирали, аліквотили та зберігали при -80 °С для подальшого ІФА.

2.15. РНК-секвенування та біоінформатичний аналіз

Зразки МКПК, культивованих у присутності МСКПЛ та без них, готували в шести біологічних та двох технічних повторах. Тотальну РНК з МКПК екстрагували за допомогою набору для виділення RNA NucleoSpin (Macherey–Nagel, Франція) згідно з протоколом виробника. Бібліотеки RNA-seq були підготовлені компанією Novogene Co., LTD (Пекін, Китай) за допомогою Agilent SureSelect Automated Strand-Specific RNA Library Prep з селекцією за polyA. Підготовлені бібліотеки з мРНК секвенували на Illumina HiSeq2000, використовуючи стратегію секвенування на парних кінцях 150 bp (короткі «ріди») і довжиною «ріда» 20 млн пар зчитування на зразок. Необроблені дані у форматі fastq спочатку оброблялися за допомогою програмного забезпечення fastp. На цьому етапі чисті дані були отримані шляхом видалення «рідів», що містять адаптери, «рідів», що містять poly-N, і «рідів» низької якості з необроблених даних. У той же час було розраховано вміст Q20, Q30 і GC для чистих даних. Усі наступні аналізи базувалися на чистих даних високої якості. Послідовності парних кінців

були вирівняні з людським транскриптомом (ідентифікатор GEO: `ensembl_homo_sapiens_grch38_p12_gca_000001405_27`) за допомогою Hisat2 v2.0.5. featureCounts v1.5.0-p3 використовувався для підрахунку прочитаних основ, вирівняних з кожним геном. Потім для кожного гена розраховували FPKM (фрагменти на мільйон кілобаз) на основі довжини гена та кількості читань, вирівнених із цим геном. Гени зі скоригованим p -значенням $< 0,05$ і $|\log_2(\text{FoldChange})| > 0$ вважалися диференціально експресованими. Гени з диференціальною експресією представлені в Додатку Д. Чисті дані були збережені в NCBI Sequence Read Archive і доступні за номером PRJNA929329.

2.16. Статистичний аналіз

Для статистичного аналізу використовували програмне забезпечення SPSS версії 27.0 (SPSS Inc.). Для візуалізації даних використовували програмне забезпечення GraphPad Prism (версія 7.0a, Inc. San Diego, CA, USA). Змінні представлені як медіани з міжквартильними інтервалами, якщо не сказано інше. Для оцінки нормальності розподілу значень використовували тести Колмогорова-Смірнова. Для порівняння залежних від часу подій всередині групи використовувався критерій числових рангів Вілкоксона. Для порівняння відмінностей між групами в кожній часовій точці використовувався U-тест Манна-Уїтні з поправкою Бонферроні. Для порівняння споріднених груп застосовували парний t -тест. Тест рангової кореляції Спірмена був проведений для перевірки кореляції між змінними. Двобічна статистична значущість була встановлена на значенні $p \leq 0,05$ для всіх тестів. Диференціальний аналіз експресії проводили за допомогою пакета DESeq2 R (1.20.0). Гени зі скоригованим p -значенням $< 0,05$ і $|\log_2(\text{FoldChange})| > 0$ вважалися диференціально експресованими. Генна онтологія (GO) аналіз збагачення диференціально експресованих генів і статистичне збагачення диференціально експресивних генів у шляхах KEGG були реалізовані за допомогою пакета clusterProfiler R.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

РОЗДІЛ 3

Характеристика МСК пуповини людини

Аналіз експресії поверхневих маркерів МСКПЛ методом проточної цитофлуориметрії виявив високий рівень експресії CD105, CD73, CD90, і відсутність маркерів гемопоетичних клітин CD34, та CD45, відповідно до мінімальних критеріїв мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин, виданих ISCT [1]. Популяція клітин з фенотипом $CD90^{+}CD73^{+}CD105^{+}CD34^{-}CD45^{-}$ на P3 склала 98,6 % (94,5 – 99,9 %, n=10) (рис. 3.1).

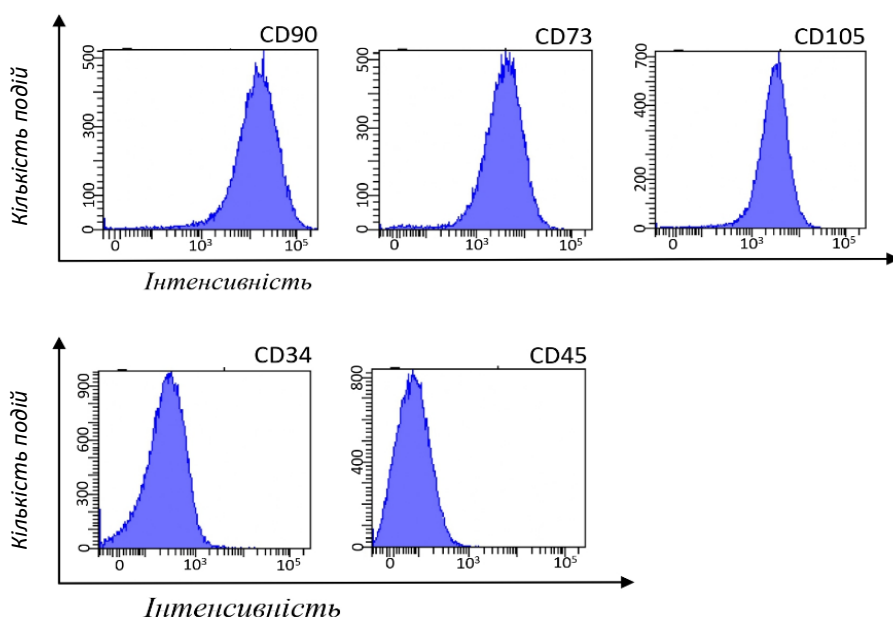


Рис. 3.1. Поверхневий фенотип МСКПЛ. Клітини були позитивними за експресією CD90, CD73, CD105 і негативними за експресією CD34 і CD45 на P3

Цитогенетичний аналіз показав, що культури МСКПЛ, отримані з пуповини доношених новонароджених мали нормальний каріотип, що відповідав статті новонароджених (46, ХУ або 46, ХХ) (рис. 3.2 а, б), а МСКПЛ експресували такі маркери клітин мезенхімального походження як віменти та α -актин гладеньких м'язів (рис. 3.2 в, г).

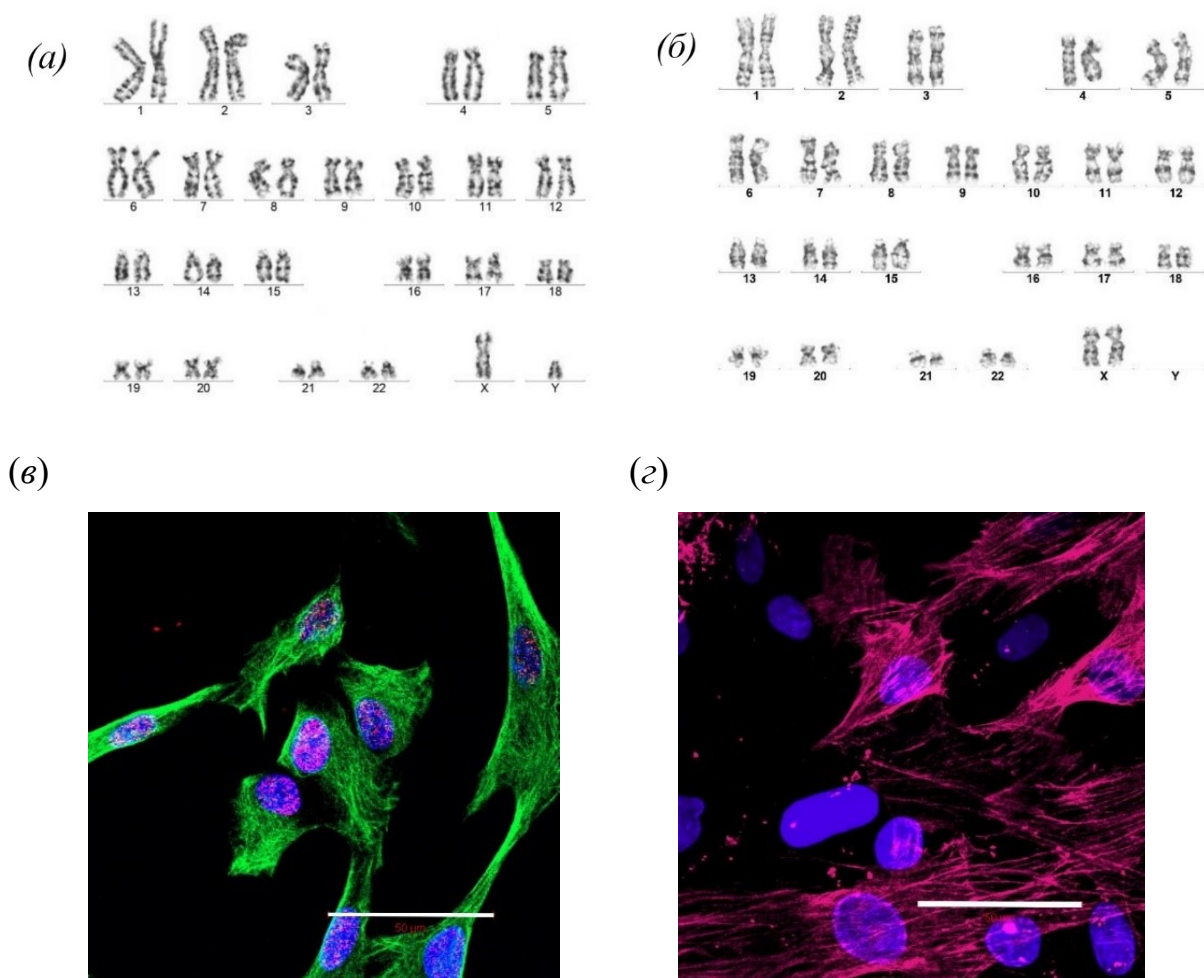


Рис. 3.2. Репрезентативний приклад нормального чоловічого (а) і жіночого (б) каріотипу лінії МСКПЛ на Р3. Експресія внутрішньоклітинних мезенхімальних маркерів в МСКПЛ: білки цитоскелету віментин (в, зелений) та α -актин гладеньких м'язів (г, рожевий). Масштаб: 50 мкм

При забарвленні аліزاریновим червоним і масляним червоним МСКПЛ на 21 добу після початку остеогенної і адипогенної індукції були виявлені

мінералізований матрикс і жирові включення відповідно, що підтверджує їх диференціювання в цих напрямках (рис. 3.3).

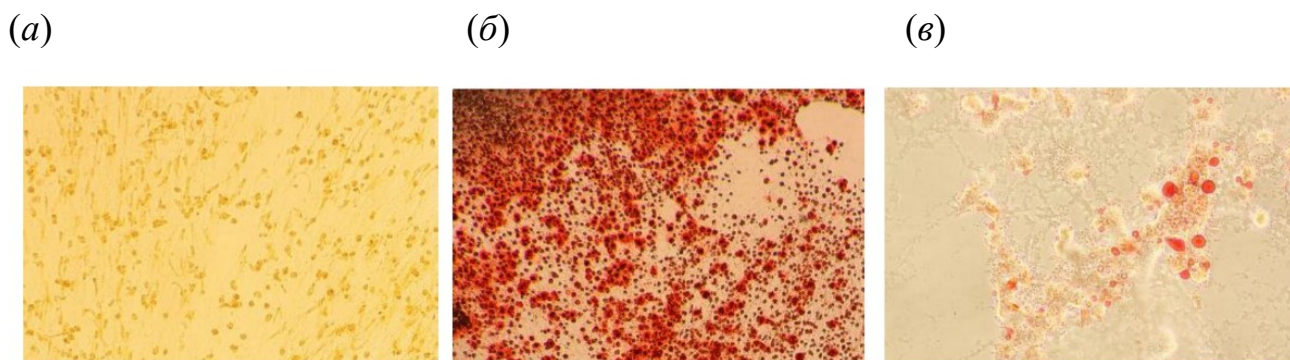


Рис. 3.3. Спрямоване диференціювання МСКПЛ. Велика кількість ліпідних вакуолей і поодинокі острівці позаклітинного кальцієвого матриксу були виявлені в культурах МСКПЛ на РЗ після індукції адипогенного та остеогенного диференціювання; контроль (а), остеогенний (б) та адипогенний (в) напрямки диференціювання. Фарбування Alizarin Red S та Oil Red O, відповідно, $\times 50$

Для валідації процесу трансфузії МСКПЛ розморожували та перерозчиняли у флаконі з 50 мл розчину для трансфузії, поступово випускаючи препарат через в/в катетер, під'єднаний до системи для трансфузій з інтервалом перемішування вмісту флакону кожні 15 хвилин. Критеріями оцінки на 20, 40 та 60 хвилині від початку трансфузії були життєздатність, кількість та розмір конгломератів та колонієутворююча активність МСКПЛ. Таким чином, було показано, що життєздатність та колонієутворююча активність клітин зберігається впродовж усього часу трансфузії та визначено, що перемішування вмісту флакону запобігає утворенню конгломератів МСКПЛ (рис. 3.4).

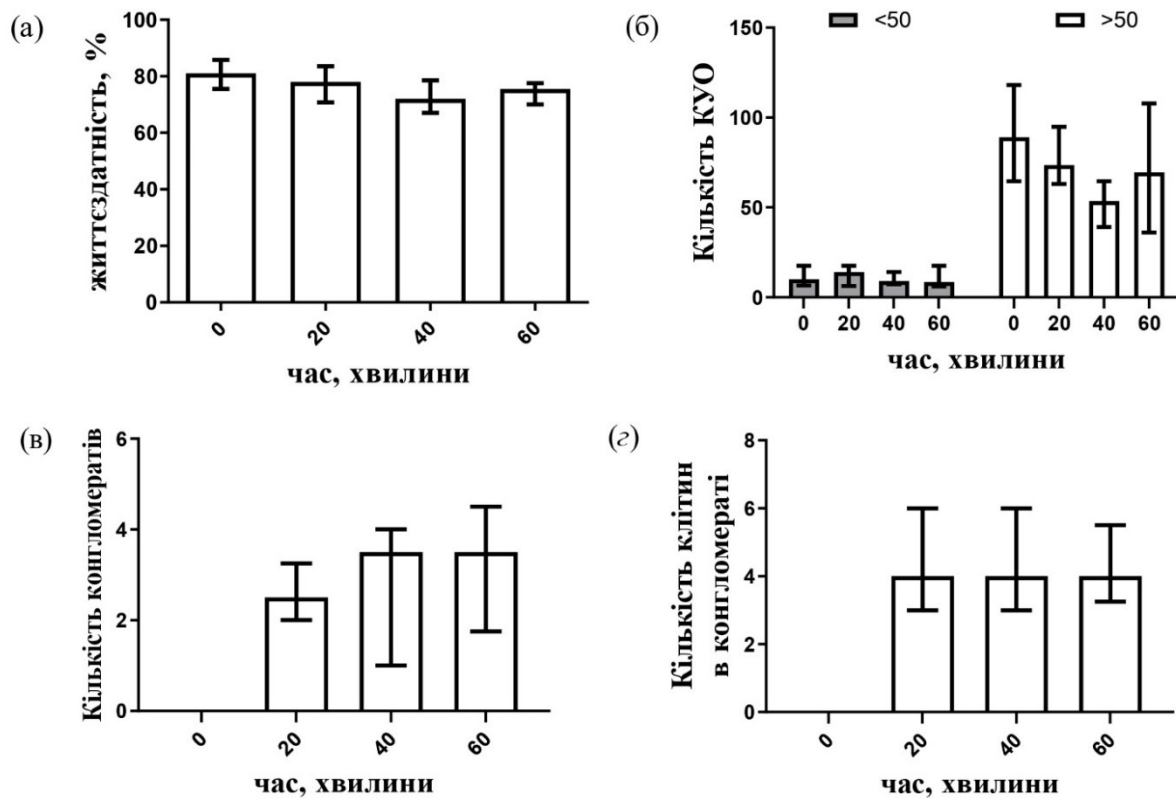


Рис. 3.4. Валідація трансфузії МСКПЛ. (а) Життєздатність клітин через різні проміжки часу; кількість конгломератів (б) та кількість клітин в конгломераті (в); КУО через різні проміжки часу в розрахунку на 500 клітин: <50 кластери, >50 колонії. Дані представлені як медіана та міжквартильний інтервал, n=8, два технічні повтори

РОЗДІЛ 4

Динамічні зміни імунотипу пацієнтів з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2 в розрізі характеристики протікання хвороби

4.1. Профіль субпопуляцій лімфоцитів у пацієнтів з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2

Для розуміння змін в встановлені клітинного імунітету при розвитку коронавірусної хвороби було проведено цитофлуориметричний аналіз різних субпопуляцій лейкоцитів в хворих з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2 (група COVID-19), та здорових волонтерів (група контролю). Відсоток основних підгруп лімфоцитів у периферичній крові пацієнтів показаний на рис. 4.1 та рис 4.2.

Відсоток CD45⁺ лімфоцитів на 7-й день у хворих був значно нижчим, ніж у здорових донорів ($p \leq 0,05$), але відновився на 14-й день (рис. 4.1 а). Середнє значення вмісту Т-клітин (CD45⁺CD3⁺) серед CD45⁺ клітин у хворих з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2, було вище значень у контрольній групі на день 0, потім нормалізувалося на 7 день і повернулося до підвищеного рівня на 14 і 28 дні ($p \leq 0,05$) (рис. 4.1 б). Відсоток В-клітин (CD19⁺) серед CD45⁺ клітин досяг максимуму на 7-й день порівняно зі значеннями на 14-й і 28-й дні та значно відрізнявся від показників контрольної групи протягом першого тижня госпіталізації (рис. 4.1 в). Відсоток NK-клітин (CD3⁻CD16⁺CD56⁺) серед CD45⁺ клітин був зниженим протягом 28 днів спостереження порівняно з контрольною групою, при цьому найнижчий рівень було зафіксовано на 7 день від початку госпіталізації (рис. 4.1 г). Вміст подвійно позитивних (DP) Т-клітин CD3⁺CD4⁺CD8⁺ серед мононуклеарних лейкоцитів у хворих з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2, був нижчим у дні 0 і 7 і відновився до значень контрольної групи на дні 14 і 28 (рис. 4.1 д).

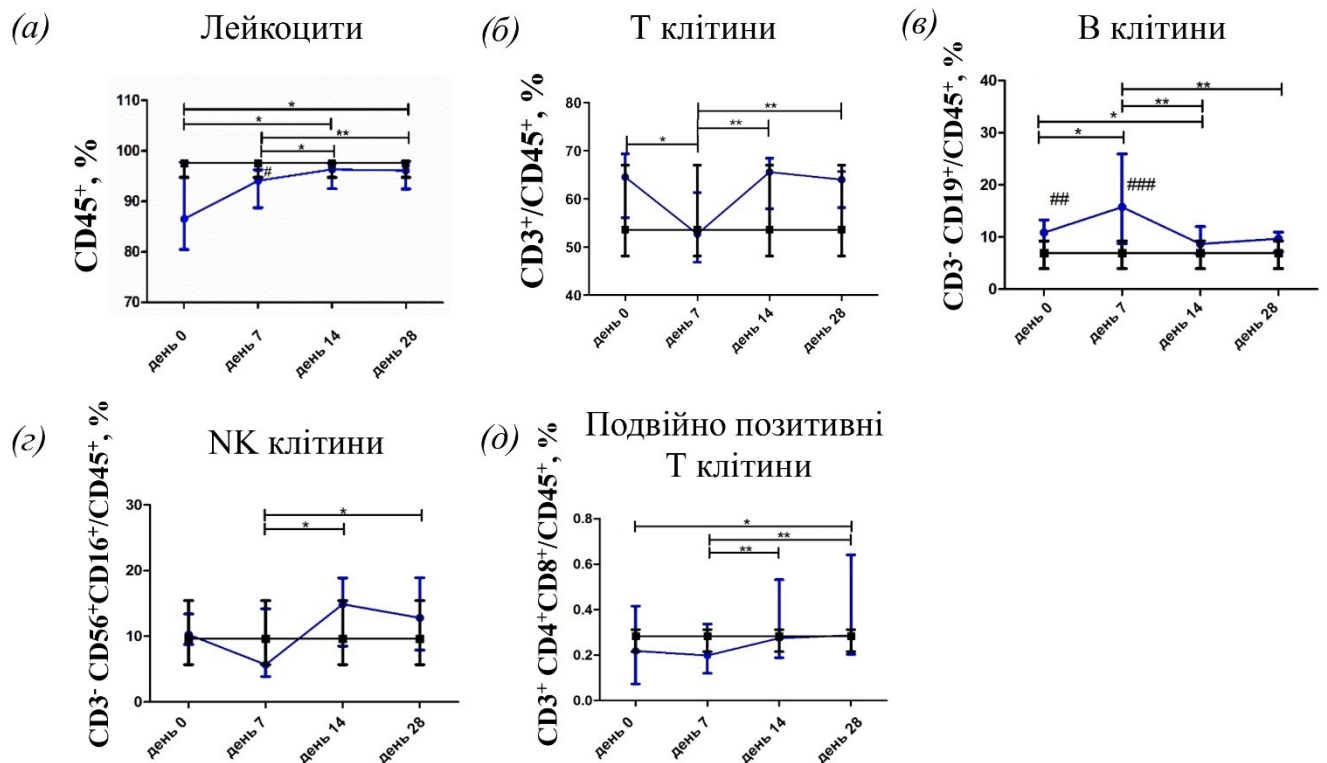


Рис. 4.1. Частота основних підгруп лімфоцитів у периферичній крові пацієнтів ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2. Критерій Вілкоксона: * - $p \leq 0.05$; ** - $p \leq 0.01$; *** - $p \leq 0.001$. Тест Манна-Уїтні був використаний для порівняння значень між групами COVID-19 та контролем у кожній точці спостереження: #- $p \leq 0,05$. Синя лінія (коло) зображує групу COVID-19, $n=14$; чорна лінія (квадрат) - група контролю, $n=17$

Частота клітин, що експресують PD-1, як у $CD3^+$, так і в $CD3^-$ популяціях Т-клітин поступово збільшувалася протягом чотирьох тижнів спостереження (рис.4.2 а та б, відповідно). Значне зростання кількості $CD3^+PD-1^{low}$ клітин відбулося з 7 до 14 дня ($p \leq 0,01$), тоді як частка $CD3^-PD-1^{low}$ клітин зросла протягом першого тижня госпіталізації, і досягла плато з 7 дня спостереження. Відсоток Т-клітин з експресією $PD-1^{low}$ був значно вищим у пацієнтів ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2, на 14 і 28 дні порівняно з контрольною групою. Відсоток не-Т-клітин, що експресували $PD-1^{low}$ був значно нижчим на початку госпіталізації порівняно з групою здорових добровольців без COVID-19.

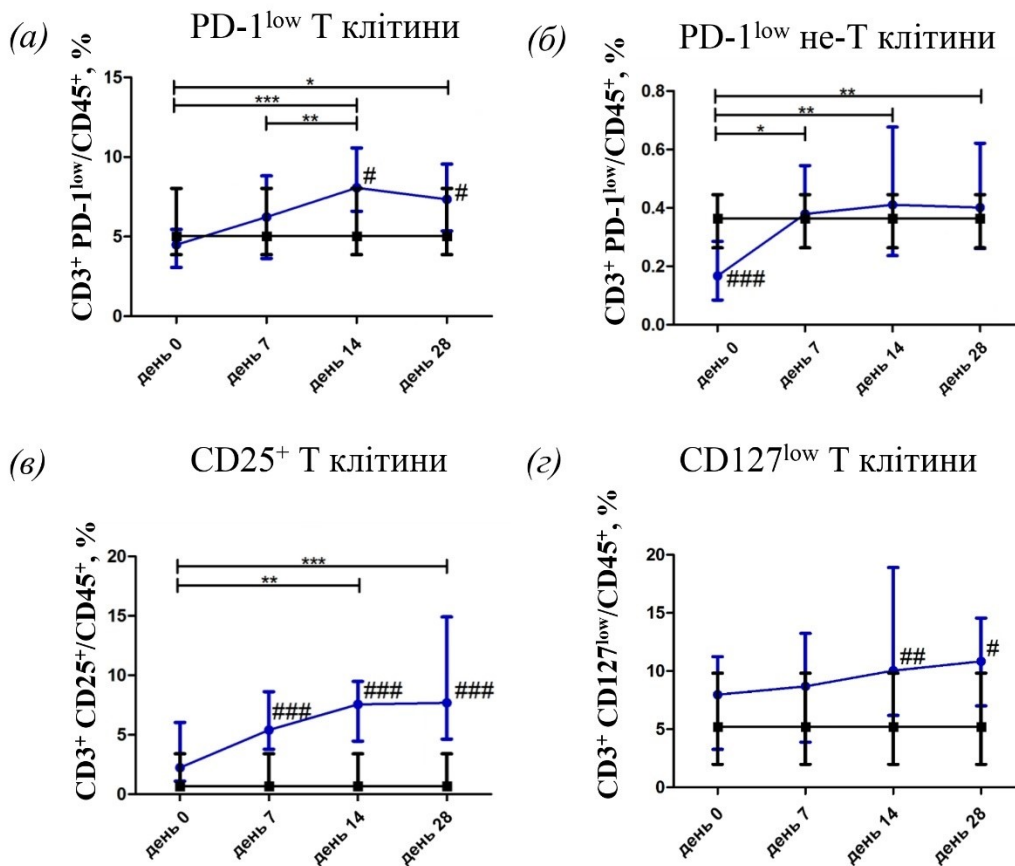


Рис. 4.2. Частота Т і не Т клітин у периферичній крові пацієнтів із COVID-19. Частота Т і не Т клітин у периферичній крові пацієнтів із COVID-19. Критерій Вілкоксона: * - $p \leq 0.05$; ** - $p \leq 0.01$; *** - $p \leq 0.001$. Тест Манна-Уїтні був використаний для порівняння значень між групами COVID-19 та контролем у кожній точці спостереження: #- $p \leq 0,05$. Синя лінія (коло) зображує групу COVID-19, $n=14$; чорна лінія (квадрат) - група контролю, $n=17$

Вміст CD25⁺ Т-клітин серед CD45⁺ клітин збільшувався протягом 28 днів спостереження і був достовірно вищим в групі хворих з групи COVID-19, ніж у контрольній групі, починаючи з 7 дня (рис.4.2 в). Відсоток CD127⁺ Т-клітин продемонстрував послідовне незначне зростання протягом періоду спостереження, досягнувши значної різниці порівняно з показниками контрольної групи на 14 і 28 день (рис.4.2 г).

Основні дані кореляційного аналізу основних груп лімфоцитів з периферичної крові хворих в групі COVID-19 представлені в Додатку Б та на

рис.4.3 та рис.4.4. Вміст NK-клітин корелював із вмістом регуляторних дендритних клітин ($r=0,503$, $p\leq 0,001$), тоді як відсоток нейтрофілів негативно корелював з плазмоцитоїдними дендритними клітинами ($r=-0,405$, $p\leq 0,001$). Вміст $CD3^+CD25^+$ клітин корелював з субпопуляціями $CD8$ Т-клітин: виснаженими ($r=0,854$, $p\leq 0,001$), активованими ($r=0,810$, $p\leq 0,001$) та зрілими ($r=0,701$, $p\leq 0,001$). Аналіз виявив негативну кореляцію між мієлоїдними клітинами $CD14^+$ і популяціями Т-клітин: подвійно позитивними $CD4^+CD8^+$ ($r=-0,325$, $p\leq 0,01$), Th-клітинами ($r=-0,807$, $p\leq 0,001$), цитотоксичними Т-клітинами ($r=-0,311$, $p\leq 0,01$), $PD-1^{low}$ ($r=-0,449$, $p\leq 0,001$) і $CD127^{low}$ субпопуляціями ($r=-0,470$, $p\leq 0,001$).

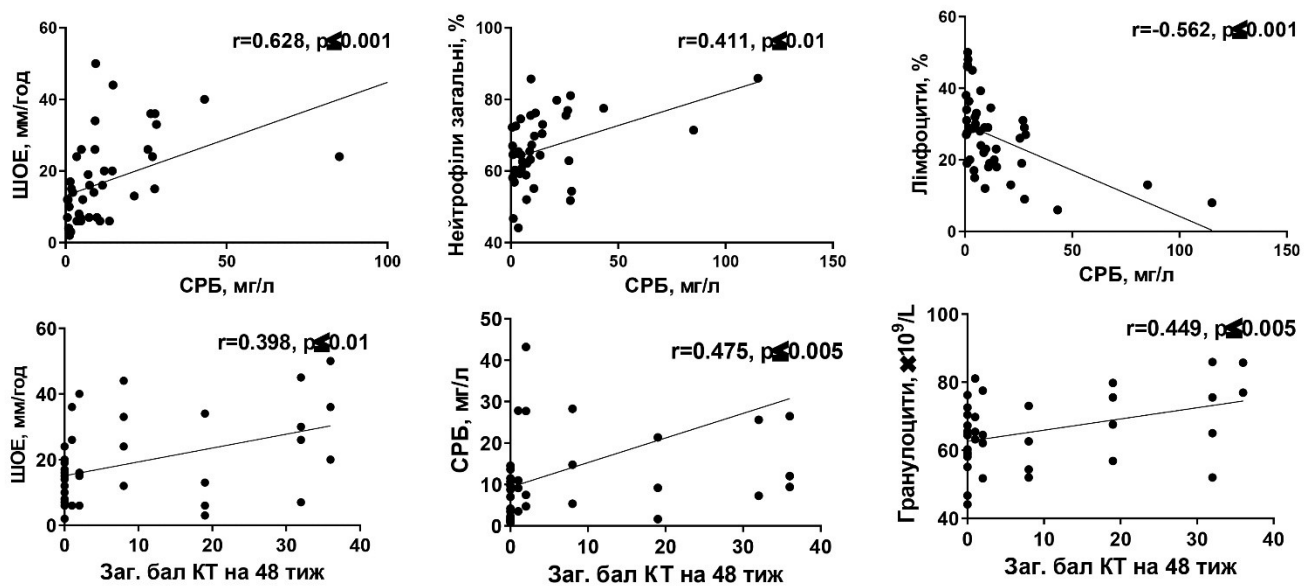


Рис.4.3. Дані кореляційного аналізу між гематологічними параметрами, С-реактивним білком і показниками КТ легень на 48 тижні хворих у групі COVID-19; r – коефіцієнт рангової кореляції Спірмена, двобічна статистична значущість встановлена на значенні $p\leq 0,05$. Усі дані кореляційного аналізу доступні в Додатку Б

Описане нами зниження відсотка Т-клітин і NK-клітин серед усіх лейкоцитів на 7 день госпіталізації та одночасне підвищення відсотка В-клітин може бути пов'язане з лікуванням кортикостероїдами, якого зазнавали хворі в перший тиждень госпіталізації [181,182]. Загалом, інші групи авторів не виявили змін у популяції В-лімфоцитів [183,184]. В нашому дослідженні відсоток NK-клітин ($CD3-CD56^+CD16^+$) серед $CD45^+$ клітин у пацієнтів з ГРДС, спричиненим SARS-

СоV-2, був нижчим у порівнянні з контрольною групою, як вже повідомлялось раніше [185,186].

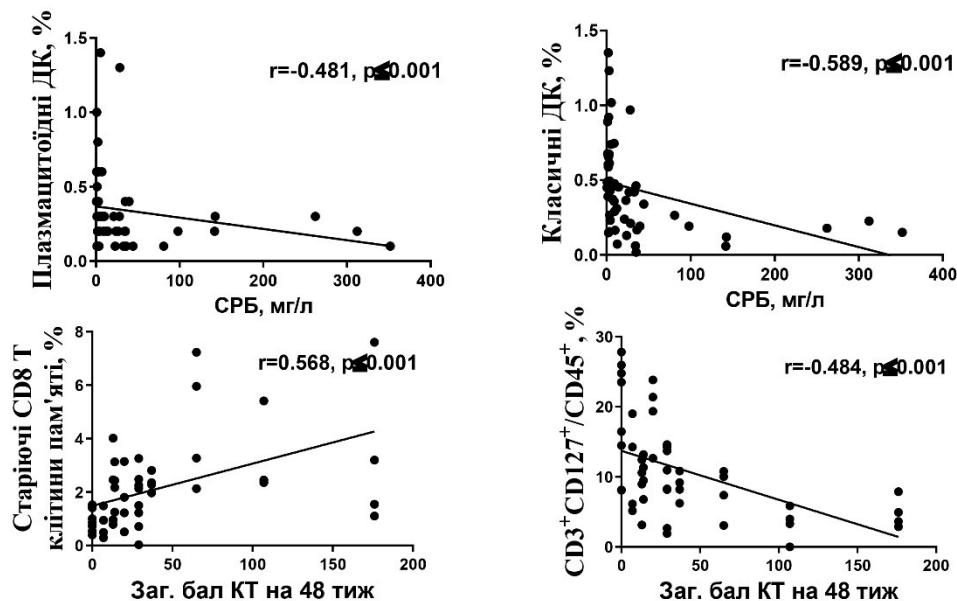


Рис.4.4. Дані кореляційного аналізу між С-реактивним білком, показниками КТ легень і основними групами лімфоцитів з периферичної крові хворих у групі COVID-19; r – коефіцієнт рангової кореляції Спірмена, двобічна статистична значущість встановлена на значенні $p \leq 0,05$. Усі дані кореляційного аналізу доступні в Додатку Б

PD-1 знижує регуляцію проліферації та продукування цитокінів Т-клітинами та контролює пошкодження нормальних тканин під час інфекції [187]. Більш того, раніше повідомлялося, що при аутоімунних захворюваннях відсоток та абсолютна кількість PD-1-експресуючих CD3⁺CD4⁺ та CD3⁺CD8⁺ Т-клітин значно підвищувався [188]. Наші результати показали більш високу частоту PD-1 позитивних Т та не-Т-клітин у різні точки спостереження порівняно з 0-м днем у пацієнтів з групи COVID-19.

CD3⁺CD4⁺CD8⁺ подвійно-позитивні Т клітин – це окрема незначна популяція клітин, яка особливо відокремлюється при розвитку вірусної інфекції і можуть проявляти як цитотоксичні, так і імуносупресивні властивості [189–191]. Підвищення рівня подвійно-позитивних Т клітин з імунофенотипом CD3⁺CD4⁺CD8⁺ серед лейкоцитів може свідчити про їх функціональне значення

для боротьби з довготривалими інфекціями у процесі відновлення. Однак, було виявлено, що зниження абсолютної кількості лімфоцитів $CD3^+CD4^+CD8^+$ у пацієнтів було пов'язано зі ступенем важкості перебігу COVID-19 [191].

Ми продемонстрували послідовне зростання вмісту $CD25^+$ та $CD127^+$ Т-клітин впродовж 28 днів від початку госпіталізації. Наші дані узгоджуються з раніше опублікованими, де повідомлялося про підвищену експресію $CD25^+$ на Т-клітинах у пацієнтів з тяжкою формою COVID-19 порівняно з легкою формою [192,193], але динамічні зміни даної популяції клітин впродовж 28 днів від початку госпіталізації пацієнтів описано вперше. Також, ми вперше дослідили динамічні зміни в рівні $CD127$ -експресуючих Т-клітини, які нещодавно були запропоновані як відповідальні за формування специфічного довготривалого Т-клітинного імунітету саме проти SARS-CoV-2 інфекції [194].

4.2. Динамічний профіль змін субпопуляцій Т-клітин у хворих з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2

CD8 Т-клітини. Вміст цитотоксичних $CD3^+CD4^-CD8^+$ та ефektorних $CD3^+CD4^-CD8^+CXCR3^{low}$ Т-клітин неухильно зростав від 0 до 28 дня (рис.4.5 а, б). Вміст активованих $CD3^+CD4^-CD8^+HLA-DR^+$ і виснажених $CD3^+CD4^-CD8^+HLA-DR^+PD-1^{low}$ Т-клітин зростав протягом усього періоду спостереження та був значно вищим на 7, 14 і 28 дні порівняно з добровольцями, які не були інфіковані SARS-CoV-2 (рис.4.5 в, е). Цікаво, що вміст активованих Т-клітин на 28-й день залишався значно вищим у групі COVID-19 порівняно з контрольною групою. Відсоток старіючих CD8 Т-клітин $CD3^+CD4^-CD8^+CD57^+PD-1^{low}$ та їхня субпопуляція пам'яті $CD3^+CD4^-CD8^+CD57^+PD-1^{low}CD45RO^+$ почали збільшуватися з 7-го дня і досягли максимального значення на 28 день (рис.4.5 г, д). Порівняно з у контрольній групі вміст зрілих $CD8^+$ Т-клітин і субпопуляція пам'яті зрілих $CD8^+$ Т-клітин були значно вищими на 14 і 28 день ($p \leq 0,05$ і $p \leq 0,01$ відповідно). Знижений відсоток регуляторних CD8 Т-клітин $CD3^+CD4^-CD8^+CD25^+CD127^{low}$ серед $CD45^+$ клітин спостерігався на 0-й день, однак зростав

починаючи з 7-го дня та залишався близьким до діапазону контрольної групи до 28 дня (рис.4.5 ж).

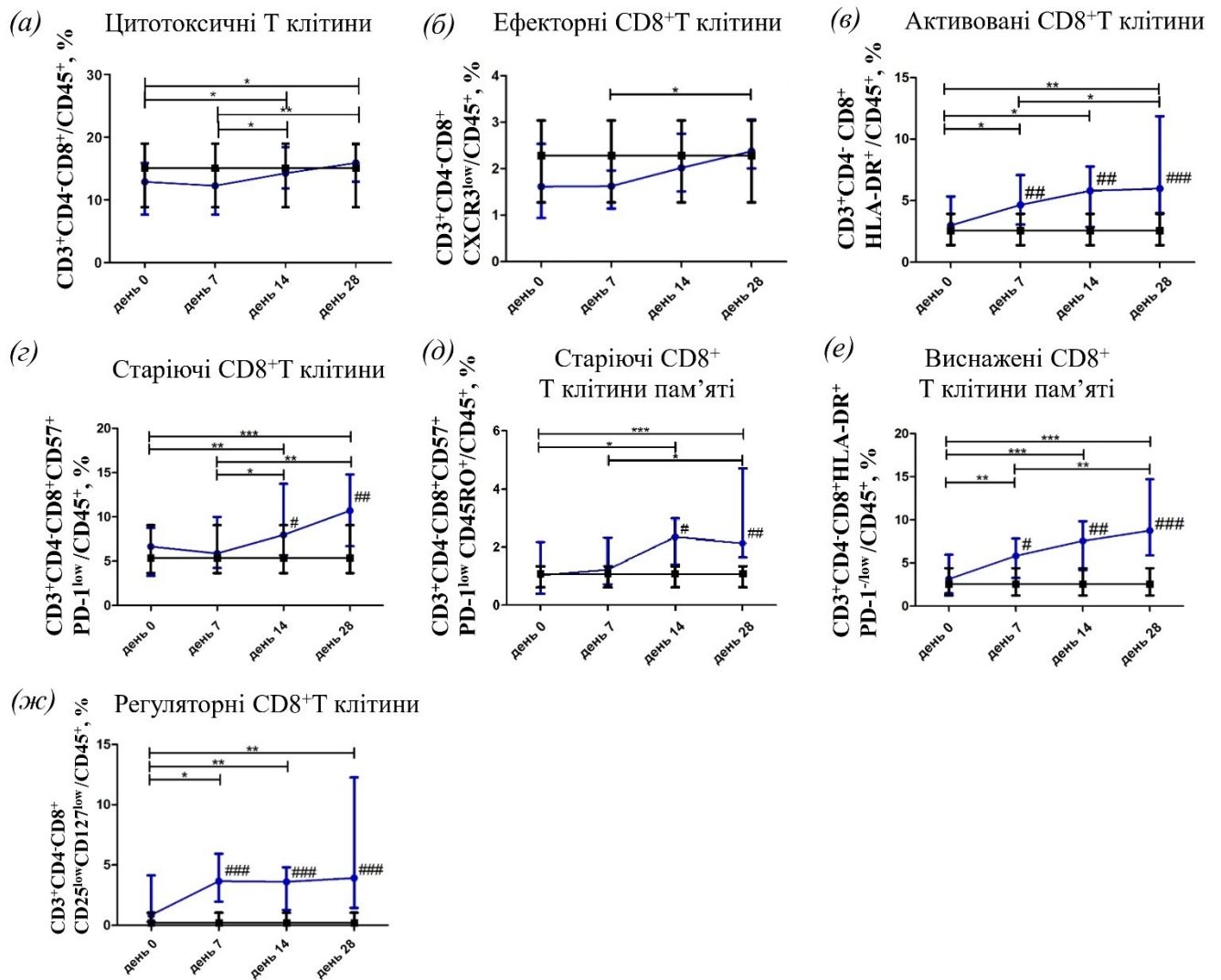


Рис.4.5. Зміни субпопуляцій $CD8^{+}$ лімфоцитів. Критерій Вілкоксона: * - $p \leq 0.05$; ** - $p \leq 0.01$; *** - $p \leq 0.001$. Тест Манна-Уїтні був використаний для порівняння значень між групами COVID-19 та контролем у кожній точці спостереження: # - $p \leq 0.05$; ## - $p \leq 0.01$. Синя лінія (коло) зображує групу COVID-19, $n=14$; чорна лінія (квадрат) - група контролю, $n=17$

CD4 Т-клітини. Відсоток Th клітин $CD3^{+}CD4^{+}CD8^{-}$ серед популяції $CD45^{+}$ значно збільшився з дня 0 до 14-го дня (рис.4.6 а). Субпопуляція $CD4^{+}$ Т-клітин пам'яті $CD3^{+}CD4^{hi}CD45RO^{+}$ стабільно зростала протягом чотирьох тижнів (рис.4.6 б). Вміст ефекторних $CD3^{+}CD4^{+}CD8^{-}CXCR3^{+}$ та активованих $CD3^{+}CD4^{+}CD8^{-}HLA-$

DR⁺ CD4 Т-клітин серед CD45⁺ лімфоцитів збільшувався протягом 28 днів з найвищим значенням на 14 день (рис.4.6 в, г). Виснажені CD4 Т клітини CD3⁺CD4⁺CD8⁻HLA-DR⁺PD-1^{-low} та старіючі клітини пам'яті CD3⁺CD4⁺CD8⁻CD57⁺PD-1⁻CD45RO⁺ поділяли таку саму поведінку, що і ефекторні CD4 Т-клітини (рис.4.6 д, е). Кількість старіючих CD4 Т-клітин CD3⁺CD4⁺CD8⁻CD57⁺PD-1⁻ серед CD45⁺ лімфоцитів збільшувалася протягом 28 днів (рис.4.6 ж). Вищезгадані субпопуляції CD4 Т -клітин не відрізнялися в порівнянні з контрольною групою. Цікаво, що відсоток регуляторних CD4 Т-клітин CD3⁺CD4⁺CD8⁻CD25^{low}CD127^{low} серед CD45⁺ клітин збільшувався і залишався значно вищим на 14 та 28 день порівняно з контрольною групою (p≤0,05) (рис.4.6 з).

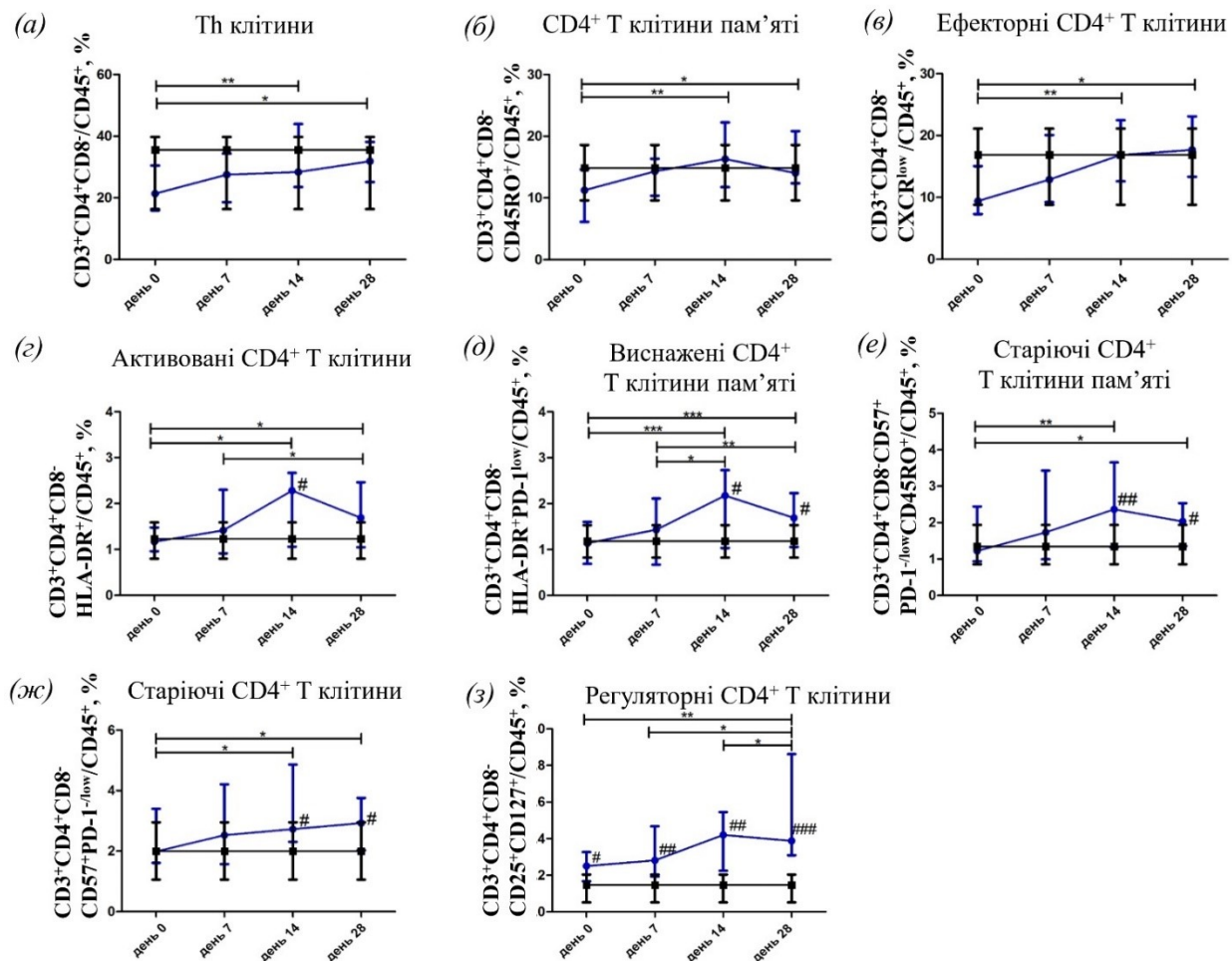


Рис.4.6. Зміни субпопуляцій CD4⁺ лімфоцитів. Критерій Вілкоксона: * - p≤0.05; ** - p≤0.01; *** - p≤0.001. Тест Манна-Уїтні був використаний для порівняння значень між групами COVID-19 та контролем у кожній точці спостереження: #-p≤0,05; ##-p≤0,01. Синя лінія (коло) зображує групу COVID-19, n=14; чорна лінія (квадрат) – група контролю, n=17

Порушення регуляції в реактивних CD8 і CD4 Т-клітинах було описано на ранній стадії розвитку імунної відповіді [195,196]. На 14-й день від початку госпіталізації пацієнтів, ми спостерігали серед популяцій CD4 Т-клітин підвищений вміст ефекторних, активованих, виснажених та старіючих клітин-пам'яті, а також старіючих CD8 Т-клітин пам'яті. І вже на 28-й день кількість цитотоксичних та активованих CD8 клітин досягала максимуму, що свідчить про активацію імунної відповідь проти прогресування запалення в легенях. Наші дані узгоджуються з попередніми дослідженнями, які повідомляли про зв'язок між високим рівнем експресії CD57 серед CD8 Т-клітин та імунним виснаженням у пацієнтів з важким COVID-19 [197].

У нашому дослідженні ми виявили сильну кореляцію між активованими CD4 або CD8 Т-клітинами та рівнем експресії PD-1. У той же час раніше відзначалася висока кореляція між клітинами, що експресують PD-1, та активованими CD4 Т-клітинами $CD38^{+}HLA-DR^{+}$, але не активованими CD8 Т-клітинами [198]. Регуляторні CD8 Т-клітини мають важливі імуносупресивні функції і здатні ефективно блокувати надмірну реакцію імунної відповіді [199]. Ми виявили позитивну кореляцію між регуляторними CD8 Т-клітинами та різними субпопуляціями цитотоксичних Т-клітин у пацієнтів з COVID-19, тоді як Gao та ін. [200] показали, що регуляторні CD8 Т-клітини негативно корелюють з частотою цитотоксичних CD8 Т-клітин у крові пацієнтів з легкою та помірною інфекцією COVID-19.

4.3. Динамічний профіль змін субпопуляцій мієлоїдних мононуклеарів у хворих на COVID-19

Відсоток $CD45^{+}CD14^{+}$ моноцитів серед $CD45^{+}$ клітин крові поступово зменшувався протягом 28 днів (рис.4.7 а). Вміст класичних дендритних клітин $CD14^{-}CD11c^{+}CD11b^{low}CD1c^{+}$ був достовірно нижчим на 0 і 7 день ($p \leq 0,05$) порівняно з контрольною групою та мав тенденцію до нормалізації на 14-й та 28-й

дні (рис.4.7 б). Вміст $CD14^+CD1c^+$ дендритних клітин підвищувався протягом періоду спостереження та був у межах норми (рис.4.7 в). Вміст плазмацитарних дендритних клітин $CD303^+HLA-DR^+$ був достовірно нижчим протягом перших 7 днів, ніж у контрольній групі, а потім достовірно зростав від 7 до 28 дня ($p \leq 0,01$) (рис.4.7 г).

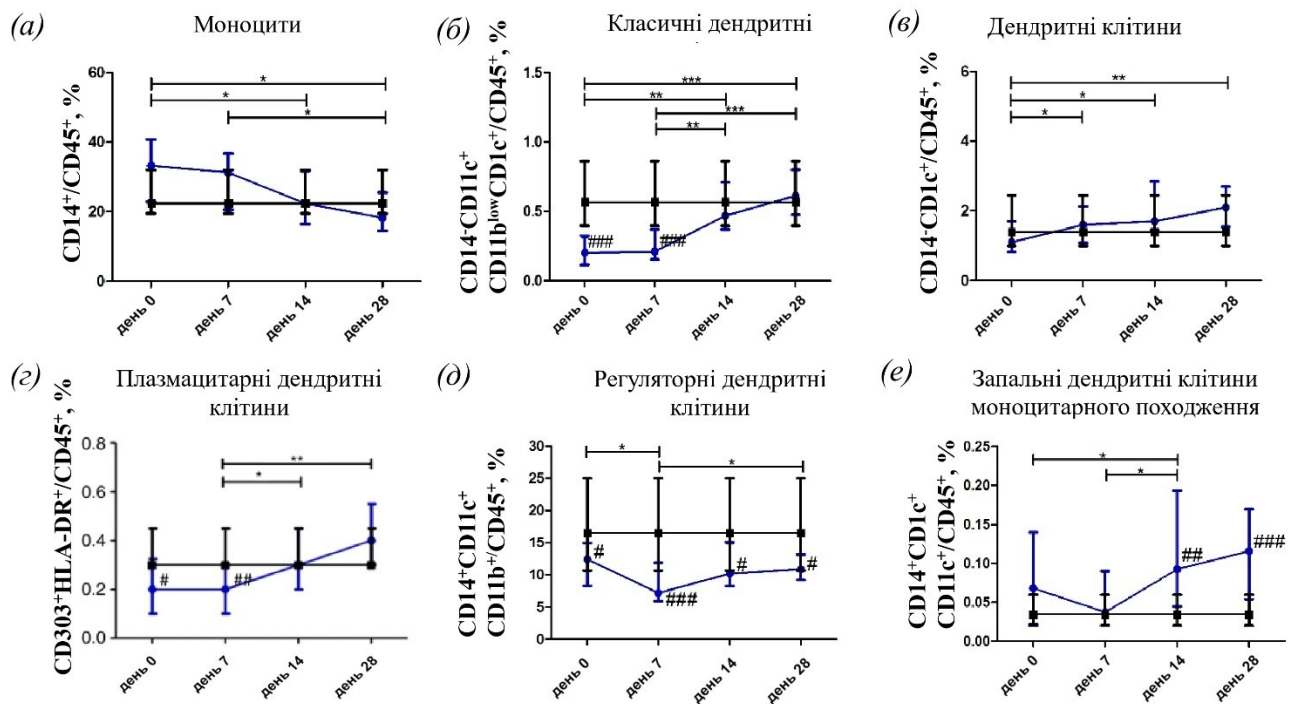


Рис.4.7. Зміни субпопуляцій міелоїдних клітин. Зміни субпопуляцій міелоїдних клітин. Критерій Вілкоксона: * - $p \leq 0.05$; ** - $p \leq 0.01$; *** - $p \leq 0.001$. Тест Манна-Уїтні був використаний для порівняння значень між групами COVID-19 та контролем у кожній точці спостереження: # - $p \leq 0,05$; ## - $p \leq 0,01$; ### - $p \leq 0,001$. Синя лінія (коло) зображує групу COVID-19, $n=14$; чорна лінія (квадрат) - група контролю, $n=17$

Порівняно з добровольцями, які не хворіли на COVID-19, відсоток регуляторних дендритних клітин $CD14^+CD11b^{dim}CD11c^{low}$ у пацієнтів з SARS-CoV-2 був значно меншим протягом чотирьох тижнів оцінки з найнижчим рівнем на 7-й день (рис.4.7 д). Відсоток запальних дендритних клітин моноцитарного походження $CD14^+CD1c^+CD11c^+$ поступово зростав з 7 по 28 день і досяг

значущої різниці на дні 14 і 28 ($p \leq 0,01$ і $p \leq 0,001$ відповідно) порівняно з контрольною групою (рис.4.7 *e*).

Ми припускаємо, що виявлений нами знижений вміст дендритних клітин з одночасним підвищенням відсотка плазмоцитарних дендритних клітин може бути викликаний кортикостероїдною терапією [201]. Ці дані узгоджуються з більш низькими відсотками плазмоцитарних та мієлоїдних дендритних клітин у крові у пацієнтів із тяжкою формою COVID-19 порівняно зі здоровими донорами [184]. Низький вміст клітин $CD1c^+$ у периферичній крові у важких пацієнтів з COVID-19 може бути наслідком посиленої міграції цих клітин до легенів [202].

РОЗДІЛ 5

Трансплантація мск пуповини хворим з ГРДС внаслідок COVID-19

5.1. Основні результати безпеки

Безпека застосування МСКПЛ оцінювалася за допомогою реєстрації побічних ефектів протягом 24 годин після кожної інфузії, включаючи колір шкіри та вимірювання артеріального тиску, температури тіла та пульсу пацієнта. Оцінку наявності будь-яких побічних ефектів проводили з моменту першої інфузії до закінчення випробування. Три послідовні інфузії МСКПЛ не мали істотних побічних ефектів.

5.2. Динаміка змін ступеню пошкодження легень у пацієнтів з ГРДС внаслідок пневмонії COVID-19

Ступінь ураження легень визначали за даними КТ та виражали в умовних одиницях. Дані на рис.5.1 представлені як медіана та міжквартильний інтервал. Тест Вілкоксона був використаний для порівняння всередині групи: *, $p \leq 0.05$, **, $p \leq 0.01$. U-тест Манна-Уїтні був використаний для порівняння між групами в кожній точці: #, $p \leq 0.05$. Він в поступово знижувався в обох групах протягом усього періоду спостереження і досяг значущої різниці між Контрольною та МСК групами на 48-й тиждень спостереження ($p < 0.05$), як показано на рис.5.1 в. В той же час, всередині кожної з груп було виявлено достовірну різницю між кожним періодом спостереження. Проте, в Контрольній групі ступінь ураження легень не змінився в період з 24 по 48 тижні (рис.5.1, а), тоді як в МСК групі цей параметр знизився (рис.5.1, б).

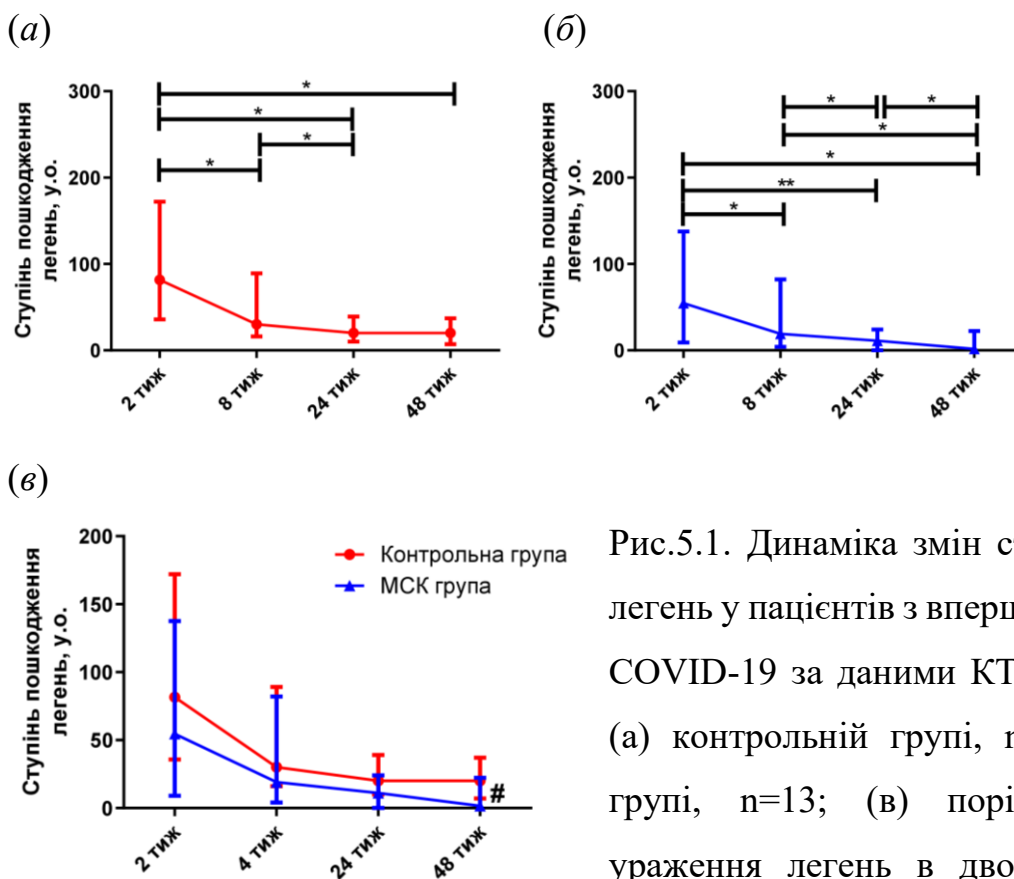


Рис.5.1. Динаміка змін ступеню ураження легень у пацієнтів з вперше діагностованим COVID-19 за даними КТ протягом року в (а) контрольній групі, $n=14$; (б) в МСК групі, $n=13$; (в) порівняння ступеню ураження легень в двох групах; у.о. – умовні одиниці

Позитивний вплив терапії МСК на легені як у короткостроковому, так і в довгостроковому періодах було показано раніше у пацієнтів із важким перебігом COVID-19 [203]. Крім того, інші автори опублікували покращення результатів КТ грудної клітки в перший місяць після інфузії МСК порівняно з плацебо [155,169]. В даній роботі було виявлено значне зменшення пошкодження легенів протягом одного року спостереження в групі МСК порівняно з Контрольною групою. У пацієнтів з групи МСК загальний бал ураження легенів за даними КТ поступово знижувався з 2-го до 48-го тижня спостереження, демонструючи сприятливий довгостроковий терапевтичний ефект МСКПЛ на перебіг фіброзних змін легенів, тоді як у Контрольній групі відновлення ураженої тканини легень спостерігалось лише до 24-го тижня із залишковими фіброзними змінами до 48-го тижня.

У даному дослідженні довгострокові (до одного року) покращення стану легенів пацієнтів з ГРДС, як видно за даними КТ, відповідали даним щодо трансплантації МСКПЛ при ХОЗЛ із сильним системним запаленням [142]. Згідно

з попередніми дослідженнями, після внутрішньовенної трансплантації МСК можуть накопичуватися в легеневих капілярах протягом короткого часу і можуть мінімізувати пошкодження альвеолярного епітелію та фіброз легень зменшуючи накопичення колагену та проникності ендотелію судин [204]. Також МСКПЛ можуть мати профілактичну дію при застосуванні на початку захворювання. Хоча численні доклінічні дослідження продемонстрували, що трансплантація МСКПЛ пацієнтам з ГРДС може значно послабити запалення та покращити відновлення пошкодженої легеневої тканини, результати наших та інших клінічних досліджень були неоднозначними, що підкреслює необхідність кращого розуміння цих механізмів у пацієнтів із ГРДС, який розвився внаслідок коронавірусної хвороби. Крім того, механізм інфузії МСКПЛ також впливає на стан пацієнтів, перебіг та кінцевий результат коронавірусної хвороби. Тому при плануванні стратегії лікування, слід прийняти до уваги кратність та дозу введених МСКПЛ, а також час, який минув від початку хвороби та стадію захворювання. Переважна більшість досліджень повідомляє про однократне введення МСК [145,146,170], в той час як дана робота демонструє пролонгований імуномодулюючий ефект МСКПЛ після трьох послідовних введеннь.

5.3. Динаміка змін гематологічних у пацієнтів з з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2

Динаміка параметрів крові у пацієнтів із з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2 (контрольна група) та МСК груп протягом 28 днів від початку лікування залежно від часу спостереження представлена на рисунках нижче. Дані представлені у вигляді медіани та міжквартильного інтервалу. Світло-зелений прямокутник відповідає нормальному діапазону. Знаково-ранговий критерій Вілкоксона для порівняння всередині групи: *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$. U-тест Манна-Уїтні для порівняння контрольної та МСК груп у кожній часовій точці: #, $p \leq 0,05$; ##, $p \leq 0,01$. Різниця в концентрації лейкоцитів, гранулоцитів, лімфоцитів і

нейтрофілів, відсотку еозинофілів і моноцитів не досягли значущості між двома групами, але динамічний профіль показав деякі дрібні зміни (рис.5.2, рис.5.3 та рис.5.6, відповідно). Так, кількість лейкоцитів зросла на 7-й день з наступним зниженням на 28-й день як у МСК, так і в Контрольній групах. У МСК групі концентрація гранулоцитів значно знизилася на 28-й день порівняно з початковим днем, на відміну від Контрольної групи (рис.5.2).

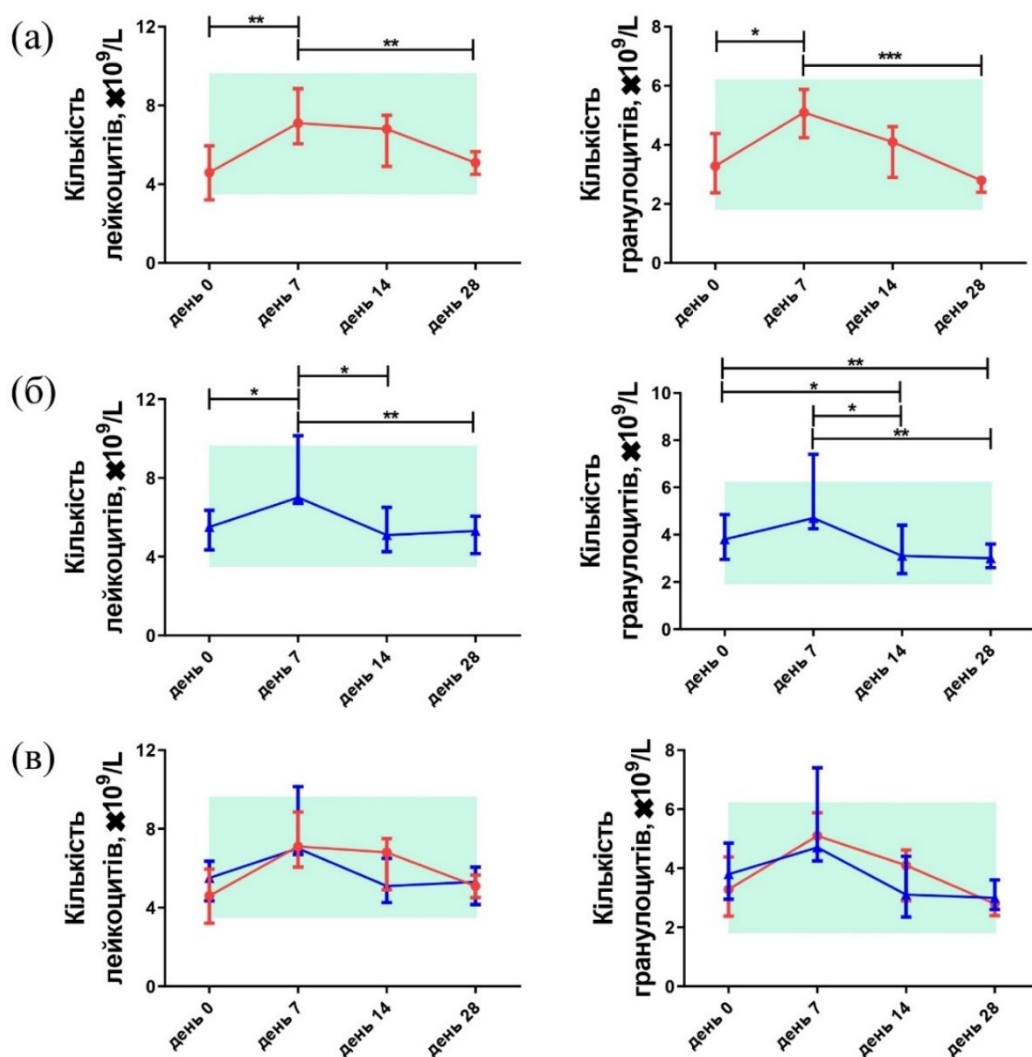


Рис.5.2. Динамічні зміни кількості лейкоцитів та гранулоцитів у пацієнтів (а) контрольної та (б) МСК груп і (в) порівняння двох груп. Червона лінія (коло) позначає Контрольну групу, n=14; синя лінія (трикутники) позначає групу МСК, n=13

Незначне, але достовірне збільшення відсотка еозинофілів (Ео) на 28-й день спостерігалось в МСК групі порівняно з початком спостереження. Порівняно з 0-им днем, відсоток еозинофілів значно збільшився на 28-й день також і в Контрольній групі, причому зріс у два рази з 14-го по 28-й день (рис.5.3). Відсоток нейтрофілів (Neu) поступово знижувався протягом 28-ми днів в обох групах, але відсоток паличкоядерних нейтрофілів на 14-й день був значно нижчим у МСК групі (рис.5.4).

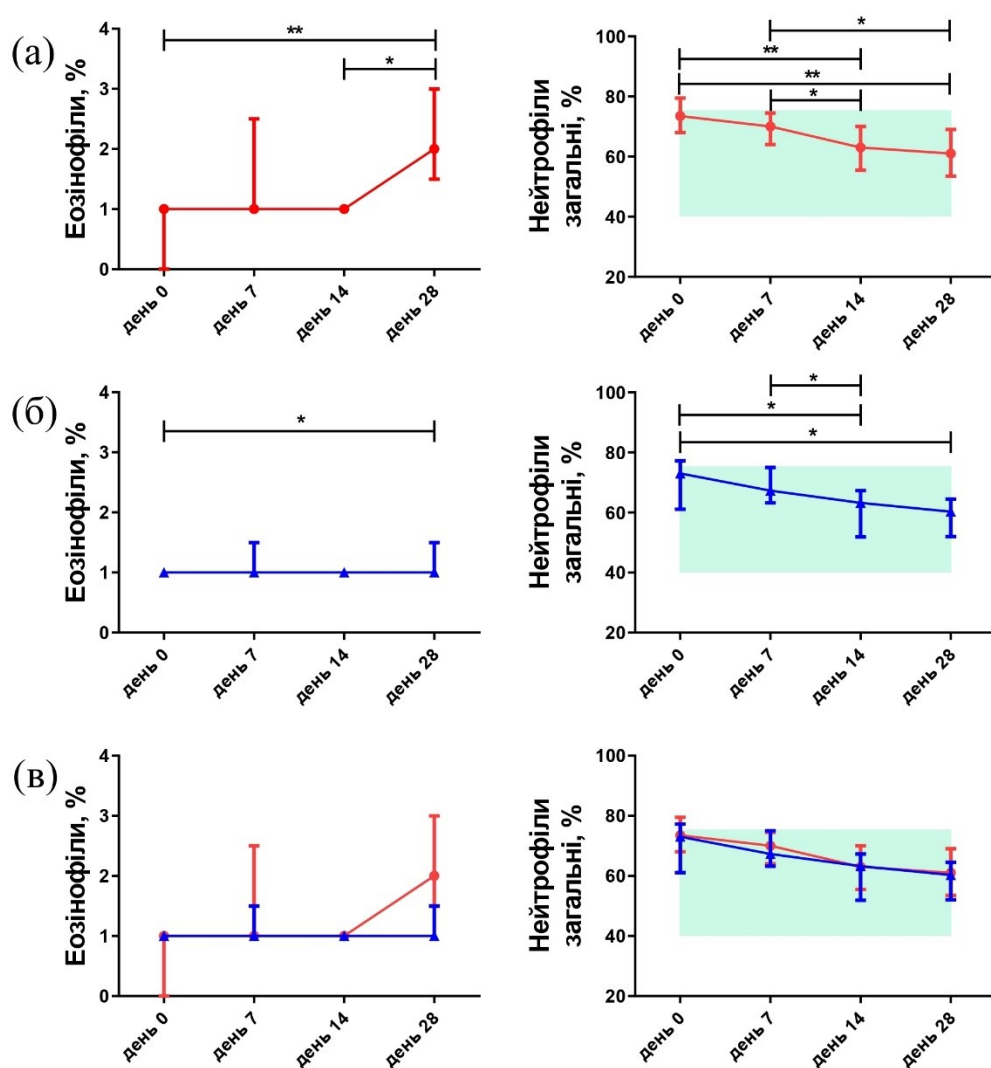


Рис.5.3. Динамічні зміни у відсотку еозинофілів та нейтрофілів у пацієнтів (а) контрольної та (б) МСК груп і (в) порівняння двох груп. Червона лінія (коло) позначає Контрольну групу, n=14; синя лінія (трикутники) позначає групу МСК, n=13

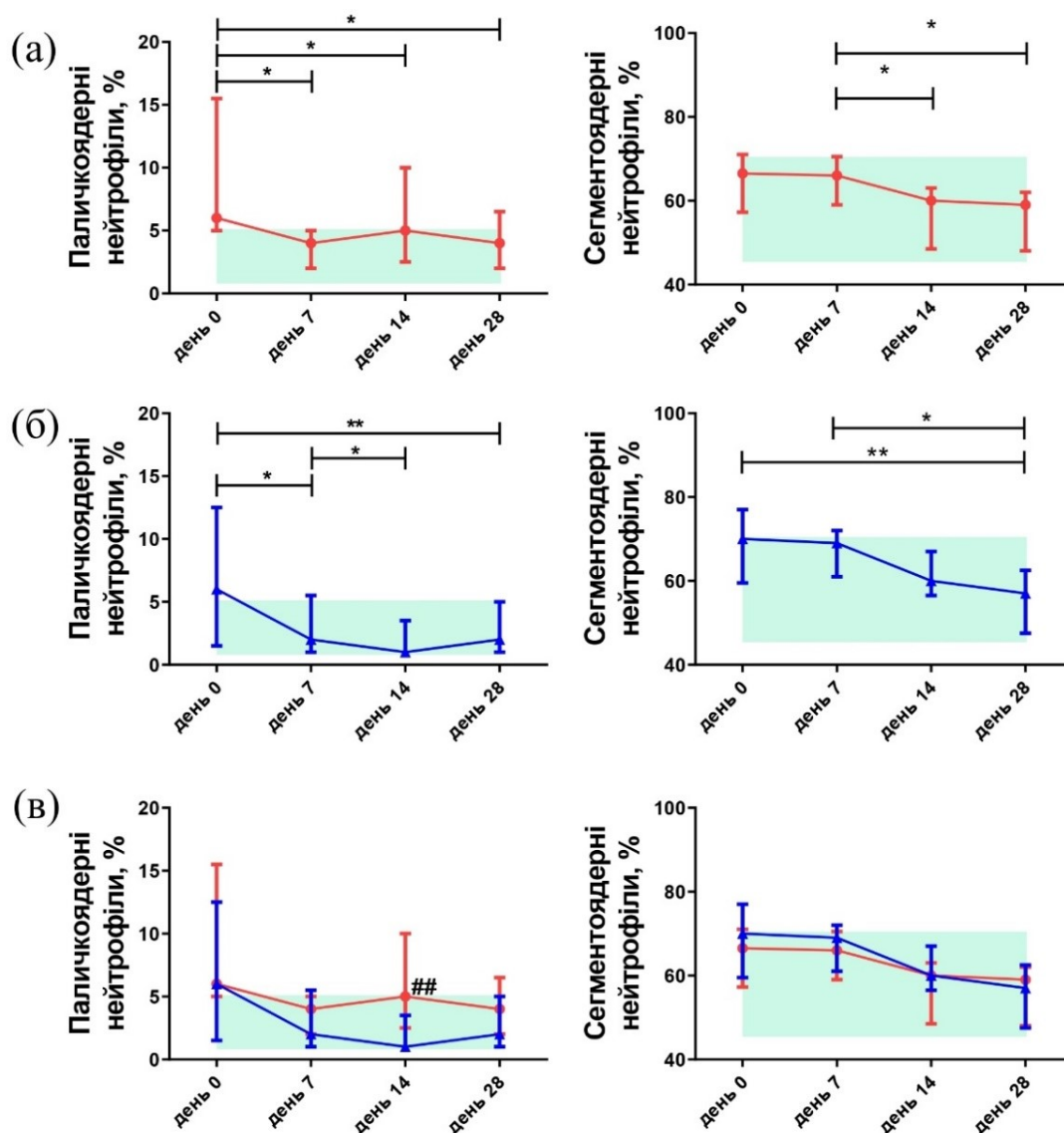


Рис.5.4. Динамічні зміни у відсотку паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів у пацієнтів (а) контрольної та (б) МСК груп і (в) порівняння двох груп. Червона лінія (коло) позначає Контрольну групу, n=14; синя лінія (трикутники) позначає групу МСК, n=13

Зростання відсотка лімфоцитів відбувалося в обох групах і досягло достовірної різниці порівняно з початком госпіталізації на 28 день спостереження (рис.5.5). Також на 28 добу відсоток лімфоцитів був достовірно вищим в МСК групі порівняно з контрольною групою. Кількість лімфоцитів регулярно зростала, при чому в МСК групі подвоєння кількості лімфоцитів відбулося на 7-й день, в той час

як в COVID-19 групі лише на 14-й. Відсоток моноцитів знаходився в межах норми в обох групах, але в МСК групі достовірно зростає, починаючи з 14 дня (рис.5.6).

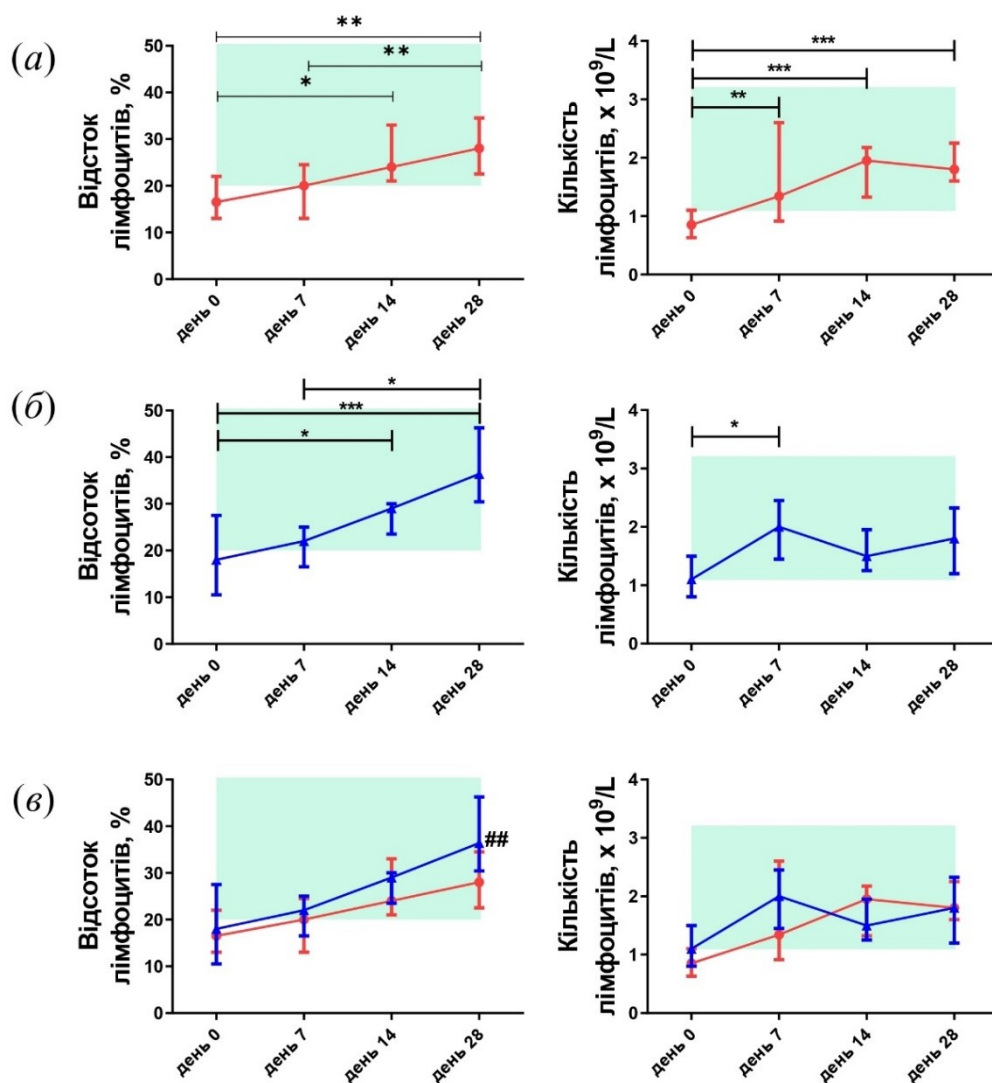


Рис.5.5. Динамічні зміни лімфоцитів у пацієнтів (а) контрольної та (б) МСК груп і (в) порівняння двох груп. Червона лінія (коло) позначає Контрольну групу, $n=14$; синя лінія (трикутники) позначає групу МСК, $n=13$

Швидкість осідання еритроцитів була підвищена на початку періоду спостереження в обох групах, але достовірно знизилася на 28 день. В Контрольній групі значення ШОЕ залишалися підвищеними протягом семи днів, в той час як в групі МСК спостерігалася тенденція до більш швидкого зниження цього параметру у порівнянні з контрольної групою. Проте статистичної достовірності між групами не було виявлено (рис.5.7).

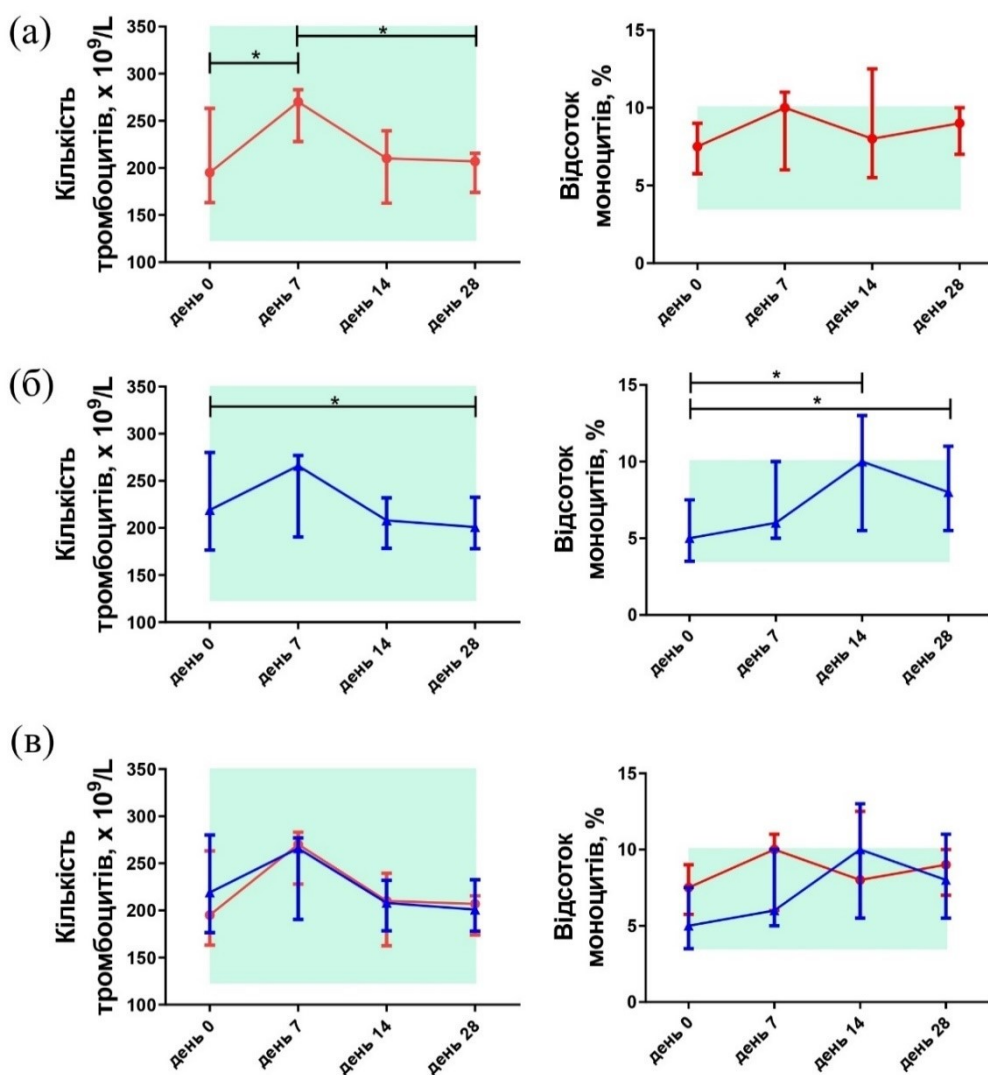
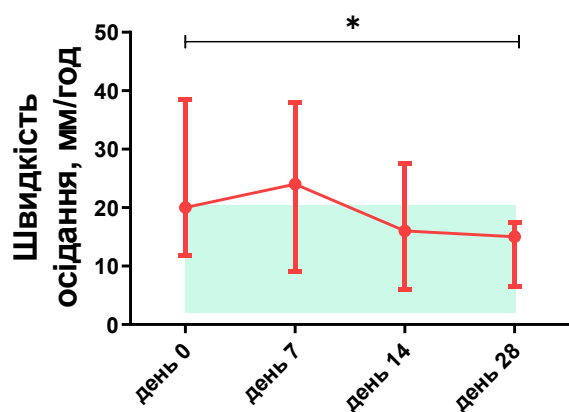


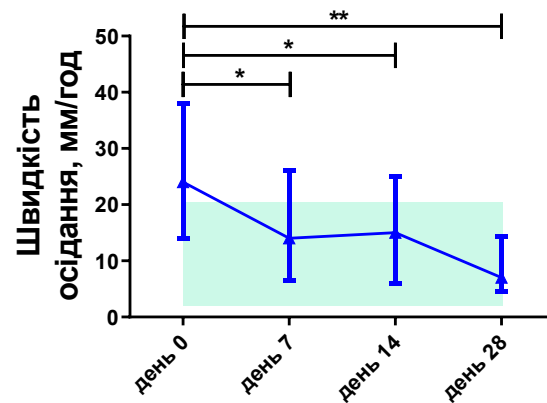
рис.5.6. Динамічні зміни тромбоцитів та моноцитів у пацієнтів (а) контрольної та (б) МСК груп і (в) порівняння двох груп. Червона лінія (коло) позначає Контрольну групу, n=14; синя лінія (трикутники) позначає групу МСК, n=13

На 0-й день лейкопенію мали 5 з 14 (35,71 %) пацієнтів в COVID-19 групі і 2 з 13 (15,38 %) пацієнтів в МСК групі; при цьому у трьох із 15-ти (20,0 %) пацієнтів Контрольної групи та у трьох із 13-ти (23,07 %) пацієнтів у групі МСК на 7-й день був лейкоцитоз (рис.5.8). На 7-й день у 12-ти із 14-ти (85,71 %) пацієнтів Контрольної групи та у 7-ми із 13 (53,84 %) пацієнтів в МСК групі спостерігалась лімфопенія. На 28-й день один із десяти (10 %) пацієнтів в МСК групі мав лімфопенію, тоді як у Контрольній групі жоден з пацієнтів її не мав (рис.5.9 б).

(a)



(б)



(в)

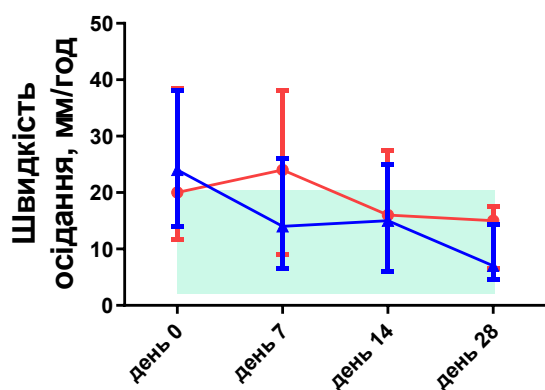


Рис.5.7 . Динамічні зміни ШОЕ у пацієнтів (а) контрольної та (б) МСК груп і (в) порівняння двох груп. Червона лінія (коло) позначає Контрольну групу, n=14; синя лінія (трикутники) позначає групу МСК, n=13

Згідно з раніше опублікованими даними, у пацієнтів з COVID-19 широко присутні мієлоцитоз і лімфопенія [158]. Однак на 28-й день в даному дослідженні було виявлено збільшення вмісту лімфоцитів після терапії МСКПЛ, що також відмічалось в іншому дослідженні [160]. Раніше повідомлялося, що підвищений вміст паличкоядерних нейтрофілів у крові пацієнтів корелював з тяжкістю протікання COVID-19 [159]. У той же час інше клінічне випробування показало, що трансплантація МСК значно знижувала кількість нейтрофілів через два та чотири місяці [161]. У даному дослідженні спостерігалось достовірне зниження вмісту паличкоядерних нейтрофілів на 14-ту добу після початку клітинної терапії у порівнянні з Контрольною групою, тому можна припустити, що спостережуване зменшення відносного вмісту цих клітин може свідчити про ослаблення запального процесу після терапії МСКПЛ.

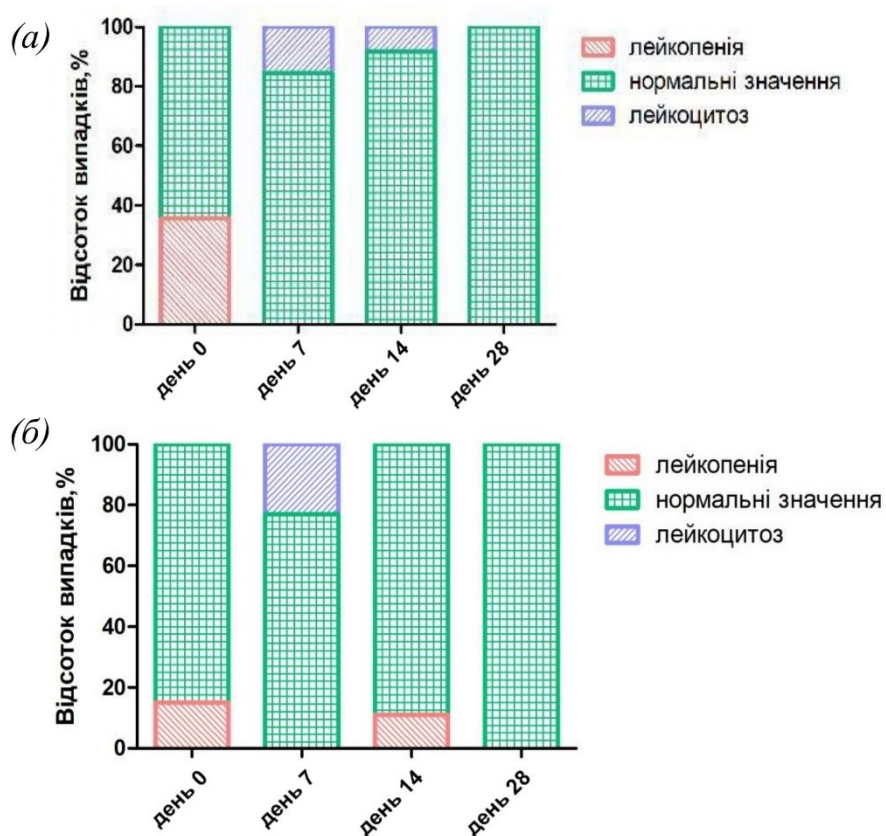


Рис.5.8. Відсоток хворих з лейкопенією або лейкоцитозом в контрольній COVID-19 (а) та МСК (б) групі в залежності від часу спостереження

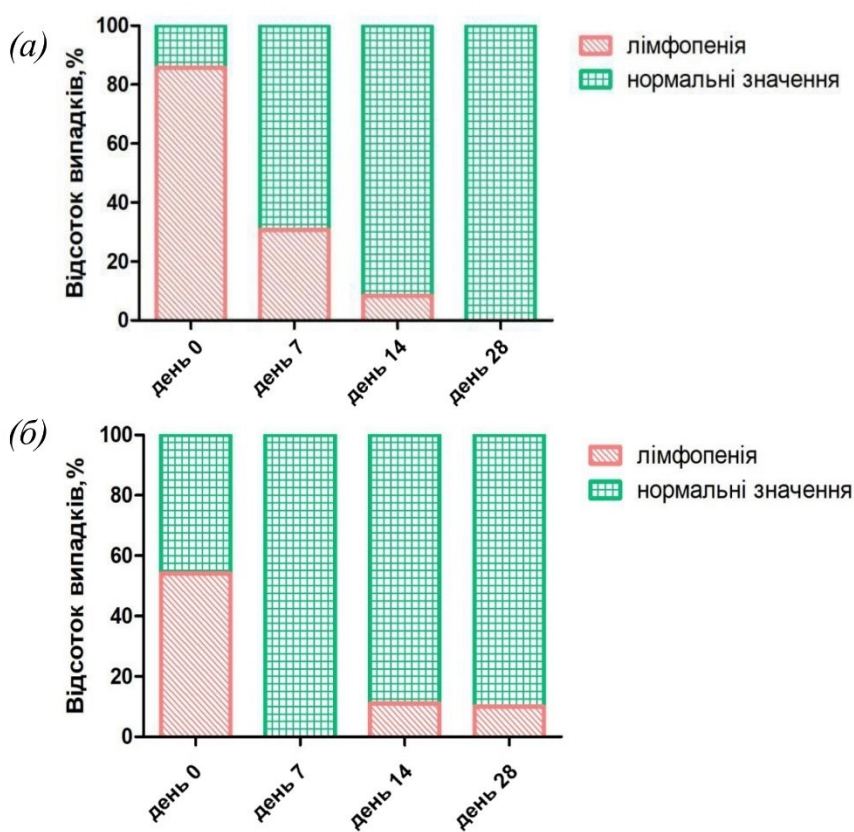


Рис.5.9. Відсоток хворих з лімфопенією. в контрольній COVID-19 (а) та МСК (б) групі в залежності від часу спостереження

Подібну динаміку у підвищених нейтрофілах порівняно зі зниженням лімфоцитів у важких пацієнтів з COVID-19 раніше повідомляли Liu та ін. [205]. Інші дослідження також показали, що важкі пацієнти з пневмонією COVID-19 мають імунну недостатність, що в свою чергу призводить до серйозної інфекції та смерті [206]. Зниження лімфоцитів може бути спричинено розрегульованою продукцією цитокінів [207], руйнуванням лімфатичних органів [208] та міграцією циркулюючих CD8⁺ лімфоцитів у легені [99,209].

Таким чином нами встановлено, що COVID-19 супроводжується в більшості випадків лейкопенією, лімфопенією та мієлоцитозом. Трансплантація МСК має позитивний вплив на перебіг запального процесу у хворих на COVID-19, а саме призводить до швидкого зниження таких маркерів запалення, як СРБ, ШОЕ та паличкоядерних нейтрофілів. Ці дані узгоджуються з результатами інших авторів [21,59,124,154,160,167].

5.4. Динаміка змін рівнів біомаркерів в плазмі хворих на COVID-19

Кількісний вміст білкових біомаркерів в плазмі та сироватці визначали методом імуноферментного аналізу. Для порівняння залежних від часу подій всередині групи використовувався критерій числових рангів Вілкоксона, для порівняння відмінностей між групами в кожній часовій точці використовувався U-тест Манна-Уїтні. Для всіх позначень на рисунках далі.: * - $p \leq 0.05$; ** - $p \leq 0.01$; *** - $p \leq 0.001$; # - $p \leq 0.05$; ## - $p \leq 0.01$; ### - $p \leq 0.001$; \$ - $p \leq 0.05$; \$\$ - $p \leq 0.01$; \$\$\$ - $p \leq 0.001$.

Результати аналізу рівнів цитокінів і хемокінів у плазмі крові у групах МСК, контрольній COVID-19 та групі здорових волонтерів показали, що протягом двох тижнів спостереження вміст С-реактивного білку (СРБ) у плазмі хворих на COVID-19 у контрольній групі був значно вищим порівняно з групою волонтерів, що не хворіли на COVID-19 і знижувався з 7-го по 28-й день спостереження. В МСК групі підвищений рівень СРБ спостерігався протягом першого тижня і почав знижуватися з початку спостереження і на 28-й день достовірно відрізнявся від усіх

попередніх значень (рис.5.10). В МСК та COVID-19 групі вміст СРБ на початок госпіталізації достовірно не відрізнявся та позитивно корелював з ступенем фіброзування легень за даними комп'ютерної томографії на 2 тижні від початку госпіталізації ($r=0.439$, $p\leq 0.005$, $n=46$). Цікаво, що в даній роботі спостерігалася 7-денна затримка у зниженні рівня СРБ у Контрольній COVID-19 групі порівняно з групою МСК.

Рівень СРБ в крові хворих на ковід в МСК групі позитивно корелював з ШОЕ ($r=0.628$, $p\leq 0.001$, $n=44$) та вмістом нейтрофілів ($r=0.411$, $p\leq 0.005$, $n=39$) та негативно з відсотком лімфоцитів ($r=-0.562$, $p\leq 0.001$, $n=45$) та кількістю NT-proBNP ($r=-0.574$, $p\leq 0.001$, $n=42$). В COVID-19 групі було виявлено негативну кореляцію між СРБ і класичними ($r=-0,589$, $p\leq 0,001$, $n=71$) та плазмоцитоїдними дендритними клітинами ($r=-0,481$, $p\leq 0,001$, $n=71$) (рис.4.3 та рис.4.4).

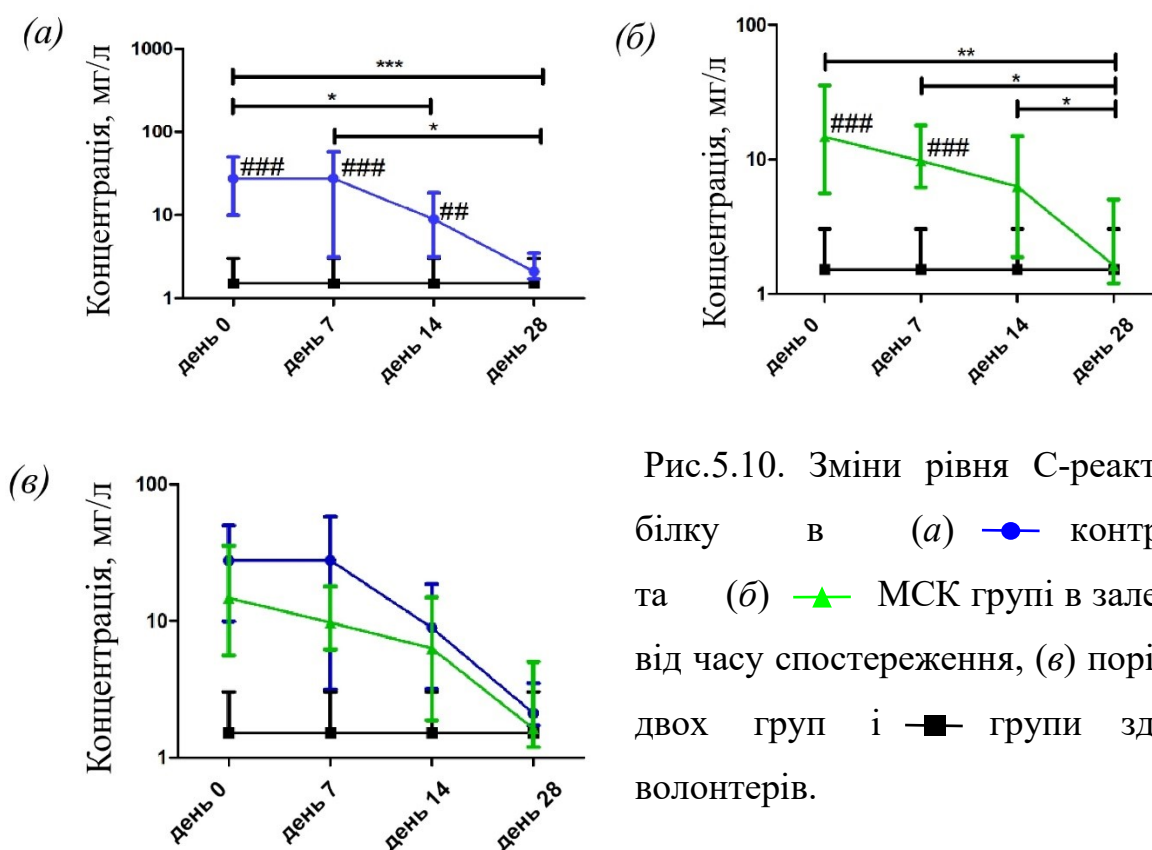


Рис.5.10. Зміни рівня С-реактивного білку в (а) — контрольній та (б) — МСК групі в залежності від часу спостереження, (в) порівняння двох груп і — групи здорових волонтерів.

Синдром надмірного вивільнення цитокінів є одним із важливих факторів, що впливають на смертність і тяжкість перебігу COVID-19. Він виникає через те,

що імунні клітини посилено секретують прозапальні цитокіни в циклі позитивного зворотного зв'язку. Підвищені рівні СРБ, прозапальних цитокінів і ШОЕ в крові є характеристиками «цитокінового шторму» [101]. Згідно з попередніми дослідженнями трансплантація МСК може виступати як імуномодулятор при розвитку цитокінового шторму, спричиненого запаленням [166].

Рівень IP-10 у плазмі крові пацієнтів в контрольній COVID-19 групі був підвищений порівняно з групою здорових волонтерів, за винятком нормалізації показника на 7 день. В МСК групі рівень IP-10 був достовірно вищим за значення здорових волонтерів на 0, 7 та 28 добу та достовірно відрізнявся від контрольної COVID-19 групи на 7 і 28 день (рис.5.11).

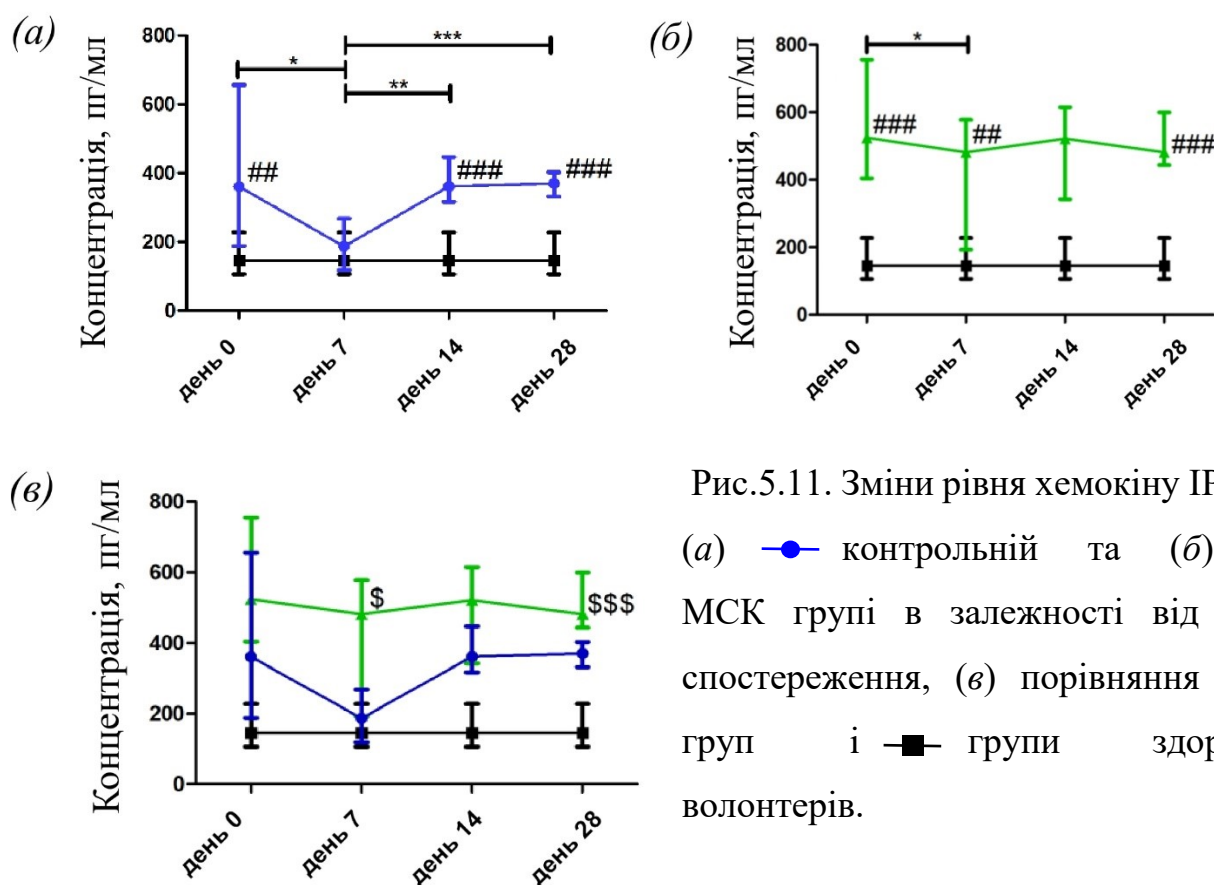


Рис.5.11. Зміни рівня хемокіну IP-10 в (а) — контрольній та (б) — МСК групі в залежності від часу спостереження, (в) порівняння двох груп і — групи здорових волонтерів.

IP-10 є прогностичним маркером при COVID-19 [171], його зростання відмічається у складних випадках [172,173], і цей показник позитивно корелює з коагуляційними факторами такими як тромбіновий час та активований частковий тромбопластиновий час [210]. Також відомо, що експресія IP-10 зростає при впливі шипікового білку на ендотелій людини [211], при розвитку захворювань

коронарних артерій [212], позитивно корелює зі ступеня оклюзії коронарних судин (Tavakolian Ferdousie et al., 2017), при атеросклерозі коронарних судин та захворюваннях серця [214]. Підвищення рівня цього хемокіну властиво при порушенні ендотеліального бар'єру в головному мозку людини при різних інфекційних захворюваннях [215–217]. Цікаво, що високий рівень IP-10 асоціюється з високим титром антитіл після вакцинування. Також транзиторне підвищення CXCL10, IFN- γ , IP-10, IL-6 та СРБ було відмічено на 2 день після COVID-19 вакцинування BNT162b2 mRNA (Pfizer/BioNtech) [218].

Таким чином підвищення IP-10 у хворих в МСК групі може свідчити про негативний вплив МСК на серцево-судинну систему, бар'єрну функцію ендотелію та запалення ендотелію, в якому головну роль відіграє гіперактивування коагуляційної системи [219].

В даному дослідженні встановлено, що рівень MCP-1 та TNF- α зріс в крові хворих після трансплантації МСК на 7 добу і знижувався на 14 та 28 доби відповідно, тоді як COVID-19 групі цей показник спадав на 7 добу і зростав до кінця спостереження (рис.5.12). Рівні MCP-1 дещо зросли протягом першого тижня спостереження, але залишалися незмінними до 28 дня на відміну від Контрольної групи, де вони різко зросли, починаючи з другого тижня. В МСК групі зростання рівня TNF- α в крові пацієнтів на 7 добу госпіталізації досягає достовірних відмінностей від значень здорових волонтерів. На 28 день спостереження рівень TNF- α в обох групах достовірно не відрізняється від початку лікування, хоча у пацієнтів контрольної групи цей показник достовірно відрізнявся від значень здорових волонтерів. Рівні TNF- α та IP-10 у плазмі хворих з COVID-19 корелювали з виснаженими CD4⁺ клітинами ($r=0,235$, $p\leq 0,05$ та $r=0,338$, $p\leq 0,005$, $n=71$, відповідно). IP-10 корелював з CD4 та CD8 зрілими клітинами пам'яті ($r=0,330$, $p\leq 0,005$ та $r=0,327$, $p\leq 0,005$, $n=71$, відповідно), тоді як TNF- α негативно корелював із кількістю лімфоцитів ($r=-0,372$, $p\leq 0,01$, $n=71$) та відсотком еозинофілів ($r=-0,388$, $p\leq 0,01$, $n=71$).

Цікаво, що рівень TNF- α знижувався в крові хворих після одно- [155], двох- [220] та трикратної трансплантації МСК [169] через три, шість та п'ять діб від початку терапії відповідно. Раніше у клінічних дослідженнях було показано, що трикратна інфузія МСК призводила до зниження рівня MCP-1 [161]. Подібно до IP-10 в крові пацієнтів хворих на COVID-19 з порушеннями ендотеліального бар'єру головного мозку інші автори також відмічають високі рівні MCP-1 та TNF- α , які корелюють із ступенем тяжкості та підвищеним тромбоутворенням [210,217].

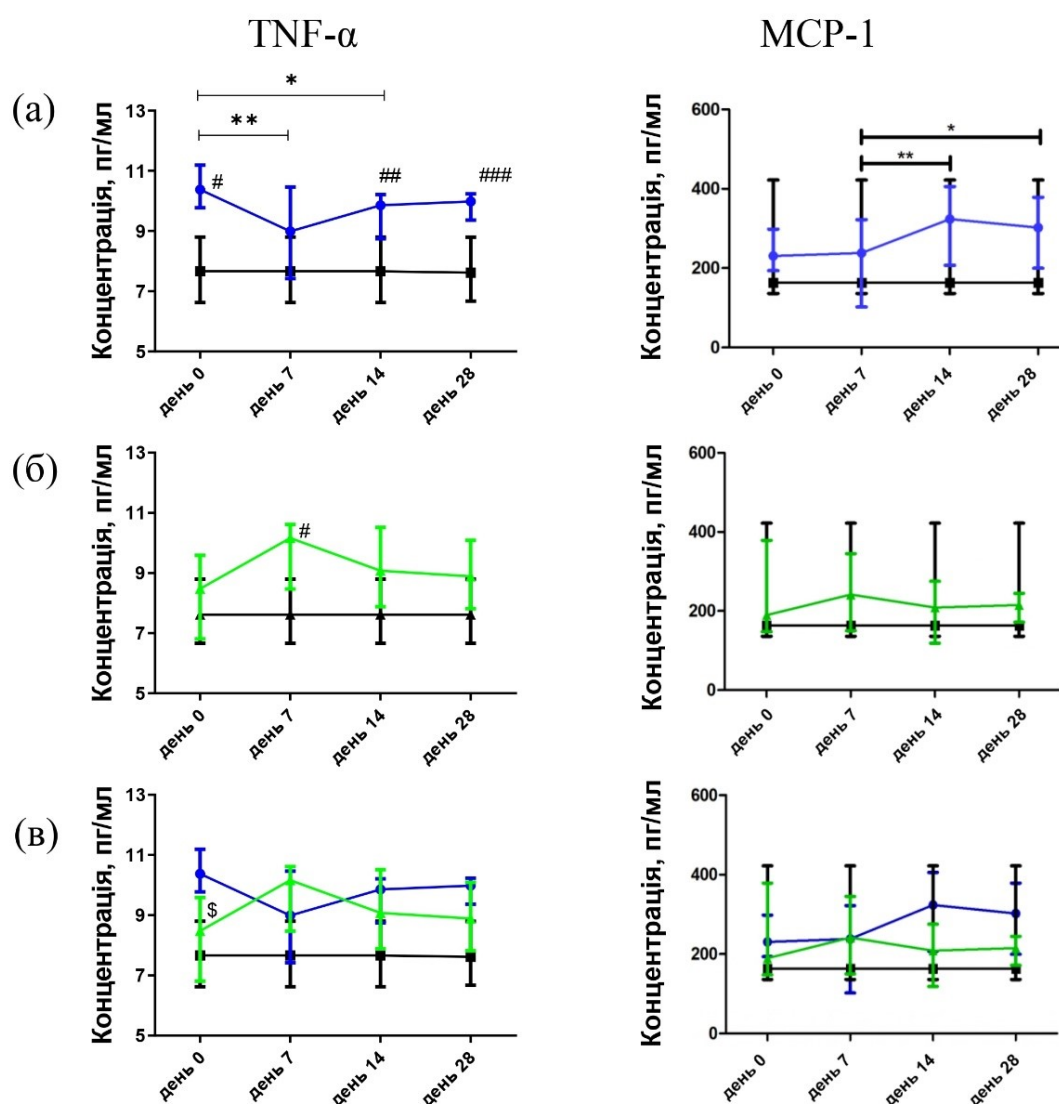


Рис.5.12. Зміни рівнів MCP-1 і TNF α в (а) —●— контрольній та (б) —▲— МСК групі в залежності від часу спостереження, (в) порівняння двох груп і —■— групи здорових волонтерів

Рівень інтерлейкіну-10 (IL-10) був на 7 день достовірно вищий в МСК групі порівняно з COVID-19 групою, проте не відрізнявся від значень групи здорових волонтерів в обох групах (рис.5.13). З 7 по 14 день відбувалася нормалізація цього цитокіну в обох групах, а потім у контрольній COVID-19 групі рівень IL-10 різко зріс і достовірно відрізнявся на 28-й день всередині групи від значень у дні 7 та 14.

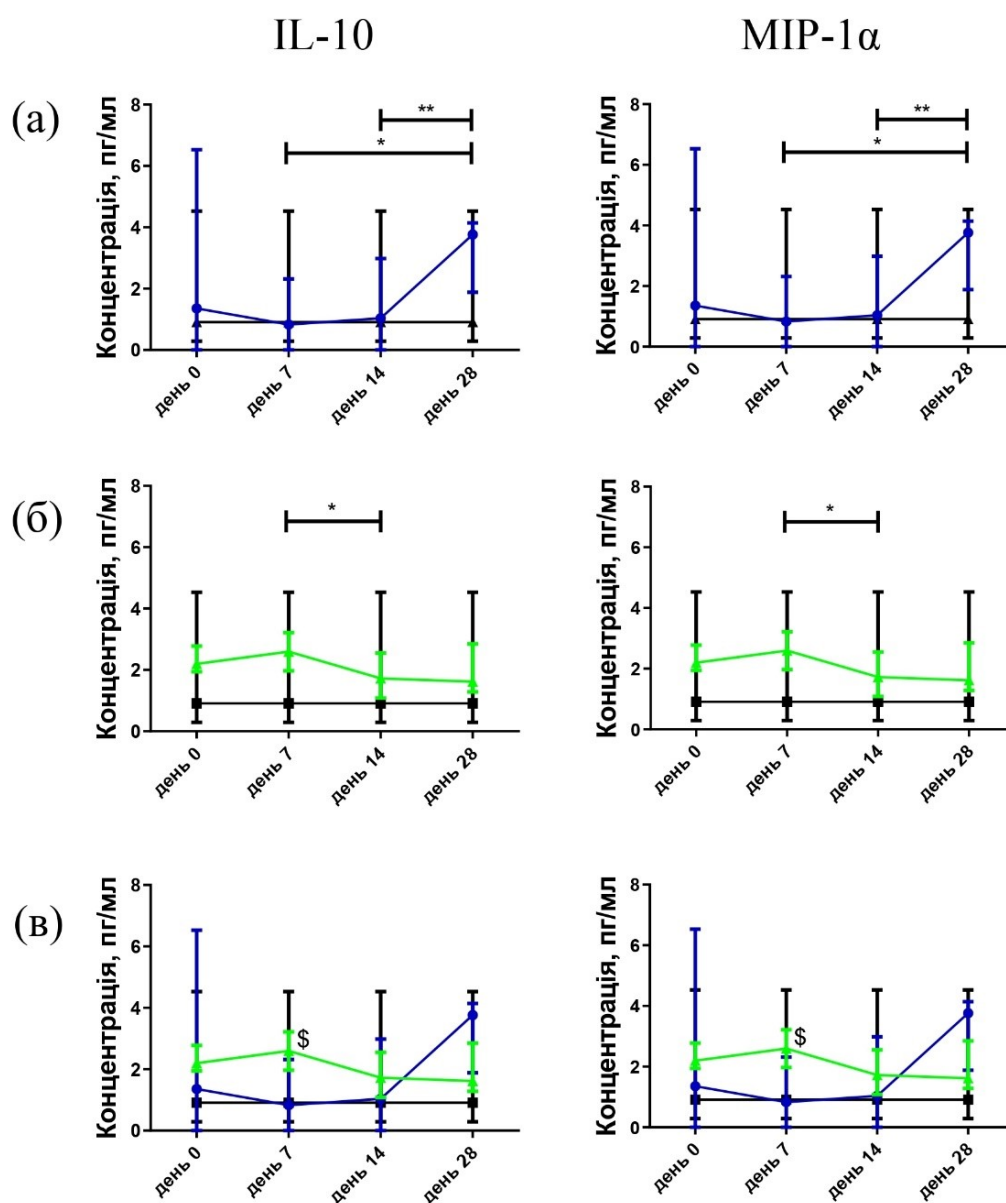


Рис.5.13. Зміни рівнів інтерлейкіну 10 та MIP-1 α в (а) — контрольній та (б) — МСК групі в залежності від часу спостереження, (в) порівняння двох груп і — групи здорових волонтерів

Інтерлейкіни 2 та 6 (IL-2 та IL-6) істотно не змінювалися протягом періоду спостереження в обох групах та не відрізнялися в МСК і Контрольній групах (рис.5.14). Вміст MIP-1 α був достовірно вищим на 7 і 28 добу в групі МСК порівняно з групою COVID-19, проте не відрізнявся від значень групи здорових волонтерів в обох групах (рис.5.13).

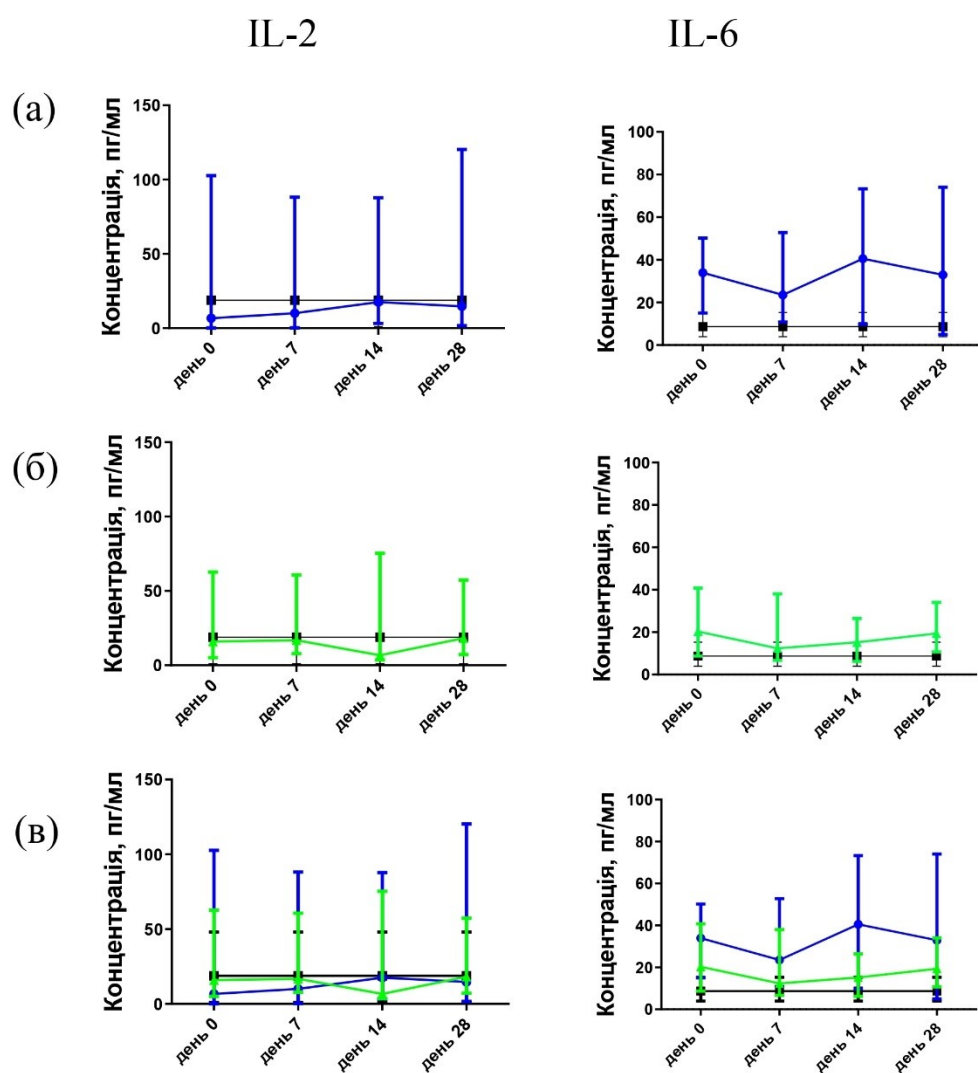


Рис.5.14. Зміни рівнів інтерлейкінів 2 та 6 в (а) —●— контрольній та (б) —▲— МСК групі в залежності від часу спостереження, (в) порівняння двох груп і —■— групи здорових волонтерів

Раніше було показано, що IL-10 підвищується у хворих COVID-19 зі зростанням тяжкості перебігу захворювання [221,222]. І хоча попередньо IL-10 вважали протизапальним цитокіном, зростання IL-10 у пацієнтів з синдромом

цитокінового шторму, позитивна кореляція з про-запальними цитокінами та С-реактивним білком, вмістом IFN- γ -продукуючих ефektorних CD4⁺ та CD8⁺ Т-клітин та виснаженими CD8⁺ Т-клітинами може свідчити про його про-запальні властивості, окрім цього, вважається, що він стимулює до проліферації цитотоксичні Т-лімфоцити [223]. У поточному дослідженні не було виявлено жодного впливу потрійної трансплантації МСКПЛ на рівні інтерлейкіну 2 (IL-2) в плазмі хворих. Мета-аналіз проведений Zhang та ін. [170] показав, що трансплантація МСК при COVID-19 має значний позитивний вплив на перебіг хвороби і без зміни рівнів СРБ, IL-6 та IL-2, які детектували у крові хворих. Цікаво, що трансплантація МСКПЛ у клінічних дослідженнях на стадії Па [59,155,224] не виявила істотних змін рівня IL-6, хоча показники пневмонії за даними КТ покращилися, що збігається з результатами, отриманими в даній роботі.

Вміст G-CSF поступово знижувався протягом періоду спостереження у пацієнтів Контрольної групи на відміну від групи МСК, де він стабільно зростав протягом усього періоду спостереження; та досяг достовірної різниці між групами на 14 і 28 дні (рис.5.15). Рівень ангіотензину II в крові пацієнтів незначно зростає на 7 добу після трансплантації МСК, а до кінця періоду спостереження нормалізується в обох групах (рис.5.15). Проте ми спостерігали достовірну різницю між групами, що може бути обумовлено особливостями перебігу супутніх патологій серцево-судинної системи у пацієнтів. Ангіотезин II відіграє важливу роль в рекрутуванні нейтрофілів в легені, він стимулює виділення хемокинів та адгезивних молекул на ендотеліальних клітинах та клітинах гладеньких м'язів, що покращує адгезію нейтрофілів та мононуклеарів [225,226]. Також цей білок стимулює Т-лімфоцити до проліферації, диференціювання, ефекторної функції, міграції та адгезії [227,228]. Було показано, що інфузія ангіотензину II свиням призводить до підвищення тиску в легеневих артеріях, зменшує постачання кисню, збільшує коагуляцію, порушує перфузію легень, викликає дифузне ураження альвеол та некроз каналців нирок [229]. Зростання рівня ангіотензину II спостерігається в критично хворих пацієнтів на COVID-19 [230,231].

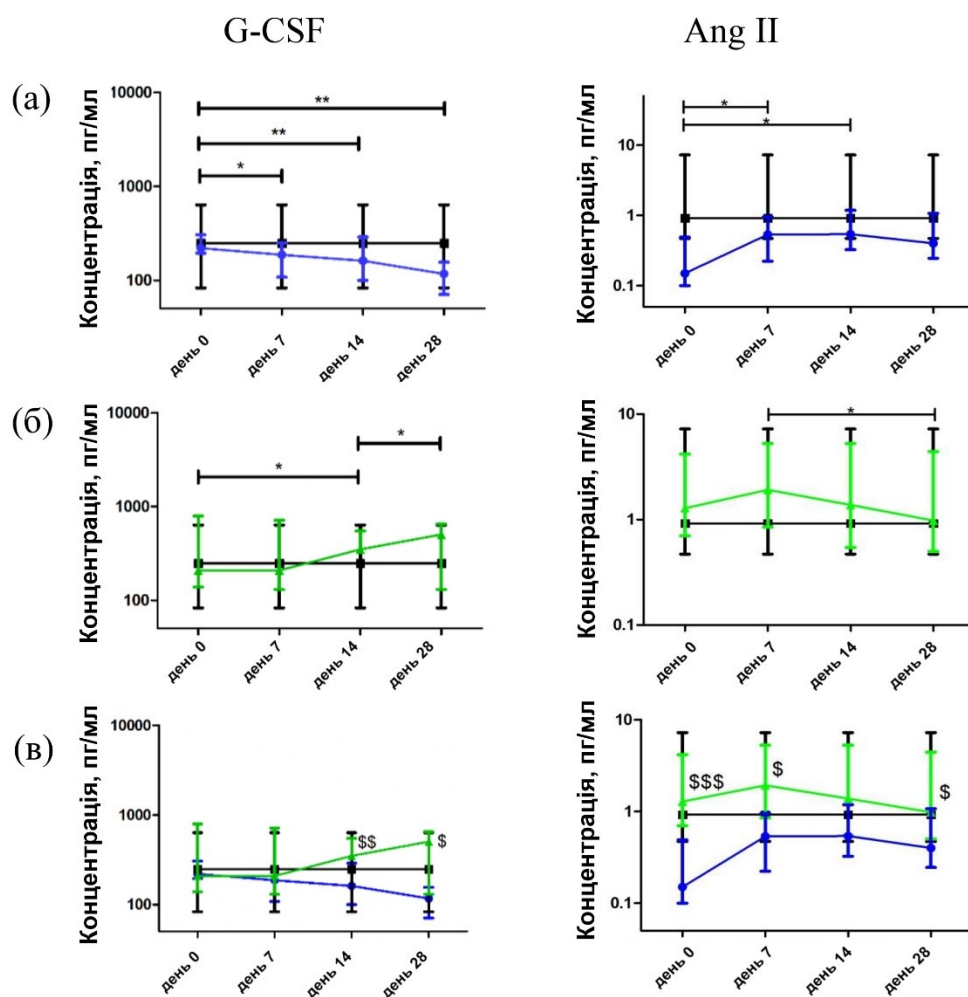


Рис.5.15. Зміни рівнів G-CSF та ангіотензину II в (а) —●— контрольній та (б) —▲— МСК групі в залежності від часу спостереження, (в) порівняння двох груп і —■— групи здорових волонтерів

Концентрація NT-proBNP, N-кінцевого прогормону натрійуретичного пептиду мозку, у плазмі пацієнтів в групі МСК значно підвищувалася на 28 день порівняно з днями 0 і 14 (рис.5.16). Незначне підвищення рівня NT-proBNP у плазмі крові на 28 день спостерігалось і в Контрольній групі. Рівень тропоніну I (TnI) у плазмі хворих в групі МСК не змінювався, тоді як у Контрольній групі він достовірно знижувався на 7, 14 та 28 добу порівняно з початком спостереження (рис.5.16). Проте не було різниці в рівнях цих білків між групами і здоровими волонтерами.

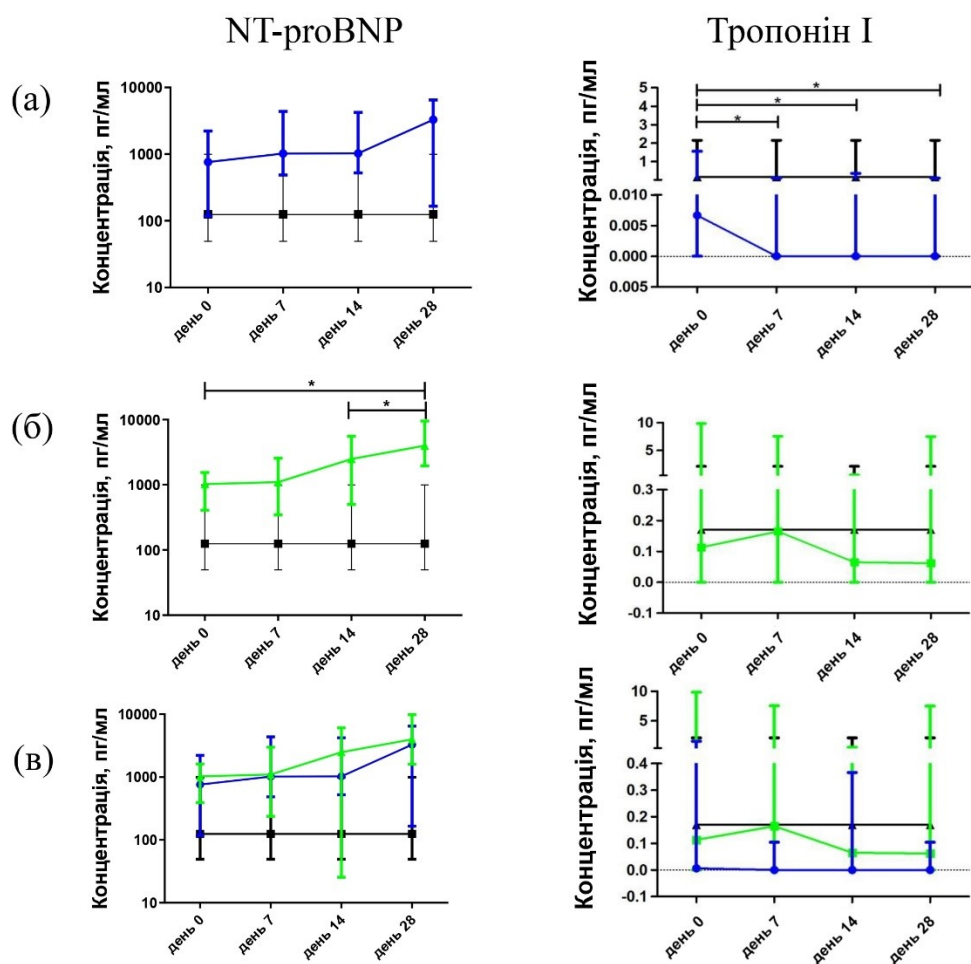


Рис.5.16. Зміни рівнів NT-proBNP та тропоніну І в (а) —●— контрольній та (б) —▲— МСК групі в залежності від часу спостереження, (в) порівняння двох груп і —■— групи здорових волонтерів

Після трансплантації МСКПЛ в плазмі пацієнтів спостерігалось достовірне зменшення концентрації сурфактанту D (SP-D) на 7 та 28 дні (рис.5.17). Цікаво, що у пацієнтів в Контрольній групі спостерігалось підвищення рівня SP-D з 14 до 28 день. Рівень розчинної форми рецепту до кінцевих продуктів глікозилювання (sRAGE) був достовірно нижчий через 7 та 14 днів у пацієнтів в Контрольній групі порівняно з початком спостереження, причому його рівень поступово збільшувався з 7 дня та досяг достовірної різниці на 14 і 28 день (рис.5.17). У групі МСК спостерігалось незначне зниження рівня sRAGE протягом усього періоду госпіталізації.

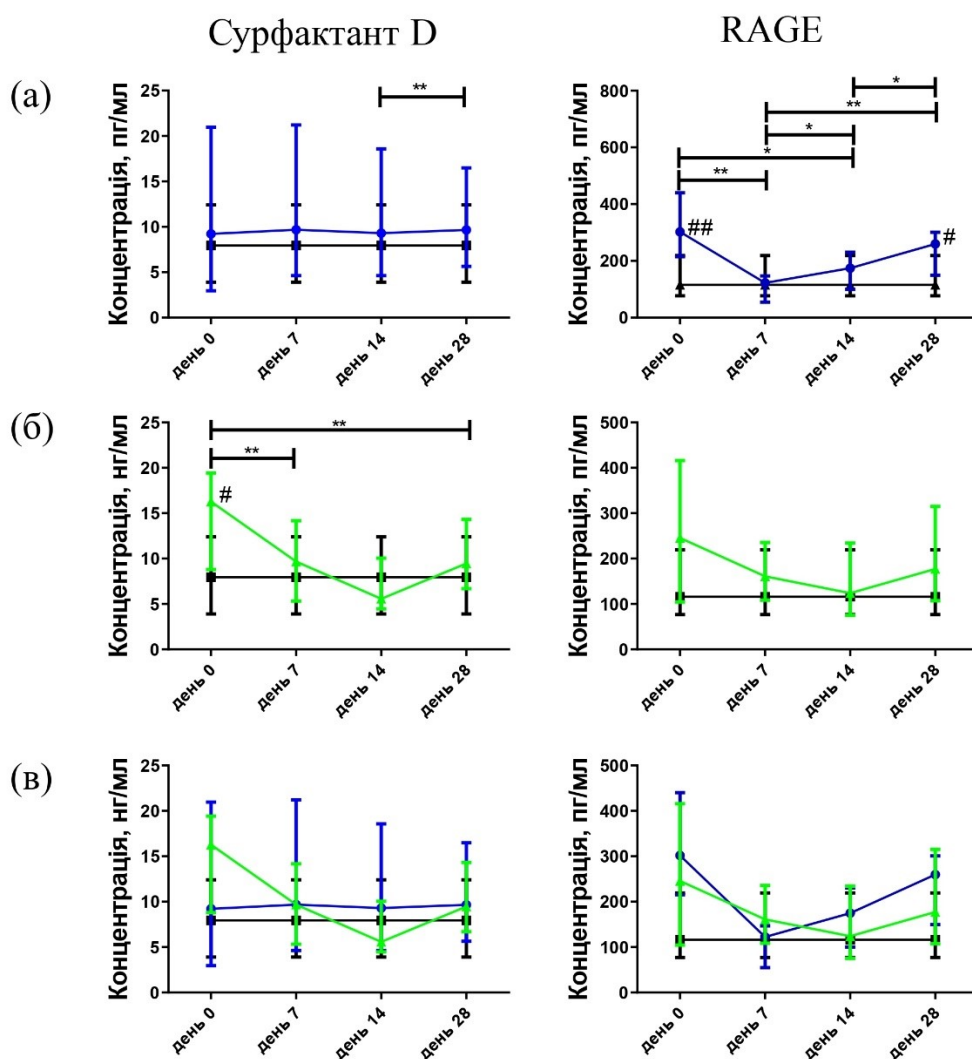


Рис.5.17. Зміни рівнів сурфактанту D та RAGE в (а) —●— контрольній та (б) —▲— МСК групі в залежності від часу спостереження, (в) порівняння двох груп і —■— групи здорових волонтерів. * або # - $p \leq 0.05$; ** або ## - $p \leq 0.01$.

За даними клінічних досліджень рівень SP-D у сироватці рекомендовано використовувати як біомаркер при гострих і хронічних респіраторних захворюваннях, таких як хронічне обструктивне захворювання легень та ідіопатичний легеневий фіброз. Сурфактант D секретується альвеолярними клітинами II типу, а підвищені концентрації в сироватці крові є результатом вивільнення білка при порушеннях структурної цілісності альвеолярно-капілярної мембрани [232]. Як відомо, альвеолярний епітелій II типу є основною мішенню SARS-CoV-2 [233]; а отже зниження пошкодження легеневої тканин, яке продемонстровано в даній роботі, може бути позитивним результатом клітинної

терапії. Також раніше повідомлялося, що клітинна терапія може пригнічувати утворення рубцевої тканини в легенях через пригнічення активації фібробластів і відкладення колагену, а також запобігання процесу епітеліально-мезенхімального переходу альвеолярних епітеліальних клітин типу II в пошкоджених ділянках [234]. Крім того, в даній роботі продемонстровано, що рівень SP-D у плазмі знижувався на 7 і 28 дні після трансплантації МСКПЛ, що свідчить про ослаблення запалення легенів і інгібування загибелі альвеолярного епітелію II типу, що також було опубліковано раніше [235]. Крім того, раніше повідомлялося про позитивну кореляцію SP-D з СРБ [232]. В даній роботі продемонстровано позитивну кореляцію між SP-D та ступенем пошкодження легенів за даними КТ, маркерами запалення ШОЕ та IP-10.

Висока концентрація sRAGE, специфічного маркера ураження альвеолярного епітелію I типу, в крові пацієнтів є прогностичним біомаркером розвитку ГРДС та важкої стадії COVID-19 [235–237]. Раніше повідомлялося, що терапія кортикостероїдами призводить до зниження рівня sRAGE в крові педіатричних пацієнтів із ГРДС [238]. У даному дослідженні sRAGE трохи знизився після терапії МСКПЛ. Окрім того, в даній роботі виявлено, що у пацієнтів, які отримували МСКПЛ, концентрація sRAGE позитивно корелює з рівнем MCP-1 і MIP-1 α у плазмі та загальним балом КТ. І навпаки, підвищення рівня sRAGE у плазмі пацієнтів Контрольної групи на 14 і 28 дні порівняно з початковим днем свідчило про активацію запальних процесів у легенях. А різке зниження рівня sRAGE на сьомий день у пацієнтів Контрольної групи збігається з періодом терапії кортикостероїдами.

Однак, зниження рівня цитокінів у плазмі крові може не відображати зменшення запалення легенів і покращення стану легеневого епітелію і, навпаки, відсутність змін у рівні цитокінів не означає відсутність покращення в місці запалення. Так, Wick та ін. показали, що при терапії МСК рівень цитокінів знижується у просвіті альвеол легень, в той час як в плазмі їх рівень лишається незмінним [239]. Відомо, що IP-10 є прогностичним маркером при COVID-19 [171], і ріст його рівня у плазмі спостерігався у важких випадках [172,173], а

трансплантація МСКПЛ не впливала на рівні IP-10 у важкохворих пацієнтів з COVID-19 [154,155]. Однак в даному дослідженні рівень IP-10 в плазмі знизився після трансплантації МСКПЛ на 7 день, проте все одно залишався вищим, ніж у контрольних пацієнтів на 14 і 28 дні. Отримані в даній роботі результати показали вищі рівні MIP-1 α на 7 і 28 дні в групі МСК на противагу відсутності змін рівня MIP-1 α в плазмі після терапії МСК, що було показано раніше [161]. Дані щодо високого рівня G-CSF у групі МСК на 14 і 28 дні суперечать попереднім повідомленням про зв'язок високих рівнів G-CSF із тяжкістю протікання хвороби і прогресуванням запалення у пацієнтів з COVID-19 [240,241], оскільки в даній роботі не спостерігалось жодного погіршення у пацієнтів, які отримали терапію МСКПЛ. Незважаючи на те, що для IL-10 відомі протизапальні властивості, деякі дослідження відзначають його прозапальний ефект при COVID-19 [223,242,243]. В даній роботі в групі МСК після заключної трансплантації було виявлено значний ріст рівня IL-10 у порівнянні з Контрольною групою. Таким чином, вперше було показано, що трансплантація МСК у пацієнтів із тяжкою формою COVID-19 призвела до підвищення у плазмі крові рівня таких прозапальних цитокінів, як IP-10, MIP-1 α , G-CSF та IL-10, без загострення захворювання.

5.5. Динаміка змін рівнів мікроРНК в плазмі хворих на COVID-19

Зміни відносних рівнів експресії мікроРНК залежно від часу аналізу в кожній з груп та у порівнянні між групами представлені на рисунках нижче. Для всіх рисунків умовні позначення для критерію Вілкоксона відповідають * - $p \leq 0.05$; ** - $p \leq 0.01$, для теста Манна-Уїтні: # - $p \leq 0.05$; ## - $p \leq 0.01$ та \$ - $p \leq 0.05$; у.о. – умовні одиниці. На початку спостереження рівні експресії miR-27a-3p, miRNA-133a-3p, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-126-3p, і miR-221-3p були значно вищими у хворих з COVID-19 порівняно із здоровими волонтерами і знижувалися протягом всього періоду спотсереження (рис.5.18, рис.5.19 та рис.5.20, відповідно). Відносний

рівень експресії miR-27a-3p та miR-133a-3p у пацієнтів з групи COVID-19 значно знизився протягом першого тижня і залишався в межах значень групи здорових до 28 дня (рис.5.18 а). Всередині групи МСК рівень експресії miR-27a-3p у хворих достовірно відрізнявся на 7 і 28 дні порівняно з початком госпіталізації, проте залишалася значно вищою ніж у групи здорових волонтерів. У групі МСК відносний рівень експресії miR-133a-3p знизився втричі до дня 7 і також перебував в межах нормальних значень весь період спостереження(рис.5.18 б).

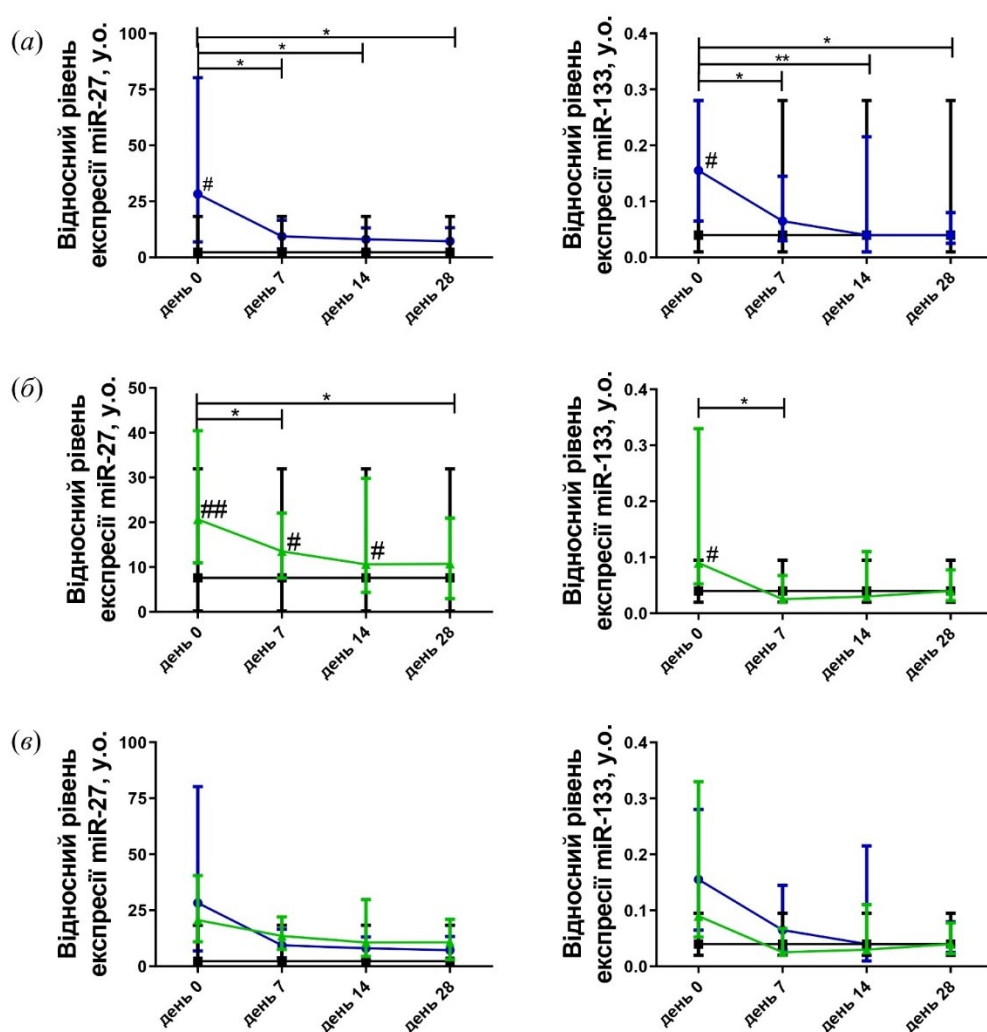


Рис.5.18. Зміни рівнів miR-27a-3p та miRNA-133a-3p в залежності від часу спостереження у хворих в (а) —●— групі контролю, n=14; (б) —▲— МСК групі, n=13; (в) порівняння між групами, —■— - група здорових волонтерів, n=17

Відносний рівень експресії miR-146a-5p, miR-21-5p та miR-221-3p у плазмі крові контрольної групи був значно нижчим на 14 та 28 день порівняно з 0 днем. В МСК групи ці мікро РНК знижувалися на 7 та 28 добу у порівнянні з початком госпіталізації (рис. 5.19 та рис. 5.20).

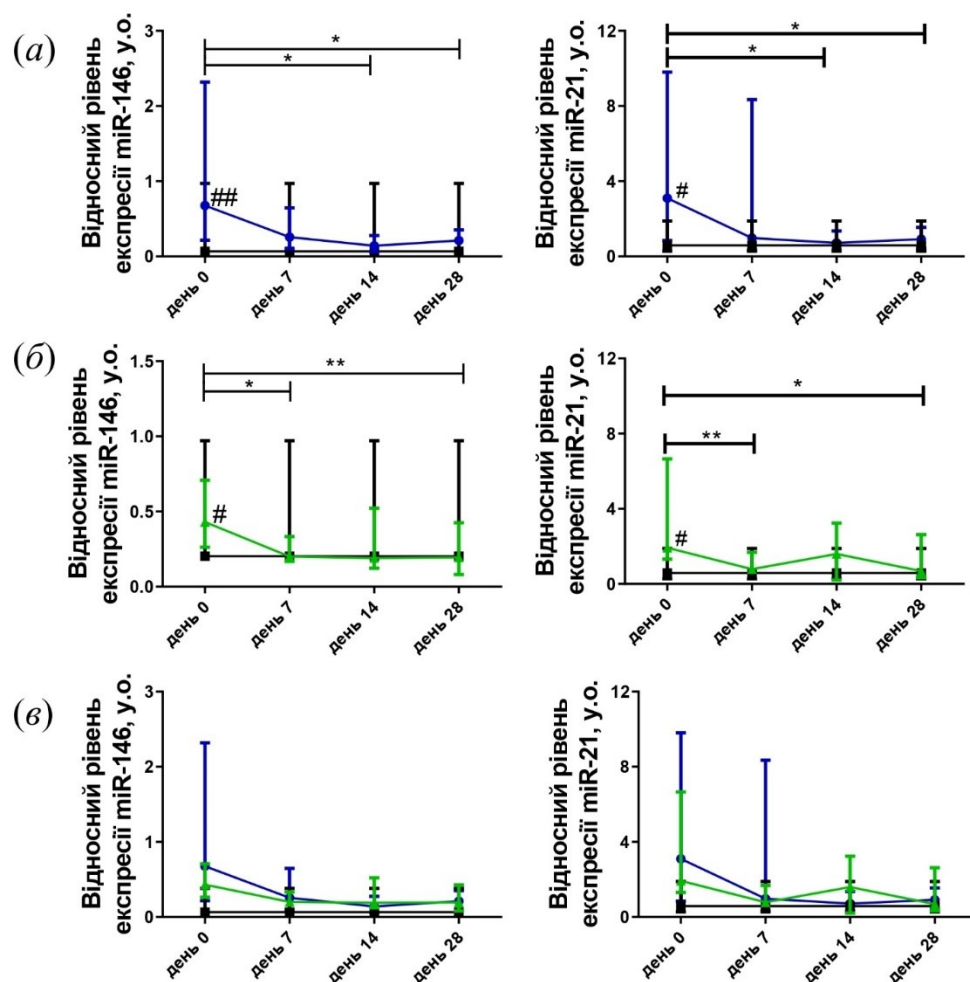


Рис.5.19. Зміни рівнів miR-146a-5p та miRNA-21-5p в залежності від часу спостереження у хворих в (а) — групі контролю, n=14; (б) — МСК групі, n=13; (в) порівняння між групами, —■— - група здорових волонтерів, n=17

Наприклад, відносний рівень експресії miR-21-5p і miR-146a-5p знизився більш ніж у чотири рази, а miR-221-3p більш ніж у три рази в Контрольній групі, в той час як в групі МСК – лише вдвічі. Відносний рівень експресії miR-126-3p групі COVID-19 достовірно відрізнявся від групи здорових волонтерів протягом усього

періоду спостереження, хоч і знизився на 14 день порівнянно з 0 днем. Тоді як у групі МСК рівень miR-126-3p не змінювався протягом 28 днів (рис. 5.20 б).

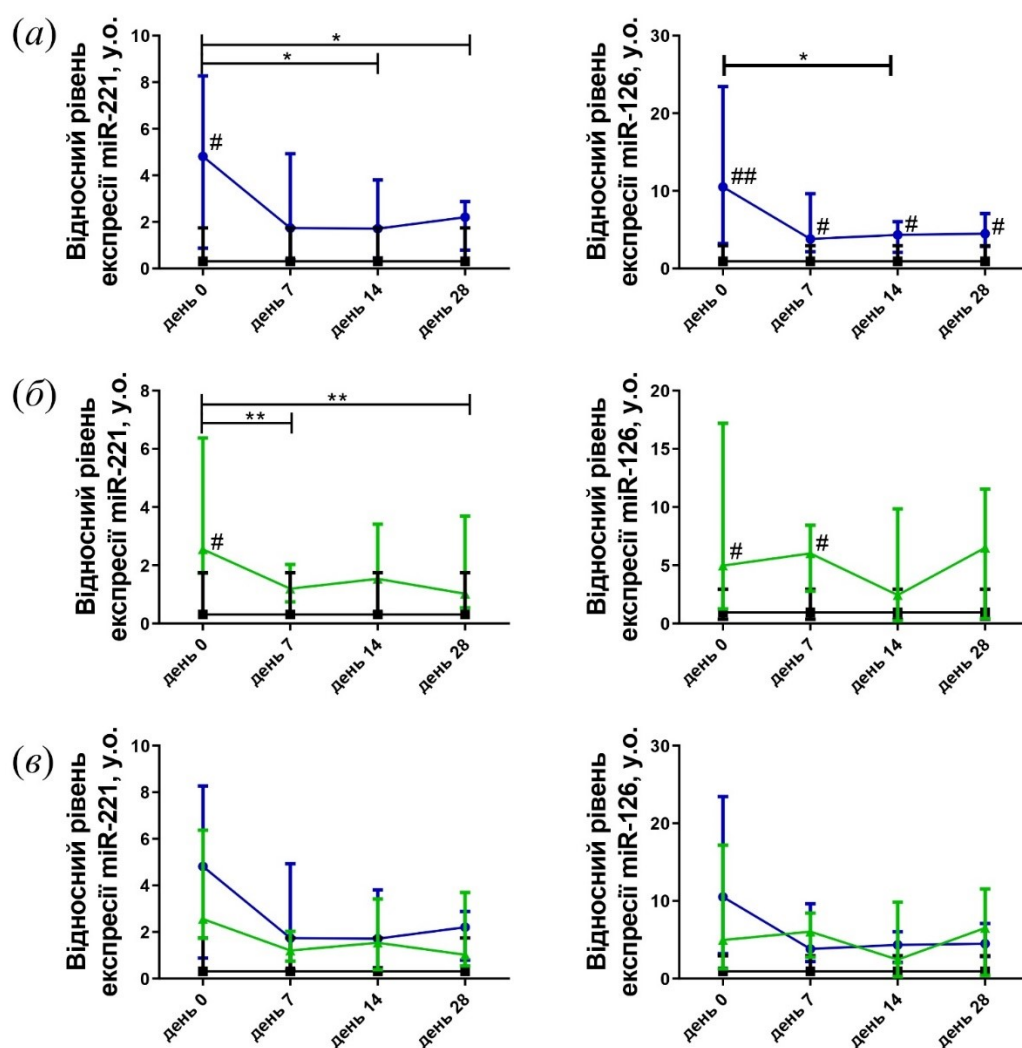


Рис. 5.20. Зміни рівнів miR-221-3p та miRNA-126-3p в залежності від часу спостереження у хворих в (а) — групі контролю, n=14; (б) — МСК групі, n=13; (в) порівняння між групами, —■— - група здорових волонтерів, n=17

Рівень експресії miR-92a-3p у пацієнтів групи COVID-19 на 0 і 7 дні госпіталізації був значно нижчим порівняно з групою МСК (рис.5.21). Експресія miR-92a-3p і miR-424-5p поступово зростала як у COVID-19, так і в МСК групах протягом усього періоду спостереження, із значущою різницею між 7 та 28 днями та групою здорових волонтерів на 28 день.

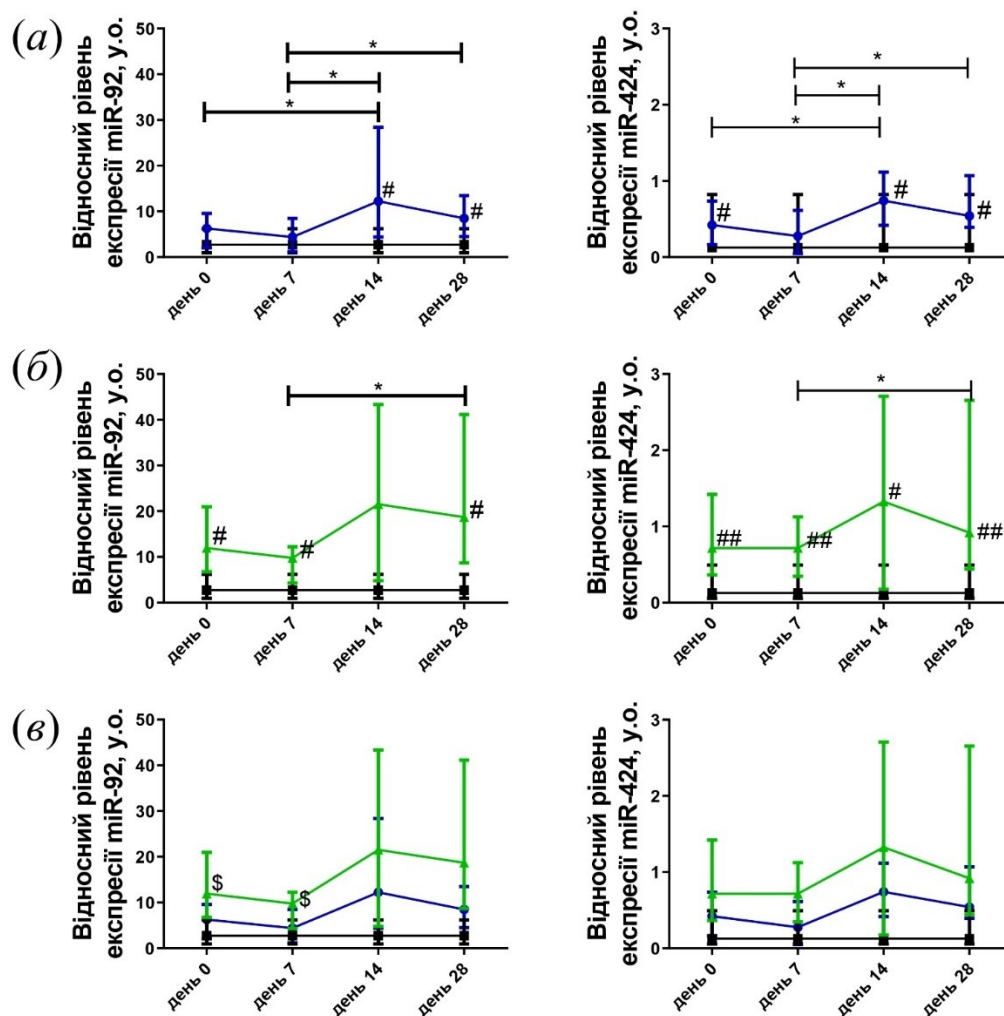


Рис. 5.21. Зміни рівнів miRNA-92a-3p та miRNA-424a-5p в залежності від часу спостереження у хворих в (а) — групі контролю, n=14; (б) — МСК групі, n=13; (в) порівняння між групами, —■— - група здорових волонтерів, n=17

Відносний рівень експресії miR-124-3p не змінювався протягом усього періоду спостереження в жодній з груп і перебував в межах значень здорової групи. Рівень експресії miRNA-124-3p не змінювався протягом всього періоду спостереження та не відрізнявся між групами та від значень здорових донорів (рис.5.22).

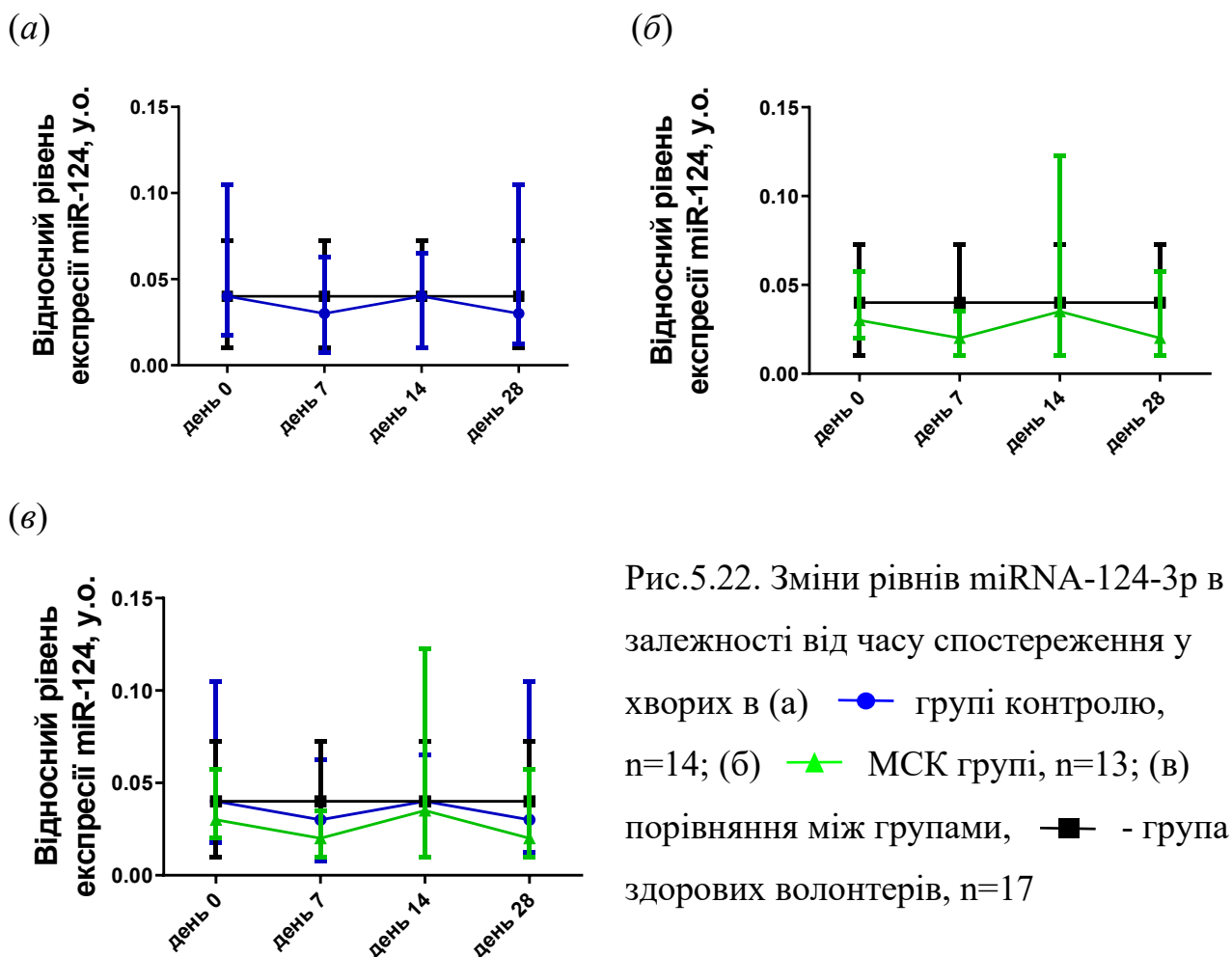


Рис.5.22. Зміни рівнів miRNA-124-3p в залежності від часу спостереження у хворих в (а) —●— групі контролю, n=14; (б) —▲— МСК групі, n=13; (в) порівняння між групами, —■— - група здорових волонтерів, n=17

Активна роль мікроРНК у запаленні підтверджується попередніми даними про підвищену експресію мікроРНК-221 у мишей з гострим ураженням легень, який було індуковано ліпополісахаридом [244]; підвищені рівні miR-133a-3p при атеросклеротичному тромботичному інфаркті мозку та кардіоемболічному інсульті [245]; підвищений вміст miR-21 у пацієнтів з COVID-19 у порівнянні з особами, які не хворіли на COVID-19 [246], і активацію її експресії в CD14⁺ клітинах у пацієнтів з аксіальним спондилоартритом [247]. Чисельні дослідження показують, що miR-146, miR-27 і miR-126 є потенційними біомаркерами запалення при ГРДС [248–252]. Раніше повідомлялося, що miR-146a є важливим молекулярним супресором запалення через його здатність регулювати ланки TLR та NFκB внутрішньоклітинної сигналізації, а також впливати на сімейство протеогліканів [249]. Повідомлялося, що miR-146a зменшує вивільнення NFκB-залежних

прозапальних цитокінів моноцитами, стимульованими TNF- α [253]. Крім того, було помічено, що збільшення рівня експресії miR-146a-5p зменшує пошкодження легеневих клітин шляхом пригнічення запальних реакцій [248]. Високий рівень експресії miR-146a-5p у плазмі крові у обох груп порівняно зі здоровими волонтерами був також показаний Donyavi та ін. [254]. Циркулююча miR424-5p є маркером запалення, виявленим після марафонських пробіжок [255]. MiR424-5p підвищується при гострому інфаркті міокарда та аутоімунному захворюванні пухирчатці [256,257]. У пацієнтів із безсимптомним COVID-19 ця мікроРНК нижча, ніж у пацієнтів із вираженими симптомами [258]. Цікаво, що miR424-5p залучено при розвитку артеросклероза шляхом активування диференціювання моноцитів в макрофаги [259] та дендритні клітини [260]. Велика кількість експериментальних робіт встановила, що miR-424-5p експресується на вищому рівні в ендотеліальних клітинах при ушкодженнях судин, гіпоксії та ішемії серця [261,262]. Таким чином вищий рівень miR-424-5p в крові пацієнтів з COVID-19 на 7 добу після трансплантації МСК може вказувати про більший рівень пошкодження судин та розвиток ендотеліальної дисфункції.

miR-92a-3p вважається ефективним біомаркером у діагностиці гострого загострення хронічного обструктивного захворювання легень, і рівні її експресії підвищені в плазмі пацієнтів із ХОЗЛ [263]. Підвищення рівня miR-92a-3p спостерігається у пацієнтів з COVID-19, патологіями судинної системи та при розвитку гострого ураження легень ліпосахаридами у тварин [264–266]. У даному дослідженні рівень прозапальних miR-146a, miR-27a, miR-126, miR-221, miR-21 і miR-133 у плазмі хворих не відрізнявся між групами та знижувався протягом усього періоду спостереження. Однак після закінчення курсу традиційного лікування відбулося значне підвищення miR-92a-3p і miR424-5p у пацієнтів як в МСК, так і в COVID-19 групах. Можливо, що зростання рівнів miR-92a-3p та IL-6 з 7 по 14 доби госпіталізації в групі COVID-19 вказує про більший рівень пошкодження судин та ендотеліальну дисфункцію. Також було виявлено, що рівень miR-424-5p і miR-92a-3p у плазмі негативно корелює з ураженням легень за

даними КТ. Раніше було встановлено, що мікроезули, які містять miR-92a-3p, miR-21-5p, miR-16-5p, miR-126 і miR-182-5p індукують виснаження Т-клітин, як було показано в роботі Cui та ін. [267]. Окрім того, miR-92a-3p негативно регулює імунну відповідь опосередковану TLR і призводить до зниження експресії IL-6 [268]. Таким чином, негативна кореляція між відносними рівнями miR-92a-3p і miR-424-5p в плазмі пацієнтів з рівнями СРБ, SP-D та IP-10, разом із даними, згаданими вище, може вказувати на їхню компенсаторну роль у зменшенні запалення.

5.6. Кореляція між гематологічними параметрами, цитокінами, мікроРНК і показниками КТ легень у групі МСК

Усі дані кореляційного аналізу доступні в Додатку В, вибрані дані представлені на рис.5.23. Рівні СРБ негативно корелювали з відсотком лімфоцитів ($r = -0,562$, $p \leq 0,0001$) та позитивно з ШОЕ ($r = 0,628$, $p \leq 0,0001$) і відсотком нейтрофілів ($r = 0,411$, $p \leq 0,01$). Рівень SP-D корелює з ШОЕ ($r = 0,386$, $p \leq 0,01$) та кількістю лімфоцитів ($r = -0,383$, $p \leq 0,01$). IP-10 негативно корелює з кількістю лімфоцитів ($r = -0,551$, $p \leq 0,001$), еозинофілів ($r = -0,384$, $p \leq 0,01$), та miR-27a-3p ($r = -0,472$, $p \leq 0,005$), miR-92 ($r = -0,409$, $p \leq 0,01$), miR-424 ($r = -0,436$, $p \leq 0,005$). Рівні тропоніну I корелюють з експресією miR-133a-3p позитивно ($r = 0,372$, $p = 0,05$) і еозинофілів негативно ($r = -0,352$, $p \leq 0,05$). Рівні sRAGE в плазмі позитивно корелювали з концентрацією MCP-1 ($r = 0,516$, $p \leq 0,001$) та MIP-1 α ($r = 0,299$, $p \leq 0,05$). Концентрація MCP-1 негативно корелювала з miR-21-5p ($r = -0,396$, $p \leq 0,01$). miR-92a-3p негативно корелювала з CRP ($r = -0,477$, $p \leq 0,001$), SP-D ($r = -0,450$, $p \leq 0,005$) та IP-10 ($r = -0,409$, $p \leq 0,005$). Негативну кореляцію виявлено між miR-424-5p та CRP ($r = -0,435$, $p \leq 0,005$), SP-D ($r = -0,452$, $p \leq 0,005$) та IP-10 ($r = -0,436$, $p \leq 0,005$).

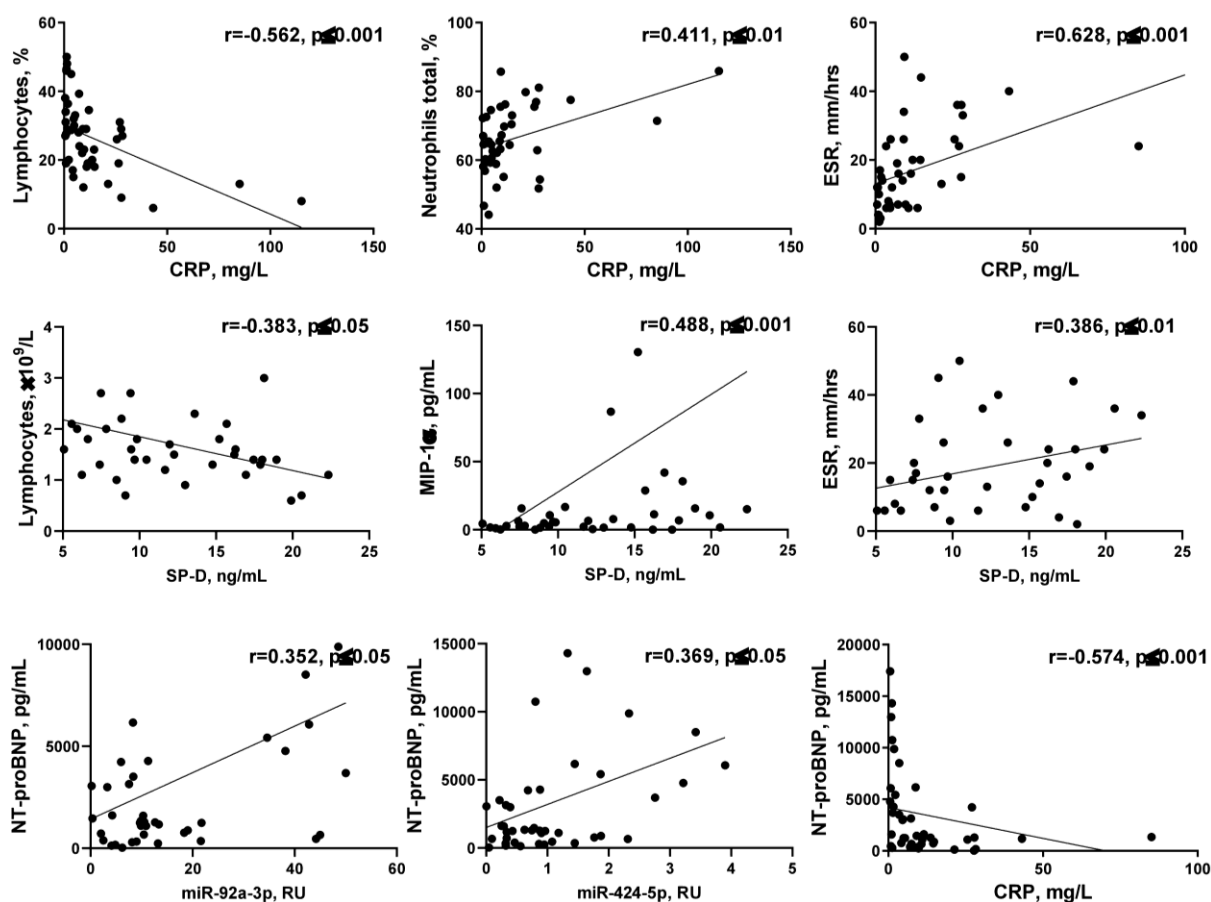


Рис.5.23. Вибрані дані кореляційного аналізу між загальними показниками КТ легень, параметрами крові, цитокінами та мікроРНК у пацієнтів з COVID-19. Усі дані кореляційного аналізу доступні в Додатку В. r – коефіцієнт рангової кореляції Спірмена, двобічна статистична значущість встановлена на значенні $p \leq 0,05$

ШОЕ позитивно корелювала з параметрами КТ легень на 2 тижні ($r = 0,445$, $p \leq 0,005$), 24 ($r = 0,457$, $p \leq 0,005$) і 48 ($r = 0,398$, $p \leq 0,05$). Кількість гранулоцитів позитивно корелює з інтенсивністю фіброзу легень на 24 тижні ($r = 0,457$, $p \leq 0,005$) і 48 ($r = 0,449$, $p \leq 0,005$). Рівні СРБ позитивно корелювали з пошкодженням легень на 2-му тижні ($r = 0,439$, $p \leq 0,005$), 8 ($r = 0,386$, $p \leq 0,05$), 24 ($r = 0,510$, $p \leq 0,001$) і 48 ($r = 0,475$, $p \leq 0,005$). Рівні МСР-1 позитивно корелювали із загальним балом КТ на 8-му тижні ($r = 0,471$, $p \leq 0,005$) і 48 ($r = 0,499$, $p \leq 0,005$). Концентрація SP-D

корелює із сумарними балами КТ на 2 тижні ($r = 0,373$, $p \leq 0,05$). Рівні RAGE позитивно корелювали з балами КТ на 2 тижнях ($r = 0,437$, $p \leq 0,005$), 8 ($r = 0,436$, $p \leq 0,01$), 24 ($r = 0,420$, $p \leq 0,01$) і 48 ($r = 0,510$, $p \leq 0,005$). miR-424a-5p негативно корелювала зі ступенем ураження легень на 2-му тижні ($r = -0,571$, $p \leq 0,001$), 8 ($r = -0,426$, $p \leq 0,01$) і 24 ($r = -0,351$, $p \leq 0,05$). рівні miR-21a-5p негативно корелює із загальним балом КТ на тижні 2 ($r = -0,412$, $p \leq 0,01$), 8 ($r = -0,479$, $p \leq 0,005$) і 48 ($r = -0,353$, $p \leq 0,05$). Протягом тижня 2 загальні бали КТ корелювали негативно з відносними рівнями експресії miR-92a-3p ($r = -0,480$, $p \leq 0,005$).

РОЗДІЛ 6

Вплив кріоконсервованих мезенхімальних стромальних клітин пуповини людини на мононуклеарні клітини периферичної крові пацієнтів з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2 *in vitro*

6.1. Зміни імунотипу мононуклеарних клітин периферичної крові хворих, рівнів цитокінів та кількості клітин при співкультивуванні з МСКПЛ

Зміни у співвідношенні субпопуляцій мононуклеарних клітин периферичної крові хворих з COVID-19 після 6 днів співкультивування у присутності та без МСКПЛ представлені на рис.6.1 та рис.6.2. Дані представлені як середнє зі стандартним відхиленням. Парний *t* тест був використаний для порівняння між групами, умовні позначення на всіх рисунках: *, $p < 0.05$; ns, немає різниці.

Аналіз даних проточної цитофлуориметрії продемонстрував збільшення субпопуляцій ранніх Т клітин $CD69^+CD25^-$ та Т клітин середньої стадії диференціації $CD69^+CD25^+$ серед $CD3^+$ Т-клітин у МКПК після спільного культивування з МСКПЛ (рис.6.1 а, б). Під впливом МСКПЛ відсоток ефекторних Т-клітин ($CXCR3^+$), старіючих ефекторних CD8 і CD4 Т-клітин ($CD57^+CXCR3^+$) і CD8 Т-клітин пам'яті ($CD57^+CXCR3^+CD45RO^+$) зменшився в МКПК (рис.6.1 в, г, д і е, відповідно) .

МСКПЛ не впливали на дозрівання $CD3^+CD4^+CD8^-$ Т-клітин, цитотоксичних $CD3^+CD4^-CD8^+$ Т-клітин, та регуляторних Т-клітин ($CD3^+CD4^+CD8^-CD25^{low}CD127^{low}$) під час співкультивування з МКПК (рис.6.2 а, б і в, відповідно). Спільне культивування з МСКПЛ значно зменшувало проліферацію

МКПК, що співвідноситься зі зниженою експресією генів, залучених до поділу клітин, за даними аналізу транскриптому (рис.6.2 з та рис.6.3).

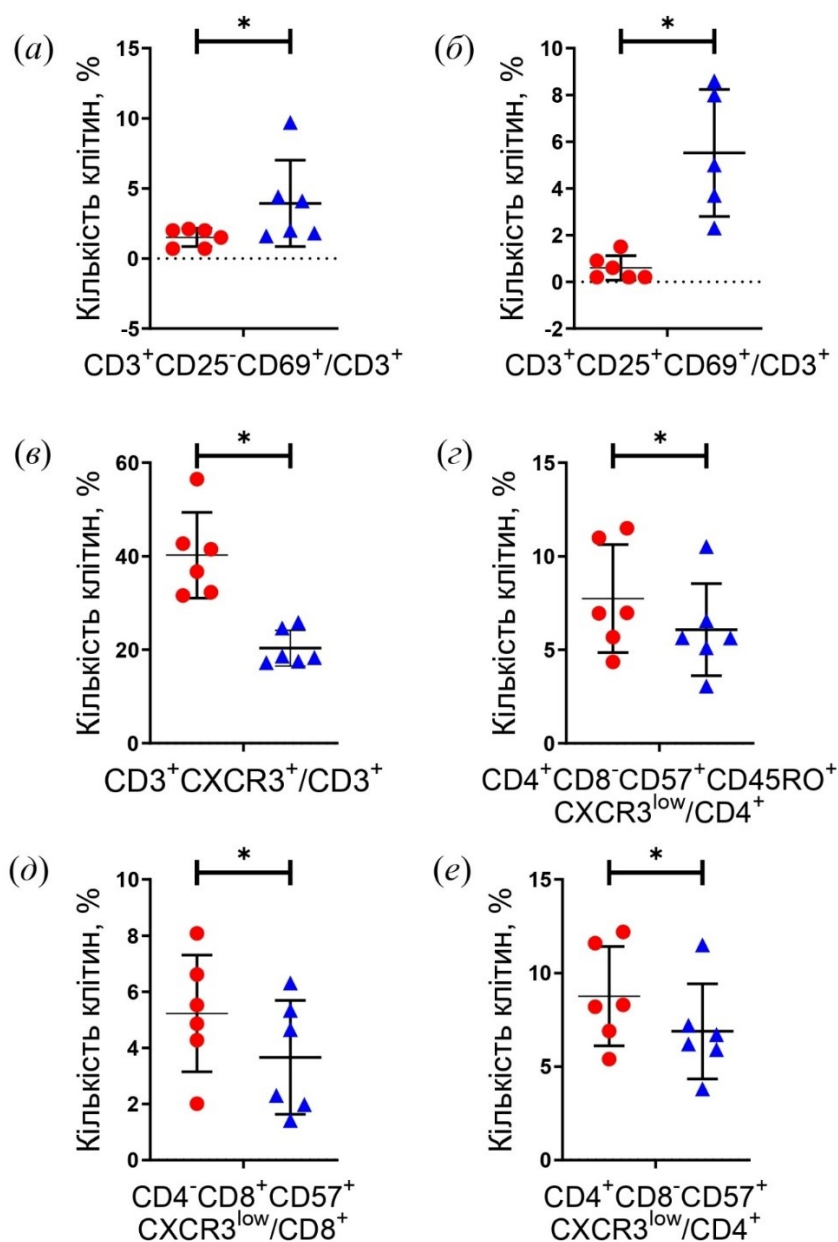


Рис.6.1. Зміни у співвідношенні субпопуляцій МКПК. Червоні кола відповідають Контрольній групі, сині трикутники – МСК групі

ІФА кондиціонованого середовища із культури МСКПЛ/МКПК показав значне збільшення продукції MCP-1, IL-6 та G-CSF і помітно послаблену секрецію MIP-1 α , IL-10 та IL-12p70 в порівнянні з кондиціонованим середовищем з культури МКПК без МСКПЛ. Концентрація IL-2 та IP-10 суттєво не змінювалася в кондиціонованому середовищі, зібраному із культур МКПК та МСКПЛ/МКПК (рис.6.3).

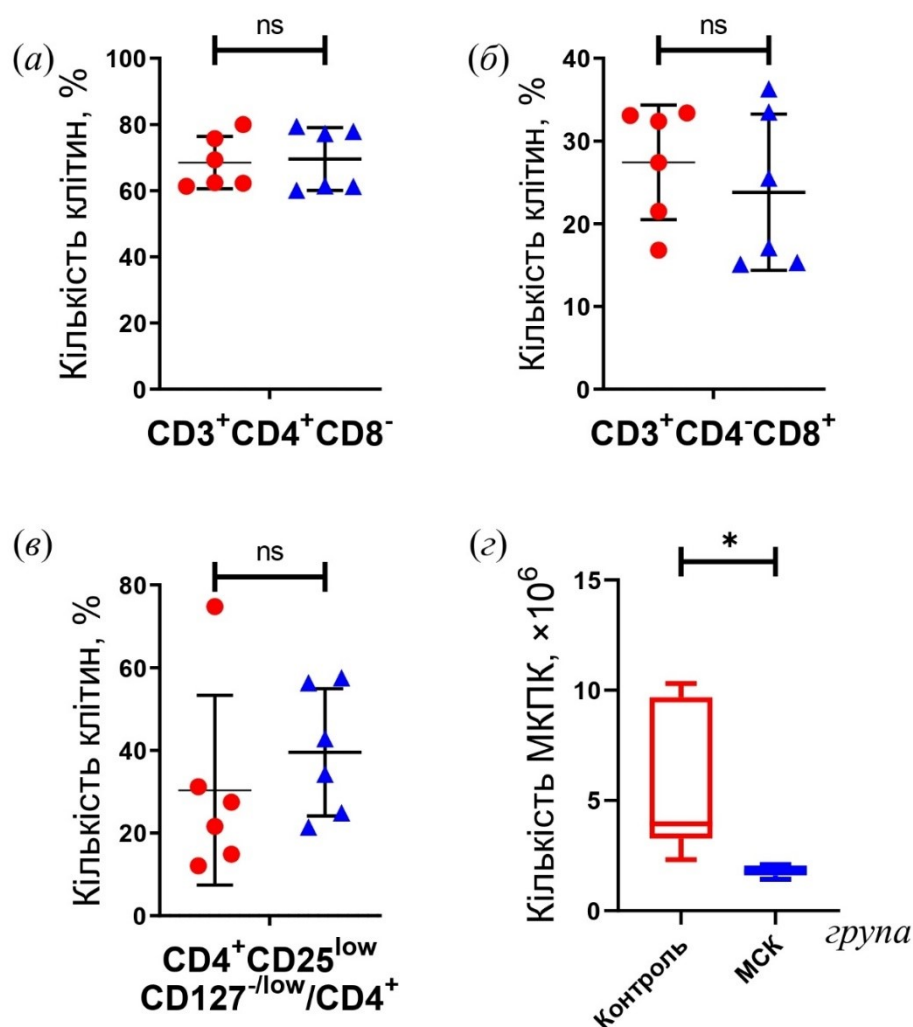


Рис.6.2. Зміни у співвідношенні субпопуляцій МКПК (а, б, в) та проліферації (г). Червоні кола відповідають Контрольній групі, сині трикутники – МСК групі

Крім того, було показано удвічі вищий рівень експресії PD-L1 у МКПК в умовах спільного культивування. МСКПЛ можуть регулювати відповідь Т-клітин за допомогою міжклітинних контактних взаємодій і секреції розчинних факторів. Інгібування проліферації Т-клітин відбувається внаслідок взаємодії рецептора PD-1 з його лігандом [269]. Крім того, розчинні фактори, такі як PGE2 та IDO, беруть участь в інактивації Т-клітин, зупинці клітинного циклу у G0/G1 фазі, апоптозі та інгібуванні вироблення запальних цитокінів [269,270]. Цікаво, що гени, задіяні у виробництві PTGES та IDO2, були активовані в МКПК після спільного культивування з МСКПЛ.

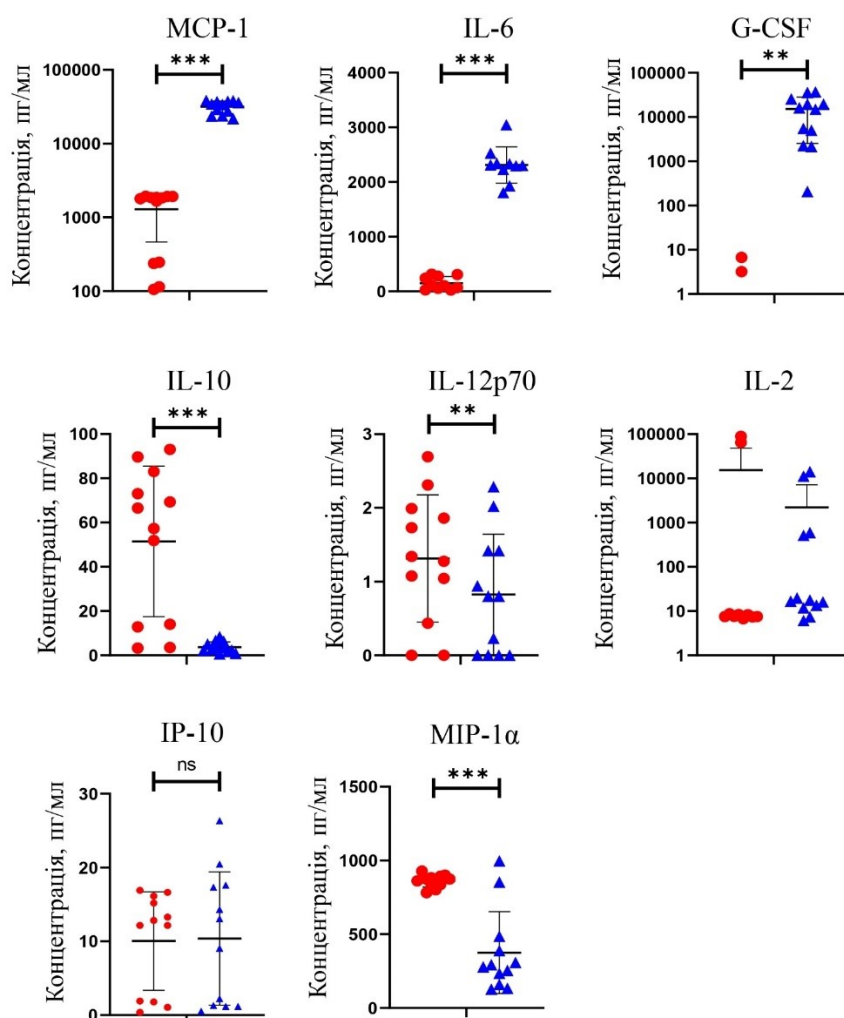


Рис.6.3. Зміни у рівнях цитокінів в середовищі від МКПК після 6 днів співкультивування з та без МСКПЛ. Дані представлені як середнє зі стандартним відхиленням. Парний t тест використаний для порівняння між групами: *, $p < 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$; ns, немає різниці. Червоні кола відповідають Контрольній групі, сині трикутники – МСК групі

Було виявлено, що пацієнти з COVID-19, які отримували МСК, мали значно підвищену частку та абсолютну кількість CD4⁺ Т-клітин і Treg в організмі [271]. МСК можуть стимулювати дозрівання Т-клітин, про що свідчить посилення ранніх Т-клітинних маркерів CD25 і CD69 при спільному культивуванні з МСК [272]. Крім того, дані RNAseq, отримані в дослідженнях Zhu та ін., продемонстрували, що МСК посилюють експресію генів, залучених у реакцію запалення [59]. Ці висновки вказують на те, що МСК не тільки мають протизапальні властивості, але й надають імуностимулюючу дію на Т-лімфоцити. МСК також мають здатність змінювати різні підгрупи Т-клітин, що може сприяти одужанню від інфекції SARS-CoV-2. Лікування MSC підвищувало експресію IL12R, STAT4 і STAT6 в CD4⁺ Т-клітинах і перешкоджало Т-клітинам секретувати IFN- γ і TNF- α , що переводило клітини з прозапального стану на протизапальний стан [273,274]. Також було показано, що

кондиціоноване середовище після спільного культивування МСКПЛ і МКПК мають підвищений вміст IL-6, MCP-1 і G-CSF і знижений MIP-1 α та IL-12, що відповідає рівням експресії відповідних генів у МКПК за даними аналізу транскриптому. Подібні дані щодо впливу МСК на секрецію IL-6, MCP-1, MIP-1 α та IL-12 МКПК були повідомлені раніше [275,276]. З іншого боку, той факт, що МСКПЛ призводив до зниження IL-10 при спільному культивуванні з МКПК, не узгоджується з даними, коли використовувалися МКПК від здорових донорів. Але зниження експресії IL-10 спостерігалось після спільного культивування МКПК пацієнтів із COVID-19 із МСК, отриманими з пульпи зуба [277].

В ході дослідження було показано, що МСКПЛ індукують експресію CD69 як маркерів ранніх Т-клітин і CD25 як маркерів середньої стадії, що узгоджується з даними літератури [59]. При цьому відсоток ефektorних Т-клітин та відсоток ефektorних зрілих CD8 і CD 4 Т-клітин зменшився під впливом МСКПЛ, що відповідає рівням експресії CXCR3 у МКПК за даними РНК-секвенування. Крім того, раніше повідомлялося про зменшення пулу ефektorних Т-клітин після спільного культивування активованих МКПК з МСКПЛ [278].

6.2. Визначення змін в експресії генів мононуклеарних клітин периферичної крові пацієнтів до та після співкультивування з МСКПЛ

Для визначення змін в експресії генів були порівняні профілі транскриптомів мононуклеарних клітин периферичної крові (МКПК), отриманих від хворих на коронавірусну пневмонію, культивованих спільно з мезенхімальними стромальними клітинами пуповини людини (група МСК) і без них (Контрольна група). В результаті були виявлені 4172 гени з диференціальною експресією; з них 2993 гени мали підвищений рівень експресії в МСК групі, а 1179 – знижений (рис.6.4).

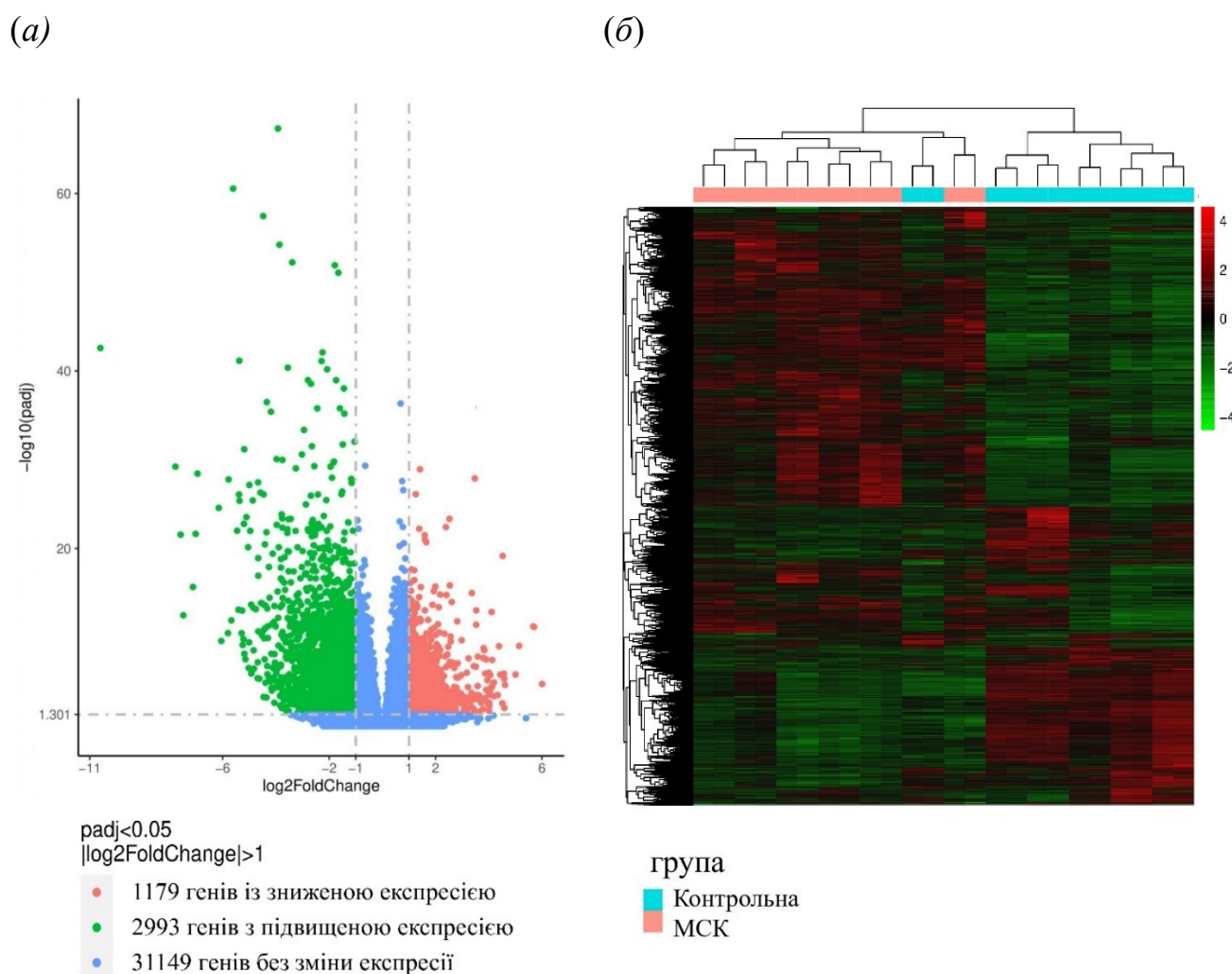


Рис.6.4. Профіль транскриптому МКПК, отриманих від пацієнтів із COVID-19, культивованих з та без МСКПЛ. (a) Графік для диференціально експресованих генів. (б) Теплова карта представляє кількість диференціально експресованих генів між групами. Експерименти проводили в двох біологічних повторах. Експресію генів з $\log_2\text{Fold}<1$ вважали зниженою, з $\log_2\text{Fold}>1$ – підвищеною, значення $\text{padj}<0,05$ вважали значущим

Аналіз молекулярної функції генів з підвищеною регуляцією серед збагачених категорій бази даних «Онтології генів» (GO) показав, що гени серингідролази, пептидази серинового типу, ендопептидази серинового типу, ендопептидази та металопептидази були найбільше надекспресовані (рис.6.5). Аналіз біологічних процесів генів з підвищеною регуляцією серед збагачених категорій бази даних GO показав, що також були активовані гени, задіяні в

організації позаклітинного матриксу, ангіогенезі, імунному захисті (особливо в імунитеті, опосередкованому нейтрофілами), і міграції лейкоцитів.

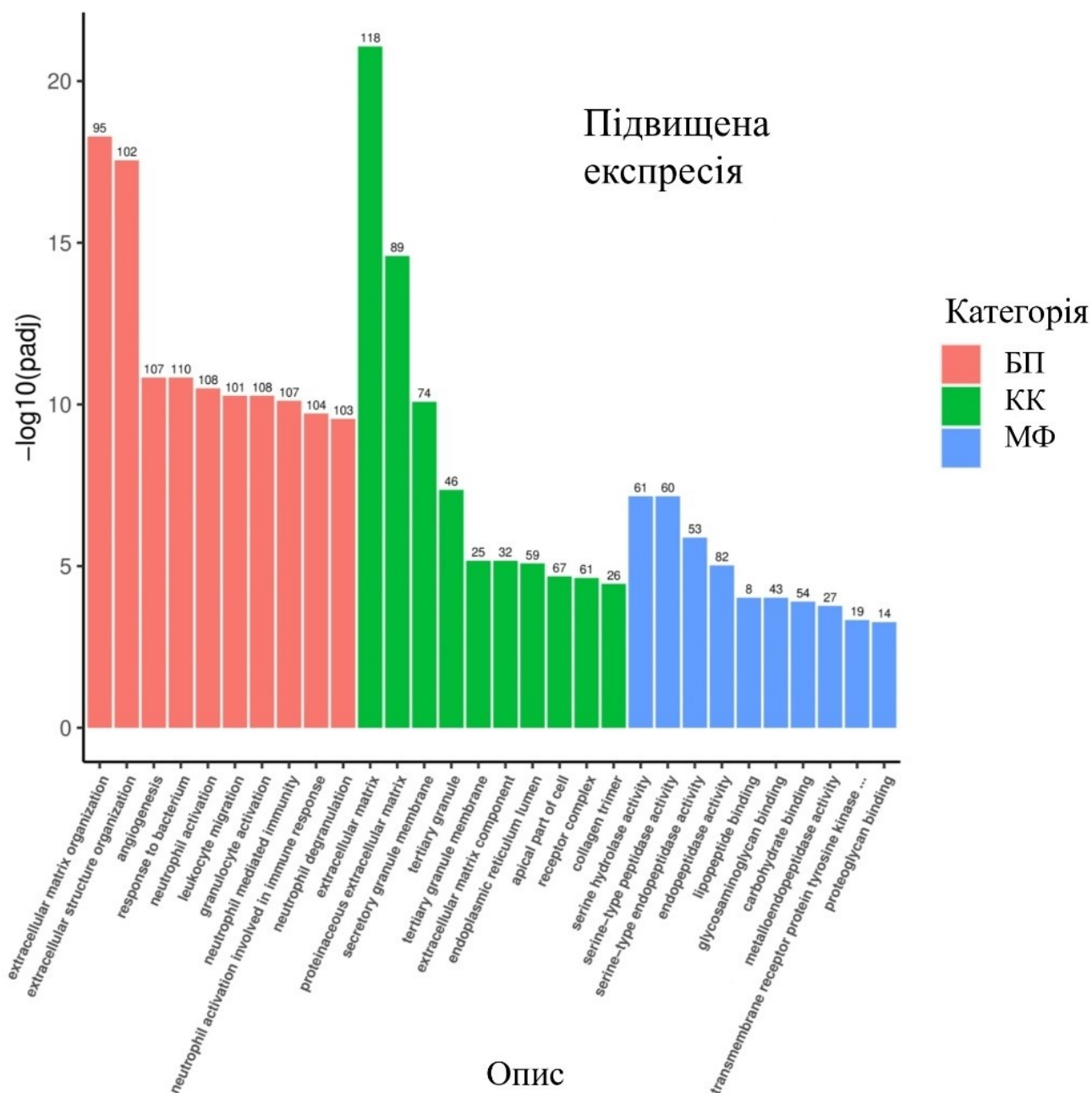


Рис.6.5. Збагачені категорії за результатами GO аналізу 2063 генів з підвищеною експресією. Скорочення категорій: БП – біологічні процеси, КК – клітинний компонент, МФ – молекулярна функція

Розподіл за молекулярною функцією генів зі зниженою регуляцією за даними GO показав, що найбільш релевантними категоріями були гени, що кодують білки, асоційовані зі зв'язуванням з хроматином та тубуліном каталітичною активністю та впливом на ДНК. Аналіз біологічних процесів генів зі зниженою регуляцією серед збагачених категорій бази даних GO показав низьку експресію генів, які беруть участь у поділі клітин (рис.6.6).

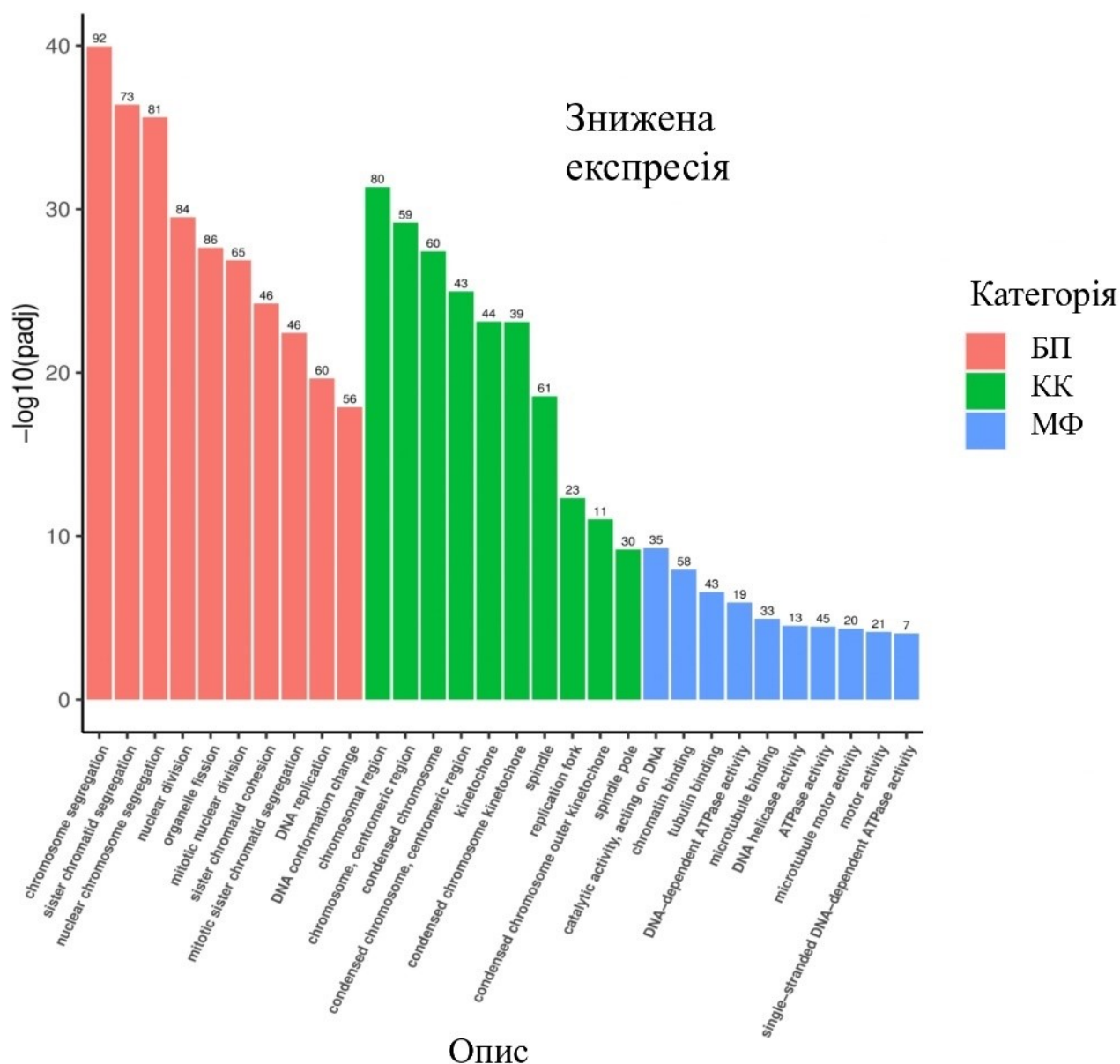


Рис.6.6. Збагачені категорії за результатами GO аналізу 1433 генів зі зниженою експресією. Скорочення категорій: БП – біологічні процеси, КК – клітинний компонент, МФ – молекулярна функція

Анотація метаболічних шляхів в базі даних KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Кіотська енциклопедія генів і геномів) виявила, що МСКПЛ індукують асоційовані із запаленням сигнальні шляхи (від рецепторів В-клітин та NF-каппа В сигналінг) в МКПК хворих (рис.6.7).

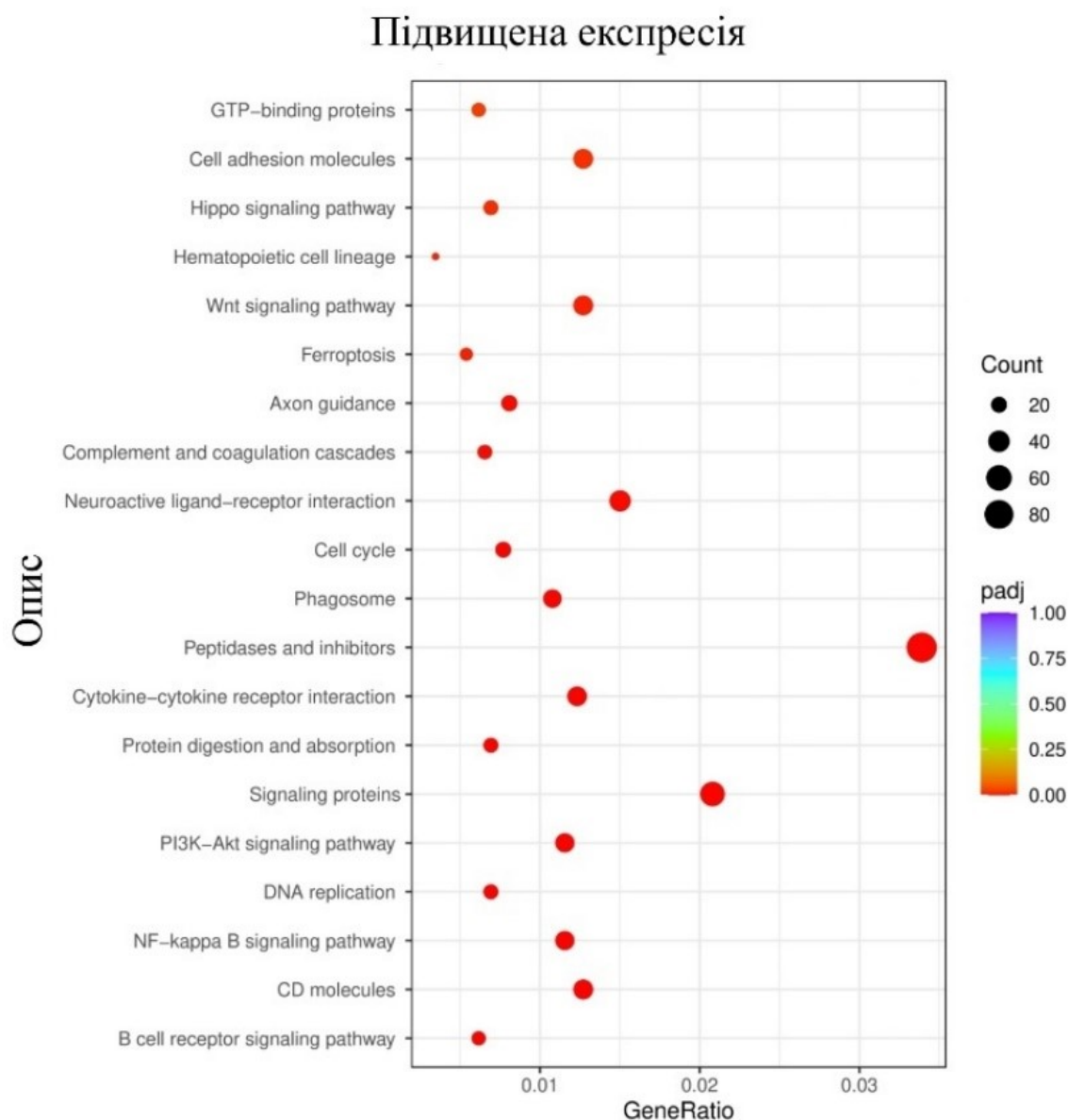


Рис.6.7. Анотація генів з підвищеною експресією в базі даних KEGG. Експерименти проводили в двох біологічних повторах. Експресію генів з $\log_2\text{Fold} < 1$ вважали зниженою, з $\log_2\text{Fold} > 1$ – підвищеною, значення $\text{padj} < 0,05$ вважали значущим

Більше того, представленість генів, які асоційовані з фагосомами, цитокін-цитокіновими взаємодіями, розщепленням білків та фероптозом, серед збагачених

категорій в базі даних KEGG вказує на активацію механізмів імунної відповіді в МКПК. Збагачені категорії генів зі зниженою експресією, проаналізовані в базі даних KEGG, включали гени, пов'язані з проліферацією клітин, а саме з реплікацією ДНК, клітинним циклом і репаративним FA/BRCA механізмом. Крім того, знижені рівні експресії в МКПК після спільного культивування з МСКПЛ були виявлені для генів асоційованих з апоптозом (рис.6.8).

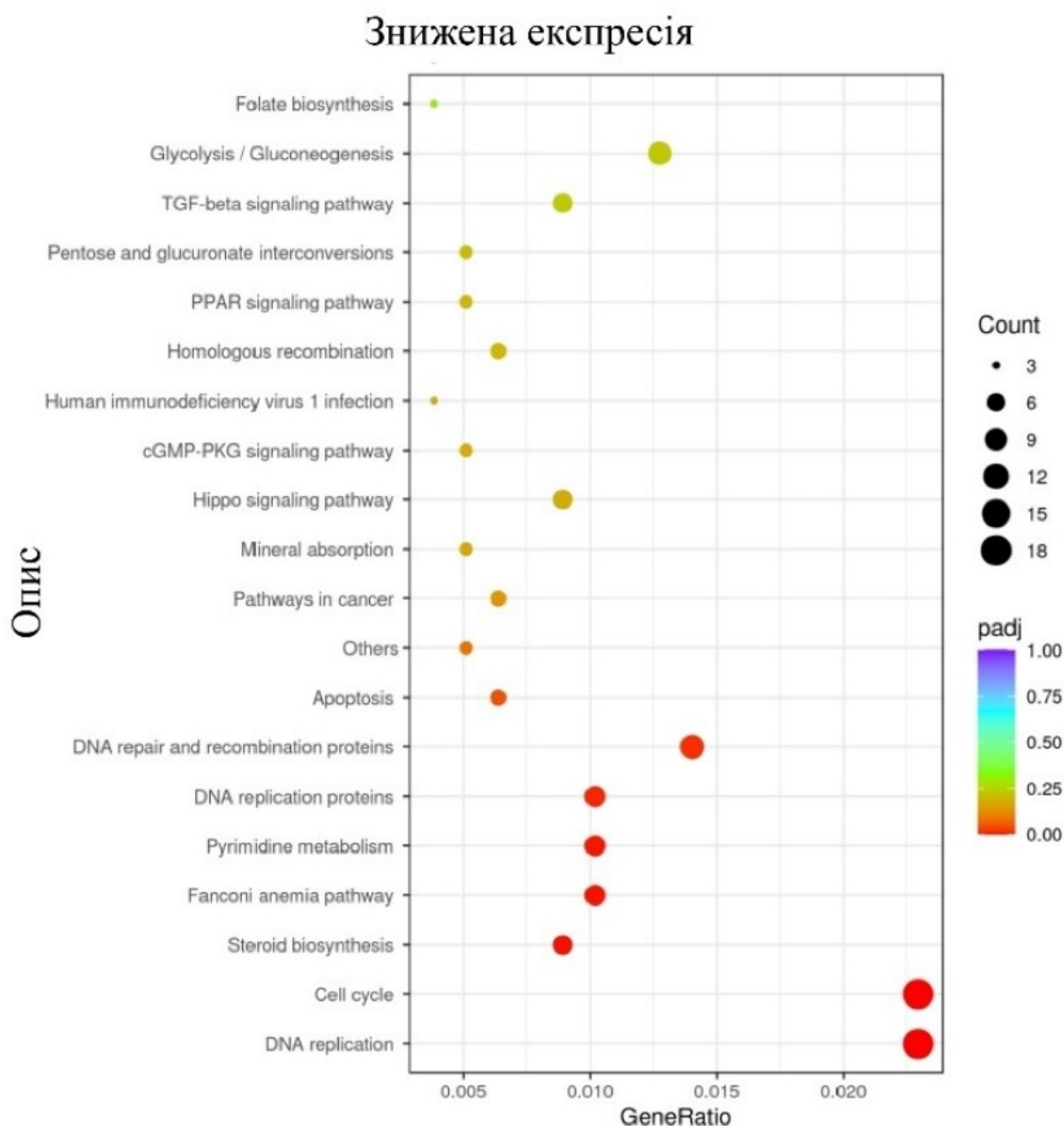


Рис.6.8. Анотація генів з підвищеною експресією в базі даних KEGG. Експерименти проводили в двох біологічних повторах. Експресію генів з $\log_2\text{Fold} < 1$ вважали зниженою, з $\log_2\text{Fold} > 1$ – підвищеною, значення $\text{padj} < 0,05$ вважали значущим

Таким чином, дані експериментів *in vitro* демонструють, що під впливом МСКПЛ в МКПК хворих на коронавірусну пневмонію посилюється експресія генів, залучених до розвитку імунної відповіді, зокрема активації нейтрофілів, міграції лейкоцитів і фагоцитозу, і знижується експресія генів, пов'язаних з апоптозом.

Відомо, що МСК, виділені з Вартонових драглів активують нейтрофіли. Зокрема, вони посилюють дихальний метаболізм та активність фагоцитів і зменшують апоптоз [279,280]. Водночас той факт, що МСКПЛ знижують експресію генів, які беруть участь у проліферації в МКПК, свідчить про певний імуносупресивний ефект. Цікаво, що ми спостерігали збільшення експресії генів, пов'язаних із фероптозом, у лейкоцитах хворих на COVID-19, що може мати позитивний вплив, оскільки раніше повідомлялося про підвищення експресії генів, пов'язаних із фероптозом у МКПК під час гострої фази хвороби та зниження експресії у фазі одужання [281]. Крім того, відомо, що опосередкований МСК імуномодулюючий ефект на МКПК відбувається через активацію NF-каппа В сигнального шляху [282], що також узгоджується з даними аналізу профілю транскриптомів.

Отримані результати показують, що МСКПЛ зменшують ступінь пошкодження легенів за даними комп'ютерної томографії і не проявляють сильних імуносупресивних властивостей; натомість вони мають імуномодулюючий ефект щодо відновлення вмісту лімфоцитів та нейтрофілопоезу. Потрібні подальші дослідження для оцінки терапевтичної ефективності та механізмів інфузії МСКПЛ у пацієнтів із запальними захворюваннями дихальних шляхів і ГРДС, спричиненими, зокрема, SARS-CoV-2.

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

На початку госпіталізації пацієнтів з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2, дослідження гематологічних показників показало наявність мієлоцитозу, лімфо- та лейкопенії, яка з початком лікування змінюється лейкоцитозом. Також у хворих спостерігався підвищений вміст паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів. Встановлена негативна кореляція між кількістю мієлоїдних ... клітин та ..., нейтрофілів та лімфоцитів свідчить про переважання мієлопоезу над лімфопоезом на початкових стадіях захворювання. Ці дані узгоджуються з даними інших дослідників [159][172,173], і свідчать, про розвиток дисбалансу між вродженою та набутою ланкою імунітету на початку коронавірусного захворювання з формуванням імунодефіцитного стану. Видужування пацієнтів на фоні консервативного лікування супроводжується встановленням адаптивного Т-клітинного імунітету, а саме відбувається зростання вмісту подвійно позитивних Т-клітин, CD127- та CD25-експресуючих Т-клітин, CD3⁺PD-1^{low} і CD3-PD-1^{low} Т-клітин, CD4⁺ і CD8⁺ регуляторних, активованих, виснажених та старіючих клітин пам'яті з 14 доби від початку госпіталізації. Низький вміст низки субпопуляцій дендритних клітин на початку захворювання та повільне відновлення регуляторних дендритних клітин підтверджує імунодіфіцитний стан пацієнтів з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2, на початку госпіталізації. Тож одним із завданням терапії ГРДС при коронавірусній хворобі є нормалізація імунної системи, що дозволить уникнути цитокинової бурі, покращить потенціал організму до боротьби з інфекцією та її наслідками. Також на початку госпіталізації спостерігалися високі рівні СРБ та ШОЕ. В цьому контексті застосування МСК терапії було розглянуто, як потенційний напрямок, оскільки за результатами багатьох доклінічних та клінічних досліджень МСК проявляли імуносупресивні та імномодулюючі властивості. Результати нашої роботи показали, що, дійсно, МСК терапія стимулює

відновлення рівня лімфоцитів та прискорює зниження таких маркерів запалення як СРБ і ШОЕ, а також нормалізацію кількості паличкоядерних нейтрофілів. Оскільки ці показники мають найбільшу ступінь корелятивного зв'язку зі ступенем пошкодження легень через 1 рік після МСК терапії, їх зниження додатково свідчить про позитивний вплив останньої на протікання ГРДС.

Також в даній роботі було вперше виявлено достовірно вищі відносні рівні експресії miR-221-3p, miR-27a-3p, miR-133a-3p і miR-126-3p на початку госпіталізації пацієнтів із ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2. Тож ці мікроРНК можуть в подальшому бути розглянуті як додаткові діагностичні та прогностичні маркери при ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2 та іншими вірусами. Однак, ми не спостерігали зниження рівня цих мікроРНК за умов МСК терапії. Також нами було вперше показано, що ступінь фіброзу легень через 1 рік спостереження позитивно корелює з концентраціями MCP-1, SP-D, RAGE, вмістом старіючих Т-клітин та Т-клітин пам'яті та негативно корелює з вмістом CD127⁺ Т-клітин, рівнями експресії miR-92a-3p, miR-21a-5p і miR-424-5p в плазмі крові хворих з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2. Сурфактант D та RAGE є маркерами безпосереднього пошкодження альвеоцитів та ендотеліальних клітин, тож їх зростання свідчить про гостре враження легень, і, як випливає з нашого дослідження, безпосередньо є фактором ризику фіброзування тканини легень. Виявлена в цій роботі достовірна негативна середня кореляція між відносними рівнями miR-92a-3p і miR-424-5p, які можуть бути асоційовані з ендотеліальною дисфункцією, в плазмі пацієнтів і рівнями СРБ, SP-D та IP-10, може вказувати на їхню компенсаторну роль у зменшенні запалення, що узгоджується з раніше встановленими даними інших авторів [172,173].

Зростання вмісту старіючих субпопуляцій Т-клітин у пацієнтів з ГРДС є свідченням виснаження адаптивного імунітету, і може бути одним із факторів ризику фіброзних ускладнень, оскільки старіючі Т-клітини не здатні ефективно боротися з вірусом, та є одним із джерел цитокінів. CD127 ранній маркер активації Т-клітин, і необхідний для їх адекватного дозрівання та проліферації [283], тож низький вміст цих CD127⁺ Т-клітин свідчить про враження процесу лімфопоезу, що

підтверджується також негативною кореляцією між лімфопенією та ступенем враження легень через 1 рік спостереження.

За нашими дослідженнями МСК терапія призвела до падіння рівня SP-D в сироватці крові хворих хоча значення не досягли достовірної відмінності, в той же час не спостерігалось впливу на рівні MCP-1, RAGE, miR-92a-3p, miR-21a-5p і miR424-5p. Також нами показано, що трансплантація МСК призводить до достовірного зростання в плазмі хворих вмісту протизапального цитокіну IL-10 та прозапальних хемокинів IP-10, MIP-1 α та G-CSF.

Таким чином, з вище наведених експериментальних даних випливає, що МСК терапія призводить до зниження лише певних маркерів запалення (СРБ, ШОЕ, паличкоядерних нейтрофілів), призводить до зростання протизапального цитокіну IL-10 в той же час не впливає на інші (miR-221-3p, miR-27a-3p, miR-133a-3p, miR-126-3p, miR-92a-3p, miR-21a-5p, miR124-5p, miR424-5p, MCP-1, RAGE, IL-2, IL-6). Потрібно відмітити, що вище наведена низка мікроРНК, не є валідованими маркерами запалення та наразі не встановлена їх прогностична значимість для оцінки перебігу ГРДС при коронавірусній хворобі. Потрібно відмітити, що МСК терапія може покращувати стан хворих, але не впливати на рівні прозапальних цитокінів в крові пацієнтів, що було встановлено в багатьох роботах [170, [59,155,224]. При системному введенні МСК можуть накопичуватися в легневих капілярах протягом короткого часу і викликати зниження продукції маркерів запалення, пошкодження легень та цитокінів в тканині легень, однак при цьому це не відображається в плазмі крові хворих на ГРДС, тому дослідження цих параметрів в плазмі/ сироватці крові може бути не об'єктивним в оцінці стану пацієнта [164, 167, 170, 204].

Перш за все, було показано, що трьохкратна трансфузія МСКПЛ з інтервалом в 3 доби в дозі 1×10^6 клітин/кг маси тіла на ранній/ середній стадії захворювання на ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2 є безпечною і не мала істотних побічних ефектів, має імуномодулюючий вплив на перебіг запального процесу та призводить до суттєвого (в 12 разів) зниження рівня фіброзу легень через 1 рік спостереження. Переважна більшість досліджень повідомляє про однократне введення МСК

[145,146,170], в той час як дана робота демонструє пролонгований вплив МСКПЛ на стан легень у пацієнтів з ГРДС при коронавірусній хворобі після трьох послідовних введень. Численні доклінічні дослідження продемонстрували, що трансплантація МСКПЛ на моделях розвитку ГРДС у тварин може значно послабити запалення та покращити відновлення пошкодженої легеневої тканини [163]. За результатами наших досліджень та літературних даних терапія МСК у людини ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2 призводить до імуномодуляції, а не до вираженого імуносупресорного впливу. Також, важливе значення має ступень враження легень при ГРДС, так при у критично-важких пацієнтів на ШВЛ не спостерігалось покращення стану при МСК терапії [97, 110, 176]. Тож, потрібні більш глибокі клінічні випробування, протокол яких передбачав би можливість дослідження різноманітних маркерів в легенево-бронхіальному лаважі, а також ескалація доз, варіабельність інтервальності введення та відбір проб для моніторингу стану пацієнтів у короткострокові терміни після лікування (1-2 доби). Також при плануванні стратегії лікування, слід прийняти до уваги час, який минув від початку хвороби, стадію захворювання та супутню медикаментозну терапію.

Для з'ясування активації сигнальних шляхів-мішеней імнних клітин та механізмів імуномодулюючої дії МСКПЛ було проведено їх спільне культивування з моноклеарними клітинами периферичної крові (МКПК), отриманих від хворих з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2, з МСКПЛ та досліджено транскриптом на рівні мРНК, імнотип Т-клітин, секрецію низки цитокінів та хемокінів.

В результаті аналізу транскриптому МКПК були виявлені 4172 гени з диференціальною експресією; з них 2993 гени мали підвищений рівень експресії в МСК групі, а 1179 – знижений. Аналіз біологічних процесів генів з підвищеною регуляцією показав активацію генів, які задіяні в організації позаклітинного матриксу, ангіогенезі, імунному захисті (особливо в імунітеті, опосередкованому нейтрофілами), і міграції лейкоцитів. Можна припустити, що підвищення вмісту прозапальних хемокінів IP-10, MIP-1 α та G-CSF в плазмі крові хворих на ГРДС при коронавірусному захворюванні після МСК терапії в нашому дослідженні вказує про стимуляційний ефект МСК на певні ланки клітинного імунітету, що

узгоджується з підвищеною регуляцією генів залучених до імунного захисту, міграції лейкоцитів у МКПК за спів культивування з МСК. Ці дані також узгоджуються з анотацією метаболічних шляхів серед збагачених категорій в базі даних KEGG виявила, що МСКПЛ індукують асоційовані із запаленням сигнальні шляхи (від рецепторів В-клітин та NF-каппа В сигналінг) в МКПК хворих. Відомо, що опосередкований МСК імуномодулюючий ефект на МКПК відбувається через активацію NF-каппа В сигнального шляху [282].

Цікаво, що ми спостерігали збільшення експресії генів, пов'язаних із фероптозом, у лейкоцитах хворих на COVID-19, що може мати позитивний вплив, оскільки раніше повідомлялося про підвищення експресії генів, пов'язаних із фероптозом у МКПК під час гострої фази хвороби та зниження експресії у фазі одужання [281].

Спільне культивування з МСКПЛ значно зменшувало проліферацію МКПК, що співвідноситься зі зниженою експресією генів, залучених до поділу клітин, включали гени, пов'язані з реплікацією ДНК, клітинним циклом і репаративним механізмом за даними аналізу транскриптому.

Було продемонстровано збільшення експресії CD69 як маркерів ранніх Т-клітин і CD25 як маркерів середньої стадії серед субпопуляцій CD3⁺ після спільного культивування та зменшення відсотку ефektorних, старіючих ефektorних CD8 і CD4 Т-клітин і CD8 Т-клітин пам'яті. Стимулювання дозрівання Т-клітин під впливом МСК було встановлено раніше [59, 272]. Інгібування дозрівання ефektorних ефektorних старіючих CD8 і CD 4 Т-клітин під впливом МСКПЛ узгоджується з нашими даними РНК-секвенування, де спостерігається достовірне зниження відносного рівня експресії CXCR3 та результатами інших авторів [278]. Також було показано, що кондиціоноване середовище після спільного культивування МСКПЛ і МКПК мають підвищений вміст IL-6, MCP-1 і G-CSF і знижений MIP-1 α та IL-12, що відповідає рівням експресії відповідних генів у МКПК за даними аналізу транскриптому. Подібні дані щодо впливу МСК на секрецію IL-6, MCP-1, MIP-1 α та IL-12 МКПК були повідомлені раніше [275,276, 277], що в цілому свідчать про імуномодулюючий вплив МСК на МКПК хворих на

ГРДС, спричинений SARS-CoV-2. Таким чином, експериментальні дані, представлені в даній роботі, відображають багатофункціональну відповідь МКПК на імуномодулюючий ефект МСКПЛ. Передбачуваний механізм дії МСКПЛ на імунні клітини у пацієнтів порівняно з моделлю *in vitro* представлений на рис.7.1.

В результаті виконання даної дисертаційної роботи було встановлено, що трьохкратна внутрішньовенна трансплантація МСКП з інтервалом в 3 доби в дозі 1×10^6 клітин/кг маси тіла на ранній/ середній стадії захворювання на ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2, є безпечною, не викликає суттєвих побічних негативних ефектів, має імуномодулюючий вплив на перебіг запального процесу та призводить до суттєвого зниження рівня фіброзу легень (в 12 разів) через 1 рік спостереження.

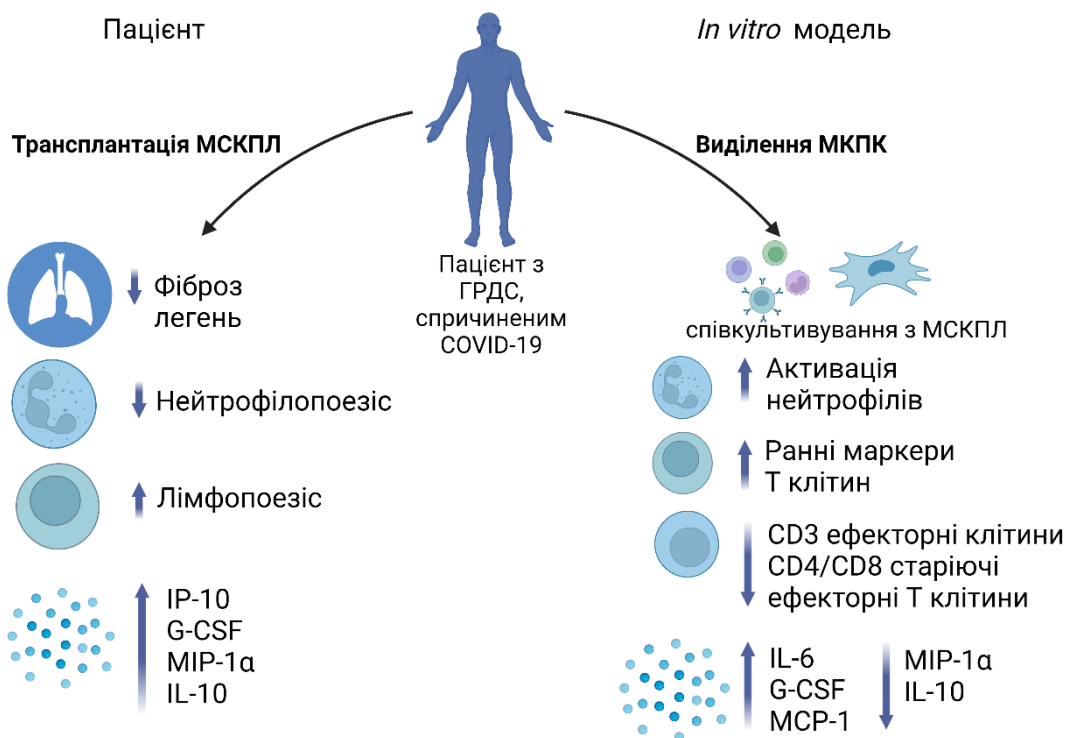


Рис.7.1. Імуномодуляторний ефект МСКПЛ *in vivo* та *in vitro*. МСКПЛ після трансплантації пацієнтам з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2, призводять до зменшення ступеню пошкодження легенів і зниження кількості нейтрофілів, стимулюють лімфопоез та секрецію прозапальних цитокінів. *In vitro* модель співкультивування МСКПЛ з МКПК від пацієнтів з ГРДС виявила підвищення активації нейтрофілів, експресії ранніх маркерів Т клітин, секреції цитокінів і зниження кількості ефektorних та зрілих ефektorних CD4 і CD8 Т клітин

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі охарактеризовано динамічні зміни рівнів про- та протизапальних цитокінів, хемокінів та рівнів мікроРНК протягом 28 діб у хворих з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2, після трансплантації МСКПЛ та порівняно дані з групами контролю та відносно здорових донорів. Встановлено, що трьохкратна внутрішньовенна трансплантація МСКП з інтервалом в 3 доби в дозі 1×10^6 клітин/кг маси тіла на ранній/ середній стадії захворювання на ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2, є безпечною, не викликає суттєвих побічних негативних ефектів, має імуномодуючий вплив на перебіг запального процесу та призводить до суттєвого зниження рівня фіброзу легень (в 12 разів) через 1 рік спостереження.

За результатами роботи зроблені наступні висновки:

1. Доведено відповідність МСКПЛ мінімальним вимогам, виданим ISCT, за високим рівнем експресії CD105, CD73, CD90 і відсутністю маркерів гемопоетичних клітин CD34 та CD45 та здатністю до спрямованого диференціювання.
2. Вперше описано підвищений вміст $CD4^+$ і $CD8^+$ регуляторних, активованих, виснажених та старіючих клітин пам'яті з 14 дня спостереження. Вперше зростання вмісту подвійно позитивних Т клітин, $CD127^-$ та $CD25^-$ експресуючих Т-клітин, $CD3^+PD-1^{low}$ і $CD3^-PD-1^{low}$ Т-клітин, моноцитів та дендритних клітин протягом 28 діб. Вперше виявлено достовірно вищі відносні рівні експресії miR-221-3p, miR-27a-3p, miR-133a-3p і miR-126-3p на початку госпіталізації пацієнтів із ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2.
3. Вперше виявлено, що ступінь фіброзу легень через 1 рік спостереження позитивно корелює з концентраціями MCP-1, RAGE, вмістом старіючих Т-клітин та Т-клітин пам'яті та негативно корелює з вмістом $CD127^+$ Т-клітин, рівнями експресії miR-92a-3p, miR-21a-5p і miR424-5p в плазмі крові хворих з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2.

4. Вперше встановлено, що терапія МСК призводить до зниження ступеня фіброзування легень у хворих з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2 за даними КТ через 1 рік після трансплантації.
5. Виявлено, що трансплантація МСК стимулює відновлення рівня лімфоцитів та прискорює зниження таких маркерів запалення, як СРБ, ШОЕ та паличкоядерних нейтрофілів.
6. Встановлено, що трансплантація МСК призводить до достовірного зростання в плазмі хворих вмісту протизапального цитокіну IL-10 та прозапальних хемокінів IP-10, MIP-1 α та G-CSF.
7. Виявлено, що терапія МСК не має достовірного впливу на відносний рівень експресії мікроРНК, що асоційовані з функціональним станом легенів та запаленням (miR-27a-3p, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-126-3p, miRNA-133a-3p і miR-221-3p, miR-92a-3p, miR-124-3p і miR-424-5p) в плазмі крові хворих з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2.
8. Встановлено, що МСКПЛ пригнічують проліферацію МКПК хворих з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2, підвищують на МКПК рівні експресії таких маркерів ранньої активації Т клітин як CD69 і CD25 та зменшують відсоток ефektorних CD8⁺ і CD4⁺ Т-клітин. МСКПЛ посилюють в МКПК експресію генів, асоційованих із запаленням, активацією нейтрофілів та міграцією лейкоцитів та пригнічують експресію генів, пов'язаних з реплікацією ДНК, клітинним циклом і репаративним механізмом, що було показано при розподілі диференційно експресованих генів МКПК відносно біологічних процесів і метаболічних шляхів згідно з GO та KEGG класифікацією.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- [1] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315–7. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.
- [2] Gronthos S, Zannettino ACW, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 2003;116:1827–35. <https://doi.org/10.1242/JCS.00369>.
- [3] Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 2007;131:324–36. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.08.025>.
- [4] Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991;78:55–62. <https://doi.org/10.1182/blood.v78.1.55.55>.
- [5] Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991;9:641–50. <https://doi.org/10.1002/JOR.1100090504>.
- [6] Dennis JE, Charbord P. Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells* 2002;20:205–14. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.20-3-205>.
- [7] Takashima Y, Era T, Nakao K, Kondo S, Kasuga M, Smith AG, et al. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell* 2007;129:1377–88. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.04.028>.
- [8] Isern J, García-García A, Martín AM, Arranz L, Martín-Pérez D, Torroja C, et al. The neural crest is a source of mesenchymal stem cells with specialized hematopoietic stem cell niche function. *Elife* 2014;3. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.03696>.
- [9] Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell* 2008;3:301–13. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2008.07.003>.

- [10] Corselli M, Chen CW, Sun B, Yap S, Rubin JP, Péault B. The Tunica Adventitia of Human Arteries and Veins As a Source of Mesenchymal Stem Cells. *Https://HomeLiebertpubCom/Scd* 2011;21:1299–308. <https://doi.org/10.1089/SCD.2011.0200>.
- [11] Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000;109:235–42. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2141.2000.01986.X>.
- [12] Girdlestone J, Limbani VA, Cutler AJ, Navarrete C V. Efficient expansion of mesenchymal stromal cells from umbilical cord under low serum conditions. *Cytotherapy* 2009;11:738–48. <https://doi.org/10.3109/14653240903079401>.
- [13] Gong X, Sun Z, Cui D, Xu X, Zhu H, Wang L, et al. Isolation and characterization of lung resident mesenchymal stem cells capable of differentiating into alveolar epithelial type II cells. *Cell Biol Int* 2014;38:405–11. <https://doi.org/10.1002/CBIN.10240>.
- [14] Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS. Potential therapeutic applications of muscle-derived mesenchymal stem and progenitor cells. *Expert Opin Biol Ther* 2010;10:505–17. <https://doi.org/10.1517/14712591003610606>.
- [15] Jarvinen L, Badri L, Wettlaufer S, Ohtsuka T, Standiford TJ, Toews GB, et al. Lung resident mesenchymal stem cells isolated from human lung allografts inhibit T cell proliferation via a soluble mediator. *J Immunol* 2008;181:4389–96. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.181.6.4389>.
- [16] Lecourt S, Marolleau JP, Fromigué O, Vauchez K, Andriamanalijaona R, Ternaux B, et al. Characterization of distinct mesenchymal-like cell populations from human skeletal muscle in situ and in vitro. *Exp Cell Res* 2010;316:2513–26. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2010.04.020>.
- [17] Li S, Huang K-J, Wu J-C, Hu MS, Sanyal M, Hu M, et al. Peripheral blood-derived mesenchymal stem cells: candidate cells responsible for healing critical-sized calvarial bone defects. *Stem Cells Transl Med* 2015;4:359–68. <https://doi.org/10.5966/SCTM.2014-0150>.
- [18] MacIas MI, Grande J, Moreno A, Domnguez I, Bornstein R, Flores AI. Isolation and characterization of true mesenchymal stem cells derived from human term

- decidua capable of multilineage differentiation into all 3 embryonic layers. *Am J Obstet Gynecol* 2010;203:495.e9-495.e23. <https://doi.org/10.1016/J.AJOG.2010.06.045>.
- [19] Marongiu F, Gramignoli R, Sun Q, Tahan V, Miki T, Dorko K, et al. Isolation of Amniotic Mesenchymal Stem Cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2010;12:1E.5.1-1E.5.11. <https://doi.org/10.1002/9780470151808.SC01E05S12>.
- [20] Mebarki M, Abadie C, Larghero J, Cras A. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem/stromal cells: a promising candidate for the development of advanced therapy medicinal products. *Stem Cell Res Ther* 2021;12:1–10. <https://doi.org/10.1186/S13287-021-02222-Y/TABLES/1>.
- [21] Meng F, Xu R, Wang S, Xu Z, Zhang C, Li Y, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell therapy in patients with COVID-19: a phase 1 clinical trial. *Signal Transduct Target Ther* 2020;5. <https://doi.org/10.1038/S41392-020-00286-5>.
- [22] Meng X, Ichim TE, Zhong J, Rogers A, Yin Z, Jackson J, et al. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J Transl Med* 2007;5. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-5-57>.
- [23] Miao Z, Jin J, Chen L, Zhu J, Huang W, Zhao J, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int* 2006;30:681–7. <https://doi.org/10.1016/J.CELLBI.2006.03.009>.
- [24] Namiot ED, Niemi JVL, Chubarev VN, Tarasov V V., Schiöth HB. Stem Cells in Clinical Trials on Neurological Disorders: Trends in Stem Cells Origins, Indications, and Status of the Clinical Trials. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol 23, Page 11453 2022;23:11453. <https://doi.org/10.3390/IJMS231911453>.
- [25] Patki S, Kadam S, Chandra V, Bhonde R. Human breast milk is a rich source of multipotent mesenchymal stem cells. *Hum Cell* 2010;23:35–40. <https://doi.org/10.1111/J.1749-0774.2010.00083.X>.
- [26] Poloni A, Rosini V, Mondini E, Maurizi G, Mancini S, Discepoli G, et al. Characterization and expansion of mesenchymal progenitor cells from first-

- trimester chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy* 2008;10:690–7. <https://doi.org/10.1080/14653240802419310>.
- [27] Ridge SM, Sullivan FJ, Glynn SA. Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression. *Mol Cancer* 2017;16. <https://doi.org/10.1186/S12943-017-0597-8>.
- [28] Roubelakis MG, Pappa KI, Bitsika V, Zagoura D, Vlahou A, Papadaki HA, et al. Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2007;16:931–51. <https://doi.org/10.1089/SCD.2007.0036>.
- [29] Trivanović D, Kocić J, Mojsilović S, Krstić A, Ilić V, Okić Djordjević I, et al. Mesenchymal stem cells isolated from peripheral blood and umbilical cord Wharton's jelly. *Srp Arh Celok Lek* 2013;141:178–86. <https://doi.org/10.2298/SARH1304178T>.
- [30] Walker NM, Badri LN, Wadhwa A, Wettlaufer S, Peters-Golden M, Lama VN. Prostaglandin E2 as an inhibitory modulator of fibrogenesis in human lung allografts. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:77–84. <https://doi.org/10.1164/RCCM.201105-0834OC>.
- [31] Xu X, Liang Y, Li X, Ouyang K, Wang M, Cao T, et al. Exosome-mediated delivery of kartogenin for chondrogenesis of synovial fluid-derived mesenchymal stem cells and cartilage regeneration. *Biomaterials* 2021;269. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2020.120539>.
- [32] Yang G, Fan X, Mazhar M, Yang S, Xu H, Dechsupa N, et al. Mesenchymal Stem Cell Application and Its Therapeutic Mechanisms in Intracerebral Hemorrhage. *Front Cell Neurosci* 2022;16. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2022.898497>.
- [33] Zeddou M, Briquet A, Relic B, Josse C, Malaise MG, Gothot A, et al. The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood. *Cell Biol Int* 2010;34:693–701. <https://doi.org/10.1042/CBI20090414>.
- [34] Pittenger MF, Discher DE, Péault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AI. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *Npj Regenerative Medicine* 2019 4:1 2019;4:1–15. <https://doi.org/10.1038/s41536-019-0083-6>.

- [35] Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 2004;8:301–16. <https://doi.org/10.1111/J.1582-4934.2004.TB00320.X>.
- [36] Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* 2007;25:1384–92. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.2006-0709>.
- [37] Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal* 2011;9. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-12>.
- [38] Brooke G, Tong H, Levesque JP, Atkinson K. Molecular trafficking mechanisms of multipotent mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and placenta. *Stem Cells Dev* 2008;17:929–40. <https://doi.org/10.1089/SCD.2007.0156>.
- [39] Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells* 2003;21:50–60. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.21-1-50>.
- [40] Nishiyama N, Miyoshi S, Hida N, Uyama T, Okamoto K, Ikegami Y, et al. The significant cardiomyogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Stem Cells* 2007;25:2017–24. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.2006-0662>.
- [41] Wu KH, Chan CK, Tsai C, Chang YH, Sieber M, Chiu TH, et al. Effective treatment of severe steroid-resistant acute graft-versus-host disease with umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Transplantation* 2011;91:1412–6. <https://doi.org/10.1097/TP.0B013E31821ABA18>.
- [42] Galipeau J, Sensébé L. Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell* 2018;22:824–33. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2018.05.004>.
- [43] Krampera M, Le Blanc K. Mesenchymal stromal cells: Putative microenvironmental modulators become cell therapy. *Cell Stem Cell* 2021;28:1708–25. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2021.09.006>.

- [44] DiMarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. Mesenchymal stem cells in tissue repair. *Front Immunol* 2013;4. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2013.00201>.
- [45] Fitzsimmons REB, Mazurek MS, Soos A, Simmons CA. Mesenchymal Stromal/Stem Cells in Regenerative Medicine and Tissue Engineering. *Stem Cells Int* 2018;2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8031718>.
- [46] Liang W, Chen X, Zhang S, Fang J, Chen M, Xu Y, et al. Mesenchymal stem cells as a double-edged sword in tumor growth: focusing on MSC-derived cytokines. *Cellular & Molecular Biology Letters* 2021 26:1 2021;26:1–25. <https://doi.org/10.1186/S11658-020-00246-5>.
- [47] Timaner M, Tsai KK, Shaked Y. The multifaceted role of mesenchymal stem cells in cancer. *Semin Cancer Biol* 2020;60:225–37. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2019.06.003>.
- [48] Li N, Hua J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. *Cell Mol Life Sci* 2017;74:2345–60. <https://doi.org/10.1007/S00018-017-2473-5>.
- [49] Zhou Y, Yamamoto Y, Xiao Z, Ochiya T. The Immunomodulatory Functions of Mesenchymal Stromal/Stem Cells Mediated via Paracrine Activity. *J Clin Med* 2019;8. <https://doi.org/10.3390/JCM8071025>.
- [50] Reis M, Mavin E, Nicholson L, Green K, Dickinson AM, Wang XN. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Attenuate Dendritic Cell Maturation and Function. *Front Immunol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.02538>.
- [51] Wang LT, Ting CH, Yen ML, Liu KJ, Sytwu HK, Wu KK, et al. Human mesenchymal stem cells (MSCs) for treatment towards immune- and inflammation-mediated diseases: review of current clinical trials. *J Biomed Sci* 2016;23:1–13. <https://doi.org/10.1186/S12929-016-0289-5>.
- [52] Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ* 2013;21. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.158>.
- [53] Su J, Chen X, Huang Y, Li W, Li J, Cao K, et al. Phylogenetic distinction of iNOS and IDO function in mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression in mammalian species. *Cell Death Differ* 2013;21:388–96. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.149>.

- [54] Shi Y, Wang Y, Li Q, Liu K, Hou J, Shao C, et al. Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases. *Nat Rev Nephrol* 2018;14:493–507. <https://doi.org/10.1038/S41581-018-0023-5>.
- [55] Gur-Wahnon D, Borovsky Z, Beyth S, Liebergall M, Rachmilewitz J. Contact-dependent induction of regulatory antigen-presenting cells by human mesenchymal stem cells is mediated via STAT3 signaling. *Exp Hematol* 2007;35:426–33. <https://doi.org/10.1016/J.EXPHEM.2006.11.001>.
- [56] Fang Y, Lao P, Tang L, Chen J, Chen Y, Sun L, et al. Mechanisms of Potential Therapeutic Utilization of Mesenchymal Stem Cells in COVID-19 Treatment. *Cell Transplant* 2023;32. https://doi.org/10.1177/09636897231184611/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_09636897231184611-FIG4.JPEG.
- [57] Tan MI, Alfarafisa NM, Septiani P, Barlian A, Firmansyah M, Faizal A, et al. Potential Cell-Based and Cell-Free Therapy for Patients with COVID-19. *Cells* 2022;11. <https://doi.org/10.3390/CELLS11152319>.
- [58] Rincón M, Flavell RA, Davis RJ. Signal transduction by MAP kinases in T lymphocytes. *Oncogene* 2001;20:2490–7. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1204382>.
- [59] Zhu R, Yan T, Feng Y, Liu Y, Cao H, Peng G, et al. Mesenchymal stem cell treatment improves outcome of COVID-19 patients via multiple immunomodulatory mechanisms. *Cell Research* 2021 31:12 2021;31:1244–62. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00573-y>.
- [60] Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003;101:3722–9. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2002-07-2104>.
- [61] Ren G, Zhao X, Zhang L, Zhang J, L’Huillier A, Ling W, et al. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol* 2010;184:2321–8. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0902023>.

- [62] Genç D, Günaydın B, Sezgin S, Alada A, Tarhan EF. Immunoregulatory effects of dental mesenchymal stem cells on T and B lymphocyte responses in primary Sjögren's syndrome. *Immunotherapy* 2022;14:225–47. <https://doi.org/10.2217/IMT-2021-0174>.
- [63] Weiss ARR, Dahlke MH. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs. *Front Immunol* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.01191>.
- [64] Song N, Scholtemeijer M, Shah K. Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Trends Pharmacol Sci* 2020;41:653–64. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2020.06.009>.
- [65] Kim JH, Jo CH, Kim HR, Hwang Y Il. Comparison of Immunological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells from the Periodontal Ligament, Umbilical Cord, and Adipose Tissue. *Stem Cells Int* 2018;2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8429042>.
- [66] Del Papa B, Sportoletti P, Cecchini D, Rosati E, Balucani C, Baldoni S, et al. Notch1 modulates mesenchymal stem cells mediated regulatory T-cell induction. *Eur J Immunol* 2013;43:182–7. <https://doi.org/10.1002/EJI.201242643>.
- [67] Hong JW, Lim JH, Chung CJ, Kang TJ, Kim TY, Kim YS, et al. Immune Tolerance of Human Dental Pulp-Derived Mesenchymal Stem Cells Mediated by CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Regulatory T-Cells and Induced by TGF-β1 and IL-10. *Yonsei Med J* 2017;58:1031–9. <https://doi.org/10.3349/YMJ.2017.58.5.1031>.
- [68] Watanabe Y, Tsuchiya A, Seino S, Kawata Y, Kojima Y, Ikarashi S, et al. Mesenchymal Stem Cells and Induced Bone Marrow-Derived Macrophages Synergistically Improve Liver Fibrosis in Mice. *Stem Cells Transl Med* 2019;8:271–84. <https://doi.org/10.1002/SCTM.18-0105>.
- [69] de Witte SFH, Luk F, Sierra Parraga JM, Garghesha M, Merino A, Korevaar SS, et al. Immunomodulation By Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells (MSC) Is Triggered Through Phagocytosis of MSC By Monocytic Cells. *Stem Cells* 2018;36:602–15. <https://doi.org/10.1002/STEM.2779>.
- [70] Vasandan AB, Jahnavi S, Shashank C, Prasad P, Kumar A, Jyothi Prasanna S. Human Mesenchymal stem cells program macrophage plasticity by altering their

- metabolic status via a PGE2-dependent mechanism. *Sci Rep* 2016;6. <https://doi.org/10.1038/SREP38308>.
- [71] Wang G, Cao K, Liu K, Xue Y, Roberts AI, Li F, et al. Kynurenic acid, an IDO metabolite, controls TSG-6-mediated immunosuppression of human mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ* 2018;25:1209–23. <https://doi.org/10.1038/S41418-017-0006-2>.
- [72] François M, Romieu-Mourez R, Li M, Galipeau J. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol Ther* 2012;20:187–95. <https://doi.org/10.1038/MT.2011.189>.
- [73] Ghahremani Piraghaj M, Soudi S, Ghanbarian H, Bolandi Z, Namaki S, Hashemi SM. Effect of efferocytosis of apoptotic mesenchymal stem cells (MSCs) on C57BL/6 peritoneal macrophages function. *Life Sci* 2018;212:203–12. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2018.09.052>.
- [74] Zheng X-S, Wang Q, Min J, Shen X-R, Li Q, Zhao Q-C, et al. Single-Cell Landscape of Lungs Reveals Key Role of Neutrophil-Mediated Immunopathology during Lethal SARS-CoV-2 Infection. *J Virol* 2022;96. <https://doi.org/10.1128/JVI.00038-22>.
- [75] Su VYF, Lin CS, Hung SC, Yang KY. Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium Induces Neutrophil Apoptosis Associated with Inhibition of the NF- κ B Pathway in Endotoxin-Induced Acute Lung Injury. *Int J Mol Sci* 2019;20. <https://doi.org/10.3390/IJMS20092208>.
- [76] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004;303:1532–5. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1092385>.
- [77] Shahir M, Mahmoud Hashemi S, Asadirad A, Varahram M, Kazempour-Dizaji M, Folkerts G, et al. Effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes on the induction of mouse tolerogenic dendritic cells. *J Cell Physiol* 2020;235:7043–55. <https://doi.org/10.1002/JCP.29601>.
- [78] Li S, Wu J, Zhu S, Liu YJ, Chen J. Disease-Associated Plasmacytoid Dendritic Cells. *Front Immunol* 2017;8. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.01268>.

- [79] Shin K-S, Jeon I, Kim B-S, Kim I-K, Park Y-J, Koh C-H, et al. Monocyte-Derived Dendritic Cells Dictate the Memory Differentiation of CD8⁺ T Cells During Acute Infection. *Front Immunol* 2019;0:1887. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.01887>.
- [80] Loke XY, Imran SAM, Tye GJ, Zaman WSWK, Nordin F. Immunomodulation and Regenerative Capacity of MSCs for Long-COVID. *Int J Mol Sci* 2021;22. <https://doi.org/10.3390/IJMS222212421>.
- [81] Healy ME, Bergin R, Mahon BP, English K. Mesenchymal stromal cells protect against caspase 3-mediated apoptosis of CD19(+) peripheral B cells through contact-dependent upregulation of VEGF. *Stem Cells Dev* 2015;24:2391–402. <https://doi.org/10.1089/SCD.2015.0089>.
- [82] Fan L, Hu C, Chen J, Cen P, Wang J, Li L. Interaction between Mesenchymal Stem Cells and B-Cells. *Int J Mol Sci* 2016;17. <https://doi.org/10.3390/IJMS17050650>.
- [83] Orthocoronavirinae ~ ViralZone n.d. <https://viralzone.expasy.org/785> (accessed May 3, 2024).
- [84] Chan JFW, Kok KH, Zhu Z, Chu H, To KKW, Yuan S, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect* 2020;9:221–36. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1719902>.
- [85] Sharma A, Ahmad Farouk I, Lal SK. COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention. *Viruses* 2021;13. <https://doi.org/10.3390/V13020202>.
- [86] Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med* 2020;26:450–2. <https://doi.org/10.1038/S41591-020-0820-9>.
- [87] Zhang T, Wu Q, Zhang Z. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. *Curr Biol* 2020;30:1346-1351.e2. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2020.03.022>.
- [88] Oreshkova N, Molenaar RJ, Vreman S, Harders F, Oude Munnink BB, Van Der Honing RWH, et al. SARS-CoV-2 infection in farmed minks, the Netherlands,

- April and May 2020. *Eurosurveillance* 2020;25:1. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.23.2001005>.
- [89] Rodrigues GM, Volpato FCZ, Wink PL, Paiva RM, Barth AL, de-Paris F. SARS-CoV-2 Variants of Concern: Presumptive Identification via Sanger Sequencing Analysis of the Receptor Binding Domain (RBD) Region of the S Gene. *Diagnostics* 2023;13. <https://doi.org/10.3390/DIAGNOSTICS13071256>.
- [90] Jiang S, Hillyer C, Du L. Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 and Other Human Coronaviruses. *Trends Immunol* 2020;41:355–9. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2020.03.007>.
- [91] Du L, He Y, Zhou Y, Liu S, Zheng BJ, Jiang S. The spike protein of SARS-CoV--a target for vaccine and therapeutic development. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:226–36. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO2090>.
- [92] Song W, Gui M, Wang X, Xiang Y. Cryo-EM structure of the SARS coronavirus spike glycoprotein in complex with its host cell receptor ACE2. *PLoS Pathog* 2018;14. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1007236>.
- [93] Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci* 2020;12. <https://doi.org/10.1038/S41368-020-0074-X>.
- [94] Fuentes-Prior P. Priming of SARS-CoV-2 S protein by several membrane-bound serine proteinases could explain enhanced viral infectivity and systemic COVID-19 infection. *Journal of Biological Chemistry* 2021;296:100135. <https://doi.org/10.1074/JBC.REV120.015980>.
- [95] Yousefi Dehbidi M, Goodarzi N, Azhdari MH, Doroudian M. Mesenchymal stem cells and their derived exosomes to combat Covid-19. *Rev Med Virol* 2022;32. <https://doi.org/10.1002/RMV.2281>.
- [96] Reusch N, De Domenico E, Bonaguro L, Schulte-Schrepping J, Baßler K, Schultze JL, et al. Neutrophils in COVID-19. *Front Immunol* 2021;12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.652470>.
- [97] Schulte-Schrepping J, Reusch N, Paclik D, Baßler K, Schlickeiser S, Zhang B, et al. Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. *Cell* 2020;182:1419-1440.e23. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.08.001>.

- [98] Tomashefski JF. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 2000;21:435–66. [https://doi.org/10.1016/S0272-5231\(05\)70158-1](https://doi.org/10.1016/S0272-5231(05)70158-1).
- [99] Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med* 2020;8:420–2. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30076-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30076-X).
- [100] Tian S, Xiong Y, Liu H, Niu L, Guo J, Liao M, et al. Pathological study of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) through postmortem core biopsies. *Mod Pathol* 2020;33:1007–14. <https://doi.org/10.1038/S41379-020-0536-X>.
- [101] Channappanavar R, Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin Immunopathol* 2017;39:529. <https://doi.org/10.1007/S00281-017-0629-X>.
- [102] Collange O, Tacquard C, Delabranche X, Leonard-Lorant I, Ohana M, Onea M, et al. Coronavirus Disease 2019: Associated Multiple Organ Damage. *Open Forum Infect Dis* 2020;7. <https://doi.org/10.1093/OFID/OFAA249>.
- [103] Ruan Q, Yang K, Wang W, Jiang L, Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med* 2020;46:846–8. <https://doi.org/10.1007/S00134-020-05991-X>.
- [104] Park J, Pabon M, Choi AMK, Siempos II, Fredenburgh LE, Baron RM, et al. Plasma surfactant protein-D as a diagnostic biomarker for acute respiratory distress syndrome: Validation in US and Korean cohorts. *BMC Pulm Med* 2017;17:1–7. <https://doi.org/10.1186/S12890-017-0532-1/FIGURES/1>.
- [105] Ware LB, Zhao Z, Koyama T, Brown RM, Semler MW, Janz DR, et al. Derivation and validation of a two-biomarker panel for diagnosis of ARDS in patients with severe traumatic injuries. *Trauma Surg Acute Care Open* 2017;2. <https://doi.org/10.1136/TSACO-2017-000121>.
- [106] Guo T, Fan Y, Chen M, Wu X, Zhang L, He T, et al. Cardiovascular Implications of Fatal Outcomes of Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol* 2020;5:811–8. <https://doi.org/10.1001/JAMACARDIO.2020.1017>.
- [107] Shi S, Qin M, Shen B, Cai Y, Liu T, Yang F, et al. Association of Cardiac Injury With Mortality in Hospitalized Patients With COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Cardiol* 2020;5:802–10. <https://doi.org/10.1001/JAMACARDIO.2020.0950>.

- [108] Akhmerov A, Marbán E. COVID-19 and the Heart. *Circ Res* 2020;126:1443–55. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317055>.
- [109] Baba M, Yoshida K, Ieda M. Clinical Applications of Natriuretic Peptides in Heart Failure and Atrial Fibrillation. *Int J Mol Sci* 2019;20. <https://doi.org/10.3390/IJMS20112824>.
- [110] Li X, Pan X, Li Y, An N, Xing Y, Yang F, et al. Cardiac injury associated with severe disease or ICU admission and death in hospitalized patients with COVID-19: a meta-analysis and systematic review. *Crit Care* 2020;24. <https://doi.org/10.1186/S13054-020-03183-Z>.
- [111] Flores-Solís LM, Hernández-Domínguez JL. Cardiac troponin I in patients with chronic kidney disease stage 3 to 5 in conditions other than acute coronary syndrome. *Clin Lab* 2014;60:281–90. <https://doi.org/10.7754/CLIN.LAB.2013.121103>.
- [112] Arunachalam G, Upadhyay R, Ding H, Triggle CR. MicroRNA Signature and Cardiovascular Dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol* 2015;65:419–29. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000178>.
- [113] Coskunpinar E, Cakmak HA, Kalkan AK, Tiryakioglu NO, Erturk M, Ongen Z. Circulating miR-221-3p as a novel marker for early prediction of acute myocardial infarction. *Gene* 2016;591:90–6. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2016.06.059>.
- [114] Liu X, Dong Y, Chen S, Zhang G, Zhang M, Gong Y, et al. Circulating MicroRNA-146a and MicroRNA-21 Predict Left Ventricular Remodeling after ST-Elevation Myocardial Infarction. *Cardiology* 2015;132:233–41. <https://doi.org/10.1159/000437090>.
- [115] Townley-Tilson WHD, Callis TE, Wang D. MicroRNAs 1, 133, and 206: Critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:1252–5. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2009.03.002>.
- [116] Widera C, Gupta SK, Lorenzen JM, Bang C, Bauersachs J, Bethmann K, et al. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *J Mol Cell Cardiol* 2011;51:872–5. <https://doi.org/10.1016/J.YJMCC.2011.07.011>.

- [117] Yao Y, Du J, Cao X, Wang Y, Huang Y, Hu S, et al. Plasma Levels of MicroRNA-499 Provide an Early Indication of Perioperative Myocardial Infarction in Coronary Artery Bypass Graft Patients. *PLoS One* 2014;9:e104618. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0104618>.
- [118] Hashmi S, Ahmed M, Murad MH, Litzow MR, Adams RH, Ball LM, et al. Survival after mesenchymal stromal cell therapy in steroid-refractory acute graft-versus-host disease: systematic review and meta-analysis. *Lancet Haematol* 2016;3:e45–52. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(15\)00224-0](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(15)00224-0).
- [119] Zhou T, Li HY, Liao C, Lin W, Lin S. Clinical Efficacy and Safety of Mesenchymal Stem Cells for Systemic Lupus Erythematosus. *Stem Cells Int* 2020;2020. <https://doi.org/10.1155/2020/6518508>.
- [120] Assis ACM, Carvalho JL, Jacoby BA, Ferreira RLB, Castanheira P, Diniz SOF, et al. Time-dependent migration of systemically delivered bone marrow mesenchymal stem cells to the infarcted heart. *Cell Transplant* 2010;19:219–30. <https://doi.org/10.3727/096368909X479677>.
- [121] Mardpour S, Hamidieh AA, Taleahmad S, Sharifzad F, Taghikhani A, Baharvand H. Interaction between mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles and immune cells by distinct protein content. *J Cell Physiol* 2019;234:8249–58. <https://doi.org/10.1002/JCP.27669>.
- [122] Luz-Crawford P, Kurte M, Bravo-Alegria J, Contreras R, Nova-Lamperti E, Tejedor G, et al. Mesenchymal stem cells generate a CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. *Stem Cell Res Ther* 2013;4. <https://doi.org/10.1186/SCRT216>.
- [123] Luz-Crawford P, Djouad F, Toupet K, Bony C, Franquesa M, Hoogduijn MJ, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Interleukin 1 Receptor Antagonist Promotes Macrophage Polarization and Inhibits B Cell Differentiation. *Stem Cells* 2016;34:483–92. <https://doi.org/10.1002/STEM.2254>.
- [124] Leng Z, Zhu R, Hou W, Feng Y, Yang Y, Han Q, et al. Transplantation of ACE2-Mesenchymal Stem Cells Improves the Outcome of Patients with COVID-19 Pneumonia. *Aging Dis* 2020;11:216. <https://doi.org/10.14336/AD.2020.0228>.

- [125] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105:1815–22. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2004-04-1559>.
- [126] Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 2008;111:1327–33. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2007-02-074997>.
- [127] Romieu-Mourez R, François M, Boivin M-N, Bouchentouf M, Spaner DE, Galipeau J. Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype. *J Immunol* 2009;182:7963–73. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0803864>.
- [128] Zhang JY, Wang XM, Xing X, Xu Z, Zhang C, Song JW, et al. Single-cell landscape of immunological responses in patients with COVID-19. *Nature Immunology* 2020 21:9 2020;21:1107–18. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0762-x>.
- [129] Leeman KT, Pessina P, Lee JH, Kim CF. Mesenchymal Stem Cells Increase Alveolar Differentiation in Lung Progenitor Organoid Cultures. *Sci Rep* 2019;9. <https://doi.org/10.1038/S41598-019-42819-1>.
- [130] Golchin A, Seyedjafari E, Ardeshirylajimi A. Mesenchymal Stem Cell Therapy for COVID-19: Present or Future. *Stem Cell Rev Rep* 2020;16:427–33. <https://doi.org/10.1007/S12015-020-09973-W>.
- [131] Song N, Wakimoto H, Rossignoli F, Bhare D, Ciccocioppo R, Chen KS, et al. Mesenchymal stem cell immunomodulation: In pursuit of controlling COVID-19 related cytokine storm. *Stem Cells* 2021;39:707–22. <https://doi.org/10.1002/STEM.3354>.
- [132] Vishnupriya M, Naveenkumar M, Manjima K, Sooryasree N V., Saranya T, Ramya S, et al. Post-COVID pulmonary fibrosis: therapeutic efficacy using with mesenchymal stem cells - How the lung heals. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2021;25:2748–51. https://doi.org/10.26355/EURREV_202103_25438.
- [133] Wang F, Fang B, Qiang X, Shao J, Zhou L. The efficacy of mesenchymal stromal cell-derived therapies for acute respiratory distress syndrome—a meta-analysis of

- preclinical trials. *Respir Res* 2020;21:307. <https://doi.org/10.1186/S12931-020-01574-Y>.
- [134] Fengyun W, LiXin Z, Xinhua Q, Bin F. Mesenchymal Stromal Cells Attenuate Infection-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome in Animal Experiments: A Meta-Analysis. *Cell Transplant* 2020;29. <https://doi.org/10.1177/0963689720969186>.
- [135] Mokhber Dezfouli MR, Jabbari Fakhr M, Sadeghian Chaleshtori S, Dehghan MM, Vajhi A, Mokhtari R. Intrapulmonary autologous transplant of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells improves lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome in rabbit. *Crit Care* 2018;22. <https://doi.org/10.1186/S13054-018-2272-X>.
- [136] Sung DK, Chang YS, Sung I, Yoo HS, Ahn SY, Park WS. Antibacterial effect of mesenchymal stem cells against *Escherichia coli* is mediated by secretion of beta-defensin-2 via toll-like receptor 4 signalling 2015. <https://doi.org/10.1111/cmi.12522>.
- [137] Lee JW, Fang X, Gupta N, Serikov V, Matthay MA. Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of *E. coli* endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:16357. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0907996106>.
- [138] Wang L, Shi M, Tong L, Wang J, Ji S, Bi J, et al. Lung-Resident Mesenchymal Stem Cells Promote Repair of LPS-Induced Acute Lung Injury via Regulating the Balance of Regulatory T cells and Th17 cells. *Inflammation* 2019;42:199–210. <https://doi.org/10.1007/S10753-018-0884-6>.
- [139] Li Y, Xu J, Shi W, Chen C, Shao Y, Zhu L, et al. Mesenchymal stromal cell treatment prevents H9N2 avian influenza virus-induced acute lung injury in mice. *Stem Cell Res Ther* 2016;7:1–11. <https://doi.org/10.1186/S13287-016-0395-Z>.
- [140] Devaney J, Horie S, Masterson C, Elliman S, Barry F, O'Brien T, et al. Human mesenchymal stromal cells decrease the severity of acute lung injury induced by *E. coli* in the rat. *Thorax* 2015;70:625–35. <https://doi.org/10.1136/THORAXJNL-2015-206813>.

- [141] Liu J, Li P, Zhu J, Lin F, Zhou J, Feng B, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunomodulation of recruited mononuclear phagocytes during acute lung injury: a high-dimensional analysis study. *Theranostics* 2021;11:2232–46. <https://doi.org/10.7150/THNO.52514>.
- [142] Armitage JD, Tan DBA, Sturm M, Moodley YP. Transcriptional Profiling of Circulating Mononuclear Cells from Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease receiving Mesenchymal Stromal Cell Infusions. *Stem Cells Transl Med* 2021;10:1470–81. <https://doi.org/10.1002/sctm.21-0024>.
- [143] De Oliveira HG, Cruz FF, Antunes MA, De Macedo Neto AV, Oliveira GA, Svartman FM, et al. Combined Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cell Therapy and One-Way Endobronchial Valve Placement in Patients with Pulmonary Emphysema: A Phase I Clinical Trial. *Stem Cells Transl Med* 2017;6:962–9. <https://doi.org/10.1002/SCTM.16-0315>.
- [144] Weiss DJ, Casaburi R, Flannery R, LeRoux-Williams M, Tashkin DP. A placebo-controlled, randomized trial of mesenchymal stem cells in COPD. *Chest* 2013;143:1590–8. <https://doi.org/10.1378/chest.12-2094>.
- [145] Taufiq H, Shaik Fakiruddin K, Muzaffar U, Lim MN, Rusli S, Kamaluddin NR, et al. Systematic review and meta-analysis of mesenchymal stromal/stem cells as strategical means for the treatment of COVID-19. *Ther Adv Respir Dis* 2023;17:1–23. <https://doi.org/10.1177/17534666231158276>.
- [146] Wang F, Li Y, Wang B, Li J, Peng Z. The safety and efficacy of mesenchymal stromal cells in ARDS: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Crit Care* 2023;27. <https://doi.org/10.1186/S13054-022-04287-4>.
- [147] Rossello-Gelabert M, Gonzalez-Pujana A, Igartua M, Santos-Vizcaino E, Hernandez RM. Clinical progress in MSC-based therapies for the management of severe COVID-19. *Cytokine Growth Factor Rev* 2022;68:25. <https://doi.org/10.1016/J.CYTOGFR.2022.07.002>.
- [148] Wang L, Li Y, Xu M, Deng Z, Zhao Y, Yang M, et al. Regulation of Inflammatory Cytokine Storms by Mesenchymal Stem Cells. *Front Immunol* 2021;12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.726909>.

- [149] Raza SS, Khan MA. Mesenchymal stem cells: a new front emerges in coronavirus disease 2019 treatment. *Cytotherapy* 2022;24:755. <https://doi.org/10.1016/J.JCYT.2020.07.002>.
- [150] Galleu A, Riffo-Vasquez Y, Trento C, Lomas C, Dolcetti L, Cheung TS, et al. Apoptosis in mesenchymal stromal cells induces in vivo recipient-mediated immunomodulation. *Sci Transl Med* 2017;9. <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AAM7828>.
- [151] Li TT, Zhang B, Fang H, Shi M, Yao WQ, Li Y, et al. Human mesenchymal stem cell therapy in severe COVID-19 patients: 2-year follow-up results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *EBioMedicine* 2023;92. <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2023.104600>.
- [152] Shi L, Zheng Y, Cheng Z, Ji N, Niu C, Wang Y, et al. One-year follow-up study after patients with severe COVID-19 received human umbilical cord mesenchymal stem cells treatment. *Stem Cell Res Ther* 2022;13. <https://doi.org/10.1186/S13287-022-02972-3>.
- [153] Bowdish ME, Barkauskas CE, Overbey JR, Gottlieb RL, Osman K, Duggal A, et al. A Randomized Trial of Mesenchymal Stromal Cells for Moderate to Severe Acute Respiratory Distress Syndrome from COVID-19. *Am J Respir Crit Care Med* 2023;207:261–70. <https://doi.org/10.1164/RCCM.202201-0157OC>.
- [154] Adas G, Cukurova Z, Yasar KK, Yilmaz R, Isiksacan N, Kasapoglu P, et al. The Systematic Effect of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Critical COVID-19 Patients: A Prospective Double Controlled Trial. *Cell Transplant* 2021;30. <https://doi.org/10.1177/09636897211024942>.
- [155] Shi L, Huang H, Lu X, Yan X, Jiang X, Xu R, et al. Effect of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on lung damage in severe COVID-19 patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2021 6:1 2021;6:1–9. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00488-5>.
- [156] Saleh M, Vaezi AA, Aliannejad R, Sohrabpour AA, Kiaei SZF, Shadnough M, et al. Cell therapy in patients with COVID-19 using Wharton's jelly mesenchymal

- stem cells: a phase 1 clinical trial. *Stem Cell Res Ther* 2021;12. <https://doi.org/10.1186/S13287-021-02483-7>.
- [157] Monsel A, Hauw-Berlemont C, Mebarki M, Heming N, Mayaux J, Nguekap Tchoumba O, et al. Treatment of COVID-19-associated ARDS with mesenchymal stromal cells: a multicenter randomized double-blind trial. *Crit Care* 2022;26:1–14. <https://doi.org/10.1186/S13054-022-03930-4/TABLES/5>.
- [158] Hazeldine J, Lord JM. Neutrophils and COVID-19: Active Participants and Rational Therapeutic Targets. *Front Immunol* 2021;12:2097. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.680134>.
- [159] Morrissey SM, Geller AE, Hu X, Tieri D, Cooke EA, Ding C, et al. Emergence of Low-density Inflammatory Neutrophils Correlates with Hypercoagulable State and Disease Severity in COVID-19 Patients. *MedRxiv* 2020:2020.05.22.20106724. <https://doi.org/10.1101/2020.05.22.20106724>.
- [160] Shu L, Niu C, Li R, Huang T, Wang Y, Huang M, et al. Treatment of severe COVID-19 with human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2020;11. <https://doi.org/10.1186/S13287-020-01875-5>.
- [161] Rebelatto CLK, Senegaglia AC, Franck CL, Daga DR, Shigunov P, Stimamiglio MA, et al. Safety and long-term improvement of mesenchymal stromal cell infusion in critically COVID-19 patients: a randomized clinical trial. *Stem Cell Res Ther* 2022;13:122. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02796-1>.
- [162] Liang B, Chen J, Li T, Wu H, Yang W, Li Y, et al. Clinical remission of a critically ill COVID-19 patient treated by human umbilical cord mesenchymal stem cells: A case report. *Medicine* 2020;99:E21429. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000021429>.
- [163] Zhu J, Feng B, Xu Y, Chen W, Sheng X, Feng X, et al. Mesenchymal stem cells alleviate LPS-induced acute lung injury by inhibiting the proinflammatory function of Ly6C⁺ CD8⁺ T cells. *Cell Death Dis* 2020;11. <https://doi.org/10.1038/S41419-020-03036-1>.
- [164] KOUROUPIS D, LANZONI G, LINETSKY E, CAYETANO SM, METALONIS SW, LEÑERO C, et al. Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells modulate TNF and soluble TNF Receptor 2 (sTNFR2) in COVID-19 ARDS patients. *Eur Rev*

- Med Pharmacol Sci 2021;25:4435–8.
https://doi.org/10.26355/EURREV_202106_26156.
- [165] Dilogio IH, Aditianingsih D, Sugiarto A, Burhan E, Damayanti T, Sitompul PA, et al. Umbilical cord mesenchymal stromal cells as critical COVID-19 adjuvant therapy: A randomized controlled trial. *Stem Cells Transl Med* 2021;10:1279–87. <https://doi.org/10.1002/SCTM.21-0046>.
- [166] Irmak DK, Darıcı H, Karaöz E. Stem Cell Based Therapy Option in COVID-19: Is It Really Promising? *Aging Dis* 2020;11:1174. <https://doi.org/10.14336/AD.2020.0608>.
- [167] Mardani R, namavar M, ghorbi E, Shoja Z, Zali F, Kaghazian H, et al. Association between serum inflammatory parameters and the disease severity in COVID-19 patients. *J Clin Lab Anal* 2022;36:e24162. <https://doi.org/10.1002/jcla.24162>.
- [168] Mattoli S, Schmidt M. Investigational Use of Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Secretome as Add-On Therapy in Severe Respiratory Virus Infections: Challenges and Perspectives. *Adv Ther* 2023;40:2626. <https://doi.org/10.1007/S12325-023-02507-Z>.
- [169] Xu X, Jiang W, Chen L, Xu Z, Zhang Q, Zhu M, et al. Evaluation of the safety and efficacy of using human menstrual blood-derived mesenchymal stromal cells in treating severe and critically ill COVID-19 patients: An exploratory clinical trial. *Clin Transl Med* 2021;11. <https://doi.org/10.1002/CTM2.297>.
- [170] Zhang M, Yan X, Shi M, Li R, Pi Z, Ren X, et al. Safety and efficiency of stem cell therapy for COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Glob Health Res Policy* 2022;7:1–13. <https://doi.org/10.1186/S41256-022-00251-5/TABLES/4>.
- [171] Yang Y, Shen C, Li J, Yuan J, Wei J, Huang F, et al. Plasma IP-10 and MCP-3 levels are highly associated with disease severity and predict the progression of COVID-19. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2020;146:119-127.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.04.027>.
- [172] Wang GL, Gao HX, Wang YL, Wei X, Liu YZ, Lu JH, et al. Serum IP-10 and IL-7 levels are associated with disease severity of coronavirus disease 2019. *Cytokine* 2021;142. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155500>.

- [173] Kleymenov DA, Bykonina EN, Popova LI, Mazunina EP, Gushchin VA, Kolobukhina L V., et al. A Deep Look Into COVID-19 Severity Through Dynamic Changes in Blood Cytokine Levels. *Front Immunol* 2021;12:4508. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.771609>.
- [174] Manoharan R, Kore RA, Mehta JL. Mesenchymal stem cell treatment for hyperactive immune response in patients with COVID-19. *Immunotherapy* 2022;14:1055–65. <https://doi.org/10.2217/IMT-2021-0245>.
- [175] Treatment of Coronavirus COVID-19 Pneumonia (Pathogen SARS-CoV-2) With Cryopreserved Allogeneic P_MMSCs and UC-MMSCs - Full Text View - ClinicalTrials.gov n.d. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04461925> (accessed September 26, 2022).
- [176] Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus (nCoV) infection is suspected n.d. <https://www.who.int/publications/i/item/10665-332299> (accessed July 25, 2021).
- [177] Gerashchenko G V., Hryshchenko N V., Melnichuk NS, Marchyshak T V., Chernushyn SY, Demchyshina I V., et al. Genetic characteristics of SARS-CoV-2 virus variants observed upon three waves of the COVID-19 pandemic in Ukraine between February 2021-January 2022. *Heliyon* 2024;10. <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2024.E25618>.
- [178] Kashuba VI, Hryshchenko N V., Gerashchenko G V., Melnichuk NS, Marchishak T V., Chernushyn SY, et al. Identification and characterization of the SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 upon the new outbreak of the COVID-19 in Ukraine in February 2021. *Biopolym Cell* 2021;37:117–24. <https://doi.org/10.7124/BC.000A52>.
- [179] Büttner L, Aigner A, Fleckenstein FN, Hamper CM, Jonczyk M, Hamm B, et al. Diagnostic Value of Initial Chest CT Findings for the Need of ICU Treatment/Intubation in Patients with COVID-19. *Diagnostics* 2020, Vol 10, Page 929 2020;10:929. <https://doi.org/10.3390/DIAGNOSTICS10110929>.
- [180] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 2001;25:402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

- [181]Marté JL, Toney NJ, Cordes L, Schlom J, Donahue RN, Gulley JL. Original research: Early changes in immune cell subsets with corticosteroids in patients with solid tumors: implications for COVID-19 management. *J Immunother Cancer* 2020;8. <https://doi.org/10.1136/JITC-2020-001019>.
- [182]Abdin SM, Elgendy SM, Alyammahi SK, Alhamad DW, Omar HA. Tackling the cytokine storm in COVID-19, challenges and hopes. *Life Sci* 2020;257:118054. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2020.118054>.
- [183]Deng Z, Zhang M, Zhu T, Zhili N, Liu Z, Xiang R, et al. Dynamic changes in peripheral blood lymphocyte subsets in adult patients with COVID-19. *International Journal of Infectious Diseases* 2020;98:353–8. <https://doi.org/10.1016/J.IJID.2020.07.003>.
- [184]Tomić S, Đokić J, Stevanović D, Ilić N, Gruden-Movsesijan A, Dinić M, et al. Reduced Expression of Autophagy Markers and Expansion of Myeloid-Derived Suppressor Cells Correlate With Poor T Cell Response in Severe COVID-19 Patients. *Front Immunol* 2021;0:208. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.614599>.
- [185]Demaria O, Carvelli J, Batista L, Thibult M-L, Morel A, André P, et al. Identification of druggable inhibitory immune checkpoints on Natural Killer cells in COVID-19. *Cell Mol Immunol* 2020;17:1. <https://doi.org/10.1038/S41423-020-0493-9>.
- [186]Wang J, Jiang M, Chen X, Montaner LJ. 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;108:17–41. <https://doi.org/10.1002/JLB.3COVR0520-272R>.
- [187]Riley James L. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev* May; 229(1) 2009:114–25. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3424066/> (accessed August 15, 2021).
- [188]Pyzik A, Grywalska E, Matyjaszek-Matuszek B, Smoleń A, Pyzik D, Roliński J. Frequencies of PD-1- positive T CD3+CD4+, T CD3+CD8+ and B CD19+ lymphocytes in female patients with Graves' disease and healthy controls–

- preliminary study. *Mol Cell Endocrinol* 2017;448:28–33. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2017.03.006>.
- [189] Nascimbeni M, Shin EC, Chiriboga L, Kleiner DE, Rehermann B. Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Blood* 2004;104:478–86. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2003-12-4395>.
- [190] Overgaard NH, Jung J-W, Steptoe RJ, Wells JW. CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *J Leukoc Biol* 2015;97:31–8. <https://doi.org/10.1189/JLB.1RU0814-382>.
- [191] Iannetta M, Buccisano F, Fraboni D, Malagnino V, Campogiani L, Teti E, et al. Baseline T-lymphocyte subset absolute counts can predict both outcome and severity in SARS-CoV-2 infected patients: a single center study. *Scientific Reports* 2021 11:1 2021;11:1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90983-0>.
- [192] Yang X, Dai T, Zhou X, Qian H, Guo R, Lei L, et al. Naturally activated adaptive immunity in COVID-19 patients. *J Cell Mol Med* 2020;24:12457. <https://doi.org/10.1111/JCMM.15771>.
- [193] Kalfaoglu B, Almeida-Santos J, Tye CA, Satou Y, Ono M. T-Cell Hyperactivation and Paralysis in Severe COVID-19 Infection Revealed by Single-Cell Analysis. *Front Immunol* 2020;11:589380. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.589380>.
- [194] Neidleman J, Luo X, Frouard J, Xie G, Gill G, Stein ES, et al. SARS-CoV-2-Specific T Cells Exhibit Phenotypic Features of Helper Function, Lack of Terminal Differentiation, and High Proliferation Potential. *Cell Rep Med* 2020;1. <https://doi.org/10.1016/J.XCRM.2020.100081>.
- [195] Kusnadi A, Ramírez-Suástegui C, Fajardo V, Chee SJ, Meckiff BJ, Simon H, et al. Severely ill COVID-19 patients display impaired exhaustion features in SARS-CoV-2-reactive CD8+ T cells. *Sci Immunol* 2021;6. <https://doi.org/10.1126/SCIIMMUNOL.ABE4782>.
- [196] Peng Y, Mentzer AJ, Liu G, Yao X, Yin Z, Dong D, et al. Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat Immunol* 2020;21:1336. <https://doi.org/10.1038/S41590-020-0782-6>.

- [197] Biasi S De, Meschiari M, Gibellini L, Bellinazzi C, Borella R, Fidanza L, et al. Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. *Nat Commun* 2020;11. <https://doi.org/10.1038/S41467-020-17292-4>.
- [198] Zenarruzabeitia O, Astarloa-Pando G, Terrén I, Orrantia A, Pérez-Garay R, Seijas-Betolaza I, et al. T Cell Activation, Highly Armed Cytotoxic Cells and a Shift in Monocytes CD300 Receptors Expression Is Characteristic of Patients With Severe COVID-19. *Front Immunol* 2021;12:655934. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.655934>.
- [199] Yu Y, Ma X, Gong R, Zhu J, Wei L, Yao J. Recent advances in CD8⁺ regulatory T cell research. *Oncol Lett* 2018;15:8187. <https://doi.org/10.3892/OL.2018.8378>.
- [200] Gao M, Liu Y, Guo M, Wang Q, Wang Y, Fan J, et al. Regulatory CD4⁺ and CD8⁺ T cells are negatively correlated with CD4⁺/CD8⁺ T cell ratios in patients acutely infected with SARS-CoV-2. *J Leukoc Biol* 2021;109:91–7. <https://doi.org/10.1002/JLB.5COVA0720-421RR>.
- [201] Boor PPC, Metselaar HJ, Mancham S, Tilanus HW, Kusters JG, Kwekkeboom J. Prednisolone Suppresses the Function and Promotes Apoptosis of Plasmacytoid Dendritic Cells. *American Journal of Transplantation* 2006;6:2332–41. <https://doi.org/10.1111/J.1600-6143.2006.01476.X>.
- [202] Campana P, Parisi V, Leosco D, Bencivenga D, Ragione F Della, Borriello A. Dendritic Cells and SARS-CoV-2 Infection: Still an Unclear Connection. *Cells* 2020;9:1–23. <https://doi.org/10.3390/CELLS9092046>.
- [203] Shi L, Yuan X, Yao W, Wang S, Zhang C, Zhang B, et al. Human mesenchymal stem cells treatment for severe COVID-19: 1-year follow-up results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *EBioMedicine* 2022;75:103789. <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2021.103789>.
- [204] He X, Li C, Yin H, Tan X, Yi J, Tian S, et al. Mesenchymal stem cells inhibited the apoptosis of alveolar epithelial cells caused by ARDS through CXCL12/CXCR4 axis. *Bioengineered* 2022;13:9060. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2052652>.

- [205] Liu J, Li S, Liu J, Liang B, Wang X, Wang H, et al. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine* 2020;55:102763. <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2020.102763>.
- [206] Shi H, Wang W, Yin J, Ouyang Y, Pang L, Feng Y, et al. The inhibition of IL-2/IL-2R gives rise to CD8⁺ T cell and lymphocyte decrease through JAK1-STAT5 in critical patients with COVID-19 pneumonia. *Cell Death Dis* 2020;11. <https://doi.org/10.1038/S41419-020-2636-4>.
- [207] Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020;395:497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5).
- [208] Lax SF, Skok K, Zechner P, Kessler HH, Kaufmann N, Koelblinger C, et al. Pulmonary Arterial Thrombosis in COVID-19 With Fatal Outcome : Results From a Prospective, Single-Center, Clinicopathologic Case Series. *Ann Intern Med* 2020;173:350–61. <https://doi.org/10.7326/M20-2566>.
- [209] Liao M, Liu Y, Yuan J, Wen Y, Xu G, Zhao J, et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nature Medicine* 2020 26:6 2020;26:842–4. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0901-9>.
- [210] Chen Y, Wang J, Liu C, Su L, Zhang D, Fan J, et al. IP-10 and MCP-1 as biomarkers associated with disease severity of COVID-19. *Molecular Medicine* 2020;26:1–12. <https://doi.org/10.1186/S10020-020-00230-X/FIGURES/5>.
- [211] Rotoli BM, Barilli A, Visigalli R, Ferrari F, Dall'Asta V. Endothelial Cell Activation by SARS-CoV-2 Spike S1 Protein: A Crosstalk between Endothelium and Innate Immune Cells. *Biomedicines* 2021;9. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9091220>.
- [212] Ardigo D, Assimes TL, Fortmann SP, Go AS, Hlatky M, Hytopoulos E, et al. Circulating chemokines accurately identify individuals with clinically significant atherosclerotic heart disease. *Physiol Genomics* 2007;31:402–9. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00104.2007>.
- [213] Tavakolian Ferdousie V, Mohammadi M, Hassanshahi G, Khorramdelazad H, Falahati-Pour SK, Mirzaei M, et al. Serum CXCL10 and CXCL12 chemokine levels

- are associated with the severity of coronary artery disease and coronary artery occlusion. *Int J Cardiol* 2017;233:23–8. <https://doi.org/10.1016/J.IJCARD.2017.02.011>.
- [214] Altara R, Mallat Z, Booz GW, Zouein FA. The CXCL10/CXCR3 Axis and Cardiac Inflammation: Implications for Immunotherapy to Treat Infectious and Noninfectious Diseases of the Heart. *J Immunol Res* 2016;2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4396368>.
- [215] Wang K, Wang H, Lou W, Ma L, Li Y, Zhang N, et al. IP-10 promotes blood-brain barrier damage by inducing tumor necrosis factor alpha production in Japanese encephalitis. *Front Immunol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01148>.
- [216] Shimizu F, Nishihara H, Sano Y, Takeshita Y, Takahashi S, Maeda T, et al. Markedly Increased IP-10 Production by Blood-Brain Barrier in Neuromyelitis Optica. *PLoS One* 2015;10:e0122000. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122000>.
- [217] Savarraj J, Park ES, Colpo GD, Hinds SN, Morales D, Ahnstedt H, et al. Brain injury, endothelial injury and inflammatory markers are elevated and express sex-specific alterations after COVID-19. *J Neuroinflammation* 2021;18. <https://doi.org/10.1186/S12974-021-02323-8>.
- [218] Karimabad MN, Kounis NG, Hassanshahi G, Hassanshahi F, Mplani V, Koniari I, et al. The Involvement of CXC Motif Chemokine Ligand 10 (CXCL10) and Its Related Chemokines in the Pathogenesis of Coronary Artery Disease and in the COVID-19 Vaccination: A Narrative Review. *Vaccines (Basel)* 2021;9. <https://doi.org/10.3390/VACCINES9111224>.
- [219] Perico L, Benigni A, Casiraghi F, Ng LFP, Renia L, Remuzzi G. Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19. *Nat Rev Nephrol* 2021;17:46–64. <https://doi.org/10.1038/S41581-020-00357-4>.
- [220] Lanzoni G, Linetsky E, Correa D, Messinger Cayetano S, Alvarez RA, Kouroupis D, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells for COVID-19 acute respiratory distress syndrome: A double-blind, phase 1/2a, randomized controlled trial. *Stem Cells Transl Med* 2021;10:660–73. <https://doi.org/10.1002/SCTM.20-0472>.

- [221] Han H, Ma Q, Li C, Liu R, Zhao L, Wang W, et al. Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. *Https://DoiOrg/101080/2222175120201770129* 2020;9:1123–30. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1770129>.
- [222] Zhao Y, Qin L, Zhang P, Li K, Liang L, Sun J, et al. Longitudinal COVID-19 profiling associates IL-1RA and IL-10 with disease severity and RANTES with mild disease. *JCI Insight* 2020;5. <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.139834>.
- [223] Lu L, Zhang H, Dauphars DJ, He YW. A Potential Role of Interleukin 10 in COVID-19 Pathogenesis. *Trends Immunol* 2021;42:3–5. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2020.10.012>.
- [224] Wei F, Kong D, Li T, Li A, Tan Y, Fang J, et al. Efficacy and safety of umbilical cord mesenchymal stem cells for the treatment of patients with COVID-19. *Clinics* 2021;76. <https://doi.org/10.6061/CLINICS/2021/E2604>.
- [225] Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Rupérez M, Egido J. Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001;10:321–9. <https://doi.org/10.1097/00041552-200105000-00005>.
- [226] Pastore L, Tessitore A, Martinotti S, Toniato E, Alesse E, Bravi MC, et al. Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo. *Circulation* 1999;100:1646–52. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.100.15.1646>.
- [227] Silva-Filho JL, Caruso-Neves C, Pinheiro AAS. Angiotensin II type-1 receptor (AT1R) regulates expansion, differentiation, and functional capacity of antigen-specific CD8⁺ T cells. *Scientific Reports* 2016 6:1 2016;6:1–17. <https://doi.org/10.1038/srep35997>.
- [228] Xavier LL, Neves PFR, Paz LV, Neves LT, Bagatini PB, Timmers LFSM, et al. Does Angiotensin II Peak in Response to SARS-CoV-2? *Front Immunol* 2021;11. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.577875>.
- [229] Rysz S, Al-Saadi J, Sjöström A, Farm M, Campoccia Jalde F, Plattén M, et al. COVID-19 pathophysiology may be driven by an imbalance in the renin-angiotensin-aldosterone system. *Nat Commun* 2021;12. <https://doi.org/10.1038/S41467-021-22713-Z>.

- [230] Wu Z, Hu R, Zhang C, Ren W, Yu A, Zhou X. Elevation of plasma angiotensin II level is a potential pathogenesis for the critically ill COVID-19 patients. *Crit Care* 2020;24. <https://doi.org/10.1186/S13054-020-03015-0>.
- [231] Kai H, Kai M. Interactions of coronaviruses with ACE2, angiotensin II, and RAS inhibitors-lessons from available evidence and insights into COVID-19. *Hypertens Res* 2020;43:648–54. <https://doi.org/10.1038/S41440-020-0455-8>.
- [232] Alay H, Laloglu E. The role of angiopoietin-2 and surfactant protein-D levels in SARS-CoV-2-related lung injury: A prospective, observational, cohort study. *J Med Virol* 2021;93:6008–15. <https://doi.org/10.1002/jmv.27184>.
- [233] Lim A, Radujkovic A, Weigand MA, Merle U. Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) as a biomarker of COVID-19 disease severity and indicator of the need for mechanical ventilation, ARDS and mortality. *Ann Intensive Care* 2021;11. <https://doi.org/10.1186/s13613-021-00836-2>.
- [234] Qin L, Liu N, Bao C le meng, Yang D zhi, Ma G xing, Yi W hong, et al. Mesenchymal stem cells in fibrotic diseases—the two sides of the same coin. *Acta Pharmacologica Sinica* 2022 44:2 2022;44:268–87. <https://doi.org/10.1038/s41401-022-00952-0>.
- [235] Carcaterra M, Caruso C. Alveolar epithelial cell type II as main target of SARS-CoV-2 virus and COVID-19 development via NF-Kb pathway deregulation: A physio-pathological theory. *Med Hypotheses* 2021;146. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110412>.
- [236] Mokra, Mikolka, Kosutova, Mokry. Corticosteroids in Acute Lung Injury: The Dilemma Continues. *Int J Mol Sci* 2019;20:4765. <https://doi.org/10.3390/ijms20194765>.
- [237] Roy D, Ramasamy R, Schmidt AM. Journey to a Receptor for Advanced Glycation End Products Connection in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection with Stops along the Way in the Lung, Heart, Blood Vessels, and Adipose Tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2021;41:614–27. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.315527>.
- [238] Kimura D, Saravia J, Rovnaghi CR, Meduri GU, Schwingshackl A, Cormier SA, et al. Plasma biomarker analysis in pediatric ARDS: Generating future framework

- from a pilot randomized control trial of methylprednisolone: A framework for identifying plasma biomarkers related to clinical outcomes in pediatric ARDS. *Front Pediatr* 2016;4:184432. <https://doi.org/10.3389/FPED.2016.00031/BIBTEX>.
- [239] Wick KD, Leligdowicz A, Zhuo H, Ware LB, Matthay MA. Mesenchymal stromal cells reduce evidence of lung injury in patients with ARDS. *JCI Insight* 2021;6. <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.148983>.
- [240] Meizlish ML, Pine AB, Bishai JD, Goshua G, Nadelmann ER, Simonov M, et al. A neutrophil activation signature predicts critical illness and mortality in COVID-19. *Blood Adv* 2021;5:1164–77. <https://doi.org/10.1182/BLOODADVANCES.2020003568>.
- [241] Hasanvand A. COVID-19 and the role of cytokines in this disease. *Inflammopharmacology* 2022 30:3 2022;30:789–98. <https://doi.org/10.1007/S10787-022-00992-2>.
- [242] Islam H, Chamberlain TC, Mui AL, Little JP. Elevated Interleukin-10 Levels in COVID-19: Potentiation of Pro-Inflammatory Responses or Impaired Anti-Inflammatory Action? *Front Immunol* 2021;12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.677008>.
- [243] Alshammary AF, Alsughayyir JM, Alharbi KK, Al-Sulaiman AM, Alshammary HF, Alshammary HF. T-Cell Subsets and Interleukin-10 Levels Are Predictors of Severity and Mortality in COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Med (Lausanne)* 2022;9:1147. <https://doi.org/10.3389/FMED.2022.852749/BIBTEX>.
- [244] Wang T, Jiang L, Wei X, Dong Z, Liu B, Zhao J, et al. Inhibition of miR-221 alleviates LPS-induced acute lung injury via inactivation of SOCS1/NF- κ B signaling pathway. <https://doi.org/10.1080/1538410120191632136> 2019;18:1893–907. <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1632136>.
- [245] Xu P, Xin J, Song L, Chen Y, Ma J, Liu L, et al. Serum miR-133 as a Potential Biomarker in Acute Cerebral Infarction Patients. *Clin Lab* 2020;66:1923–8. <https://doi.org/10.7754/CLIN.LAB.2019.190933>.

- [246] Garg A, Seeliger B, Derda AA, Xiao K, Gietz A, Scherf K, et al. Circulating cardiovascular microRNAs in critically ill COVID-19 patients. *Eur J Heart Fail* 2021;23:468–75. <https://doi.org/10.1002/EJHF.2096>.
- [247] Fogel O, Bugge Tinggaard A, Fagny M, Sigrist N, Roche E, Leclere L, et al. Deregulation of microRNA expression in monocytes and CD4⁺ T lymphocytes from patients with axial spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther* 2019;21:1–14. <https://doi.org/10.1186/S13075-019-1829-7/FIGURES/3>.
- [248] Zeng Z, Gong H, Li Y, Jie K, Ding C, Shao Q, et al. Upregulation of miR-146a contributes to the suppression of inflammatory responses in LPS-induced acute lung injury. *Exp Lung Res* 2013;39:275–82. <https://doi.org/10.3109/01902148.2013.808285>.
- [249] Lambert KA, Roff AN, Panganiban RP, Douglas S, Ishmael FT. MicroRNA-146a is induced by inflammatory stimuli in airway epithelial cells and augments the anti-inflammatory effects of glucocorticoids. *PLoS One* 2018;13. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0205434>.
- [250] Han Y, Li Y, Jiang Y. The Prognostic Value of Plasma MicroRNA-155 and MicroRNA-146a Level in Severe Sepsis and Sepsis-Induced Acute Lung Injury Patients. *Clin Lab* 2016;62. <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2016.160511>.
- [251] Wu X, Wu C, Gu W, Ji H, Zhu L. Serum Exosomal MicroRNAs Predict Acute Respiratory Distress Syndrome Events in Patients with Severe Community-Acquired Pneumonia. *Biomed Res Int* 2019;2019:1–11. <https://doi.org/10.1155/2019/3612020>.
- [252] Zhang S, Hong Y, Liu H, Wang Q, Xu J, Zhang Y, et al. miR-584 and miR-146 are candidate biomarkers for acute respiratory distress syndrome. *Exp Ther Med* 2021;21:445. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.9873>.
- [253] Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:12481. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0605298103>.
- [254] Donyavi T, Bokharaei-Salim F, Baghi HB, Khanaliha K, Janat-Makan MA, Karimi B, et al. Acute and post-acute phase of COVID-19: Analyzing expression patterns

- of miRNA-29a-3p, 146a-3p, 155-5p, and let-7b-3p in PBMC. *Int Immunopharmacol* 2021;97:107641. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2021.107641>.
- [255] Gonzalo-Calvo D de, Benitez ID, Pinilla L, Carratala A, Moncusi-Moix ANNA, Gort-Paniello C, et al. Circulating microRNA profiles predict the severity of COVID-19 in hospitalized patients. *Translational Research* 2021;236:147–59. <https://doi.org/10.1016/J.TRSL.2021.05.004>.
- [256] Bye A, Røsjø H, Nauman J, Silva GJJ, Follestad T, Omland T, et al. Circulating microRNAs predict future fatal myocardial infarction in healthy individuals - The HUNT study. *J Mol Cell Cardiol* 2016;97:162–8. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.05.009>.
- [257] Wang M, Liang L, Li L, Han K, Li Q, Peng Y, et al. Increased miR-424-5p expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with pemphigus. *Mol Med Rep* 2017;15:3479–84. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6422>.
- [258] Fernández-Pato A, Virseda-Berdices A, Resino S, Ryan P, Martínez-González O, Pérez-García F, et al. Plasma miRNA profile at COVID-19 onset predicts severity status and mortality. *Emerg Microbes Infect* 2022;11:676–88. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2038021>.
- [259] Muñoz-Pacheco P, Ortega-Hernández A, Miana M, Cachofeiro V, Fernández-Cruz A, Gómez-Garre D. Ezetimibe inhibits PMA-induced monocyte/macrophage differentiation by altering microRNA expression: a novel anti-atherosclerotic mechanism. *Pharmacol Res* 2012;66:536–43. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2012.09.005>.
- [260] Zyulina V, Yan KK, Ju B, Schwarzenberger E, Passegger C, Tam-Amersdorfer C, et al. The miR-424(322)/503 gene cluster regulates pro- versus anti-inflammatory skin DC subset differentiation by modulating TGF- β signaling. *Cell Rep* 2021;35:109049. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2021.109049>.
- [261] Merlet E, Atassi F, Motiani RK, Mougenot N, Jacquet A, Nadaud S, et al. miR-424/322 regulates vascular smooth muscle cell phenotype and neointimal formation in the rat. *Cardiovasc Res* 2013;98:458. <https://doi.org/10.1093/CVR/CVT045>.

- [262] Ghosh G, Subramanian I V., Adhikari N, Zhang X, Joshi HP, Basi D, et al. Hypoxia-induced microRNA-424 expression in human endothelial cells regulates HIF- α isoforms and promotes angiogenesis. *J Clin Invest* 2010;120:4141–54. <https://doi.org/10.1172/JCI42980>.
- [263] Shen Y, Lu H, Song G. MiR-221-3p and miR-92a-3p enhances smoking-induced inflammation in COPD. *J Clin Lab Anal* 2021;35:e23857. <https://doi.org/10.1002/jcla.23857>.
- [264] Fu L, Zhu P, Qi S, Li C, Zhao K. MicroRNA-92a antagonism attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced pulmonary inflammation and injury in mice through suppressing the PTEN/AKT/NF- κ B signaling pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2018;107:703–11. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.040>.
- [265] Fayyad-Kazan M, Makki R, Skafi N, El Homsy M, Hamade A, El Majzoub R, et al. Circulating miRNAs: Potential diagnostic role for coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Infection, Genetics and Evolution* 2021;94:105020. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105020>.
- [266] Shang F, Wang SC, Hsu CY, Miao Y, Martin M, Yin Y, et al. MicroRNA-92a mediates endothelial dysfunction in CKD. *Journal of the American Society of Nephrology* 2017;28:3251–61. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016111215>.
- [267] Cui J, Li Q, Luo M, Zhong Z, Zhou S, Jiang L, et al. Leukemia cell-derived microvesicles induce T cell exhaustion via miRNA delivery. *Oncoimmunology* 2018;7. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1448330>.
- [268] Lai L, Song Y, Liu Y, Chen Q, Han Q, Chen W, et al. MicroRNA-92a negatively regulates toll-like receptor (TLR)-triggered inflammatory response in macrophages by targeting MKK4 kinase. *Journal of Biological Chemistry* 2013;288:7956–67. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.445429>.
- [269] Mallis P, Chatzistamatiou T, Dimou Z, Sarri E-F, Georgiou E, Salagianni M, et al. Mesenchymal stromal cell delivery as a potential therapeutic strategy against COVID-19: Promising evidence from in vitro results. *World J Biol Chem* 2022;13:47–65. <https://doi.org/10.4331/WJBC.V13.I2.47>.
- [270] Mallis P, Michalopoulos E, Chatzistamatiou T, Giokas CS. Interplay between mesenchymal stromal cells and immune system: clinical applications in immune-

- related diseases. *Exploration of Immunology* 2021;1:112–39. <https://doi.org/10.37349/EI.2021.00010>.
- [271] Chen MC, Lai KSL, Chien KL, Teng ST, Lin YR, Chao W, et al. pcMSC Modulates Immune Dysregulation in Patients With COVID-19-Induced Refractory Acute Lung Injury. *Front Immunol* 2022;13. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.871828>.
- [272] Fan XL, Zeng QX, Li X, Li CL, Xu Z Bin, Deng XQ, et al. Induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells activate quiescent T cells and elevate regulatory T cell response via NF- κ B in allergic rhinitis patients. *Stem Cell Res Ther* 2018;9. <https://doi.org/10.1186/S13287-018-0896-Z>.
- [273] Li Z, Niu S, Guo B, Gao T, Wang L, Wang Y, et al. Stem cell therapy for COVID-19, ARDS and pulmonary fibrosis. *Cell Prolif* 2020;53:e12939. <https://doi.org/10.1111/CPR.12939>.
- [274] Chouw A, Milanda T, Sartika CR, Kirana MN, Halim D, Faried A. Potency of Mesenchymal Stem Cell and Its Secretome in Treating COVID-19. *Regen Eng Transl Med* 2022;8:43–54. <https://doi.org/10.1007/S40883-021-00202-5/TABLES/2>.
- [275] Mareschi K, Castiglia S, Sanavio F, Rustichelli D, Muraro M, Defedele D, et al. Immunoregulatory effects on T lymphocytes by human mesenchymal stromal cells isolated from bone marrow, amniotic fluid, and placenta. *Exp Hematol* 2016;44:138-150.e1. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2015.10.009>.
- [276] Chinnadurai R, Rajan D, Qayed M, Arafat D, Garcia M, Liu Y, et al. Potency Analysis of Mesenchymal Stromal Cells Using a Combinatorial Assay Matrix Approach. *Cell Rep* 2018;22:2504–17. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.013>.
- [277] Croci S, Bonacini M, Dolci G, Massari M, Facciolongo N, Pignatti E, et al. Human Dental Pulp Stem Cells Modulate Cytokine Production in vitro by Peripheral Blood Mononuclear Cells From Coronavirus Disease 2019 Patients. *Front Cell Dev Biol* 2021;8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.609204>.
- [278] Cruz-Barrera M, Flórez-Zapata N, Lemus-Díaz N, Medina C, Galindo C-C, González-Acero L-X, et al. Integrated Analysis of Transcriptome and Secretome

- From Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells Reveal New Mechanisms for the Modulation of Inflammation and Immune Activation. *Front Immunol* 2020;11:2449. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.575488>.
- [279] Taghavi-Farahabadi M, Mahmoudi M, Rezaei N, Hashemi SM. Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Exosomes and Conditioned Media Increased Neutrophil Lifespan and Phagocytosis Capacity. *Immunol Invest* 2021;50:1042–57. <https://doi.org/10.1080/08820139.2020.1801720>.
- [280] Mahmoudi M, Taghavi-Farahabadi M, Namaki S, Baghaei K, Rayzan E, Rezaei N, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells improved function and survival of neutrophils from severe congenital neutropenia patients in vitro. *Hum Immunol* 2019;80:990–8. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2019.10.006>.
- [281] Li X, Zhang Z, Wang Z, Gutiérrez-Castrellón P, Shi H. Cell deaths: Involvement in the pathogenesis and intervention therapy of COVID-19. *Signal Transduct Target Ther* 2022;7:1–21. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01043-6>.
- [282] Fan XL, Zhang Z, Ma CY, Fu QL. Mesenchymal stem cells for inflammatory airway disorders: Promises and challenges. *Biosci Rep* 2019;39. <https://doi.org/10.1042/BSR20182160>.
- [283] Dunham RM, Cervasi B, Brenchley JM, Albrecht H, Weintrob A, Sumpter B, et al. CD127 and CD25 expression defines CD4⁺ T cell subsets that are differentially depleted during HIV infection. *J Immunol* 2008;180:5582–92. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.180.8.5582>.

Додаток А

Список публікацій здобувача за темою дисертації

Статті у наукових фахових виданнях:

- 1) Dynamic changes in radiological parameters, immune cells, selected miRNAs, and cytokine levels in peripheral blood of patients with severe COVID 19 / **Bukreieva, T.**, Kyryk, V., Nikulina, V., Svitina, H., Vega, A., Chybisov, O., Shablii, I., Mankovska, O., Lobyntseva, G., Nemtinov, P., Skrypkina, I., & Shablii, V. // Biomedical reports, 2023, 18(5), 33. DOI:10.3892/br.2023.1615. IF 2.3 Q2. *Особистий внесок здобувача – розробка та планування дослідження, розробка методик, ІФА, аналіз даних, підготовка рукопису.*
- 2) Treatment of Acute Respiratory Distress Syndrome Caused by COVID-19 with Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells / **Bukreieva, T.**, Svitina, H., Nikulina, V., Vega, A., Chybisov, O., Shablii, I., Ustymenko, A., Nemtinov, P., Lobyntseva, G., Skrypkina, I., & Shablii, V. // International journal of molecular sciences, 2023, 24(5), 4435. DOI:10.3390/ijms24054435. IF 4.9 Q1 *Особистий внесок здобувача – розробка та планування дослідження, розробка методик, отримання, тестування, і підготовка МСКПЛ для трансплантації та експерименти зі спільним культивуванням МКПК/МСКПЛ, ІФА, аналіз даних, підготовка рукопису.*
- 3) Effects of human placenta cryopreservation on molecular characteristics of placental mesenchymal stromal cells”. / Navakauskienė, R., Žukauskaitė, D., Borutinskaitė, V. V., **Bukreieva, T.**, Skliutė, G., Valatkaitė, E., Zentelytė, A., Piešinienė, L., & Shablii, V. // Frontiers in bioengineering and biotechnology 2023, 11, 1140781. DOI:10.3389/fbioe.2023.1140781. IF 4.53 Q2 *Особистий внесок здобувача – розробка дослідження, отримання, характеристика МСК, аналіз даних, підготовка рукопису.*

Тези наукових доповідей:

- 1) **Bukreieva T. V.**, Nikulina V. V., Skrypkinia I. Ya., Kyryk V. M., Vega A. R., Chybisov O. L., Duda O. V., Shablii V. A. / Dynamic alterations of immunophenotype, C reactive protein and interleukine-6 levels in peripheral blood of severe COVID-19 patients // XV Всеукраїнська конференція молодих вчених з міжнародною участю. Biopolymers and Cell. 2021. Vol. 37. N 3. (Київ, 26-27 травня 2021) – P. 231.
- 2) **Bukreieva T.V.**, Kyryk V.M., Svitina H.M., Nikulina V.V., Shablii Iu.M., Chybisov O.L., Nemtinov P.I., Ustymenko A.M., Lobyntseva G.S., Skrypkinia I.Ia., Shablii, V. A. / T cell response is associated with cytokine and miRNA levels in patients with COVID-19 // Всеукраїнська конференція з молекулярної і клітинної біології з міжнародною участю // All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation. Збірник тез (Київ, 15-17 червня 2022) – P. 70.
- 3) **Bukreieva T.V.**, Kyryk V.M., Nikulina V.V., Svitina H.M., Vega A.R., Chybisov O.L., Shablii Iu.M., Mankovska O.O., Ustymenko A.M., Lobyntseva G.S., Nemtinov P.I., Skrypkinia I.Ia., Shablii, V. A. / Treatment for COVID-19 with intravenous administration of umbilical cord-derived MSCs // CLINICAL TRANSLATION OF PERINATAL DERIVATIVES: WHERE DO WE STAND? Joint Meeting: 6th International Placenta Stem Cell Society (IPLASS) Meeting and Final Meeting of the COST Action (CA17116) “International Network for Translating Research on Perinatal Derivatives into Therapeutic Approaches” Abstract book. (Брешия, Італія, 02-03 вересня 2022)
- 4) **Букресєва Т.В.**, Світїна Г.М., Нікуліна В.В., Вега А.Р., Чибісов О.Л., Шаблій Ю.М., Устименко А.М., Немтінов П.І., Лобинцева Г.С., Скрипкіна І.Я., Шаблій В.А. / Лікування гострого респіраторного дистрес-синдрому, викликаного COVID-19, мезенхімальними стовбуровими клітинами пуповини людини//

Конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики (Київ, 21.02.2023)

- 5) **Bukreieva T.V.**, Svitina H.M., Nikulina V.V., Vega A.R., Chybisov O.L., Shablii Iu.M., Kyryk V.M., Ustymenko A.M., Nemtinov P.I., Lobyntseva G.S., Skrypkina I.Ya., Shablii V.A. / Multifunctional response of PBMC from patients with COVID-19 to the immunomodulatory capability of hUC-MSC // Конференція молодих вчених ІМБГ у рамках XVIII Міжнародної наукової конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» присвяченої 50-річчю ІМБГ НАНУ і 70-річчю відкриття подвійної спіралі ДНК. Збірник тез. (Київ, 27 вересня 2023 року) – P.71.
- 6) Shablii V. A., **Bukreieva T. V.**, Svitina H. M., Nikulina V. V., Vega A. R., Chybisov O. L., Shablii Iu. M., Ustymenko A. M., Nemtinov P. I., Lobyntseva G. S., Skrypkina I. Ya. // ISSCR São Paulo International Symposium 2023, Ribeirão Preto, São Paulo, (Бразилія, 22-24 вересня 2023)
- 7) **Bukreieva T. V.**, Svitina H. M., Nikulina V. V., Kyryk V.M., Vega A. R., Chybisov O. L., Shablii Iu. M., Ustymenko A. M., Nemtinov P. I., Lobyntseva G. S., Skrypkina I. Ya., Shablii V. A. / Effects of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Therapy on Immune Response and Lung Fibrosis in Severe COVID-19 // XVIII Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Київ, 21-22 травня 2024)

Додаток Б

Таблиця Б.1.

Дані кореляційного аналізу між гематологічними параметрами, біомаркерами, показниками КТ легень і основними групами лімфоцитів з периферичної крові хворих у контрольній групі COVID-19

			Заг. бал КТ 48 тиж	Лейкоцити	Заг. нейтрофіли	Паличкоядерні нейтрофіли	Сегментоядерні нейтрофіли	Кількість лімфоцитів	Відсоток лімфоцитів	Моноцити	Еозінофіли	Гранулоцити	ШОЕ	G-CSF	C-реакт. білок	IP-10	MIP-1a	MCP-1	CD45+	CD3- CD56+16+/CD45+	CD3-CD19+/CD45+	CD3+/CD45+	CD3+CD57hi/CD45+	CD3+CD4+CD8- /CD45+	CD3+CD4+CD8- CX CR3low/CD45	CD3+CD4+CD8-HLA DR+/CD45	
Коефіцієнт кореляції Ро Спірмена	Заг. бал КТ 48 тиж	Ro	1,000	-,116	,295	,351*	,167	-,424**	-,206	-,127	-,030	-,011	,477**	,397**	,240	,576**	,478**	,288	,020	-,096	-,209	,017	,408**	-,360*	-,327*	,277	
		r		,457	,055	,021	,283	,005	,185	,416	,848	,947	,001	,008	,117	,000	,001	,058	,898	,536	,174	,913	,006	,016	,030	,068	
		N	44	43	43	43	43	42	43	43	43	42	43	44	44	44	44	44	43	44	44	44	44	44	44	44	
	Лейкоцити	Ro	-,116	1,000	,167	-,151	,298*	,432**	-,211	,037	,009	,849**	-,024	,007	,164	-,177	-,011	-,032	-,080	,114	,228	-,355**	,039	-,028	-,009	,018	
		r		,457		,232	,280	,030	,001	,130	,790	,948	,000	,865	,960	,241	,206	,936	,819	,571	,417	,100	,009	,780	,841	,951	,896
		N	43	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	53	53	53	53	53	52	53	53	53	53	53	53	53	
	Заг. нейтр. офіли	Ro	,295	,167	1,000	,508**	,862**	-,686**	-,931**	-,395**	-,343*	,517**	,425**	,443**	,688**	,029	,276*	-,257	-,380**	,048	,099	-,064	-,038	-,352**	-,305*	,087	
		r		,055	,232		,000	,000	,000	,003	,012	,000	,002	,001	,000	,838	,045	,063	,006	,735	,480	,648	,785	,010	,026	,537	
		N	43	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	53	53	53	53	53	52	53	53	53	53	53	53	53	
	Паличка- ядерні нейтрофіл	Ro	,351*	-,151	,508**	1,000	,087	-,501**	-,417**	-,461**	-,136	,040	,157	,286*	,327*	,228	,426**	,123	-,032	-,099	-,215	,233	,085	-,070	-,098	,024	
		r		,021	,280	,000		,535	,000	,002	,001	,333	,777	,262	,038	,017	,101	,001	,380	,823	,479	,121	,093	,545	,617	,487	,862
		N	43	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	53	53	53	53	53	52	53	53	53	53	53	53	53	
	Сегмент- ядерні нейтрофіл	Ro	,167	,298*	,862**	,087	1,000	-,510**	-,845**	-,227	-,297*	,593**	,368**	,376**	,593**	-,071	,122	-,330*	-,474**	,124	,220	-,212	-,093	-,329*	-,287*	,045	
		r		,283	,030	,000	,535		,000	,000	,102	,031	,000	,007	,006	,000	,613	,385	,016	,000	,377	,114	,128	,507	,016	,037	,750
		N	43	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	53	53	53	53	53	52	53	53	53	53	53	53	53	
	Кількість лімфоцитів	Ro	-,424**	,432**	-,686**	-,501**	-,510**	1,000	,652**	,258	,351*	,005	-,528**	-,448**	-,613**	-,103	-,195	,214	,348*	-,034	,179	-,082	-,035	,399**	,380**	-,100	
		r		,005	,001	,000	,000	,000		,000	,065	,011	,972	,000	,001	,000	,466	,167	,128	,012	,809	,205	,562	,806	,003	,005	,482
		N	42	52	52	52	52	52	52	52	52	51	52	52	52	52	52	52	51	52	52	52	52	52	52	52	
	Відсоток лімфоцитів	Ro	-,206	-,211	-,931**	-,417**	-,845**	,652**	1,000	,145	,249	-,545**	-,416**	-,396**	-,731**	,007	-,181	,257	,446**	-,101	-,113	,156	,094	,408**	,364**	,042	
		r		,185	,130	,000	,002	,000		,300	,073	,000	,002	,003	,000	,962	,195	,063	,001	,470	,422	,264	,503	,002	,007	,763	
		N	43	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	53	53	53	53	53	52	53	53	53	53	53	53	53	
	Моноцити	Ro	-,127	,037	-,395**	-,461**	-,227	,258	,145	1,000	,096	-,039	-,071	-,174	-,148	-,006	-,460**	,035	-,048	-,105	,258	-,019	-,207	,196	,190	-,181	
		r		,416	,790	,003	,001	,102	,065	,300		,496	,785	,616	,213	,290	,967	,001	,803	,733	,453	,063	,894	,137	,159	,173	,194
		N	43	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	53	53	53	53	53	52	53	53	53	53	53	53	53	
Еозінофіл	Ro	-,030	,009	-,343*	-,136	-,297*	,351*	,249	,096	1,000	-,139	-,237	-,153	-,428**	-,092	-,064	,317*	,243	,130	-,225	-,124	,113	-,010	,070	-,082		
	r		,848	,948	,012	,333	,031	,011	,073	,496		,325	,088	,274	,001	,513	,646	,021	,083	,352	,106	,378	,419	,944	,618	,560	
	N	43	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	53	53	53	53	53	52	53	53	53	53	53	53	53		
Гранулоцити	Ro	-,011	,849**	,517**	,040	,593**	,005	-,545**	-,039	-,139	1,000	,244	,146	,467**	-,170	,056	-,191	-,295*	,026	,230	-,297*	-,009	-,135	-,116	,032		
	r		,947	,000	,000	,777	,000	,972	,000	,785	,325		,081	,302	,000	,229	,695	,174	,035	,855	,100	,032	,952	,339	,412	,823	
	N	42	52	52	52	52	51	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	51	52	52	52	52	52	52	52		
ШОЕ	Ro	,477**	-,024	,425**	,157	,368**	-,528**	-,416**	-,071	-,237	,244	1,000	,424**	,545**	,003	,174	-,031	-,172	,071	-,119	-,056	,308*	-,257	-,287*	,225		
	r		,001	,865	,002	,262	,007	,000	,002	,616	,088	,081		,002	,000	,982	,213	,826	,223	,611	,397	,689	,025	,063	,037	,105	
	N	43	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	53	53	53	53	53	52	53	53	53	53	53	53	53		

Продовж. табл. Б.1.

			Заг. бал КТ 48 тиж	Лейкоцити	Заг. нейтрофіли	Паличкоядерні нейтрофіли	Сегментоядерні нейтрофіли	Кількість лімфоцитів	Відсоток лімфоцитів	Моноцити	Еозинофіли	Гранулоцити	ШОЕ	G-CSF	C-реакт. білок	IP-10	MIP-1a	MCP-1	CD45+	CD3-CD56+16+/CD45+	CD3-CD19+/CD45+	CD3+/CD45+	CD3+CD57hi/CD45+	CD3+CD4+CD8-/CD45+	CD3+CD4+CD8-CX CR3low/CD45	CD3+CD4+CD8-HLA DR+/CD45
Коефіцієнт кореляції Ро Спірмена	G-CSF	Po	,397**	,007	,443**	,286*	,376**	-,448**	-,396**	-,174	-,153	,146	,424**	1,000	,220	,040	-,014	,145	-,208	,056	,020	-,026	-,120	,008	,026	,079
		p	,008	,960	,001	,038	,006	,001	,003	,213	,274	,302	,002		,065	,739	,909	,229	,083	,644	,865	,830	,317	,945	,832	,512
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71	71
	C-реакт. білок	Po	,240	,164	,688**	,327*	,593**	-,613**	-,731**	-,148	-,428**	,467**	,545**	,220	1,000	,276*	,003	-,086	-,223	,189	,187	,081	,071	-,200	-,217	,128
		p	,117	,241	,000	,017	,000	,000	,000	,290	,001	,000	,000	,065		,020	,979	,474	,063	,115	,119	,501	,555	,095	,069	,288
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71	71
	IP-10	Po	,576**	-,177	,029	,228	-,071	-,103	,007	-,006	-,092	-,170	,003	,040	,276*	1,000	,157	,365**	-,028	,187	-,054	,251*	,407**	-,083	-,121	,201
		p	,000	,206	,838	,101	,613	,466	,962	,967	,513	,229	,982	,739	,020		,190	,002	,816	,118	,654	,034	,000	,492	,315	,092
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71	71
	MIP-1a	Po	,478**	-,011	,276*	,426**	,122	-,195	-,181	-,460**	-,064	,056	,174	-,014	,003	,157	1,000	,327**	,046	-,201	-,416**	,168	,280*	-,129	-,238*	-,027
		p	,001	,936	,045	,001	,385	,167	,195	,001	,646	,695	,213	,909	,979	,190		,005	,705	,093	,000	,163	,018	,284	,046	,823
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71	71
	MCP-1	Po	,288	-,032	-,257	,123	-,330*	,214	,257	,035	,317*	-,191	-,031	,145	-,086	,365**	,327**	1,000	,150	-,008	-,255*	,275*	,283*	,264*	,162	,090
		p	,058	,819	,063	,380	,016	,128	,063	,803	,021	,174	,826	,229	,474	,002	,005		,216	,950	,032	,021	,017	,026	,176	,457
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71	71
	miR-27a	Po	,242	-,316*	,161	,206	,033	-,270	-,128	-,048	,126	-,256	,217	,401**	,222	,180	-,288*	-,003	,017	,117	,208	,050	-,135	-,165	-,075	-,115
		p	,114	,021	,249	,138	,815	,053	,361	,734	,367	,067	,118	,001	,065	,137	,016	,979	,893	,333	,084	,679	,266	,173	,538	,345
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	70	70	70	70	70	69	70	70	70	70	70	70	70
	CD45+	Po	,020	-,080	-,380**	-,032	-,474**	,348*	,446**	-,048	,243	-,295*	-,172	-,208	-,223	-,028	,046	,150	1,000	,127	-,288*	,183	,011	,091	,054	-,070
		p	,898	,571	,006	,823	,000	,012	,001	,733	,083	,035	,223	,083	,063	,816	,705	,216		,294	,016	,130	,927	,454	,658	,564
		N	43	52	52	52	52	51	52	52	52	51	52	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
	CD3-CD56+16+/CD45+	Po	-,096	,114	,048	-,099	,124	-,034	-,101	-,105	,130	,026	,071	,056	,189	,187	-,201	-,008	,127	1,000	-,302*	-,112	,270*	-,113	-,055	,088
		p	,536	,417	,735	,479	,377	,809	,470	,453	,352	,855	,611	,644	,115	,118	,093	,950	,294		,010	,352	,023	,346	,649	,466
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71	71
	CD3-CD19+/CD45+	Po	-,209	,228	,099	-,215	,220	,179	-,113	,258	-,225	,230	-,119	,020	,187	-,054	-,416**	-,255*	-,288*	-,302*	1,000	-,216	-,384**	,066	,092	,024
		p	,174	,100	,480	,121	,114	,205	,422	,063	,106	,100	,397	,865	,119	,654	,000	,032	,016	,010		,070	,001	,584	,446	,841
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71	71
	CD3+/CD45+	Po	,017	-,355**	-,064	,233	-,212	-,082	,156	-,019	-,124	-,297*	-,056	-,026	,081	,251*	,168	,275*	,183	-,112	-,216	1,000	-,004	,560**	,482**	,205
		p	,913	,009	,648	,093	,128	,562	,264	,894	,378	,032	,689	,830	,501	,034	,163	,021	,130	,352	,070		,970	,000	,000	,086
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71	71
	CD3+CD57hi/CD45+	Po	,408**	,039	-,038	,085	-,093	-,035	,094	-,207	,113	-,009	,308*	-,120	,071	,407**	,280*	,283*	,011	,270*	-,384**	-,004	1,000	-,199	-,185	,275*
		p	,006	,780	,785	,545	,507	,806	,503	,137	,419	,952	,025	,317	,555	,000	,018	,017	,927	,023	,001	,970		,096	,123	,020
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71	71

Продовж. табл. Б.1.

			Заг.бал КТ 48 тиж	Лейкоцити	Заг.нейтрофіли	Паличкоядерні нейтрофіли	Сегментоядерні нейтрофіли	Кількість лімфоцитів	Відсоток лімфоцитів	Моноцити	Еозинофіли	Гранулоцити	ШОЕ	G-CSF	C-реакт.білок	IP-10	MIP-1a	MCP-1	CD45+	CD3- CD56+16+/CD45+	CD3-CD19+/CD45+	CD3+/CD45+	CD3+CD57hi/CD45+	CD3+CD4+CD8- /CD45+	CD3+CD4+CD8- CXCR3low/CD45	CD3+CD4+CD8-HLA- DR+/CD45	
Коефіцієнт кореляції Ро Спірмена	CD3+CD4+CD8- /CD45+	Po	-.360	-.028	-.352	-.070	-.329	.399	.408	.196	-.010	-.135	-.257	.008	-.200	-.083	-.129	.264	.091	-.113	.066	.560	-.199	1,000	.932	.326	
		p	.016	.841	.010	.617	.016	.003	.002	.159	.944	.339	.063	.945	.095	.492	.284	.026	.454	.346	.584	.000	.096	.000	.006		
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71		
	CD3+CD4+CD8- CXCR3low/ CD45	Po	-.327	-.009	-.305	-.098	-.287	.380	.364	.190	.070	-.116	-.287	.026	-.217	-.121	-.238	.162	.054	-.055	.092	.482	-.185	.932	1,000	.422	
		p	.030	.951	.026	.487	.037	.005	.007	.173	.618	.412	.037	.832	.069	.315	.046	.176	.658	.649	.446	.000	.123	.000	.000		
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	73	71	
	CD3+CD4+CD8-HLA- DR+/CD45	Po	.277	.018	.087	.024	.045	-.100	.042	-.181	-.082	.032	.225	.079	.128	.201	-.027	.090	-.070	.088	.024	.205	.275	.326	.422	1,000	
		p	.068	.896	.537	.862	.750	.482	.763	.194	.560	.823	.105	.512	.288	.092	.823	.457	.564	.466	.841	.086	.020	.006	.000		
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71	71	
	CD3+CD4- CD8+/CD45	Po	.037	-.009	-.266	-.177	-.174	.314	.329	-.128	.169	-.196	-.038	-.303	-.178	.084	.229	.281	.207	.142	-.296	.210	.670	.055	.009	-.071	
		p	.812	.947	.055	.204	.212	.023	.016	.359	.225	.164	.789	.010	.137	.484	.055	.018	.086	.239	.012	.078	.000	.647	.944	.557	
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71	71	
	CD3+CD4- CD8+CXC R3low/CD45	Po	.267	-.110	-.198	-.051	-.165	.165	.243	.089	.241	-.191	-.081	-.263	-.275	.051	.210	.231	.077	-.131	-.228	.224	.496	.109	.179	.058	
		p	.080	.432	.156	.714	.238	.241	.080	.527	.082	.175	.565	.027	.020	.671	.079	.052	.525	.277	.056	.061	.000	.364	.136	.629	
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71	71	
	CD3+CD4- CD8+HLA- DR+/CD45	Po	.281	-.035	-.112	-.198	-.034	.101	.125	-.043	.138	-.128	.041	-.313	.163	.307	-.068	.045	.025	.139	.072	-.147	.528	-.227	-.133	.289	
		p	.065	.801	.423	.155	.811	.476	.372	.761	.325	.365	.772	.008	.175	.009	.574	.707	.838	.248	.551	.221	.000	.057	.270	.014	
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71	71	
	Коефіцієнт кореляції Ро Спірмена	CD3+CD4+CD8+/C	Po	.101	.003	-.154	.067	-.249	.224	.253	-.075	.059	-.082	-.019	-.137	-.147	.155	.119	.177	.063	-.021	-.142	.268	.480	.217	.277	.345
			p	.513	.982	.272	.633	.072	.110	.067	.594	.676	.565	.891	.253	.220	.197	.321	.139	.604	.861	.239	.024	.000	.069	.019	.003
			N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71	
		CD3+CD4+hiCD45RO+/CD45	Po	.033	.035	-.205	.110	-.274	.269	.243	.128	.157	-.080	-.088	.266	-.103	.019	-.065	.317	.066	-.028	-.026	.428	-.064	.790	.802	.419
			p	.832	.804	.142	.434	.047	.054	.080	.363	.260	.571	.532	.025	.392	.874	.590	.007	.586	.816	.832	.000	.599	.000	.000	.000
			N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71	71
CD4+57+PD1-/CD45		Po	.219	.075	-.036	.075	-.078	.050	.115	-.116	.128	.028	.207	.239	.259	.319	-.030	.250	-.075	.251	-.102	.393	.423	.405	.462	.659	
		p	.153	.592	.796	.593	.577	.727	.414	.408	.361	.845	.138	.045	.029	.007	.805	.036	.536	.035	.399	.001	.000	.000	.000	.000	
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71	71	
CD14+/CD45+		Po	.285	-.047	.421	.195	.338	-.543	-.452	-.172	-.121	.182	.241	.052	.197	-.012	.099	-.406	-.176	-.169	-.041	-.381	-.032	-.807	-.731	-.226	
		p	.061	.738	.002	.161	.013	.000	.001	.218	.386	.196	.082	.665	.099	.919	.412	.000	.146	.159	.732	.001	.790	.000	.000	.058	
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71	71	
CD303+HLA-DR+/CD45	Po	-.169	-.112	-.405	-.373	-.227	.198	.293	.373	.238	-.240	-.365	-.199	-.481	-.060	-.128	-.104	.117	.061	-.139	-.118	-.031	-.052	-.066	-.164		
	p	.272	.426	.003	.006	.102	.160	.033	.006	.086	.087	.007	.097	.000	.619	.286	.386	.334	.612	.326	.795	.668	.585	.171			
	N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71	71		

Продовж. табл. Б.1.

			Заг. бал. КТ 48 тиж	Лейкоцити	Заг. нейтрофіли	Паличкодерні нейтрофіли	Сегментоядерні нейтрофіли	Кількість лімфоцитів	Відсоток лімфоцитів	Моноцити	Еозинофіли	Гранулоцити	ШОЕ	G-CSF	C-реакт. білок	IP-10	MIP-1a	MCP-1	CD45+	CD3-CD56+16+/CD45+	CD3-CD19+/CD45+	CD3+/CD45+	CD3+CD57+/CD45+	CD3+CD4+CD8- /CD45+	CD3+CD4+CD8- CXCR3low/CD45	CD3+CD4+CD8- HLA-DR+/CD45
Коефіцієнт кореляції: Po Спірмена	CD14-CD1c+/CD45+	Po	.131	.151	-.106	-.142	-.041	.103	.127	.076	.105	.057	-.075	-.072	-.170	.082	-.261	-.247	.056	-.068	.242	-.275	.182	-.228	-.095	.129
		p	.397	.282	.451	.310	.769	.467	.364	.587	.455	.691	.595	.548	.157	.499	.028	.038	.645	.571	.042	.020	.129	.055	.429	.283
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71	71
	CD11bdimCD11dow/CD45	Po	.109	.047	.180	-.038	.267	-.194	-.186	-.220	-.129	.038	.257	.033	-.071	-.006	.289	-.046	.082	.503	.487	-.157	.274	-.274	-.268	.067
		p	.481	.736	.196	.787	.053	.169	.182	.113	.358	.787	.083	.783	.557	.957	.014	.705	.500	.000	.000	.190	.021	.021	.024	.581
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71	71
	CD14+CD1c+/CD45	Po	-.299	-.112	-.241	-.410	-.086	.053	.217	.250	.188	-.154	-.102	-.108	-.078	.080	.401	-.171	.068	.122	.072	-.005	-.037	-.218	-.096	.014
		p	.049	.424	.082	.002	.541	.708	.119	.071	.179	.275	.467	.368	.520	.506	.001	.153	.575	.312	.553	.964	.759	.068	.426	.909
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71	71
	CD14-CD11c+CD11b/low	Po	-.153	-.073	-.510	-.431	-.344	.365	.527	.211	.277	-.274	-.267	-.175	-.589	-.073	-.145	-.136	.168	-.008	-.164	-.213	.175	-.083	.025	.066
		p	.321	.602	.000	.001	.012	.008	.000	.130	.044	.049	.054	.144	.000	.545	.227	.258	.164	.960	.173	.075	.145	.491	.834	.585
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71	71
	CD3+CD4+CD8-CD57+PD1-low	Po	.337	.094	.030	.171	-.061	-.003	.024	-.118	.200	.044	.208	.275	.252	.330	-.032	.244	-.079	.247	-.108	.284	.398	.326	.448	.667
		p	.025	.505	.833	.220	.662	.981	.866	.401	.151	.754	.135	.020	.034	.005	.791	.040	.514	.038	.368	.016	.001	.006	.000	.000
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	73	71
	CD3+CD4-CD8+57+PD1-low	Po	.343	-.033	-.184	-.013	-.195	.090	.232	-.180	.141	-.132	.159	-.304	.068	.377	.171	.222	.092	.203	-.235	.014	.877	-.193	-.104	.149
		p	.023	.817	.188	.929	.162	.524	.095	.198	.315	.351	.255	.010	.572	.001	.155	.083	.449	.090	.049	.910	.000	.107	.381	.215
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	73	71
	CD3+CD4-CD8+CD57+PD1-low	Po	.568	-.039	-.134	.077	-.203	.033	.152	-.008	.272	-.154	.050	-.271	.031	.327	.174	.188	.165	.012	-.262	.008	.592	-.303	-.246	.097
		p	.000	.780	.337	.583	.146	.819	.277	.957	.049	.274	.721	.022	.796	.005	.147	.161	.172	.921	.027	.962	.000	.010	.038	.423
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71	71
	CD3+PD1-low/CD45	Po	-.147	.104	-.250	.034	-.296	.297	.300	.063	.162	-.024	-.206	.102	-.099	.108	-.171	.175	-.026	.033	-.031	.285	.117	.548	.665	.452
		p	.341	.459	.071	.807	.031	.032	.029	.653	.246	.865	.140	.397	.412	.370	.154	.144	.829	.785	.794	.016	.333	.000	.000	.000
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71	71
	CD3-PD1low/CD45	Po	.112	.065	-.378	-.282	-.250	.331	.350	.254	.150	-.099	-.173	-.075	-.377	-.114	-.074	.075	-.135	-.281	.010	-.119	-.003	.245	.359	.209
		p	.469	.645	.005	.041	.071	.017	.010	.066	.283	.485	.217	.532	.001	.344	.539	.536	.265	.017	.933	.323	.982	.040	.002	.080
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71	71
	CD3+CD4+CD8-CD25low	Po	-.023	-.207	-.166	.096	-.255	.089	.251	-.041	-.015	-.249	-.179	-.180	.161	.247	-.215	-.046	.014	.010	.093	.298	.160	.315	.467	.379
		p	.881	.137	.235	.494	.065	.530	.069	.772	.918	.075	.199	.133	.181	.038	.071	.706	.907	.931	.438	.012	.183	.007	.000	.001
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	73	71
	CD3+CD25+/CD45	Po	.288	.007	-.219	-.038	-.196	.225	.227	-.117	.197	-.164	-.095	-.212	.209	.369	-.184	.089	.179	.252	.095	-.065	.357	-.124	.012	.106
		p	.058	.960	.116	.788	.159	.109	.103	.404	.157	.247	.501	.076	.080	.002	.124	.461	.138	.034	.431	.593	.002	.304	.922	.381
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	73	71
	CD3+CD127low/CD45	Po	-.484	.034	-.258	.026	-.289	.257	.262	.201	.159	-.034	-.279	.075	.041	.015	.435	.082	.122	.204	.066	.349	-.155	.607	.708	.160
		p	.001	.811	.062	.852	.036	.065	.058	.149	.254	.813	.043	.533	.732	.899	.000	.499	.316	.089	.587	.003	.196	.000	.000	.183
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	73	71
	CD3+CD4+CD8-HLA-DR	Po	.212	.034	.018	-.049	.050	-.039	.092	-.146	-.054	.015	.129	.076	.120	.235	-.058	.068	-.134	.199	.018	.144	.277	.318	.412	.959
		p	.168	.807	.900	.728	.723	.785	.512	.296	.701	.918	.356	.531	.320	.049	.629	.572	.268	.097	.879	.230	.019	.007	.000	.000
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71	71
	CD3+CD4-CD8+HLA-DR+PD1-low	Po	.178	.069	-.159	-.101	-.074	.191	.170	-.168	.204	-.061	-.058	-.338	.165	.371	-.053	.057	.078	.318	-.008	-.163	.551	-.196	-.152	.222
		p	.249	.622	.255	.470	.597	.174	.225	.229	.143	.668	.681	.004	.170	.001	.659	.640	.521	.007	.950	.173	.000	.102	.207	.062
		N	44	53	53	53	53	52	53	53	53	52	53	71	71	71	71	71	70	71	71	71	71	71	71	71

* Кореляція достовірною при $p < 0,05$ (двостороння)
**Кореляція достовірною при $p < 0,01$ (двостороння)
КТ - комп'ютерна томографія
ШОЕ - швидкість осідання еритроцитів

Додаток В

Таблиця В.1.

Дані кореляційного аналізу між гематологічними параметрами, цитокінами, мікроРНК і показниками КТ легень у групі МСК

			Заг.бал КТ 2 тиж	Заг.бал КТ 8 тиж	Заг.бал КТ 24 тиж	Заг.бал КТ 48 тиж	C-реактивний білок	IP10	MCP-1a	MIP-1a	G-CSF	IL-10	NT-proBNP	SP-D	RAGE	Лейкоцити	Гранулоцити
Коефіцієнт кореляції Ро Спірмена	Заг.бал КТ 2 тиж	Рo	1,000	,808**	,699**	,769**	,439**	,296	,386*	,323*	-,367*	,093	-,202	,373*	,437**	-,047	,040
		p		,000	,000	,000	,004	,060	,013	,037	,017	,559	,217	,015	,004	,758	,790
		N	48	44	44	40	42	41	41	42	42	42	39	42	42	45	46
	Заг.бал КТ 8 тиж	Рo	,808**	1,000	,827**	,805**	,386*	,140	,471**	,093	-,365*	,192	-,247	,103	,436**	,060	,263
		p	,000		,000	,000	,017	,407	,003	,579	,024	,248	,152	,536	,006	,707	,092
		N	44	44	40	40	38	37	37	38	38	38	35	38	38	41	42
	Заг.бал КТ 24 тиж	Рo	,699**	,827**	1,000	1,000**	,510**	,153	,249	,034	-,273	-,139	-,367*	,070	,420**	,306	,457**
		p	,000	,000			,001	,365	,138	,841	,097	,404	,030	,677	,009	,052	,002
		N	44	40	44	36	38	37	37	38	38	38	35	38	38	41	42
	Заг.бал КТ 48 тиж	Рo	,769**	,805**	1,000**	1,000	,475**	,157	,499**	,141	-,382*	,021	-,237	,111	,510**	,272	,449**
		p	,000	,000			,004	,374	,003	,418	,024	,906	,192	,525	,002	,099	,005
		N	40	40	36	40	35	34	34	35	35	35	32	35	35	38	38
	C-реактивний білок	Рo	,439**	,386*	,510**	,475**	1,000	,263	,209	-,027	-,098	,050	-,574**	,267	,246	,121	-,122
		p	,004	,017	,001	,004		,085	,173	,859	,523	,747	,000	,076	,108	,430	,431
		N	42	38	38	35	45	44	44	45	45	45	42	45	44	45	44
	IP10	Рo	,296	,140	,153	,157	,263	1,000	-,165	,010	-,079	,021	-,008	,310*	,021	-,326*	-,092
		p	,060	,407	,365	,374	,085		,284	,948	,609	,893	,958	,041	,894	,031	,558
		N	41	37	37	34	44	44	44	44	44	44	42	44	43	44	43
	MCP-1a	Рo	,386*	,471**	,249	,499**	,209	-,165	1,000	,153	-,190	,123	-,061	-,011	,516**	,159	,073
		p	,013	,003	,138	,003	,173	,284		,320	,217	,428	,700	,944	,000	,304	,643
		N	41	37	37	34	44	44	44	44	44	44	42	44	43	44	43
	MIP-1a	Рo	,323*	,093	,034	,141	-,027	,010	,153	1,000	-,349*	-,083	,046	,488**	,299*	-,204	-,024
		p	,037	,579	,841	,418	,859	,948	,320		,019	,589	,771	,001	,049	,179	,878
		N	42	38	38	35	45	44	44	45	45	45	42	45	44	45	44
	G-CSF	Рo	-,367*	-,365*	-,273	-,382*	-,098	-,079	-,190	-,349*	1,000	,239	,164	-,364*	-,407**	-,030	,029
		p	,017	,024	,097	,024	,523	,609	,217	,019		,114	,300	,014	,006	,844	,851
		N	42	38	38	35	45	44	44	45	45	45	42	45	44	45	44

Продовж. табл. В.1.

			Еозінофіли	Загальні нейтрофіли	Паличкоде рні нейтрофіли	ШОЕ	Кількість лейкоцитів	Відсоток лейкоцитів	Моноцити	miR-27 а-3р	miR-146а- 5р	miR-21-5р	miR-221-3р	miR-126-3р	miR-133а- 3р	miR-92а-3р	miR-424-5р
Коефіцієнт кореляції Ро Спірмена	Заг.бал КТ 2 тиж	Ро	-,133	,072	,098	,445 ^{***}	-,254	-,081	-,108	-,111	,053	-,412 ^{***}	-,227	,087	,043	-,480 ^{***}	-,571 ^{***}
		p	,385	,660	,521	,002	,105	,597	,479	,506	,749	,009	,165	,600	,797	,002	,000
		N	45	40	45	44	42	45	45	38	39	39	39	39	38	39	39
	Заг.бал КТ 8 тиж	Ро	-,154	,222	,001	,254	-,281	-,210	-,147	-,022	,003	-,479 ^{***}	-,316	,029	-,011	-,276	-,426 [*]
		p	,337	,187	,996	,114	,083	,188	,358	,903	,986	,004	,064	,867	,951	,108	,011
		N	41	37	41	40	39	41	41	34	35	35	35	35	34	35	35
	Заг.бал КТ 24 тиж	Ро	-,084	,281	,085	,457 ^{***}	-,057	-,240	-,170	-,117	-,115	-,256	-,208	-,078	,144	-,227	-,351 [*]
		p	,602	,096	,597	,003	,735	,131	,287	,511	,510	,137	,230	,654	,415	,189	,039
		N	41	36	41	40	38	41	41	34	35	35	35	35	34	35	35
	Заг.бал КТ 48 тиж	Ро	-,272	,331	,147	,398 [*]	-,164	-,256	-,059	-,069	-,041	-,353 [*]	-,272	-,049	,133	-,209	-,297
		p	,098	,052	,380	,013	,333	,120	,723	,712	,823	,047	,132	,789	,475	,251	,099
		N	38	35	38	38	37	38	38	31	32	32	32	32	31	32	32
	С- реактив ний білок	Ро	-,095	,411 ^{***}	,288	,628 ^{***}	-,282	-,562 ^{***}	-,171	,022	,008	,011	-,061	-,102	,060	-,477 ^{***}	-,435 ^{***}
		p	,537	,009	,055	,000	,070	,000	,263	,889	,961	,944	,703	,522	,710	,001	,004
		N	45	39	45	44	42	45	45	41	42	42	42	42	41	42	42
	IP10	Ро	-,384 ^{***}	,223	,117	,255	-,551 ^{***}	-,175	-,107	-,472 ^{***}	-,176	-,241	-,355 [*]	-,225	-,119	-,409 ^{***}	-,436 ^{***}
		p	,010	,178	,451	,099	,000	,256	,488	,002	,264	,124	,021	,151	,457	,007	,004
		N	44	38	44	43	41	44	44	41	42	42	42	42	41	42	42
	MCP-1a	Ро	,093	,196	,145	,088	,031	-,098	,136	,072	-,037	-,396 ^{***}	-,258	-,054	-,094	-,124	-,135
		p	,548	,238	,346	,577	,848	,528	,379	,653	,817	,009	,099	,736	,561	,436	,395
		N	44	38	44	43	41	44	44	41	42	42	42	42	41	42	42
	MIP-1a	Ро	,163	-,205	,285	,153	-,048	,176	,294 [*]	-,172	,019	-,077	,017	-,091	,024	-,113	-,144
		p	,284	,211	,058	,321	,761	,247	,050	,283	,907	,628	,913	,566	,883	,476	,363
		N	45	39	45	44	42	45	45	41	42	42	42	42	41	42	42
	G-CSF	Ро	,056	,045	-,209	-,099	,002	-,042	-,239	-,106	-,076	,143	-,095	-,148	-,159	,319 [*]	,225
		p	,716	,784	,168	,521	,992	,784	,114	,508	,635	,365	,549	,350	,319	,039	,152
		N	45	39	45	44	42	45	45	41	42	42	42	42	41	42	42

Продовж. табл. В.1.

			Заг. бал. КТ 2 тиж.	Заг. бал. КТ 8 тиж.	Заг. бал. КТ 24 тиж.	Заг. бал. КТ 48 тиж.	С. реактивний блок	IP10	MCP-1a	MIP-1a	G-CSF	IL-10	NT-proBNP	SP-D	RAGE	Лейкоцити	Гранулоцити
Коефіцієнт кореляції Ро Спірмена	IL-10	Ро	,093	,192	-,139	,021	,050	,021	,123	-,083	,239	1,000	,230	,040	,022	,012	-,028
		p	,559	,248	,404	,906	,747	,893	,428	,589	,114		,143	,795	,887	,938	,856
		N	42	38	38	35	45	44	44	45	45	45	42	45	44	45	44
	NT-proBNP	Ро	-,202	-,247	-,367	-,237	-,574	-,008	-,061	,046	,164	,230	1,000	-,138	-,014	-,114	,221
		p	,217	,152	,030	,192	,000	,958	,700	,771	,300	,143		,384	,931	,473	,165
		N	39	35	35	32	42	42	42	42	42	42	42	42	41	42	41
	SP-D	Ро	,373	,103	,070	,111	,267	,310	-,011	,488	-,364	,040	-,138	1,000	,167	-,235	-,305
		p	,015	,536	,677	,525	,076	,041	,944	,001	,014	,795	,384		,278	,120	,044
		N	42	38	38	35	45	44	44	45	45	45	42	45	44	45	44
	RAGE	Ро	,437	,436	,420	,510	,246	,021	,516	,299	-,407	,022	-,014	,167	1,000	,014	,071
		p	,004	,006	,009	,002	,108	,894	,000	,049	,006	,887	,931	,278		,929	,648
		N	42	38	38	35	44	43	43	44	44	44	41	44	45	44	44
	Лейкоцити	Ро	-,047	,060	,306	,272	,121	-,326	,159	-,204	-,030	,012	-,114	-,235	,014	1,000	,478
		p	,758	,707	,052	,099	,430	,031	,304	,179	,844	,938	,473	,120	,929		,001
		N	45	41	41	38	45	44	44	45	45	45	42	45	44	48	46
	Гранулоцити	Ро	,040	,263	,457	,449	-,122	-,092	,073	-,024	,029	-,028	,221	-,305	,071	,478	1,000
		p	,790	,092	,002	,005	,431	,558	,643	,878	,851	,856	,165	,044	,648	,001	
		N	46	42	42	38	44	43	43	44	44	44	41	44	44	46	50
	Еозинофіли	Ро	-,133	-,154	-,084	-,272	-,095	-,384	,093	,163	,056	,090	-,050	-,069	-,128	,266	,181
		p	,385	,337	,602	,098	,537	,010	,548	,284	,716	,557	,754	,652	,406	,068	,230
		N	45	41	41	38	45	44	44	45	45	45	42	45	44	48	46
	Загальні нейтрофіли	Ро	,072	,222	,281	,331	,411	,223	,196	-,205	,045	,217	-,078	,205	,217	,437	,247
		p	,660	,187	,096	,052	,009	,178	,238	,211	,784	,184	,644	,211	,192	,004	,124
		N	40	37	36	35	39	38	38	39	39	39	37	39	38	42	40
	Паличковоядерні нейтрофіли	Ро	,098	,001	,085	,147	,288	,117	,145	,285	-,209	-,179	-,176	,194	,241	-,099	-,273
		p	,521	,996	,597	,380	,055	,451	,346	,058	,168	,240	,265	,201	,116	,503	,067
		N	45	41	41	38	45	44	44	45	45	45	42	45	44	48	46
	ШОЕ	Ро	,445	,254	,457	,398	,628	,255	,088	,153	-,099	-,109	-,294	,386	,228	,010	-,176
		p	,002	,114	,003	,013	,000	,099	,577	,321	,521	,481	,062	,010	,142	,945	,247
		N	44	40	40	38	44	43	43	44	44	44	41	44	43	47	45
	Кількість лейкоцитів	Ро	-,254	-,281	-,057	-,164	-,282	-,551	,031	-,048	,002	-,208	,040	-,383	-,122	,621	,269
		p	,105	,083	,735	,333	,070	,000	,848	,761	,992	,187	,811	,012	,448	,000	,081
		N	42	39	38	37	42	41	41	42	42	42	39	42	41	45	43

Продовж. табл. В.1.

			Еозинофіли	Загальні нейтрофіли	Паличко- ядерні нейтрофіли	ШОЕ	Кількість лейкоцитів	Відсоток лейкоцитів	Моноцити	miR-27a-3p	miR-146a- 5p	miR-21-5p	miR-221-3p	miR-126-3p	miR-133a- 3p	miR-92a-3p	miR-424-5p
Коефіцієнт кореляції Ро Спірмена	IL-10	Рo	,090	,217	-,179	-,109	-,208	-,288	-,115	,050	,219	-,306 [*]	-,268	,278	-,174	-,091	-,097
		p	,557	,184	,240	,481	,187	,055	,450	,756	,163	,048	,086	,075	,277	,566	,543
		N	45	39	45	44	42	45	45	41	42	42	42	42	41	42	42
	NT- proBNP	Рo	-,050	-,078	-,176	-,294	,040	,335 [*]	,103	,001	,071	-,010	,017	,235	,004	,352 [*]	,369 [*]
		p	,754	,644	,265	,062	,811	,030	,517	,996	,653	,948	,914	,134	,978	,022	,016
		N	42	37	42	41	39	42	42	41	42	42	42	42	41	42	42
	SP-D	Рo	-,069	,205	,194	,386 ^{**}	-,383 [*]	-,181	-,090	-,093	,287	-,003	,112	,064	,068	-,450 ^{**}	-,452 ^{**}
		p	,652	,211	,201	,010	,012	,233	,558	,565	,065	,983	,482	,688	,673	,003	,003
		N	45	39	45	44	42	45	45	41	42	42	42	42	41	42	42
	RAGE	Рo	-,128	,217	,241	,228	-,122	-,086	-,091	,036	-,089	-,132	,015	-,012	,016	-,083	-,248
		p	,406	,192	,116	,142	,448	,579	,555	,823	,582	,410	,926	,942	,924	,606	,118
		N	44	38	44	43	41	44	44	40	41	41	41	41	40	41	41
	Лейкоц ити	Рo	,266	,437 ^{**}	-,099	,010	,621 ^{**}	-,274	-,105	,221	-,009	-,030	,026	,297	,100	-,008	,201
		p	,068	,004	,503	,945	,000	,059	,478	,166	,953	,849	,870	,056	,532	,962	,202
		N	48	42	48	47	45	48	48	41	42	42	42	42	41	42	42
	Грануло цити	Рo	,181	,247	-,273	-,176	,269	-,016	,056	-,217	-,334 [*]	-,274	-,310 [*]	-,086	-,167	,116	,125
		p	,230	,124	,067	,247	,081	,914	,712	,178	,033	,083	,049	,591	,304	,469	,437
		N	46	40	46	45	43	46	46	40	41	41	41	41	40	41	41
	Еозино філи	Рo	1,000	-,091	,125	-,351 [*]	,383 ^{**}	,154	,183	,107	,044	-,039	-,007	,070	-,183	-,024	,075
		p		,567	,398	,016	,009	,295	,213	,507	,780	,804	,965	,658	,252	,880	,636
		N	48	42	48	47	45	48	48	41	42	42	42	42	41	42	42
	Загальні нейтро філи	Рo	-,091	1,000	,157	,356 [*]	-,347 [*]	-,761 ^{**}	-,468 ^{**}	,222	,164	-,011	-,045	,156	,070	-,068	,051
		p	,567		,322	,021	,024	,000	,002	,194	,332	,951	,791	,358	,685	,690	,766
		N	42	42	42	42	42	42	42	36	37	37	37	37	36	37	37
	Паличко- ядерні нейтро філи	Рo	,125	,157	1,000	,305 [*]	-,290	-,229	,024	,215	,208	,288	,269	-,110	,166	-,111	,053
		p	,398	,322		,037	,054	,117	,869	,177	,186	,064	,084	,486	,301	,484	,740
		N	48	42	48	47	45	48	48	41	42	42	42	42	41	42	42
	ШОЕ	Рo	-,351 [*]	,356 [*]	,305 [*]	1,000	-,354 [*]	-,373 ^{**}	-,212	,164	,280	,233	,198	,078	,368 [*]	-,219	-,266
		p	,016	,021	,037		,017	,010	,152	,312	,077	,143	,214	,630	,019	,169	,093
		N	47	42	47	47	45	47	47	40	41	41	41	41	40	41	41
	Кількість лейкоц итів	Рo	,383 ^{**}	-,347 [*]	-,290	-,354 [*]	1,000	,465 ^{**}	,156	,095	-,111	,021	,064	,252	,086	,206	,284
		p	,009	,024	,054	,017		,001	,307	,571	,502	,899	,701	,122	,607	,208	,079
		N	45	42	45	45	45	45	45	38	39	39	39	39	38	39	39

Продовж. табл. В.1.

			Заг.бал КТ 2 тиж	Заг.бал КТ 8 тиж	Заг.бал КТ 24 тиж	Заг.бал КТ 48 тиж	C- реактивний білок	IP10	MCP-1a	MIP-1a	G-CSF	IL-10	NT-proBNP	SP-D	RAGE	Лейкоцити	Гранулоцити
Коефіцієнт кореляції Ро Спірмена	Відсоток лейкоцитів	Po	-.081	-.210	-.240	-.256	-.562**	-.175	-.098	.176	-.042	-.288	.335*	-.181	-.086	-.274	-.016
		p	.597	.188	.131	.120	.000	.256	.528	.247	.784	.055	.030	.233	.579	.059	.914
		N	45	41	41	38	45	44	44	45	45	45	42	45	44	48	46
	Моноцити	Po	-.108	-.147	-.170	-.059	-.171	-.107	.136	.294*	-.239	-.115	.103	-.090	-.091	-.105	.056
		p	.479	.358	.287	.723	.263	.488	.379	.050	.114	.450	.517	.558	.555	.478	.712
		N	45	41	41	38	45	44	44	45	45	45	42	45	44	48	46
	miR-27a-3p	Po	-.111	-.022	-.117	-.069	.022	-.472**	.072	-.172	-.106	.050	.001	-.093	.036	.221	-.217
		p	.506	.903	.511	.712	.889	.002	.653	.283	.508	.756	.996	.565	.823	.166	.178
		N	38	34	34	31	41	41	41	41	41	41	41	41	40	41	40
	miR-146a-5p	Po	.053	.003	-.115	-.041	.008	-.176	-.037	.019	-.076	.219	.071	.287	-.089	-.009	-.334*
		p	.749	.986	.510	.823	.961	.264	.817	.907	.635	.163	.653	.065	.582	.953	.033
		N	39	35	35	32	42	42	42	42	42	42	42	42	41	42	41
	miR-21-5p	Po	-.412**	-.479**	-.256	-.353*	.011	-.241	-.396**	-.077	.143	-.306*	-.010	-.003	-.132	-.030	-.274
		p	.009	.004	.137	.047	.944	.124	.009	.628	.365	.048	.948	.983	.410	.849	.083
		N	39	35	35	32	42	42	42	42	42	42	42	42	41	42	41
	miR-221-3p	Po	-.227	-.316	-.208	-.272	-.061	-.355*	-.258	.017	-.095	-.268	.017	.112	.015	.026	-.310*
		p	.165	.064	.230	.132	.703	.021	.099	.913	.549	.086	.914	.482	.926	.870	.049
		N	39	35	35	32	42	42	42	42	42	42	42	42	41	42	41
	miR-126-3p	Po	.087	.029	-.078	-.049	-.102	-.225	-.054	-.091	-.148	.278	.235	.064	-.012	.297	-.086
		p	.600	.867	.654	.789	.522	.151	.736	.566	.350	.075	.134	.688	.942	.056	.591
		N	39	35	35	32	42	42	42	42	42	42	42	42	41	42	41
	miR-133a-3p	Po	.043	-.011	.144	.133	.060	-.119	-.094	.024	-.159	-.174	.004	.068	.016	.100	-.167
		p	.797	.951	.415	.475	.710	.457	.561	.883	.319	.277	.978	.673	.924	.532	.304
		N	38	34	34	31	41	41	41	41	41	41	41	41	40	41	40
	miR-92a-3p	Po	-.480**	-.276	-.227	-.209	-.477**	-.409**	-.124	-.113	.319*	-.091	.352*	-.450**	-.083	-.008	.116
		p	.002	.108	.189	.251	.001	.007	.436	.476	.039	.566	.022	.003	.606	.962	.469
		N	39	35	35	32	42	42	42	42	42	42	42	42	41	42	41
	miR-424-5p	Po	-.571**	-.426*	-.351*	-.297	-.435**	-.436**	-.135	-.144	.225	-.097	.369*	-.452**	-.248	.201	.125
		p	.000	.011	.039	.099	.004	.004	.395	.363	.152	.543	.016	.003	.118	.202	.437
		N	39	35	35	32	42	42	42	42	42	42	42	42	41	42	41

Продовж. табл. В.1.

			Еозинофіли	Загальні нейтрофіли	Паличкові нейтрофіли	ШОЕ	Кількість лейкоцитів	Відсоток лейкоцитів	Моноцити	miR-27 а-3р	miR-146а- 5р	miR-21-5р	miR-221-3р	miR-126-3р	miR-133а- 3р	miR-92а-3р	miR-424-5р
Коефіцієнт кореляції Ро Спірмена	Відсоток лейкоцитів	Рo	,154	-,761**	-,229	-,373**	,465**	1,000	,281	-,159	-,081	-,008	,056	,067	,053	,187	,115
		p	,295	,000	,117	,010	,001		,053	,322	,609	,959	,723	,674	,742	,235	,469
		N	48	42	48	47	45	48	48	41	42	42	42	42	41	42	42
	Моноцити	Рo	,183	-,468**	,024	-,212	,156	,281	1,000	-,090	-,191	-,017	-,033	-,152	-,166	-,118	,062
		p	,213	,002	,869	,152	,307	,053		,575	,225	,913	,835	,336	,300	,456	,698
		N	48	42	48	47	45	48	48	41	42	42	42	42	41	42	42
	miR-27а-3р	Рo	,107	,222	,215	,164	,095	-,159	-,090	1,000	,753**	,541**	,674**	,707**	,393*	,253	,345*
		p	,507	,194	,177	,312	,571	,322	,575		,000	,000	,000	,000	,012	,111	,027
		N	41	36	41	40	38	41	41	41	41	41	41	41	40	41	41
	miR-146а-5р	Рo	,044	,164	,208	,280	-,111	-,081	-,191	,753**	1,000	,449**	,606**	,657**	,427**	,112	,125
		p	,780	,332	,186	,077	,502	,609	,225	,000		,003	,000	,000	,005	,480	,430
		N	42	37	42	41	39	42	42	41	42	42	42	42	41	42	42
	miR-21-5р	Рo	-,039	-,011	,288	,233	,021	-,008	-,017	,541**	,449**	1,000	,877**	,211	,539**	,399**	,355*
		p	,804	,951	,064	,143	,899	,959	,913	,000	,003		,000	,179	,000	,009	,021
		N	42	37	42	41	39	42	42	41	42	42	42	42	41	42	42
	miR-221-3р	Рo	-,007	-,045	,269	,198	,064	,056	-,033	,674**	,606**	,877**	1,000	,392*	,529**	,322*	,338*
		p	,965	,791	,084	,214	,701	,723	,835	,000	,000	,000		,010	,000	,037	,029
		N	42	37	42	41	39	42	42	41	42	42	42	42	41	42	42
	miR-126-3р	Рo	,070	,156	-,110	,078	,252	,067	-,152	,707**	,657**	,211	,392*	1,000	,422**	,037	,192
		p	,658	,358	,486	,630	,122	,674	,336	,000	,000	,179	,010		,006	,817	,224
		N	42	37	42	41	39	42	42	41	42	42	42	42	41	42	42
	miR-133а-3р	Рo	-,183	,070	,166	,368*	,086	,053	-,166	,393*	,427**	,539**	,529**	,422**	1,000	,305	,263
		p	,252	,685	,301	,019	,607	,742	,300	,012	,005	,000	,000	,006		,052	,096
		N	41	36	41	40	38	41	41	40	41	41	41	41	41	41	41
	miR-92а-3р	Рo	-,024	-,068	-,111	-,219	,206	,187	-,118	,253	,112	,399**	,322*	,037	,305	1,000	,794**
		p	,880	,690	,484	,169	,208	,235	,456	,111	,480	,009	,037	,817	,052		,000
		N	42	37	42	41	39	42	42	41	42	42	42	42	41	42	42
	miR-424-5р	Рo	,075	,051	,053	-,266	,284	,115	,062	,345*	,125	,355*	,338*	,192	,263	,794**	1,000
		p	,636	,766	,740	,093	,079	,469	,698	,027	,430	,021	,029	,224	,096	,000	
		N	42	37	42	41	39	42	42	41	42	42	42	42	41	42	42

* Кореляція достовірна при $p < 0,05$ (двостороння)**Кореляція достовірна при $p < 0,01$ (двостороння)

КТ - комп'ютерна томографія

ШОЕ - швидкість осідання еритроцитів