

Оригинальная статья

Трансплантация ACE2⁺ мезенхимальных стволовых клеток улучшает результат лечения пациентов с пневмонией, вызванной COVID-19

Zikuan Leng^{1,5*}, Rongjia Zhu^{2*}, Wei Hou^{3*}, Yingmei Feng^{3*}, Yanlei Yang⁴, Qin Han², Guangliang Shan², Fanyan Meng¹, Dongshu Du¹, Shihua Wang², Junfen Fan², Wenjing Wang³, Luchan Deng², Hongbo Shi³, Hongjun Li³, Zhongjie Hu³, Fengchun Zhang⁴, Jinming Gao⁴, Hongjian Liu^{5*}, Xiaoxia Li⁶, Yangyang Zhao², Kan Yin⁶, Xijing He⁷, Zhengchao Gao⁷, Yibin Wang⁷, Bo Yang⁸, Ronghua Jin^{3*}, Iia Stambler^{9,10,11}, Lee Wei Lim^{9,10,12}, Huanxing Su^{9,10,13}, Alexey Moskalev^{9,10,14}, Antonio Cano^{9,10,15}, Sasanka Chakrabarti¹⁶, Kyung-Jin Min^{9,10,17}, Georgina Ellison-Hughes^{9,10,18}, Calogero Caruso^{9,10,19}, Kunlin Jin^{9,10,20*}, Robert Chunhua Zhao^{1,2,9,10*}

¹Институт наук о жизни, Шанхайский университет, Шанхай, Китай. ²Институт основных медицинских наук, Китайская академия медицинских наук, Институт базовой медицины, Пекинский объединённый медицинский колледж, Пекин, Китай. ³Пекинская больница ЮАнь, Столичный медицинский университет, Пекин, Китай. ⁴Отделение ревматологии и клинической иммунологии, больница при Пекинском объединённом медицинском колледже, Китайская академия медицинских наук и Пекинский объединённый медицинский колледж, Пекин, Китай. ⁵Отделение ортопедии, Первая клиническая больница Чжэнчжоуского университета, Чжэнчжоу, Китай. ⁶Институт стволовых клеток и регенеративной медицины, Институт базовой медицины, университет Циндао, Шаньдун, Китай. ⁷Отделение ортопедии, Вторая клиническая больница Сианьского университета Цзяо Тун, Сиань, Китай. ⁸Отделение нейрохирургии, Первая клиническая больница Чжэнчжоуского университета, Чжэнчжоу, Китай. ⁹Исполнительный комитет по предупреждению старения и заболеваний в рамках науки и технологии, фармакологии и медицины на интерактивной карте вдоль Шелкового пути, ЮНЕСКО, Париж, Франция. ¹⁰Международное общество по проблемам старения и болезней, Форт-Уорт, штат Техас, США. ¹¹Медицинский гериатрический центр «Шмуэль-ха-Рофэ», Биур Йаков, входящий в состав Медицинской школы Саклера, Тель-Авивский университет, Тель-Авив, Израиль. ¹²Школа медико-биологических наук, медицинский факультет имени Ли Кашина, Гонконгский университет, Гонконг, Китай. ¹³Институт китайских медицинских наук, университет Макау, Тайпа, Макау, Китай. ¹⁴Институт биологии, Коми научный центр Российской академии наук, Сыктывкар, Россия. ¹⁵Отделение педиатрии, акушерства и гинекологии, университет Валенсии, Валенсия, Испания. ¹⁶Махариши Маркандешвар университет, Муллана-Амбала, Индия. ¹⁷Отделение биологических наук, университет Инха, Инчхон, Южная Корея. ¹⁸Факультет наук о жизни и медицины, Королевский колледж Лондона, Лондон, Великобритания. ¹⁹Отделение биомедицины, нейронауки и расширенной диагностики, университет Палермо, Палермо, Италия. ²⁰Научно-медицинский центр университета Северного Техаса, Форт-Уорт, TX76107, США.

[Получено 25 февраля 2020; пересмотрено 28 февраля 2020; принято 28 февраля 2020]

«Корреспонденцию следует отправлять:» Доктору Чунхуа Чжао, Школа наук о жизни, Шанхайский университет, Шанхай, Китай. Эл. почта: zhaochunhua@vip.163.com. Доктору Кунлинь, Научно-медицинский центр университета Северного Техаса, Форт-Уорт, TX 76107, США. kunlin.jin@unthsc.edu. Доктору Жунхуа Цзинь, Пекинская больница ЮАнь, Столичный медицинский университет, Пекин, Китай. Эл. почта: jin_eagle@sina.com. Хунцзянь Лю, Первая клиническая больница Чжэнчжоуского университета, Чжэнчжоу, Китай. Эл. почта: hongjianmd@126.com. #Эти авторы внесли одинаковый вклад в эту работу.

Авторское право: © 2020 Лен Цз. и соавт. Это статья с открытым доступом, распространяемая в соответствии с условиями [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), которая разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии указания оригинального автора и источника.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ: Коронавирус (HCoV-19) вызвал вспышку новой коронавирусной болезни (COVID-19) в Ухане, Китай. Предотвращение и реверсирование цитокинового шторма может быть ключом к спасению пациентов с тяжелой формой пневмонии, вызванной COVID-19. Было показано, что мезенхимальные стволовые клетки (МСК) обладают всесторонней мощной иммуномодулирующей функцией. Это исследование направлено на изучение того, улучшает ли трансплантация МСК результат лечения 7 включенных в исследование пациентов с вызванной COVID-19 пневмонией в больнице ЮАнь в Пекине, Китай, с 23 января 2020 года по 16 февраля 2020 года. Клинические исходы, а также изменения уровней воспаления и работы иммунной функции и побочные эффекты 7 включенных в исследование пациентов оценивали в течение 14 дней после введения МСК. МСК смогли вылечить или значительно улучшить функциональные результаты семи пациентов без наблюдаемых побочных эффектов. Легочная функция и симптомы у этих семи пациентов значительно улучшились через 2 дня после трансплантации МСК. Среди них два обычных и один тяжелый пациент были вылечены и выписаны через 10 дней после процедуры. После лечения уровень периферических лимфоцитов повысился, С-реактивного белка понизился, а сверхактивированные цитокин-секретирующие иммунные клетки CXCR3+CD4+Т-клетки, CXCR3+CD8+Т-клетки и CXCR3+NK-клетки исчезли в течении 3-6 дней. Кроме того, группа CD14+CD11c+CD11b^{mid} регуляторной DC-клеточной популяции существенно увеличилась. При этом в группе применения МСК по сравнению с контрольной группой плацебо уровень TNF- α значительно снизился, в то время как уровень IL-10 повысился. Помимо этого, профиль генной экспрессии показал, что МСК были ACE2⁻ и TMPRSS2⁻, что указывало на то, что МСК не содержат инфекции COVID-19. Таким образом, внутривенная трансплантация МСК была безопасной и эффективной в ходе лечения пациентов с пневмонией, вызванной COVID-19, особенно для пациентов в критическом состоянии.

Ключевые слова: COVID-19, ACE2-отрицательно, мезенхимальные стволовые клетки, трансплантация клеток, иммуномодуляция, восстановление функции

Новая коронавирусная болезнь 2019 года (COVID-19) стала глобальной чрезвычайной ситуацией в области общественного здравоохранения с тех пор, как были выявлены первые пациенты в Ухане, Китай, в декабре 2019 года. С тех пор число подтвержденных пациентов с COVID-19 резко возросло не только в Китае, но и по всему миру, включая Германию, Южную Корею, Вьетнам, Сингапур, Италию и США [1]. В настоящее время отсутствуют специфические лекарственные средства или вакцины для лечения пациентов с инфекцией COVID-19. Следовательно, существует большая неудовлетворенная потребность в безопасном и эффективном методе лечения инфицированных COVID-19 пациентов, особенно в тяжелых случаях.

В нескольких сообщениях продемонстрировано, что первым шагом патогенеза HCoV-19 является то, что вирус специфически распознает рецептор ангиотензин I-конвертирующего фермента 2 (ACE2) посредством шиповидного белка [2-4]. HCoV-19 инфицирует ACE2-положительные клетки, подобно SARS-2003 [5,6]. Кроме того, исследовательская группа из Германии обнаружила, что клеточная сериновая протеаза TMPRSS2 для примирования шиповидного белка HCoV-19 также важна для проникновения в клетку-хозяина и распространения [7], подобно другому коронавирусу (а именно SARS-2003) [8,9]. К сожалению, рецептор ACE2 широко распространен на поверхности клеток человека, особенно в альвеолярных клетках II типа (AT2) и капиллярном эндотелии [10], а клетки AT2 высоко экспрессируют TMPRSS2 [9]. Однако в костном мозге, лимфатических узлах, тимусе и селезенке иммунные клетки, такие как Т- и В-лимфоциты, и макрофаги, стабильно ACE2-отрицательны [10].

Полученные данные указывают на то, что иммунологическая терапия может быть использована для лечения инфицированных пациентов. Тем не менее, иммуномодулирующая способность может быть недостаточно сильной, если используются только один или два иммунных фактора, поскольку вирус может вызывать тяжелый цитокиновый шторм в легких, например IL-2, IL-6, IL-7, GSCF, IP10, MCP1, MIP1A и TNF α , с последующими отеком, дисфункцией воздухообмена, острым респираторным дистресс-синдромом, острым повреждением миокарда и вторичной инфекцией [11], что может привести к смерти. В связи с этим предотвращение цитокинового шторма может быть ключом к лечению пациентов, инфицированных HCoV-19. Благодаря своей мощной иммуномодулирующей способности МСК могут оказывать благоприятное воздействие для предотвращения или ослабления цитокинового шторма.

МСК широко используются в клеточной терапии, от фундаментальных исследований до клинических испытаний [12,13]. Безопасность и эффективность четко подтверждены документально в рамках многих клинических испытаний, особенно в случае иммуноопосредованных воспалительных заболеваний, таких как болезнь «трансплантат против хозяина» (БТПХ) [14] и системная красная волчанка (СКВ) [15]. МСК играют положительную роль, главным образом, посредством двух возможностей, а именно иммуномодулирующих эффектов и дифференцировочной способности [16]. МСК могут выделять многие типы цитокинов путем паракриной секреции или осуществлять прямые взаимодействия с иммунными клетками, что приводит к иммуномодуляции [17].

Иммуномодулирующие эффекты МСК запускаются далее активацией рецептора TLR в МСК, который стимулируется патоген-ассоциированными молекулами, такими как ЛПС или двухцепочечная РНК вируса [18,19], подобно HCoV-19.

Мы провели пилотное исследование по трансплантации МСК с целью изучения их терапевтического потенциала для инфицированных HCoV-19 пациентов. Кроме того, мы также изучили основные механизмы с использованием кластерного анализа высокопроизводительного секвенирования РНК (10× Genomics) на МСК и масс-цитометрии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Таблица 1. Клиническая классификация COVID-19, изданная Национальной комиссией здравоохранения Китая

Легкая форма	Обычная форма	Тяжелая форма	Критическая форма
Легкие клинические проявления, без показателей диагностической визуализации	Температура, респираторные симптомы, пневмония, клинические показатели рентгена или КТ	Соответствует одному из следующего: 1. Респираторный дистресс-синдром, ЧДД > 30/мин; 2. Насыщение кислородом < 93% в состоянии покоя; 3. Парциальное давление кислорода в артериальной крови (PaO ₂) / фракция вдыхаемого O ₂ (FiO ₂) < 300 мм рт. ст., 1 мм рт. ст. = 0,13 3 кПа	Соответствует одному из следующего: 1. Дыхательная недостаточность требует искусственной вентиляции; 2. Шок; 3. Сочетание с недостаточностью других органов, пациентам требуется наблюдение и лечение в ОИТ

Пациенты

Пациенты были включены в исследование с 23 января 2020 года по 31 января 2020 года. Все включенные пациенты были подтверждены с помощью анализа полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени на РНК HCoV-19 в Китайском центре контроля и профилактики заболеваний с использованием протокола, описанного ранее [11,20]. Последовательности были следующими: прямой праймер 5'-TCAGAATGCCAATCTCCCAAC-3'; обратный праймер 5'-AAAGGTCCACCCGATACATTTGA-3'; и зонд 5'CY5TAGTTACACTAGCCCTACTGTC-3'BNH1.

Первоначально мы включили пациентов с COVID-19 (возраст 18–95 лет) в соответствии с руководством Национальной комиссии здравоохранения Китая (таблица 1). Если при стандартном лечении никаких признаков улучшения не наблюдалось, пациенту предлагали присоединиться к данному пилотному исследованию. Пациенты не были включены в исследование, если у них был диагностирован какой-либо вид рака, или врач заявлял о критическом состоянии пациента. Мы исключили пациентов, которые участвовали в других клинических испытаниях или были участниками других клинических испытаний в течение 3 месяцев до этого.

Подготовка клеток и трансплантация

МСК клинического уровня поставлял бесплатно Шанхайский университет, Qingdao Co-orient Watson Biotechnology group со. LTD и Институт базовых медицинских наук, Китайская академия медицинских

Пилотное исследование внутривенной трансплантации МСК было выполнено на семи пациентах с пневмонией, инфицированных COVID-19. Исследование было проведено в Пекинской больнице ЮАнь, Столичном медицинском университете, Китай, и одобрено этическим комитетом больницы (LL-2020-013-K). Безопасность и научная достоверность этого исследования («Клинические испытания мезенхимальных стволовых клеток для лечения пневмонита, вызванного новым коронавирусом», Шанхайский университет/PUMC) были рассмотрены научным комитетом Международного общества по проблемам старения и болезней (ISOAD) и изданы в Китайском реестре клинических испытаний (ChiCTR2000029990).

наук. Клеточный продукт был сертифицирован Национальным институтом по контролю за продуктами и лекарствами Китая (номер разрешения: 2004L04792, 2006L01037, CXSB1900004). Перед внутривенным капельным введением, МСК суспендировали в 100 мл физиологического раствора, и общее количество трансплантированных клеток рассчитывали, исходя из 1×10^6 клеток на килограмм веса. Период интервала для трансплантации клеток определяли как время, когда симптомы и/или признаки все еще ухудшались, даже когда проводилось выжидательное лечение. Введение выполняли в течение примерно сорока минут со скоростью ~ 40 капель в минуту.

Пациентов оценивали исследователи на протяжении 14-дневного периода после получения исследуемого препарата. Клинические, рентгенологические и лабораторные результаты были зарегистрированы и подтверждены группой врачей. Подробный отчет включал первичные данные о безопасности (инфузионные и аллергические реакции, вторичную инфекцию и опасные для жизни побочные эффекты) и первичные данные об эффективности (уровень вариации цитокинов, уровень С-реактивного белка в плазме и насыщение кислородом). Вторичные результаты эффективности включали общее количество и субпопуляции лимфоцитов, КТ грудной клетки, частоту дыхания и симптомы пациента (особенно лихорадку и одышку). Кроме того, были также изучены терапевтические меры (то есть противовирусная медицина и респираторная поддержка) и их результаты.

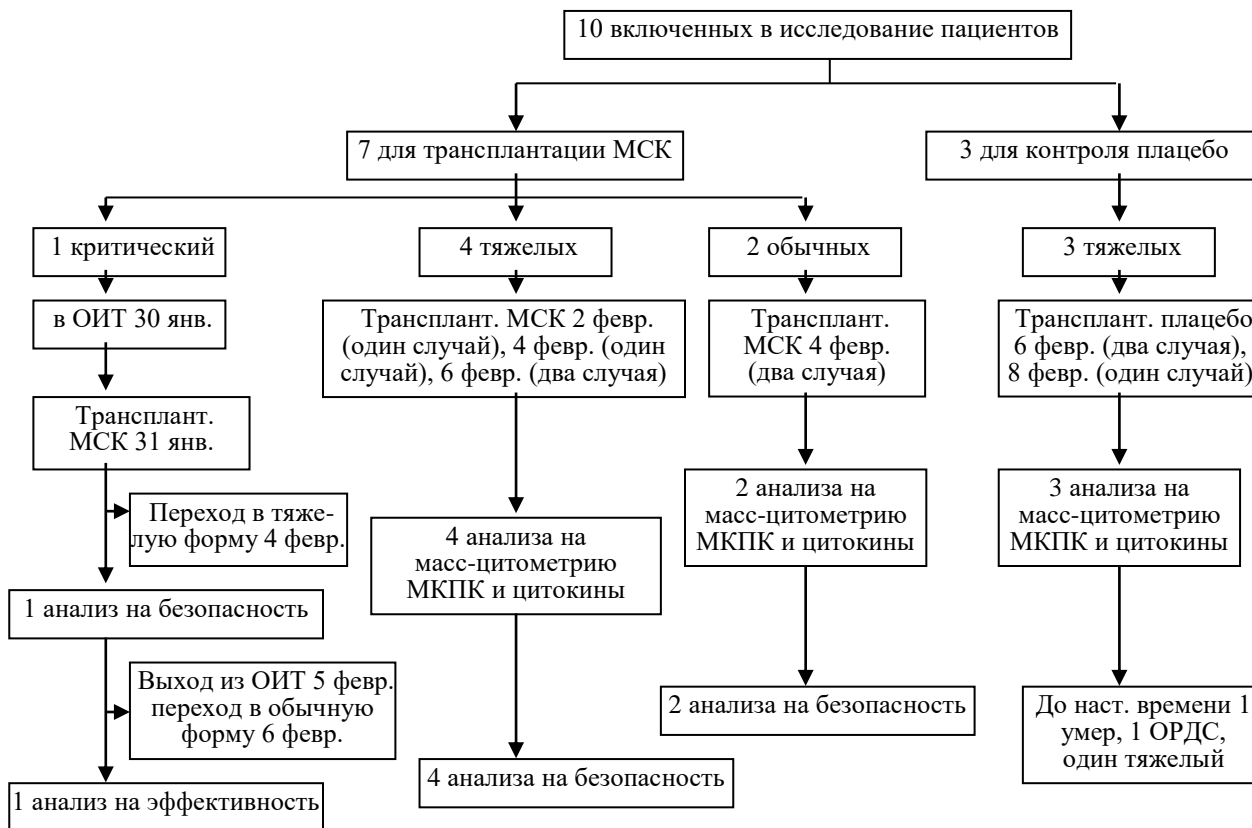


Рисунок 1. Схема лечения посредством трансплантации клеток.

Статистический анализ

MIMICS 21.0 (Интерактивная система управления медицинским изображением Materialise, Бельгия) была использована для оценки данных КТ грудной клетки. Анализ масс-цитометрии мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) описан в дополнении 1. Анализ исследования 10 x РНК-сек. описан в дополнении 2.

Данные анализировали с помощью программного обеспечения SPSS (SPSS 22.0). Различия между двумя группами оценивали с использованием непарных двусторонних t-критериев. Данные с участием более двух групп оценивали с помощью дисперсионного анализа (ANOVA). Значения P < 0,05 указывали на статистическую значимость.

Таблица 2. Общая информация о включенных пациентах

	Случай 1	Случай 2	Случай 3	Случай 4	Случай 5	Случай 6	Случай 7	Контр. 1	Контр. 2	Контр. 3
Пол	М	Ж	Ж	Ж	М	М	М	Ж	Ж	Ж
Возраст (лет)	65	63	65	51	57	45	53	75	74	46
Тип COVID-19	Критический	Тяжелый	Тяжелый	Обычный	Обычный	Тяжелый	Тяжелый	Тяжелый	Тяжелый	Тяжелый
Температура(°С, исходная)	38,6	37,7	38,2	38,5	38,4	39,0	39,0	36,0	38,9	37,7
Одышка	+++	+++	++	+	+	+++	+++	+++	++	+
Насыщение кислородом в состоянии покоя	89%	93%	92%	95%	94%	92%	90%	91%	92%	93%
Кашель, слабость, плохой аппетит	++	+	++	+	++	++	++	+	++	+
Диарея	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Дата постановки диагноза	23 янв.	27 янв.	25 янв.	3 февр.	2 февр.	27 янв.	3 февр.	3 февр.	6 февр.	5 февр.
Дата вмешательства (МСК или плацебо)	31 янв.	2 февр.	4 февр.	4 февр.	4 февр.	6 февр.	6 февр.	8 февр.	6 февр.	6 февр.
Дата восстановления	3 февр.	4 февр.	6 февр. Выписан	6 февр. Выписан	5 февр. Выписан	7 февр.	7 февр.	Летальный исход	ОРДС	Стабильно

РЕЗУЛЬТАТЫ

Процедура лечения МСК и общая информация о пациентах

Это исследование проводилось с 23 января 2020 года по 16 февраля 2020 года. Семь подтвержденных пациентов с COVID-19, включая 1 в критическом состоянии (пациент 1), 4 тяжелых (пациенты 2, 3, 6, 7) и 2 обычных (пациенты 4, 6), были включены для трансплантации МСК, и три пациента в тяжелом состоянии для контроля плацебо. Время трансплантации МСК для каждого пациента показано на рисунке 1. Общая информация о 7 пациентах приведена в таблице 1. К настоящему времени пациент в критическом состоянии завершил лечение МСК. У этого пациента на протяжении 10 лет была гипертония в анамнезе с максимальным отмеченным уровнем 180/90 мм рт.ст. Собрана вся информация о лечении пациентов.

Первичная оценка безопасности

До трансплантации МСК у пациентов наблюдались симптомы высокой температуры ($38,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), слабости, одышки и низкого насыщения кислородом. Однако через 2~4 дня после трансплантации у всех пациентов исчезли все симптомы, насыщение кислородом возросло до $\geq 95\%$ в покое, без потребления кислорода или с ним (5 литров в минуту). Кроме того, не наблюдалось никаких острых связанных с инфузией или аллергических реакций в течение двух часов после трансплантации. Аналогично, после лечения не было выявлено отсроченной гиперчувствительности или вторичных инфекций.

Подробные процедуры диагностики и лечения пациента в критическом состоянии представлены в дополнении 3. Основные симптомы и признаки указаны в таблице 3.

Оценка эффективности

Иммуномодулирующая функция МСК внесла основной вклад в эффективность лечения, и трансплантация МСК показала впечатляющие положительные результаты (таблица 3). Касательно первичного исхода у критически тяжелого пациента 1, уровень С-реактивного белка в плазме снизился с 105,5 г/л (30 января) до 10,1 г/л (13 февраля), при этом максимальный уровень 191,0 г/л был 1 февраля, что указывает на то, что состояние воспаления быстро сокращалось. Насыщение кислородом без дополнительного кислорода возросло с 89% (31 января) до 98% (13 февраля), что указывало на то, что легочные альвеолы восстановили функцию воздухообмена.

Вторичные результаты также улучшились (таблица 4). Например, для критически тяжелого пациента 1, лимфопения была значительно скорректирована после трансплантации клеток. Пациент был изолирован в боксе, с гипертонией в анамнезе и артериальным давлением, достигшим 3-й степени гипертонии. 1 февраля биохимические показатели в анализе крови показали, что аспарагиновая аминотрансфераза, креатинкиназа и миоглобин резко возросли до 57 ед./л, 513 ед./л и 138 нг/мл, соответственно, что указывает на серьезное повреждение печени и миокарда. Однако уровни этих функциональных биохимических показателей были снижены до нормальных референтных значений через 2~4 дня после лечения (таблица 4).

Таблица 3. Симптомы, признаки и максимальная температура тела пациента с критической формой заболевания с 21 января по 13 февраля 2020 года. ОИТ: отделение интенсивной терапии; НП: не применимо.

	Дом	Больница	Больница	ОИТ	ОИТ	ОИТ	ОИТ	ОИТ	Выход из ОИТ	Больница	Больница
Дата	21~22 янв.	23 янв.	24~29 янв.	30 янв.	31 янв.	1 февр.	2~3 февр.	4 февр.	5~8 февр.	9~12 февр.	13 февр.
Температура ($^{\circ}\text{C}$)	37,5	37,8	37,0~38,5	38,6	38,8	36,8	36,6~36,9	36,8	36,6~36,8	36,5~36,9	36,6
Одышка	-	+	+	++	++++	++	+	-	-	-	-
Кашель	+	+	+	++	++	+	+	-	-	-	-
Мокрота	+	+	+	++	++	+	+	-	-	-	-
О ₂ насыщение (без/с потреблением О ₂)	НП/НП	НП/НП	97% / НП	91%/95%	89%/94%	НП/98%	НП/97%	НП/96%	НП/97%	96% / НП	97% / НП
Частота дыхания	НП	23	23	27	33	22	22	21	20~22	20~22	21
Лечение (базовое-1: жаропонижающая, противовирусная и поддерживающая терапия. Базовое-2: противовирусная и поддерживающая терапия)	НП	НП	Базовое-1	Базовое-1; маска О ₂ 5 л/мин	Базовое-1; маска О ₂ 10 л/мин; транспл. клеток	Базовое-1; маска О ₂ 5 л/мин	Базовое-2; маска О ₂ 5 л/мин	Базовое-2; маска О ₂ 5 л/мин	Базовое-2; маска О ₂ 5 л/мин	Базовое-2	Базовое-2
ОТ-ПЦР вируса	НП	Положительно	НП	НП	НП	НП	НП	НП	Положительно (6 февр.)	НП	Отрицательно

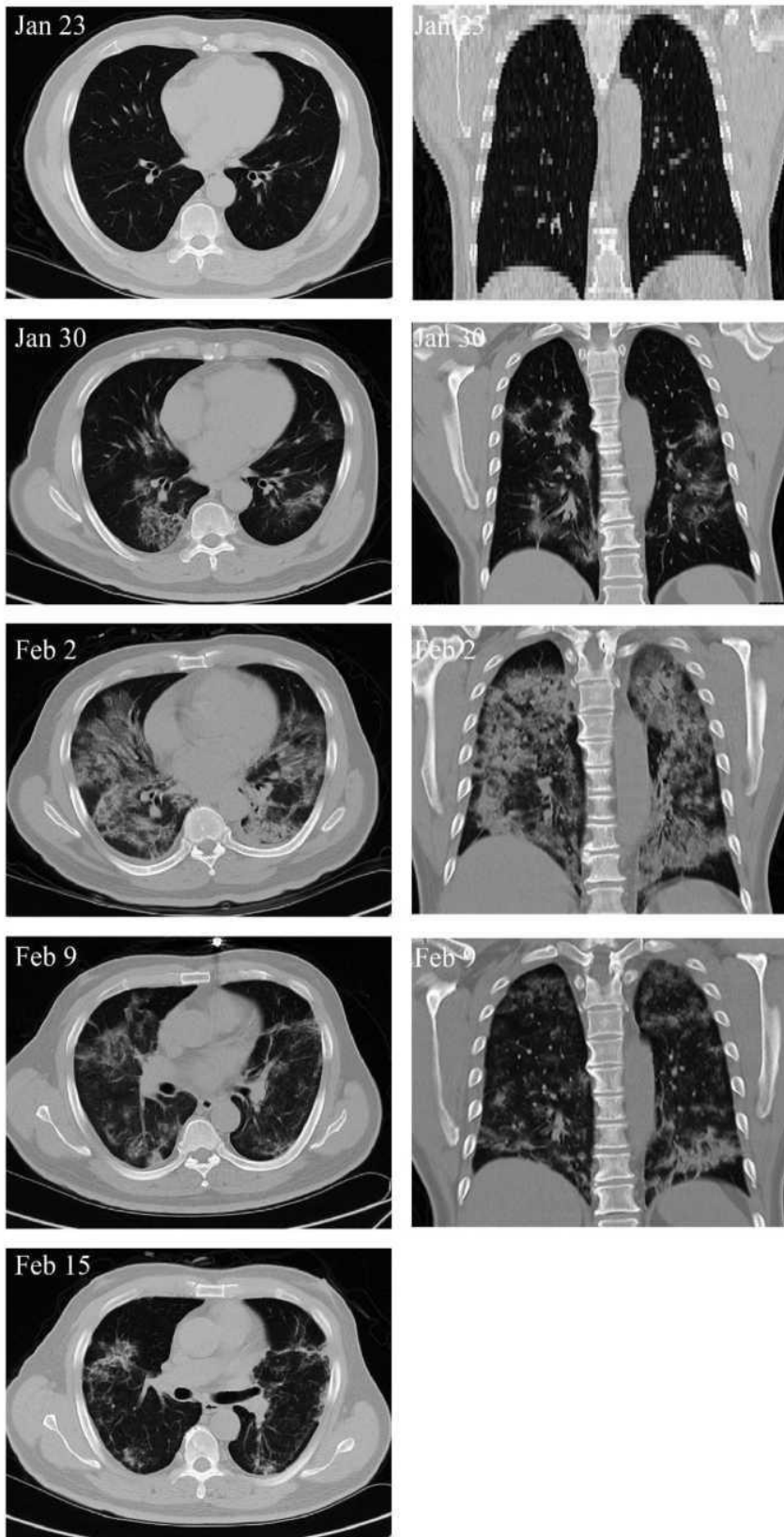


Рисунок 2. Изображения компьютерной томографии (КТ) грудной клетки пациента с критической формой COVID-19. 23 января показатели пневмонии не наблюдались. 30 января синдром матового стекла и инфильтрация пневмонии наблюдались во множественных сегментах с обеих сторон. Трансплантация клеток была проведена 31 января. 2 февраля пневмония охватила все легкие. 9 февраля инфильтрация в значительной мере уменьшилась. 15 февраля локально сохранилась лишь остаточная матовость.

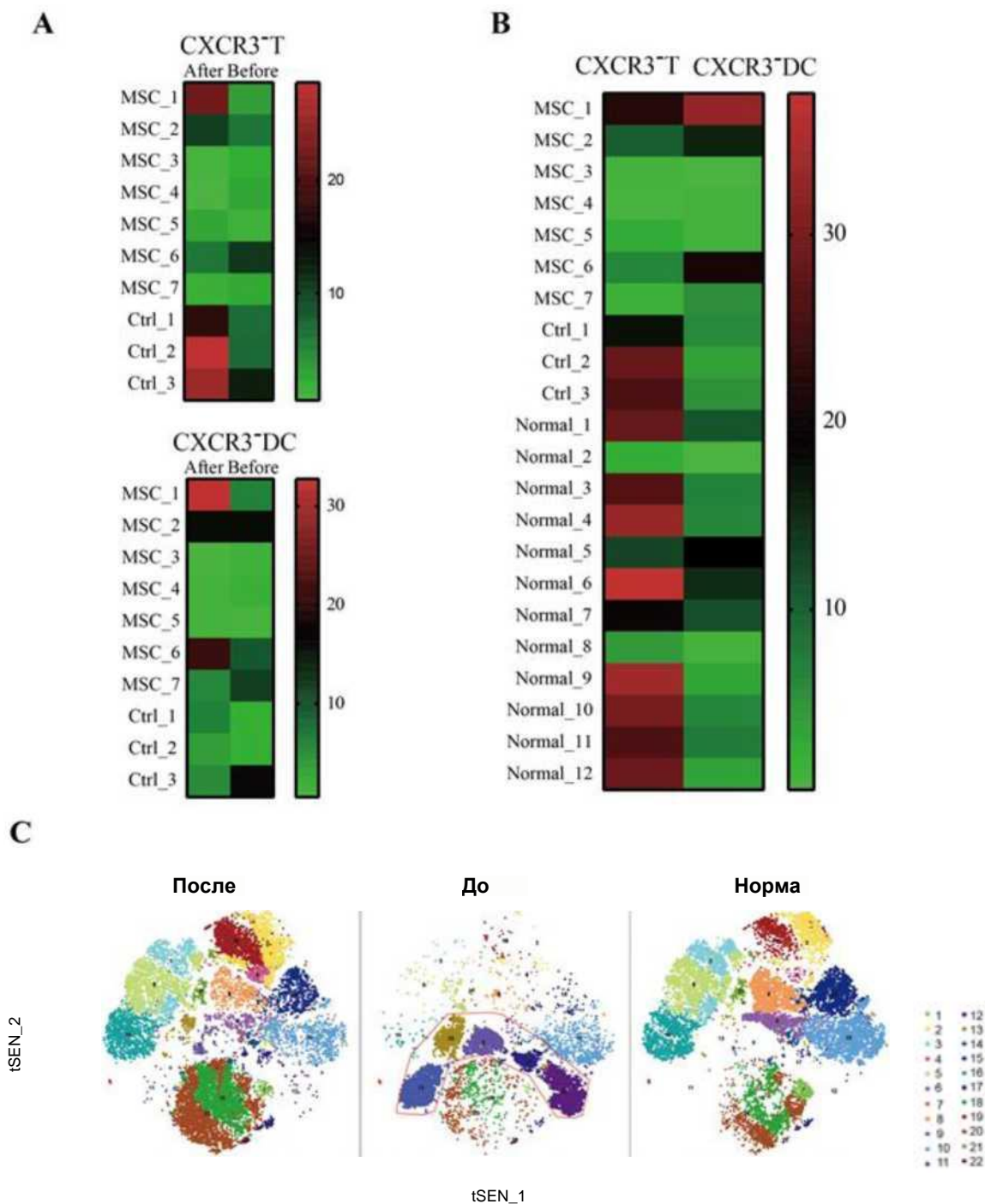


Рисунок 3. Профиль мононуклеарных клеток периферической крови пациентов. Результаты масс-цитометрии мононуклеарных клеток периферической крови включенных в исследование пациентов (**A, B**) и пациента в критическом состоянии (**C**). Нет увеличения регуляторных Т-клеток (CXCR3⁻) или дендритных клеток (DC, CXCR3⁻) для двух пациентов обычного типа (пациент 4 и 5, рис. 3А). Но у тяжелых пациентов регуляторные Т-клетки и DC увеличивались после клеточной терапии, особенно у пациента с критической степенью тяжести 1 (рис. 3В). Кроме того, для критического пациента 1 до трансплантации МСК процент сверхактивированных CXCR3⁺CD4⁺ Т-клеток (# 9), CXCR3⁺CD8⁺ Т-клеток (# 17) и CXCR3⁺NX-клеток (# 12) в МКПК был заметно выше по сравнению со здоровым контролем (рис. 3С). Однако через 6 дней после трансплантации МСК сверхактивированные Т-клетки и NK-клетки почти исчезли, и число других подтипов клеток было почти полностью возвращено к нормальным уровням, особенно в популяции CD14⁺CD11c⁺CD11b^{mid} DC (# 20). Normal: здоровые люди, MSC: группа трансплантации мезенхимальных стволовых клеток, Ctrl: контрольная группа плацебо.

Таблица 4. Лабораторные результаты пациента в критическом состоянии. Красный цвет: значение было выше нормы. Голубой цвет: значение было ниже нормы. НП: Не применимо

	Референтное значение	24 янв.	30 янв.	31 янв.	1 фев.	2 фев.	4 фев.	6 фев.	10 фев.	13 фев.
С-реактивный белок (нг/мл)	< 3,00	2,20	105,50	НП	191,00	83,40	13,60	22,70	18,30	10,10
Абсолютное число лимфоцитов (x 10 ⁹ /л)	1,10-3,20	0,94	0,60	0,35	0,23	0,35	0,58	0,87	0,73	0,93
Лейкоциты (x 10 ⁹ /л)	3,50-9,50	4,91	6,35	7,90	7,08	12,16	12,57	11,26	10,65	8,90
Абсолютное число нейтрофилов (x 10 ⁹ /л)	1,80-6,30	3,43	5,43	7,28	6,63	11,33	11,10	9,43	9,18	7,08
Абсолютное число моноцитов (x 10 ⁹ /л)	0,10-0,60	0,38	0,25	0,17	0,13	0,35	0,61	0,52	0,48	0,56
Эритроциты (x 10 ¹² /л)	4,30-5,80	4,69	4,68	4,66	4,78	4,73	4,75	5,16	4,69	4,53
Гемоглобин (г/л)	130,00-175,00	145,00	147,00	145,00	146,00	142,00	145,00	155,00	145,00	137,00
Тромбоциты (x 10 ⁹ /л)	125,00-350,00	153,00	148,00	169,00	230,00	271,00	268,00	279,00	332,00	279,00
Абсолютное число эозинофилов 10 ⁹ /л)	0,02-0,52	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,05	0,15	0,14	0,14
Абсолютное число базофилов (x 10 ⁹ /л)	0,00-0,06	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02	0,06	0,10	0,03	0,04
Общий билирубин (пмоль/л)	5,00-21,00	7,00	23,00	21,70	19,80	14,20	15,80	16,50	12,50	8,70
Альбумин (г/л)	40,00-55,00	41,70	32,30	29,70	29,90	31,60	33,00	32,20	30,10	29,10
Аспартатаминотрансфераза (ед./л)	15,00-40,00	14,00	33,00	48,00	57,00	39,00	34,00	23,00	25,00	19,00
Фибриноген (г/л)	2,00-4,00	2,44	4,24	НП	НП	4,73	НП	3,12	3,84	3,73
Прокальцитонин (нг/мл)	< 0,10	0,11	0,12	НП	НП	НП	0,10	0,18	0,15	< 0,10
Изоферменты креатинкиназы (нг/мл)	< 3,60	0,90	0,12	НП	5,67	4,24	NA	0,88	0,90	0,61
Креатинкиназа (ед./л)	50,00-310,00	168,00	231,00	НП	513,00	316,00	НП	47,00	83,00	40,00
Скорость клубочковой фильтрации (мл/мин)	> 90,00	81,30	68,00	89,60	99,00	104,00	92,50	108,10	97,10	94,10
Калий (моль/л)	3,50-5,30	3,61	2,74	3,00	3,42	3,47	4,18	4,36	4,69	4,61
Натрий (моль/л)	137,00-147,00	138,50	132,60	129,50	132,80	136,90	135,80	133,80	134,10	137,70
Миоглобин (нг/мл)	16,00-96,00	53,00	80,00	НП	138,00	77,00	НП	62,00	60,00	43,00
Тропонин (нг/мл)	< 0,056	0,10	0,07	НП	0,05	0,05	НП	0,02	0,04	0,04

13 февраля все показатели достигли нормальных уровней, а именно 19 ед./л, 40 ед./л и 43 нг/мл, соответственно. Частота дыхания снизилась до нормального уровня на 4-й день после трансплантации МСК. И лихорадка, и одышка исчезли на 4-й день после трансплантации МСК. КТ грудной клетки показала, что симптом матового стекла и инфильтрация пневмонии значительно сократились на 9-й день после трансплантации МСК (рис. 2).

Анализ на нуклеиновую кислоту НСoV-19

ОТ-ПЦР анализ на нуклеиновую кислоту НСoV-19 проводили до и после трансплантации МСК. Для пациента в критическом состоянии до трансплантации (23 января) и через 6 дней после трансплантации (6 февраля) нуклеиновая кислота НСoV-19 была положительной. Через 13 дней после трансплантации (13 февраля) нуклеиновая кислота НСoV-19 стала отрицательной. Пациенты 3, 4, 5 также показали

отрицательный результат на нуклеиновую кислоту НСoV-19 на дату этого отчета.

Масс-цитометрия (СуТОF) периферической крови пациентов

Для исследования состояния иммунной системы в ходе трансплантации МСК, мы провели СуТОF для анализа иммунных клеток в периферической крови пациентов до и после трансплантации. СуТОF показал, что почти не было увеличения регуляторных Т-клеток (CXCR3⁻) или дендритных клеток (DC, CXCR3⁻) для двух пациентов обычного типа (пациенты 4 и 5). Но у тяжелых пациентов, как регуляторные Т-клетки, так и DC повышались после клеточной терапии, особенно у пациента с критической формой. Примечательно, что не наблюдалось значительного повышения CXCR3⁻ DC после лечения плацебо у трех тяжелых контрольных пациентов.

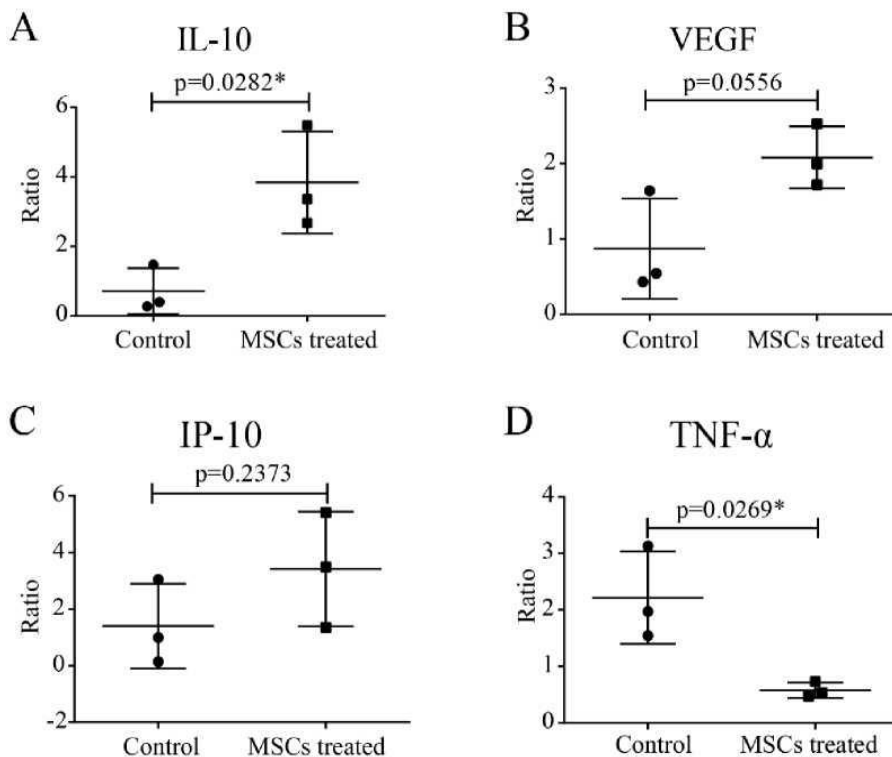
Кроме того, для пациента с критической формой до трансплантации МСК процентное содержание CXCR3+CD4+ Т-клеток, CXCR3+CD8+ Т-клеток и CXCR3+NK-клеток в МПКК пациента было значительно выше по сравнению со здоровым контролем, что вызвало воспалительный цитокиновый шторм. Тем не менее, через 6 дней после трансплантации МСК, сверхактивированные Т-клетки и NK-клетки почти исчезли, и количество других клеточных субпопуляций было почти восстановлено до нормальных уровней, особенно популяции регуляторных дендритных клеток CD14+CD11c+CD11b^{mid} (рис. 3).

Сывороточный цитокин / хемокин / анализ фактора роста

После внутривенного введения МСК показатель снижения провоспалительного цитокина TNF- α в сыворотке в сравнении до и после лечения МСК был значительным ($p < 0,05$). Между тем, показатель увеличения противовоспалительного IL-10 ($p < 0,05$) также было заметным в группе лечения МСК. Уровни хемокинов в сыворотке, таких как IP-10 и фактор роста VEGF, были повышены, но незначительно (рис. 4).

Анализ 10 x РНК-сек для трансплантированных МСК

Для дополнительно выяснения механизмов, лежащих в основе МСК-опосредованной защиты пациентов, инфицированных COVID-19, мы провели 10 x секвенирование РНК для трансплантированных МСК. 10 x РНК-сек. охватило 12 500 МСК, которые затем были полностью секвенированы с 881 215 280 исходными считываниями (дополнение рис. 2). Результаты показали, что МСК являются ACE2 или TMPRSS2 отрицательными, что указывает на то, что МСК не содержат инфекции COVID-19. Более того, противовоспалительные и трофические факторы, такие как TGF- β , HGF, LIF, GAL, NOA1, FGF, VEGF, EGF, BDNF и NGF, были высоко экспрессированы в МСК, что дополнительно демонстрирует иммуномодулирующую функцию МСК. Кроме того, SPA и SPC были высоко экспрессированы в МСК, что указывает на то, что МСК могут дифференцироваться в клетки AT2 (рис. 5). Анализ путей KEGG показал, что МСК были тесно задействованы в противовирусных путях (дополнение рис. 7).



/Комментарий к рис.: Ratio = коэффициент; Control = контроль; MSCs treated = получившие МСК/

Рисунок 4. Профиль сывороточного цитокина / хемокина / анализа фактора роста. Соотношение сывороточных цитокинов IL-10 (A), фактора роста VEGF (B), хемокина IP-10 (C) и TNF- α (D) до и после лечения МСК, выявленное у тяжелых пациентов по сравнению с контрольной группой без МСК с помощью панельного анализа, соответственно Ctrl: контрольная группа плацебо. P-значения были определены с помощью t-критерия Стьюдента. * P < 0,05.

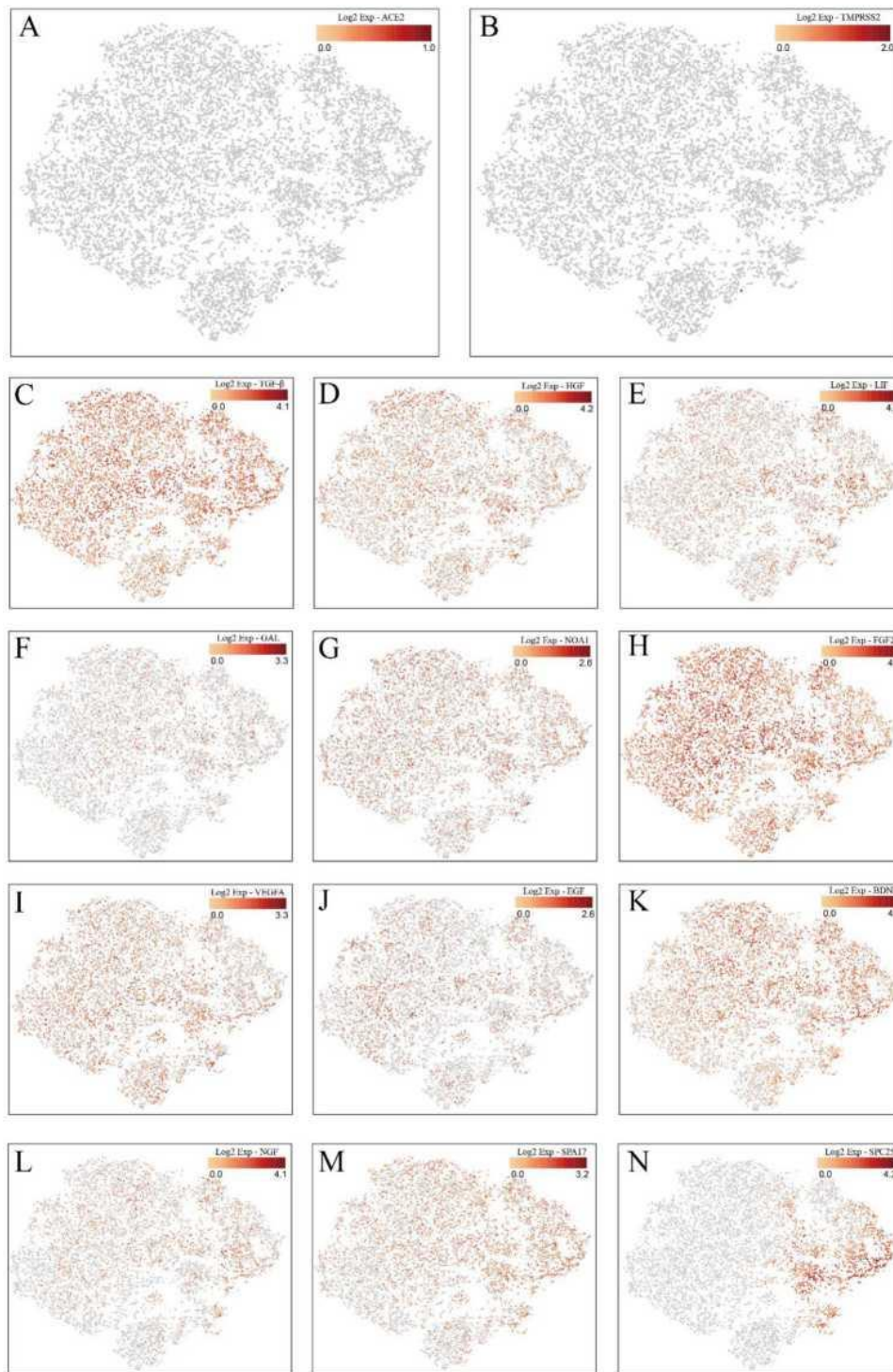


Рисунок 5. РНК-сек. анализ трансплантированных МСК. 10 x РНК-сек. анализ экспрессии генов МСК: И ACE2 (A) и TMPRSS2 (B) были экспрессированы редко. TGF- β (C), HGF (D), LIF (E), GAL (F), NOA1 (G), FGF (H), VEGF (I), EGF (J), BDNF (K) и NGF (L) были высоко экспрессированы, что указывало на иммуномодулирующую функцию МСК. SPA (M) и SPC (N) были высоко экспрессированы, что указывает на то, что МСК обладают способностью дифференцироваться в альвеолярные эпителиальные клетки II. Одна точка отражала одну клетку, а красный и серый цвета демонстрировали высокую экспрессию и низкую экспрессию, соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

И новый коронавирус, и SARS-2003 могут проникать в клетку хозяина, связывая белок S на поверхности вируса с ACE2 на поверхности клетки [3,5]. Помимо легких, ACE2 широко экспрессируется в тканях человека, включая сердце, печень, почки и органы пищеварения [10]. Фактически, почти все эндотелиальные клетки и клетки гладких мышц в органах экспрессируют ACE2, поэтому, как только вирус попадает в кровообращение, он широко распространяется. Все ткани и органы, экспрессирующие ACE2, могут стать полем битвы нового коронавируса и иммунных клеток. Это объясняет, почему все инфицированные пациенты ОИТ страдают не только от острого респираторного дистресс-синдрома, но и от таких осложнений, как острое повреждение миокарда, аритмия, острое повреждение почек, шок и смерть от синдрома полиорганной недостаточности [11] (рис. 6).

Более того, HCoV-19 чаще поражает мужчин старшего возраста с сопутствующими заболеваниями и может привести к тяжелым и даже смертельным респираторным заболеваниям, таким как острый респираторный дистресс-синдром [21], как в случае с пациентом в критическом состоянии в данном исследовании. Тем не менее, лечение COVID-2019 существенно зависит от собственной иммунной системы пациента. Когда сверхактивированная иммунная система убивает вирус, она производит большое количество воспалительных факторов, что приводит к сильному цитокиновому шторму [20]. Это указывает на то, что основной причиной повреждения этих органов может быть вызванный вирусом цитокиновый шторм. Пожилые люди могут быть намного более подвержены риску на фоне «старения» иммунной системы.

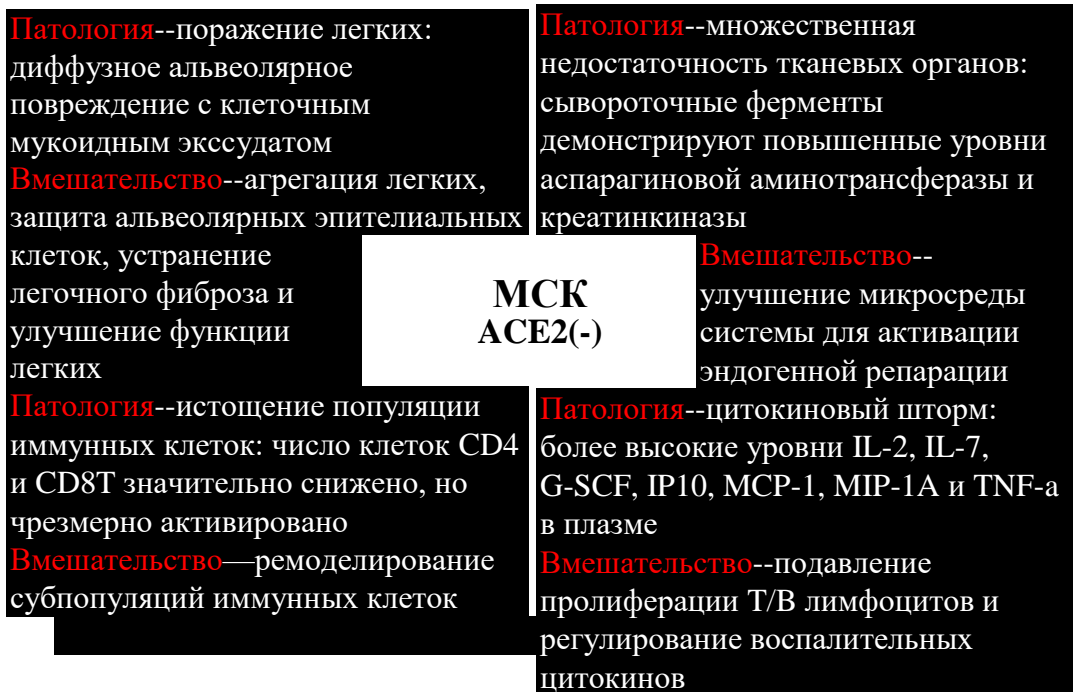


Рисунок 6. ACE2⁺ МСК приносят пользу пациентам с COVID-19 через функцию иммунорегуляции.

Наш анализ 10х scRNA-сек показывает, что МСК являются ACE2⁺ и TMPRSS2⁺ (насколько нам известно, об этом сообщается впервые) и секретируют противовоспалительные факторы для предотвращения цитокинового шторма. Они обладают естественным иммунитетом к HCoV-19. Согласно результатам потоковой масс-цитометрии, вирусная инфекция вызвала полный сбой функции лимфоцитов, даже всей иммунной системы. МСК играли жизненно важную роль в

иммуномодуляции для реверсирования субпопуляций лимфоцитов в основном через дендритные клетки. Наше предыдущее исследование показало, что совместное культивирование с МСК может сократить дифференциацию cDC от человеческих CD34⁺ клеток, одновременно увеличивая дифференциацию pDC через PGE2 [22]. Кроме того, индукция IL-10-зависимых регуляторных дендритных клеток и IRF8-контролируемых регуляторных дендритных клеток из HSC также была зафиксирована у крыс [23,24].

МСК также могут индуцировать зрелые дендритные клетки в новую Jagged-2-зависимую популяцию регуляторных дендритных клеток [25]. Все эти взаимодействия с различными дендритными клетками приводили к сдвигу иммунной системы от ответов Th1 к ответам Th2.

Несколько сообщений также были посвящены лимфопении и высоким уровням С-реактивного белка у пациентов с COVID-19 [20,21]. С-реактивный белок является биомаркером с высокой чувствительностью к воспалению и реакции хозяина на выработку цитокинов, в частности TNF α , IL-6, MCP1 и IL-8, секретируемых Т-клетками [26]. Тем не менее, большинство механистических исследований показывают, что сам С-реактивный белок вряд ли является целью вмешательства. С-реактивный белок также является биомаркером повреждения миокарда [27]

МСК-терапия может подавлять чрезмерную активацию иммунной системы и способствовать эндогенной репарации путем улучшения микросреды. После попадания в организм человека через внутривенное введение, часть МСК накапливается в легких, что может улучшить микросреду легких, защитить альвеолярные эпителиальные клетки, предотвратить фиброз легких и улучшить функцию легких.

Согласно сообщениям группы Cao [11], уровни сывороточных IL-2, IL-7, G-SCF, IP10, MCP-1, MIP-1A и TNF- α у пациентов в ОИТ были выше, чем у здоровых пациентов. Синдром высвобождения цитокинов, вызванный аномально активированными иммунными клетками, ухудшает состояние пациента, что может привести к нарушению функции эндотелиальных клеток, проницаемости капилляров, блокированию слизи в легких и, наконец, дыхательной недостаточности. И они даже могут вызвать воспалительный цитокиновый шторм, ведущий к полиорганной недостаточности. Внутривенное введение МСК в значительной мере улучшило ситуацию воспаления у пациентов с тяжелой формой COVID-19. Благодаря своей уникальной иммуносупрессорной способности уровни провоспалительных цитокинов и хемокинов в сыворотке были значительно снижены, что привлекало меньше мононуклеаров/макрофагов к поврежденному легкому, в то же время, индуцировав большее количество регуляторных дендритных клеток в области очага воспаления. Кроме того, увеличение IL-10 и VEGF способствовало восстановлению легких. В конечном счете, пациенты с тяжелой формой пневмонии, вызванной COVID-19, пережили пик ухудшения состояния и перешли на этап выздоровления.

Следовательно, тот факт, что трансплантация МСК улучшает результат лечения пациентов с COVID-2019 может быть обусловлен регулированием воспалительной

реакции и активацией репарации и регенерации тканей.

Благодарность

Эта работа была поддержана Национальной программой ключевых исследований и разработок Китая (2016YFA0101000, 2018YFE0114200), Инновационным фондом CAMS по медицинским наукам (2017-I2M-3-007) и проектом 111 (B18007), Национальным фондом естественных наук Китая (81971324, 81672313, 81700782, 81972523, 81771349)

Конфликт интересов

У нас нет конфликта интересов.

Дополнительные материалы

Дополнительные сведения можно найти онлайн на: www.aginganddisease.org/EN/10.14336/AD.2020.0228.

Использованная литература

- [1] Munster VJ, Koopmans M, van Doremalen N, van Riel D, de Wit E (2020). A Novel Coronavirus Emerging in China — Key Questions for Impact Assessment. *New England Journal of Medicine*.
- [2] Xu X, Chen P, Wang J, Feng J, Zhou H, Li X, *et al*. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *SCIENCE CHINA Life Sciences*.
- [3] Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, *et al*. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* (London, England).
- [4] Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, *et al*. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*.
- [5] Kuba K, Imai Y, Rao SA, Gao H, Guo F, Guan B, *et al*. (2005). A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nature Medicine*, 11:875-879.
- [6] Ge X-Y, Li J-L, Yang X-L, Chmura AA, Zhu G, Epstein JH, *et al*. (2013). Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*, 503:535-+.
- [7] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Kruger N, Muller M, Drosten C, Pohlmann S (2020). The novel coronavirus 2019 (2019-nCoV) uses the SARS-coronavirus receptor ACE2 and the cellular protease TMPRSS2 for entry into target cells. *bioRxiv:2020.2001.2031.929042*.
- [8] Glowacka I, Bertram S, Mueller MA, Allen P, Soilleux E, Pfefferle S, *et al*. (2011). Evidence that TMPRSS2 Activates the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein for Membrane Fusion and Reduces Viral Control by the Humoral Immune Response. *Journal of Virology*, 85:4122-4134.

- [9] Iwata-Yoshikawa N, Okamura T, Shimizu Y, Hasegawa H, Takeda M, Nagata N (2019). TMPRSS2 Contributes to Virus Spread and Immunopathology in the Airways of Murine Models after Coronavirus Infection. *Journal of Virology*, 93.
- [10] Hamming I, Timens W, Bulthuis MLC, Lely AT, Navis GJ, van Goor H (2004). Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *Journal of Pathology*, 203:631-637.
- [11] Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, *et al.* (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 395:497-506
- [12] Connick P, Kolappan M, Crawley C, Webber DJ, Patani R, Michell AW, *et al.* (2012). Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study. *Lancet Neurology*, 11:150156.
- [13] Wilson JG, Liu KD, Zhuo NJ, Caballero L, McMillan M, Fang XH, *et al.* (2015). Mesenchymal stem (stromal) cells for treatment of ARDS: a phase 1 clinical trial. *Lancet Respiratory Medicine*, 3:24-32.
- [14] Hashmi S, Ahmed M, Murad MH, Litzow MR, Adams RH, Ball LM, *et al.* (2016). Survival after mesenchymal stromal cell therapy in steroid-refractory acute graft-versus-host disease: systematic review and meta-analysis. *Lancet Haematology*, 3:E45-E52.
- [15] Kamen DL, Nietert PJ, Wang H, Duke T, Cloud C, Robinson A, *et al.* (2018). CT-04 Safety and efficacy of allogeneic umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (MSCs) in patients with systemic lupus erythematosus: results of an open-label phase I study. *Lupus Science & Medicine*, 5:A46-A47.
- [16] Galipeau J, Sensebe L (2018). Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell*, 22:824-833.
- [17] Bernardo ME, Fibbe WE (2013). Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. *Cell Stem Cell*, 13:392-402.
- [18] Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM (2010). A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One*, 5:e10088.
- [19] Li W, Ren G, Huang Y, Su J, Han Y, Li J, *et al.* (2012). Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death Differ*, 19:1505-1513.
- [20] Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, *et al.* (2020). Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*.
- [21] Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, *et al.* (2020). Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* (London, England).
- [22] Chen L, Zhang W, Yue H, Han Q, Chen B, Shi M, *et al.* (2007). Effects of human mesenchymal stem cells on the differentiation of dendritic cells from CD34(+) cells. *Stem Cells and Development*, 16:719-731.
- [23] Liu X, Qu X, Chen Y, Liao L, Cheng K, Shao C, *et al.* (2012). Mesenchymal Stem/Stromal Cells Induce the Generation of Novel IL-10-Dependent Regulatory Dendritic Cells by SOCS3 Activation. *Journal of Immunology*, 189:1182-1192.
- [24] Liu X, Ren S, Ge C, Cheng K, Zenke M, Keating A, *et al.* (2015). Sca-1 (+)Lin(-)CD117(-) Mesenchymal Stem/Stromal Cells Induce the Generation of Novel IRF8-Controlled Regulatory Dendritic Cells through Notch-RBP-J Signaling. *Journal of Immunology*, 194:4298-4308.
- [25] Zhang B, Liu R, Shi D, Liu X, Chen Y, Dou X, *et al.* (2009). Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2-dependent regulatory dendritic cell population. *Blood*, 113:46-57.
- [26] Sproston NR, Ashworth JJ (2018). Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Frontiers in Immunology*, 9.
- [27] Bisioendial RJ, Boekholdt SM, Vergeer M, Stroes ESG, Kastelein JJP (2010). C-reactive protein is a mediator of cardiovascular disease. *European Heart Journal*, 31:2087-U1505.