УДК 612.017.1, 616.9, 578.834.1, 616.24-002
№ держреєстрації 0120U104676
Інв. №

Національна академія наук України
Інститут молекулярної біології і генетики (ІМБГ)
03143, м. Київ, вул. Заболотного, 150
тел. (044) 5261169, (044) 2000356, факс (044) 5260759

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор ІМБГ НАН України
академік НАН України
_____ М.А. ТУКАЛО
14.12.2021 р.

ЗВІТ
про науково-дослідну роботу
за договорами від 29 жовтня 2020 №97/01.2020
та від 01 червня 2021 № 204/01/0246

ВИВЧЕННЯ СТАНУ ДИХАЛЬНОЇ, СЕРЦЕВО-СУДИННОЇ ТА ІМУННОЇ СИСТЕМ У ХВОРИХ З ПНЕВМОНІЄЮ COVID-19 ПІСЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ АЛОГЕННИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

Грантова підтримка Національного фонду досліджень України
у межах конкурсу «Наука для безпеки людини та суспільства»

(заключний)

Науковий керівник НДР
Старший науковий співробітник,
к.б. н. В.А. ШАБЛІЙ

2021

Результати роботи розглянуто Вченою радою Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, протокол від 14 грудня 2021 року №15

СПИСОК АВТОРІВ

Науковий керівник НДР,
старший науковий співробітник
канд.біол. наук,

14.12.2021

В. А. ШАБЛІЙ
(реферат, вступ, розділи 1, 2,3 висновки)

Відповідальний виконавець,
завідувач лабораторії біосинтезу нуклеїнових кислот
ІМБГ НАН України
канд. біол. наук, с. н. с.

14.12.2021

І. Я. СКРИПКІНА
(реферат, розділи 1, 2,3 висновки)

Виконавці
Завідуючий кафедрою інфекційних хвороб

Національної медичної академії післядипломної освіти імені Л. П. Шупика

14.12.2021

О. К. ДУДА
(розділ 3)

Завідувач лабораторії
клітинних культур,
ТОВ «Інститут клітинної терапії»,
канд.біол. наук

14.12.2021

В. В. НІКУЛІНА
(розділи 1, 2)

Старший науковий співробітник
лабораторії біосинтезу нуклеїнових кислот ІМБГ НАН України
канд. біол. наук

14.12.2021

О. В. АНОПРІЄНКО
(розділ 1, 2)

Ендоскопіст
Київська міська клінічна лікарня №4, канд. біол. наук

14.12.2021

О. Л. ЧИБІСОВ
(розділ 3)

Завідувач клініко-діагностичної лабораторії
Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України

14.12.2021

О.А. КАРЛОВСЬКИЙ
(розділ 3)

Провідний інженер
лабораторії біосинтезу нуклеїнових кислот ІМБГ НАН України

14.12.2021

Ю. М. ШАБЛІЙ
(розділ 2)

Аспірант
Національної медичної академії
післядипломної освіти імені П. Л.
Шупика

А. Р. ВЕГА
(розділ 3)

14.12.2021

Молодший науковий співробітник
відділу ензимології білкового
синтезу ІМБГ НАН України,
канд. біол. наук

М.Ю. Рибак
(розділ 2)

14.12.2021

Технік
лабораторії біосинтезу
нуклеїнових кислот ІМБГ НАНУ

О.С. Білека

14.12.2021

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 100 с., містить 3 розділи, 10 рис., 4 табл., 165 джерел.

Об’єкт дослідження – біомолекули в крові пацієнтів з тяжким перебігом хвороби COVID-19 після трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин плаценти.

Предмет дослідження – мікро РНК, цитокіни, хемокіни та імунні клітини крові хворих на COVID-19 після трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин плаценти.

Мета роботи – дослідження динаміки біомаркерів в крові пацієнтів з важкою пневмонією COVID-19 після трансплантації препаратів кріоконсервованих алогенних мезенхімальних стовбурових клітин плаценти для діагностики функціонального стану дихальної, серцево-судинної та імунної систем.

Методи дослідження – виділення мікро РНК з плазми крові, синтез кДНК на мікро РНК, ПЛР у реальному часі, ІФА, цитофлуореметричний аналіз.

Результати та їх новизна. На основі проведених досліджень охарактеризовано зміни у рівнях про- та проти-запальних цитокінів, рівня мікро РНК, ключових популяцій імунних клітин у COVID-19 пацієнтів після трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин плаценти у динаміці протягом 28 діб від початку розвитку захворювання. Особливу увагу приділено рівням мікроРНК та біомаркерам, які можуть бути індикаторами функціонального стану імунної, дихальної та серцево-судинної систем. Проведено кореляційний аналіз для визначення взаємозв’язку рівнів біомаркерів у периферійній крові та рівнів активованих імунних клітин. Зібрані дані можуть бути використані для прогнозування та своєчасного діагностування розвитку можливих ускладнень при розвитку COVID-19.

Ключові слова: COVID-19, МЕЗЕНХІМАЛЬНІ СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ, ЗАПАЛЕННЯ, ЦИТОКІНИ, ХЕМОКІНИ, МІКРОРНК, СУБПОПУЛЯЦІЇ ІМУННИХ КЛІТИН

Умови одержання звіту: за договором 204/01/0246, 01001 Київ, вул. Бориса Грінченка, 1, Національний фонд досліджень України

ABSTRACT

Report SRW: 100 p., there are 3 chapters, 10 figures, 4 tables, 165 references.

The objects of study were biomolecules in the blood of patients with severe COVID-19 disease after mesenchymal stem cells transplantation.

The subjects of research were microRNA, cytokines, chemokines and immune cells in blood of patients with COVID-19 after mesenchymal stem cells transplantation.

The aim was to study the dynamic changes of biomarkers in the blood in patients with severe COVID-19 pneumonia after mesenchymal stem cells transplantation and to determine diagnostic markers associated with the functional state of the respiratory, cardiovascular and immune systems.

Research methods included isolation of miRNA from blood plasma, cDNA synthesis on miRNA, real-time PCR, ELISA, fluorescence-activated cell sorting.

Results and novelty of the current project: changes in the levels of pro- and anti-inflammatory cytokines, microRNA and different populations of immune cells were analysed in the dynamics within 28 days from the onset of the disease in COVID-19 patients with and without MSC transplantation. The study was focused on miRNA and biomarkers, which may be used as prognostic factors of the fuctional state of immune, respiratory and cardiovascular systems. Correlation analysis was performed to determine the relationship between levels of biomarkers in peripheral blood and levels of activated immune cells. The collected data can be used to predict and timely diagnose the development of possible complications during the COVID-19 progression.

Key words: COVID-19, inflammation markers, cytokines, miRNA, immune cell populations.

ЗМІСТ

ВСТУП. 8

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ. 13

РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ 18
2.1 Матеріали та реактиви 18
2.2 Обладнання 19
2.3 Об'єкти досліджень 19
2.4 Виготовлення препаратів кріоконсервованих мезенхімальних стовбурових клітин плаценти людини 23
2.5 Інфузія препаратів кріоконсервованих мезенхімальних стовбурових клітин плаценти людини 24
2.6 Забір периферійної крові 24
2.7 Отримання плазми та сироватки з периферійної крові 25
2.8 Виділення мононуклеарних клітин із периферійної крові 25
2.9 Кріоконсервування мононуклеарних клітин периферійної крові 26
2.10 Розморожування мононуклеарних клітин периферійної крові 27
2.11 Виділення мікро РНК та оцінка її якості 27
2.12 Зворотно-транскрипційна реакція синтезу кДНК на мікро РНК 28
2.12.1 Реакція поліаденілювання 28
2.12.2 Зворотно-транскрипційна реакція 28
2.13 Кількісний аналіз вмісту мікро РНК 29
2.14 Проточна цитофлуориметрія 30
2.15 Вимірювання цитокінів 34
2.16 Статистичний аналіз 35

РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ 36
3.1 Основні характеристики пацієнтів, залучених до дослідження 36

3.2 Динамічний профіль гематологічних показників у пацієнтів з COVID-19 36
3.3 Рівні цитокінів у плазмі крові хворих на COVID-19 46
3.4 Рівні мікро РНК у плазмі крові хворих на COVID-19 58
3.5 Динамічний профіль змін субпопуляцій клітин лімфоцитів у пацієнтів з COVID-19 67
3.6 Динамічний профіль змін субпопуляцій Т-клітин у пацієнтів з COVID-19 71
3.7 Зміни у субпопуляціях мієлоїдних клітин у пацієнтів з COVID-19 в динаміці 76

ВИСНОВКИ 79
НАУКОВІ ДОРОБКИ АВТОРІВ ПРОЄКТУ 82
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ 83

ВСТУП

Важкий гострий респіраторний синдром коронавірус 2 (SARS-CoV-2) був визнаний Всесвітньою організацією охорони здоров'я коронавірусною хворобою 2019 (COVID-19) і поширився по всьому світу, що призвело до пандемії, яка вразила понад 200 мільйонів людей і спричинила більш ніж 4,4 мільйони смертей у понад 200 країнах станом на 15 серпня 2021 року (https://www.worldometers.info/coronavirus/). COVID-19 супроводжується потужним вивільненням запальних цитокінів у плазму крові, що в свою чергу спричиняє набряк легень з дисфункцією повітрообміну, виникненням гострого респіраторного дистрес-синдрому (ГРДС), гострою серцевою недостатністю та вторинними інфекціями [1], що дуже часто призводить до смерті. COVID-19 також асоціюється з лімфопенією, а також з виснаженням CD8 Т-клітин, при цьому кількість лімфоцитів обернено корелює з тяжкістю стану хворого [2-5]. Лімфопенія при COVID-19 може бути більш тривалою, ніж при інших вірусних інфекціях [4]. Залишається невідомими ключові субпопуляції Т клітин, задіяних у клітинному імунітеті при COVID-19. Наприклад, експресія рецепторів PD1, TIM3, LAG3, CTLA4, NKG2A та CD39a на Т імунних клітинах може вказувати як на гіперактивацію, так і на виснаження клітин [5-6], що, може залежати від фази розвитку імунної відповіді пацієнта з COVID-19.

За даними бази даних Національного інституту здоров’я США (clinicaltrials.gov), станом на 25 липня 2021 року вже було ініційовано 81 клінічне дослідження, при яких була застосована трансплантація мезенхімальних стовбурових (МСК) клітин та/або їх позаклітинних везикул для попередження виникнення гіперімунної реакції організму у вигляді «цитокінового шторму» у хворих на COVID-19. Через те що МСК володіють не тільки імунорегуляторними властивостями але і стимулюють відновлення пошкоджених тканинах [13, 14], все це разом надає унікального статусу

клітинній терапії для попередження та коригування наслідків COVID-19 інфекції. За результатами вже завершених 14-ти клінічних досліджень була доведена безпечність та ефективність застосування МСК як регулятора синдрому понаднормового вивільнення цитокінів [15-27]. Слід зазначити, що успішні результати лікування ГРДС вже опубліковані Ізраїльською компанією Pluristem та компанією Mesoblast (США), якими були застосовані МСК плаценти та кісткового мозку відповідно.

Інститут клітинної терапії у співпраці з Київською міською лікарнею №4 та Інститутом епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України у відповідності до Українського законодавства, та на підставі дозволу Міністерства охорони здоров'я розпочали клінічне дослідження «Лікування коронавірусної COVID-19 пневмонії (збудник SARS-CoV-2) кріоконсервованими алогенними мультипотентними мезенхімальними стовбуровими клітинами плаценти та пуповини».

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 досліджено. Тож вивчення зміни в крові різноманітних біологічних молекул, що відображають патофізіологічні процеси, дозволить встановити мішені впливу МСК і розширити наше розуміння їх терапевтичного потенціалу та вдосконалити протоколи лікування. Велика кількість доклінічних та клінічних досліджень з трансплантації МСК на ішемічну хворобу серця, та дилатаційну кардіоміопатію показали, що механізмів дії може бути декілька: стимулювання трофіки завдяки покращення кровопостачання, активування неоваскулогенезу, паракринна стимуляція регіональних прогеніторних клітин до проліферації та диференціювання, блокування апоптозу клітин, супресування імунологічного компоненту [13, 14, 25].

В даний час багато досліджень описують клінічні характеристики пацієнтів з COVID-19, 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 COVID-19 [7-10]. Залишається недостатньо даних щодо динамічних змін параметрів клітин крові та факторів запалення для оцінки прогресування COVID-19. Імунні клітини з периферичної крові пацієнта можуть бути використані як маркери захворювання COVID-19, будучи частиною швидкого та доступного аналізу крові. Але їх впровадження в клінічну практику обмежене невизначеністю механізмів, що призводять до зміни характеристик клітин крові та компонентів запалення. Дрібні зміни у субпопуляціях клітинах периферичної крові, а також зміни рівнів цитокінів у пацієнтів з COVID-19 маловідомі. Крім того, рівень та роль мікро РНК, ключових регуляторів експресії більшості генів геному людини, не досліджувався у пацієнтів з COVID-19. За попередніми даними, певні мікро РНК беруть участь у зменшенні запального процесу при гострій травмі легенів та поляризації макрофагів М2 [11], а також, було показано, що експресія мікро-РНК підвищується в нейтрофілах та макрофагах на моделі сепсису у мишей [12].

Цілями роботи було: Розробити протоколи досліджень вмісту міРНК, білкових біомаркерів та клітинних популяцій в зразках крові пацієнтів. Провести дослідження вмісту міРНК (miR-146a, miR-27a, miR-126, та miR-424), що асоціюються з функціональним станом легень в плазмі пацієнтів. Провести розробку протоколу та валідацію імуноферментного визначення вмісту про-та протизапальних цитокінів/хемокінів в сироватці крові пацієнтів. Провести розробку протоколу та валідацію імуноферментного визначення вмісту ангіотензину-2, білку RAGE та сурфактанту-D в сироватці крові пацієнтів.

Для досягнення цих цілей необхідно було виконати такі завдання:

Завдання 1. Збір зразків крові пацієнтів.

Завдання 2. Відпрацювання протоколів та проведення мультипараметричної цитофлуорометрії (визначити оптимальні концентрації

антитіл, відпрацювати протокол гейтування, виставити всі необхідні компенсації відповідно до негативних контролей, та “fluorescence minus one control”)

Завдання 3. Виділення РНК зі зразків плазми пацієнтів з подальшим синтезом кДНК за допомогою спеціалізованого набору “High Specificity miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit”.

Завдання 4. Визначення вмісту miR-146a, miR-27a, miR-126, miR-424 та miR-221 у трьох незалежних повторах з використанням набору реагентів 5×HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus.

Завдання 5. Проведення дослідження вмісту IL-2, IL-6, IL-10, GSCF, IP10, MCP1, MIP1A та TNFα в сироватці крові пацієнтів.

Завдання 6. Визначення вмісту miR-92a, miR-133, miR-21, miR-1 та miR-133 у трьох незалежних повторах з використанням набору реагентів 5× HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus.

Завдання 7. Розробка протоколу та проведення валідації з використанням Enzyme Immunoassay наборів визначення вмісту ангіотензину-2, протеїну RAGE та сурфактанту-D в сироватці крові пацієнтів; написання та затвердження відповідних стандартних операційних процедур.

Завдання 8. Дослідження вмісту ангіотензину-2, протеїну RAGE та сурфактанту-D в сироватці крові пацієнтів.

Завдання 9. Статистична обробка всіх отриманих експериментальних даних з подальшим аналізом та документуванням.

В результаті виконання роботи були розроблені стандартні операційні процедури, що регламентують приготування зразків плазми та сироватки крові пацієнтів, створені та валідовані протоколи визначення та документування вмісту міРНК та субпопуляцій імунних клітин в крові пацієнтів, отримані значення відносного рівня експресії міРНК в крові пацієнтів, отримані значення вмісту IL-2, IL-6, IL-10, GSCF, IP10, MCP1, MIP-1α та TNFα в сироватці крові пацієнтів.

Розроблені стандартні операційні процедури та валідовані протоколи були використані для дослідження вмісту біомаркерів у хворих після введення МСК. Отримані результати з визначення динаміки зміни біомаркерів (мікроРНК, хемо- та цитокіни, імунні клітини) у крові хворих з важкою пневмонією COVID-19 були використані як контрольні значення при визначенні ключових чинників перебігу захворювання для пацієнтів після трансплантації препаратів кріоконсервованих алогенних МСК плаценти для діагностики функціонального стану дихальної, серцево-судинної та імунної систем.

РОЗДІЛ 1
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

SARS-CoV-2 може призводити до розвитку гострого респіраторного дистрес синдрому (ГРДС) та серцевої недостатності, що дуже часто призводить до смерті. Завдяки унікальним імуносупресивним властивостям мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) їх трансплантація є перспективним напрямком лікування пацієнтів із важкою пневмонією COVID-19. Метою даного проекту є дослідження динаміки біомаркерів в крові пацієнтів з важкою пневмонією COVID-19 після трансплантації препаратів кріоконсервованих алогенних МСК плаценти для діагностики функціонального стану дихальної, серцево-судинної та імунної систем.

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 хвороба «трансплантат проти господаря» [28] та системний червоний вовчак [29].

Згідно www.clinicaltrials.gov, на теперішній час дію клітин цього типу також почали вивчати у госпіталях Йорданії, Бразилії, Парижа (Франція) та Копенгагену (Данія). За даними сайту sciencemag.org, такі ж дослідження виконуються в Ірані. Клінічні дослідження з вивчення дії МСК в лікуванні ускладненої COVID-19 пневмонії почали проводити у Королівському Університеті, Велика Британія (www.qub.ac.uk) та в Системі Охорони Здоров'я Маунт Сінай (Mount Sinai Health System) міста Нью-Йорк, США (www.mountsinai.org).

Вважається, що дія МСК опосередковується двома шляхами, а саме: імуномодулюючим ефектом та здатності до диференціювання в клітини тканин ушкодженого органу [30]. Успішні результати лікування ГРДС опубліковані Ізраїльською компанією Pluristem та компанією Mesoblast (США), якими були застосовані МСК плаценти та кісткового мозку

відповідно. Однак, на сьогодні клінічні дані, які відображають зміни в імунній системі після трансплантації МСК хворим на COVID-19, досить обмежені. Так, в роботі Leng Z. et al. [31], 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-клітини, $CXCR3^+CD8^+$ Т- клітини та $CXCR3^+$ NK-клітини. Крім того, популяція $CD14^+CD11c^+CD11b^{mid}$ регулятивних 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 [31].

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 [32].

Цікавим фактом на користь застосування клітинної терапії при формуванні імунних реакцій є те, що при системному запаленні спостерігається направлений вихід МСК з кісткового мозку до периферійної крові [33]. МСК починають функціонувати як імуносупресори тільки після взаємодії з сигналами запалення, наприклад, інтерферону, TNF-α або ліпополісахариду [34]. МСК мають регуляторний вплив на імунні клітини, відповідальні за вроджений імунітет. Зокрема, МСК інгібують дозрівання, активацію, ендоцитоз, антигенпрезентуючі властивості і міграцію дендритних клітин [35-37], стимулюють диференціювання макрофагів до М2-регуляторних макрофагів з протизапальною функцією [38], пригнічують дегрануляцію відповідальних за виникнення алергічних реакцій тучних клітин [39]. Дендритні клітини людини, стимульовані в присутності МСК або позаклітинних везикул, отриманих від МСК, демонстрували знижену експресію фенотипічних показників активації CD83, CD38 CD80, зменшену

міграцію та поляризацію Т-клітин, нижчу продукцію TNF-α, CXCL10, IL-12 та IFNγ, сприяли формуванню IL-17/IL-10 подвійно продукуючих Th-клітин за CTLA-4- залежним механізмом, у порівнянні з дендритними клітинами, активованими у відсутність клітин МСК [36]. До того ж, МСК пригнічують активацію нейтрофілів та секрецію протеаз останніми [40], при цьому позаклітинні везикули, виділені МСК, можуть збільшувати життєздатність та підвищувати фагоцитарну активність та продукування реактивного оксигену [41].

МСК інгібують проліферацію Т-клітин за допомогою секреції 13-індоламін-2,3-діоксигенази (IDO), простагландину Е2, TGF-β та інших факторів, стимулюють проліферацію Т регуляторних клітин і продукування ІЛ-10, попереджують диференціювання Т-клітин у субпопуляції Th1 та Th17, пригнічують цитотоксичну активність природних клітин-кілерів [42-44]. Показано, що стромальні клітини кісткового мозку беруть участь у підтримці як плазматичних, так і Т -клітин пам'яті, при цьому ключову роль відіграють рецептори МСК VCAM-1 та CXCL12 [45].

Було показано, що МСК пригнічують диференціацію В-клітин, але досі залишається невизначеним, чи регулювання В-клітин опосередковується прямим впливом МСК на В -клітини, чи МСК регулює В-клітини опосередкрвано через Т-клітини [46-48]. Тим не менш, МСК відіграють протизапальну роль при аутоімунних захворюваннях шляхом збільшення популяції CD5+IL-10+ В-регуляторних клітин [49].

Починаючи з початку пандемії COVID-19, механізм та динаміка імунної відповіді у хворих пацієнтів різного ступеня важкості детально вивчається і вже накопичено немало даних, що дозволяють окреслити основні зміни параметрів вродженого та набутого імунітету, а також низку прогностичних і діагностичних маркерів, які дозволяють передбачити перебіг захворювання. Високий рівень сурфактанту-D, ангіопротеїну-2 (Ang-2) та RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts) можуть бути використані для діагностики ГРДС різної етіології [50, 51]. Комбінація цих

маркерів та визначення рівня прозапальних цитокінів дозволить відділити пацієнтів з ГРДС, що мають гіпо- або гіпер-запальний процес. Це неабияк актуально саме для клітинної терапії, оскільки основною мішенню МСК є гіперактивні активовані імунні клітини [52].

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. Рівень смертності COVID-19 пацієнтів, асоційований з гострим ушкодженням міокарду, був достовірно вищим ніж з віком, діабетом, хронічним фіброзом легень та серцево-судинними захворюваннями в анамнезі [53, 54]. 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 [55]. 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) [56, 57]. Однак, рівень тропоніну може зростати за умови порушень ниркової функції [58]. Отже пошук високоспецифічних біомаркерів, що точно будуть відображати розвиток патології серця, особливо на ранніх етапах, в хворих на COVID-19, є актуальним завданням, що має як фундаментальне, так і суто практичне значення.

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 [59]. Рівень miR-221-3p [60] та miR-21 [61] 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 [62]. Widera et al. [63] встановив 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 [64].

В даному проекті ми зосередилися на динамічних змінах параметрів крові, таких як кількісні та якісні показники клітин периферійної крові, рівень цитокінів та мікро-РНК у периферичній крові пацієнтів із важким COVID-19 протягом 28 днів від початку госпіталізації після трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин плаценти людини.

РОЗДІЛ 2
ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Матеріали та реактиви

Реактив для виділення мікро РНК з плазми крові «NucleoSpin miRNA Kit (Macherey-Nagel, France). Набір для синтезу кДНК на матриці мікро РНК High-Specificity miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit, 5X poly A polymerase buffer, rATP (10 млМ), 10x AffinityScript RT buffer, dNTP mix (100 млМ), RT adaptor primer (10 мкМ), AffinityScript RT/RNase Block enzyme mixture, Universal Reverse primer (Agilent Technologies, США). Розчини та реактиви для ПЛР у реальному часі: 5X HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (no ROX) (Solis BioDyne, Естонія), Ficoll-Paque PLUS (Cytiva, Life Sciences, США), NucleoSpin miRNA Kit (Macherey-Nagel, France), ІФА набір для визначення G-CSF людини (BMS2001INST, Instant ELISA, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Австрія), ІФА набір для визначення IL-2 людини (BMS221INST, Instant ELISA, Thermo Fisher Scientific, Австрія), ІФА набір для визначення IL-6 людини (BMS213INST, Instant ELISA, Thermo Fisher Scientific, Австрія), ІФА набір для визначення TNF-α людини (KHC3014, Instant ELISA, Thermo Fisher Scientific, Австрія), ІФА набір для визначення IP-10 людини (BMS284INST, Instant ELISA, Thermo Fisher Scientific, Австрія), ІФА набір для визначення MIP-1α людини (KAC2201, Instant ELISA, Thermo Fisher Scientific, Австрія), ІФА набір для визначення сурфактанту D (R&D Systems, США), ІФА набір для визначення ангіотензину II (Sigma, Сполучене королівство), ІФА набір для визначення NT-proBNP (R&D Systems, США), ІФА набір для визначення RAGE (Sigma, Сполучене королівство).

2.2 Обладнання

Геманалізатор Swelab Alfa Basic (Boule Medical AB, Швеція), Міні-центрифуга «Vortex Micro-Spin FV-2400», центрифуга «Eppendorf 5417R» (Eppendorf, Німеччина), спектрофотометр «NanoDrop 2000» (Thermo Scientific, Німеччина), лабораторний пластик (наконечники і пробірки), що був використаний в роботі, мав маркування «вільні від ДНКаз і РНКаз», сортер клітин BD FACSAria (Becton Dickinson, США), Real Time PCR Detection System CFX96 (BIO-RAD Laboratories, Inc., США).

2.3 Об'єкти досліджень

У дослідженні використовували зразки плазми крові, що були отримані після підписання інформованої згоди, від 14 пацієнтів хворих на пневмонію COVID-19 (COVID-19 група) та від 13 пацієнтів хворих на пневмонію COVID-19, яким проводили інфузію мезенхімальними стовбуровими клітинами (МСК група). Вищезазначені пацієнти проходили лікування в інфекційному відділенні Київської міської лікарні №4. Додатково були отримані зразки периферичної крові умовно здорових волонтерів, які не хворіли та не були щеплені проти COVID-19. Обстеження та лікування здійснювалось відповідно до протоколів Міністерства охорони здоров'я. Інфузію мезенхімальних стовбурових клітин проводили на 1й, 3й та 6й день після включення пацієнтів в дослідження в дозі 1 млн клітин на кг ваги відповідно до протоколу клінічного дослідження «Лікування коронавірусної COVID-19 пневмонії (збудник SARS-CoV-2) кріоконсервованими алогенними мультипотентними мезенхімальними стовбуровими клітинами плаценти та пуповини» (https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04461925), що проводиться у відповідності до Українського законодавства, та на підставі дозволу Міністерства охорони здоров'я Інститутом клітинної терапії у

співпраці з Київською міською лікарнею №4 та Інститутом епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України. Схема дослідження представлена на рис.1. Загальні клінічні дані пацієнтів, залучених у дослідження, представлені в Таблиці 1.

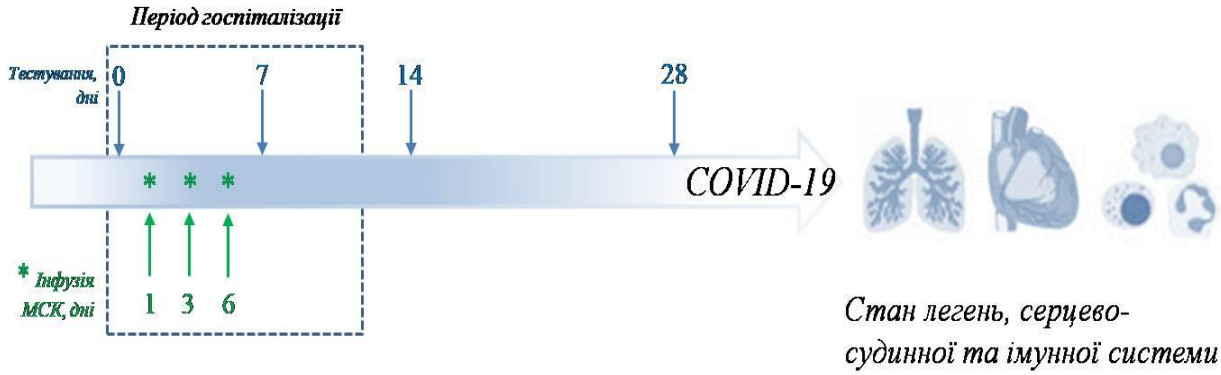


Рисунок 1. Схема дослідження. Включення пацієнтів в дослідження визначали як день 0. Інфузію МСК проводили на 1-й, 3-й та 6-й день дослідження. Тестування пацієнтів для вивчення стану легень, серцево-судинної та імунної систем проводили на день 0, 7, 14 та 28. COVID-19 - коронавірусна хвороба.

Таблиця 1 – Характеристика пацієнтів, залучених у дослідження.

Показники	Контроль група (n=14)	МСК група (n=13)	Умовно здорові волонтери (n=5)
Вік (медіана, розмах), роки	62 (55-64)	52 (32-71)	62 (36.2-67)
Стать Чоловіки Жінки	 10/14 (71.42%) 4/14 (28.57%)	 8/13 (61,5%) 5/13 (38,5%)	 2/5 (40.0%) 3/5 (60.0%)
Середнє значення тривалості від появи перших симптомів до госпіталізації, дні	11.0 ± 2.69	12.3 ± 3.37	-

Продовження Таблиці 1.

Показники	Контроль група (n=14)	МСК група (n=13)	Умовно здорові волонтери (n=5)
Супутні захворювання – кількість пацієнтів (%)			
Гіпертензія	8/14 (57.14%)	5/13 (38.5%)	3/5 (60.0%)
Діабет	1/14 (7.14%)	1/13 (7.7%)	1/5 (20.0%)
Захворювання серця	6/14 (42.85%)	4/13 (30.7%)	1/5 (20.0%)
Наявність симптомів – кількість пацієнтів (%)			
Гарячка	10/14 (71.42%)	11/13 (84.6%)	-
Кашель	14/14 (100.0%)	13/13 (100%)	
Задишка	11/14 (78.57.0%)	9/13 (69.2%)	
Діарея	1/14 (7.14%)	0/14 (0%)	
Втома	14/14 (100.0%)	13/13 (13%)	
Міалгія	3/14 (21.42%)	6/13 (46,1%)	
Клінічний результат – кількість пацієнтів (%)			
Одужали та виписані	13/14 (92.85%)	13/13 (100%)	-
Смерть	1/14 (7.14%)	0/13 (0%)	

Залучені у дослідження учасники були обстежені в повному обсязі:

Основні показники:

1. Розмір ділянки ураження легень за допомогою рентгенологічних або КТ зображень грудної клітки.

2. Оцінка змін у перебігу пневмонії та стану легеневої тканини.
3. Насичення крові киснем (SpO2) у стані спокою без кисневої підтримки.

Другорядні показники:

1. Оцінка кількості та важкості побічних явищ.
2. Загальна тривалість перебування пацієнта в стаціонарі (Кількість днів, проведених пацієнтом в стаціонарі).
3. Загальний аналіз крові через 6 місяців та через 12 місяців.
4. Комп'ютерна томограма через 6 місяців.
5. Маркери роботи серця.
6. Електрокардіограма (зміни інтервалу ST-T).
7. Маркер інфекції.
8. Концентрація С-реактивного білка.
9. Кількість лейкоцитів в літрі крові.
10. Кількість лімфоцитів в крові.
11. Відсоток лімфоцитів у лейкоцитах.

В якості нормального контролю використовували плазму крові 5 пацієнтів , що за критеріями включення відповідали протоколу дослідження. Усі зразки були зібрані за письмової інформованої згоди пацієнтів. Зразки були зібрані у відповідності з Гельсінською декларацією Всесвітньої медичної асоціації «Етичні принципи медичних досліджень за участю людини у якості об'єкта дослідження», всі процедури та протокол клінічного дослідження були розглянуті та схвалені Комітетами з етики Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України та Київської міської лікарні №4 (Затверджений на засіданні Вченої Ради КЦТОТК від 24 квітня 2020 року, протокол №4).

2.4 Виготовлення препаратів кріоконсервованих мезенхімальних стовбурових клітин плаценти людини

Плаценти отримували від донорів від 23 до 36 років на 39-41 тижні доношеної клінічно нормальної вагітності після фізіологічних пологів або кесаревого розтину в Київському міському пологовому будинку №3. Усі донори надали письмову інформовану згоду на отримання та використання їх плаценти для дослідження. Амніон видаляли і відрізали ножицями фрагмент хоріона вагою приблизно 4 г (товщиною 3-7 мм). Фрагмент тканини подрібнювали на дрібні шматочки (1–3 мм) і інтенсивно промивали на шейкері у збалансованому сольовому розчині Хенкса (HBSS) (HyClone, США) з додаванням 100 ОД/мл пеніциліну (Артеріум, Україна) і 50 мг/мл стрептоміцину (Артеріум, Україна) до тих пір, поки промивний розчин не стане безбарвним. Потім фрагменти тканини обробляли 0,1% колагеназою I (Serva, Німеччина) і 0,6 ОД/мл диспази I (Gibco, США) в 10 мл MEM (Sigma, Сполучене Королівство). Напівферментовані шматки тканини висівали в альфа-MEM (Sigma, Сполучене Королівство) з додаванням 15% FBS (Sigma, Бразилія), 1× розчину амінокислот RPMI (Sigma, Сполучене Королівство) та 1× стрептоміцин/пеніцилін (Sigma, Сполучене Королівство) на флакони для культури клітин з адгезивною поверхнею (Sarstedt, Німеччина). Для виходу клітин експланти культивували при +37°C і 5% CO2. Поживне середовище змінювали на 10 та 14 день. При досягненні 80–90% конфлюентності в моношарі, клітини дисоціювали за допомогою розчину 0,05% трипсину та 0,02% EDTA (Biohrom, Сполучене Королівство), промивали, підраховували та пересівали в нові культуральні флакони зі щільністю 4–5 тис клітин/см2. Перед кріоконсервуванням клітини розподіляли по кріоємностях та заморожували в розчині Хенкса з 5% диметлсульфоксиду (Sigma, Сполучене Королівство) на програмному заморожувачі за спеціальною програмою, розробленою для мезенхімальних клітин, та розміщували на постійне місце зберігання в дьюарах з рідким азотом.

2.5 Інфузія препаратів кріоконсервованих мезенхімальних стовбурових клітин плаценти людини

Кріоємності з препаратами кріоконсервованих мезенхімальних стовбурових клітин плаценти людини вилучали з постійного місця зберігання та розморожували на водяній бані при температурі 38°С до появи рідкої фази в ⅔ об'єму. Потім клітини переносили до центрифужної пробірки та осаджували при 400g протягом 10 хвилин в центрифузі з бакет ротором. Після центрифугування видаляли надосадову рідину і ресуспендували клітини в 100 мл розчину 0,9% хлориду натрію для інфузій (Інфузія, Україна), що містив 5% альбуміну людини (Біофарма, Україна). Здійснювали підрахунок кількості клітин та життєздатності за методом включення трипанового синього (Corning, США). Препарат для інфузій містив клітини в дозі 1 млн клітин/кг ваги пацієнта з життєздатністю 83-96%. Транспортування препарату до місця інфузії здійснювали при температурі від 15 до 25°С в термоконтейнері з логером для фіксації часу та температури доставки.

Препарат вводили внутрішньовенно крапельно, повільно, 30-40 крапель в хвилину, протягом 40-60 хвилин. Протягом внутрішньовенного введення кожні 15-20 хвилин збовтували пакет з клітинним препаратом для запобігання осаду клітин на дно флакону.

2.6 Забір периферійної крові

Забір периферійної крові здійснювався в день включення в дослідження(день 0) та на 7-й, 14-й та 28-й дні від початку включення пацієнтів в дослідження. Зразки крові транспортувались при температурі від 18°С до 25°С та зберігались до виділення плазми не більше 24 годин при +4°С. Забір крові проводили в пластикових пробірках об'ємом 4 мл з

антикогаулянтом К3ЕДТА (етилендіамінтетраоцтовою кислотою) для отримання плазми та виділення мононуклеарних клітин та без антикоагулянта для отримання сироватки.

5 мл було використано для планового аналізу крові, завершеного за допомогою гематологічного аналізатора Swelab Alfa Basic (Boule Medical AB, Швеція) у Київській міській клінічній лікарні №4. Частину зразків крові негайно транспортували до Інституту клітинної терапії, де плазму та сироватку відокремлювали, швидко заморожували та зберігали при -80 °C для виявлення цитокінів та дослідження мікро РНК.

2.7 Отримання плазми та сироватки з периферійної крові

Для отримання плазми і сироватки пробірки з периферійною кров'ю центрифугували при 1500 об/хв протягом 20 хв, після чого відбирали плазму та сироватку в кроіампули і зберігали при -80°C до виділення мікроРНК або проведення ІФА.

2.8 Виділення мононуклеарних клітин із периферійної крові

До периферійної 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 з щільністю 1,077 г/мл (Ficoll-Paque PLUS density gradient media, Cytiva) в кожну. На фікол в кожну пробірку поступово наносили кров з DPBS та центрифугували в свінг-бакет роторі (5702R, Eppendorf) без гальмування при 400 g та 20°C протягом 30 хвилин для відокремлення плазми, еритроцитів та

мононуклеарів. 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°C протягом 10 хвилин, потім видаляли надосад і до осаду додавали 4 мл буферу для лізису еритроцитів (Lysing Buffer, BD Pharm Lyse™), клітини перемішували та інкубували 5 хвилин при 20°C. Для припинення реакції додавали 10 мл DPBS + 2% FBS та осаджували клітини при 300 g та 20°C протягом 10 хвилин. Надосад видаляли та мононуклеарні клітини периферійної крові (МКПК) розчиняли в 1 мл DPBS та проводили підрахунок кількості та життєздатності клітин.

2.9 Кріоконсервування мононуклеарних клітин периферійної крові

Кріоконсервування мононуклеарних клітин периферійної крові пацієнтів проводили в середовищі, що містило 90% фетальної бичачої сироватки та 10% диметилсульфоксиду (DMSO, Sigma), в кріоампулах по 1 мл (106 клітин) на програмному заморожувачі (ЗП6, СКТБ з ДПІПК та К НАНУ) з поступовим зниженням температури (1 °С/хв) до -6 °С, потім із зниженням 0,5 °С /хв до -15°С, потім із зниженням 1 °С /хв до -32 °С, потім із зниженням 10 °С /хв до -140 °С, після чого розміщували кріоампули на постійне місце зберігання до сховища (ХБ-05) в середовищі рідкого азоту при температурі -196 °С.

2.10 Розморожування мононуклеарних клітин периферійної крові

Для кожного зразка мононуклеарних клітин периферійної крові, які потрібно розморозити готували по одній центрифужній пробірці об'ємом 15 мл з теплим середовищем RPMI-1640 (Gibco), що містило 10% інактивованої теплом сироватки (cRPMI). Кріоампулу з рідкого азоту або сухого льоду переносили до водяної бані з температурою 37°C на 2 хвилини. Коли в кріоампулі залишався невеликий шматочок льоду, переносили кріоампулу до боксу 2-го класу біобезпеки. Обробляли кріоампулу зовні дезінфікуючим засобом перед відкриттям, щоб запобігти контамінації. Додавали по краплях 1 мл теплого cRPMI до кріоампули, що містила 1 мл суспензії клітин, повільно протягом 30 секунд. 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 розчиняли в 1 мл теплого cRPMI та кількість клітин підраховували в гемоцитометрі Нойбауера. Життєздатність клітин визначали методом виключення трипанового синього (Sigma, США) або барвника 7-AAD методом проточної цитометрії.

2.11 Виділення мікро РНК та оцінка її якості

Виділення мікро РНК зі плазми крові проводилось з використанням спеціалізованого набору NucleoSpin miRNA Kit (Macherey-Nagel, France) відповідно до вимог виробника.

Отриману мікро РНК розчиняли у 50 мкл води, вільної від нуклеаз. Концентрацію визначали за допомогою спектрофотометра NanoDrop 2000 (“Thermo Scientific”, США).

2.12 Зворотно-транскрипційна реакція синтезу кДНК на міРНК

2.12.1 Реакція поліаденілювання. Після виділення мікро РНК 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 мМ) – 1 мкл. Наступним до суміші додавали 10 мкл мікро РНК. В кінці додавали 1 мкл E.coli poly A polymerase та обережно перемішували вміст пробірок.

Інкубували зразки 30 хв при +37 °С для активного поліаденілювання та зупиняли процес підвищуючи температуру до +95 °С 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 °С.

2.12.2 Зворотно-транскрипційна реакція. Зворотну транскрипцію проводили з використанням набору High-Specificity miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, США) за відповідним протоколом. 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.

2.13 Кількісний аналіз вмісту мікро РНК

Визначення концентрацій мікро РНК в досліджуваних зразках проводили шляхом кількісної ПЛР у реальному часі за допомогою набору 5X HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (no ROX) (Solis BioDyne, Естонія). U6 використовувалась як референсна РНК, відносно якої вимірювалась концентрація досліджуваних мікро РНК. Для проведенні кількісного ПЛР використовували праймери зазначені в Таблиці 2. В якості зворотного праймеру для міРНК використовувався універсальний зворотній праймер (Universal primer) з набору для синтезу High Specificity miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, США).

Таблиця 2 – Послідовність праймерів для визначення мікро РНК у плазмі крові.

Назва	Послідовність прямого праймеру, 5’ — 3’	Послідовність зворотнього праймеру, 5’ — 3’
hsa-miR-21-5p	TAGCTTATCAGACTGATGTTGA	Universal primer
hsa-miR-27a-3p	TTCACAGTGGCTAAGTTCCGC	
hsa-miR-126-3p	TCGTACCGTGAGTAATAATGCG	
hsa-miR-133a-3p	TTTGGTCCCCTTCAACCAGCTG	
hsa-miR-146a-5p	TGAGAACTGAATTCCATGGGTT	
hsa-miR-221-3p	AGCTACATTGTCTGCTGGGTTTC	
hsa-miR-92a-3p	TATTGCACTTGTCCCGGCCTGT	
hsa-miR-124-3p	TAAGGCACGCGGTGAATGCCAA	
hsa-miR-424-5p	CAGCAGCAATTCATGTTTTGAA	
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGA ATTTGCGT

ПЛР у реальному часі проходив за наступних умов: 15 хв при 95 °С для активації полімерази, 15 с при 95 °С для денатурації кДНК, 20 с при 60 °С для анеалінгу праймерів. Останні два етапи повторювали 44 рази. Після чого отримували криві плавлення продуктів реакції для підтвердження відповідності отриманого продукту. Для кожного зразку реакції ставились у трьох повторах.

2.14 Проточна цитофлуориметрія

Кріоконсервовані мононуклеарні клітини периферійної крові розморожували на водяній бані при 37 °С 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 °С, 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 послідуючим центрифугуванням при 350 g протягом 5 хв при +4 °С. Перед аналізом клітини обережно ресуспендували в 300 мкл буфера для промивання клітин.

Антитіла, що використовувалися для проточної цитометрії для визначення субпопуляції лімфоцитів, перераховані в Таблиці 3. Для визначення життєздатних клітин використовували барвник 7-аміноактиноміцин D (7-AAD, BD Biosciences, США).

Таблиця 3 – Антитіла, використані для проточної цитометрії.

Назва	Флуорохром	Клон	Кат. №	Лот	Субпопуляція клітин
CD1c	PE	F10/21A3	564900	0162405	Мієлоїдні дендритні клітини
CD3	FITC	HIT3a	555339	0064351	Т клітини
CD4	PE	RPA-T4	555347	0128475	Т хелпери
CD8	APC-Cy7	SK1	557834	0247872	Т клітини
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	HIB19	562294	0230909	В 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	Т клітини пам'яті
CD56	PE	B159	555516	0160477	NK
CD57	APC	NK-1	560845	0212460	Старіючі 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 (PD1)	PerCP-Cy™5.5	EH12.1	561273	0300813	Старіючі клітини

Продовження Таблиці 3.

Назва	Флуорохром	Клон	Кат. №	Лот	Субпопуляція клітин
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 1×10^5 клітин 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 Таблиці 4.

Таблиця 4 – Послідовність відділення відповідних субпопуляцій імунних клітин.

Субпопуляція клітин	Клас клітин
$CD45^+$/SSC	$CD45^+$ мононуклеари
$CD45^+14^+$	моноцити
$CD45^+CD3^+$	Т-клітини
$CD45^+3^-19^+$	В-клітини
$CD45^+3^-16/56^+$	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

Продовження Таблиці 4.

$CXCR3^+CD3^+CD4^+CD8^-$ $CXCR3^+CD3^+CD4^-CD8^+$	Ефекторні $CD4^+$ Т клітини Ефекторні $CD8^+$ Т клітини
$CD3^+CD4^+CD8^-HLA\text{-}DR^+$ $CD3+CD4\text{-}CD8+HLA\text{-}DR^+$	Активовані $CD4^+$ Т клітини Активовані $CD8^+$ Т клітини
$CD4^+CD45RO^+$	Т-клітини пам’яті
$CD45^+CD1c^+HLA\text{-}DR^+$	Класичні дендритні клітини
$CD45^+CD303^+HLA\text{-}DR^+$	Плазмоцитарні дендритні клітини
$CD3^+CD4^+CD57^+PD1^+$	Зрілі $CD4^+$ Т клітини
$CD3^+CD8^+CD57^+PD1^+$	Зрілі $CD8^+$ Т клітини
$CD3^+CD4^+CD57^+PD1^+CD45RO^{+/-}$ $CD3^+CD8^+CD57^+PD1^+CD45RO^{+/-}$	Зрілі $CD4^+$ Т клітини пам'яті Зрілі $CD8^+$ 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
$CD3^+CD4^+HLA\text{-}DR^{+/-}PD1^{+/-}$	Виснажені $CD4^+$ Т клітини пам’яті
$CD3^+CD8^+HLA\text{-}DR^{+/-}PD1^{+/-}$	Виснажені $CD8^+$ Т клітини пам’яті

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. Щоб уникнути включення в аналіз гранулоцитів, CD45-позитивні мононуклеарні клітини були вилучені з усіх подій на основі сигналу бічного світлорозсіювання з наступним синглетним порогом. 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 старіючі CD57+ або CD279+ клітини. Серед дендритних клітин були визначені наступні субпопуляції CD1c, CD11b, CD11c та CD303.

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 старіючі CD57+ або CD279+ клітини. Серед дендритних клітин були визначені наступні субпопуляції CD1c, CD11b, CD11c та CD303.

2.15 Вимірювання цитокінів

Вміст С-реактивного білка у сироватках крові пацієнтів визначали за допомогою AccuBind (Monobind, США) відповідно до інструкцій виробника. Межа виявлення становила 0,014 мкг/мл. Для виявлення G-CSF, IL-2, IL-6, TNF-α, IP-10 та MIP-1α проводили імуноферментний аналіз (ІФА) за допомогою наборів Invitrogen відповідно до інструкцій виробника. Для вимірювання кожного параметра були використані наступні ІФА та стандартні розчини, виробництва Instant ELISA (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Австрія): людський G-CSF (BMS2001INST), IL-2 (BMS221INST); IL-6 (BMS213INST), TNF-α (KHC3014), IP-10 (BMS284INST), MIP-1α (KAC2201), виробництва Sigma (Сполучене Королівство): ANGII (RAB0010), RAGE (RAB0007) та виробництва R&D Systems (США): NT-pro-BNp (DY3604-05) і SP-D (DSFPD0). Чутливість становила відповідно: 11 пг/мл для G-CSF; 2,3 пг/мл для IL-2; 0,92 пг/мл для IL-6; 0,13 пг/мл для TNF-α; 1 пг/мл для IP-10; 2 пг/мл для MIP-1α; 2,6 пг/мл для ANGII; 3 пг/мл для RAGE та 0,38 нг/мл для сурфактанта D. Усі вимірювання поглинання проводилися на

HumaReader HS (Human GmBH, Німеччина). Всі вимірювання проводилися в двох технічних повторах у всіх точках спостереження для кожного пацієнта.

2.16 Статистичний аналіз

Для статистичного аналізу було використано програмне забезпечення SPSS версії 27.0 (SPSS Inc.). Дані представлені як медіана та міжквартильний інтервал (IQR). Непараметричний критерій Вілкоксона був використаний для порівняння зв'язаних показників в залежності від часу спостереження. Для порівняння відмінностей між групами котролю, МСК та здоровими донорами в кожній точці часу використовували U-тест Манна-Уітні. Для перевірки взаємозв'язку між змінними було проведено непараметричний кореляційний тест Спірмена. Двостороннє значення $p < 0,05$ вважалося статистично значущим. Для візуалізації даних використовувалося програмне забезпечення GraphPad Prism (v.7.0a, Inc. Сан-Дієго, Каліфорнія, США).

Рівень експресії мікро РНК вираховували по відношенню до рівню експресії *U6* в пробі. Відносний рівень значень експресії мікроРНК розраховували за методом $2^{\Delta\Delta Ct}$, де $\Delta\Delta Ct=\Delta Ct_{U6}-\Delta Ct_{\text{таргетна мікро РНК}}$. Для оцінки статистичної значущості відмінностей між групами використовували непараметричний тест Манн-Уітні.

РОЗДІЛ 3
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Основні характеристики пацієнтів, залучених до дослідження

Всього було залучено 27 важких пацієнтів з COVID-19, госпіталізованих у Київську клінічну лікарню № 4 і які підписали письмову інформовану згоду щодо участі у дослідженні. Детальні характеристики пацієнтів наведені вище у Таблиці 1. Середній вік для груп COVID-19, МСК та контрольної становить 62,0 (55-64,0), 52 (32-71) та 62,0 (36,2-67,0) років відповідно, а інтервал від початку прояву симптомів захворювання COVID-19 до госпіталізації складав 11,0 (8,5-12,8) днів для контрольної COVID-19 групи та 12,3 (8,9-15,6) дні для МСК групи.

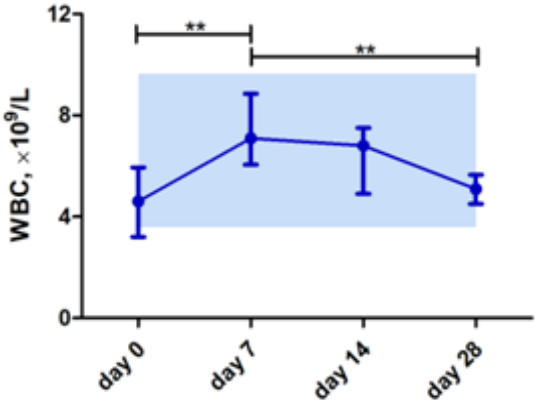
3.2 Динамічний профіль гематологічних показників у пацієнтів з COVID-19

Динаміка параметрів крові у пацієнтів із COVID-19 (контроль) та МСК груп залежно від часу спостереження представлено на рисунку 2. Збільшення кількості лейкоцитів та гранулоцитів на 7 день характерно для обох груп, потім в МСК групі відбувається їх зменшення на 14 день, яке залишається на цьому рівні до 28 дня, тоді як в COVID-19 групі йде поступове зменшення до 28 дня. Загальний відсоток нейтрофілів поступово зменшувався протягом 28-ми днів в обох групах, але відсоток юних нейтрофілів в МСК групі на 14 день був достовірно нижчим. Відсоток нейтрофілів на день 0 в контрольній і МСК групах позитивно корелював з ступенем фіброзування легень за даними комп'ютерної томографії на 2 тижні від початку госпіталізації з коефіцієнтами кореляції $r=0,644$ ($p<0.005$, $n=12$) та $r=0,905$ ($p<0.005$, $n=8$), відповідно. Зростання відсотка лімфоцитів відбувалося в обох групах і

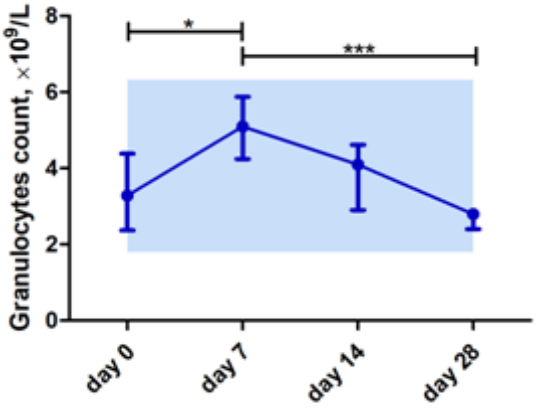
досягло достовірної різниці порівняно з початком госпіталізації на 28 день спостереження. Також на 28 добу відсоток лімфоцитів був достовірно вищим в МСК групі порівняно з контрольною групою. Кількість лімфоцитів регулярно зростала, при чому в МСК групі подвоєння кількості лімфоцитів відбулося на 7-й день, в той час як в COVID-19 групі лише на 14-й. На день 0 та 7 в контрольній групі кількість лімфоцитів негативно корелювала з ступенем фіброзування легень за даними комп'ютерної томографії на 2 тижні від початку госпіталізації з коефіцієнтами кореляції r=-0,821 ($p<0.001$, n=12) та r=-0,818 ($p<0.005$, n=12), відповідно. Негативна кореляція між кількістю лімфоцитів і даними комп'ютерної томографії спостерігається і в МСК групі на 7, 14 та 28 день з коефіцієнтами r=-0,831 ($p<0.05$, n=8), r=-0,821 ($p<0.05$, n=7) та r=-0,921 ($p<0.05$, n=6), відповідно. Порівняно з 0-им днем, відсоток еозинофілів значно збільшився на 28-й день в контрольній групі, а в МСК групі спотерігалося незначне але достовірне зростання. Відсоток еозинофілів корелював з даними комп'ютерної томографії на 2 тижні від початку госпіталізації в контрольньній групі на день 0 (r=-0,76, $p<0.005$, n=12), а в МСК групі на день 7 (r=-0,77, $p<0.05$, n=8). Кількість тромбоцитів в обох групах позначилась різким піком на 7-й день і зниженням до 28 дня, однак усі значення лежали в межах норми (125,0-350,0 × 10^9/л). Статистично значуще зниження показника швидкості осідання еритроцитів (ШОЕ) в контрольній групі спостерігалося лише на 28 день порівняно з 0-днем, в той час як в МСК групі достовірне зниження цього показника реєстрували з 7го дня. Позитивна кореляція між ШОЕ та даними комп'ютерної томографії на 2 тижні спостерігалась для контрольній групі на дні 7 (r=0,77, $p<0.01$, n=12) та 14 (r=0,679, $p<0.05$, n=11), а для МСК групи на день 0 (r=0,934, $p<0.001$, n=8). Відсоток моноцитів знаходився в межах норми в обох групах, але в МСК групі достовірно зростав, починаючи з 14 дня, та на день 0 негативно корелював з даними даними комп'ютерної томографії з коефіцієнтом r=-0,719 ($p<0.05$, n=8). Такі параметри, як, кількість еритроцитів та вміст гемоглобіну

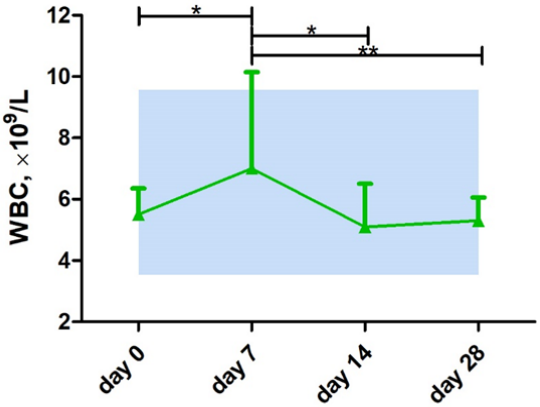
не змінювалися під час прогресування COVID-19 та раннього одужання в обох групах.

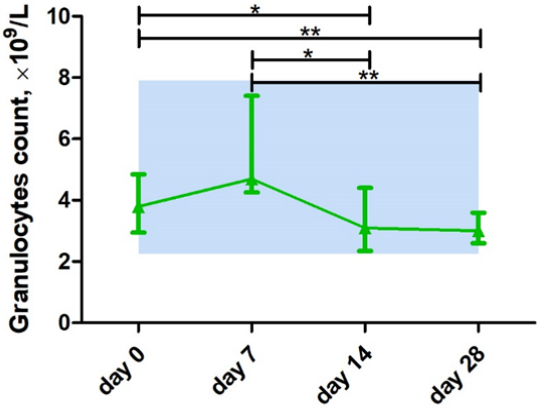
Кількість лейкоцитів

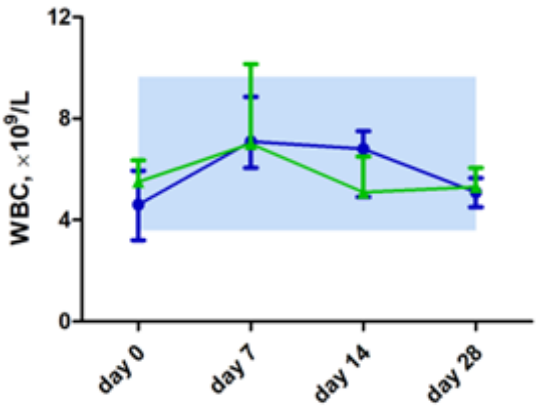


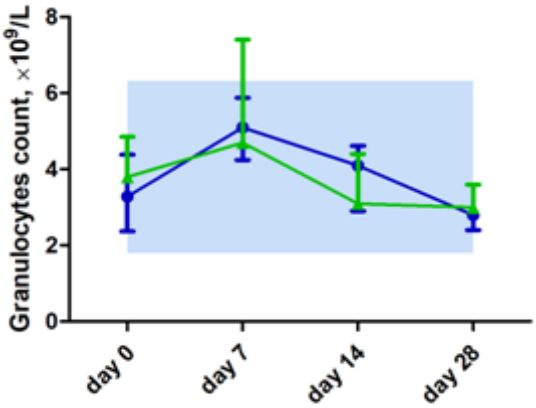
Кількість гранулоцитів







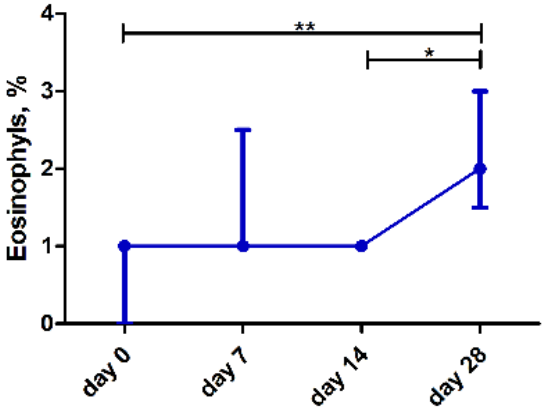


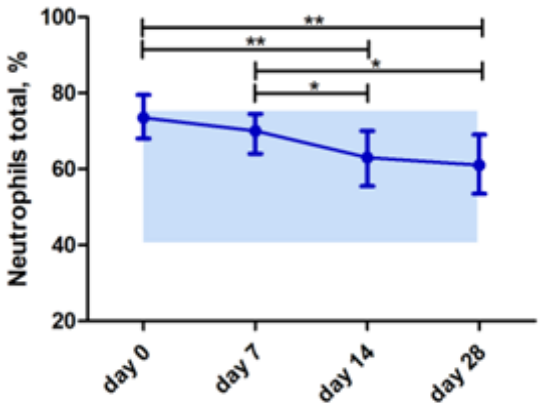


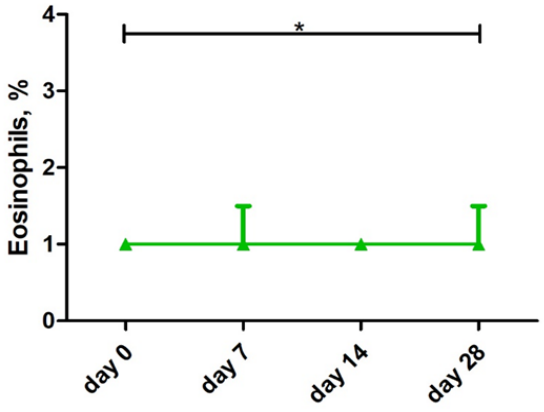
Продовження рис.2

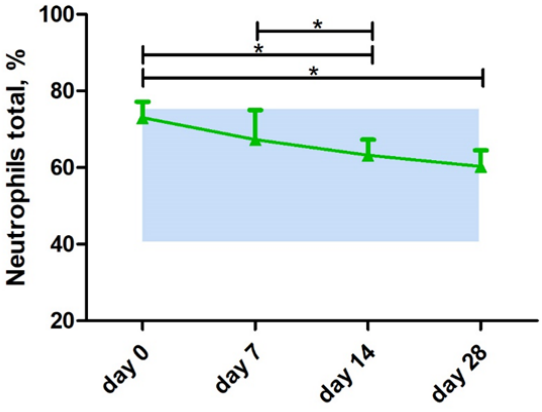
% еозинофілів

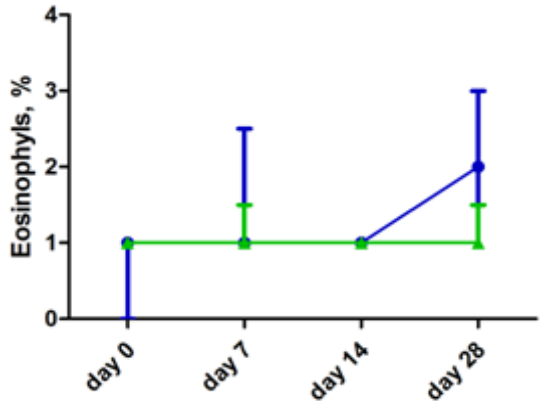
% нейтрофілів

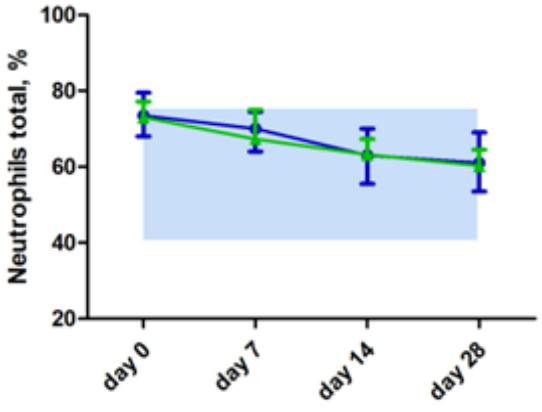






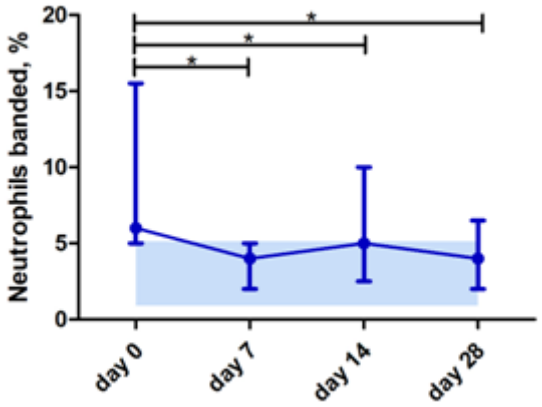


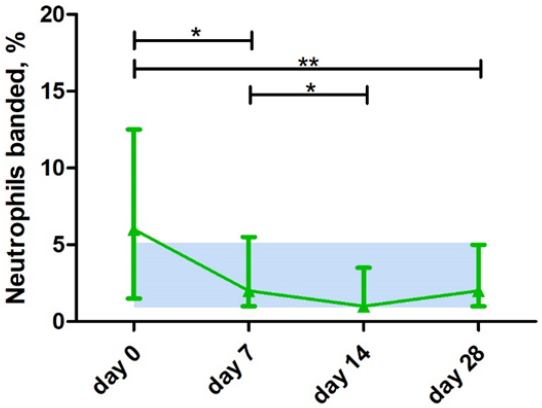


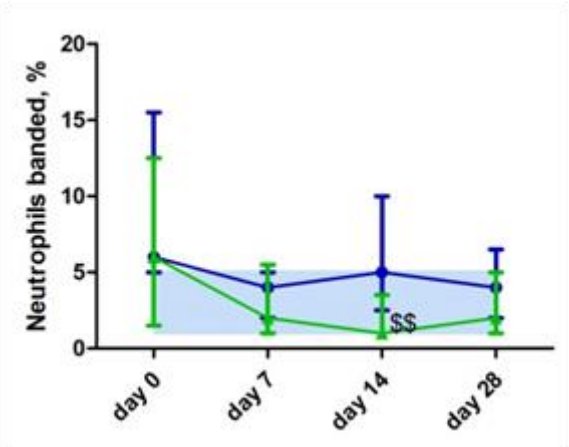


Продовження рис.2

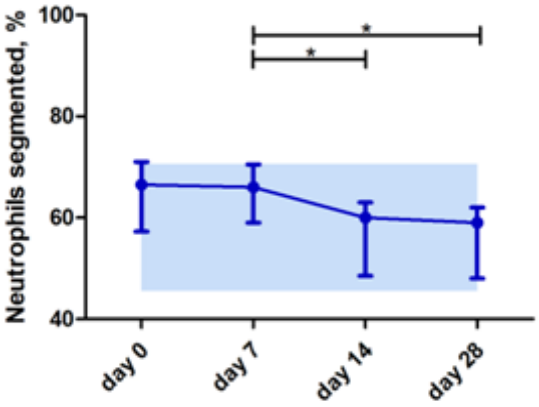
% юних нейтрофілів

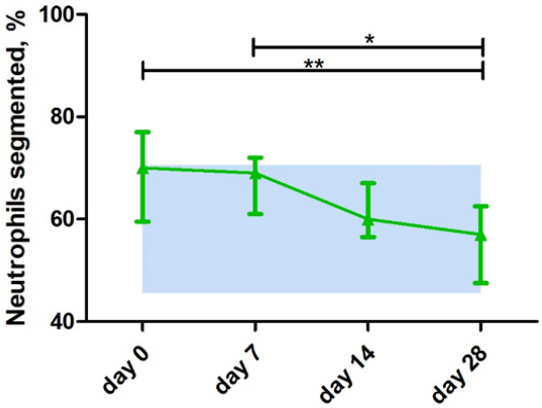


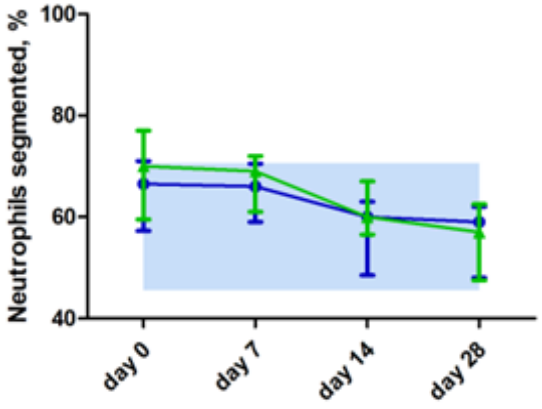




% зрілих нейтрофілів



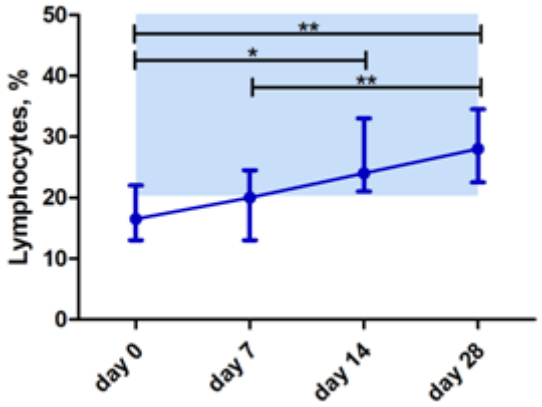


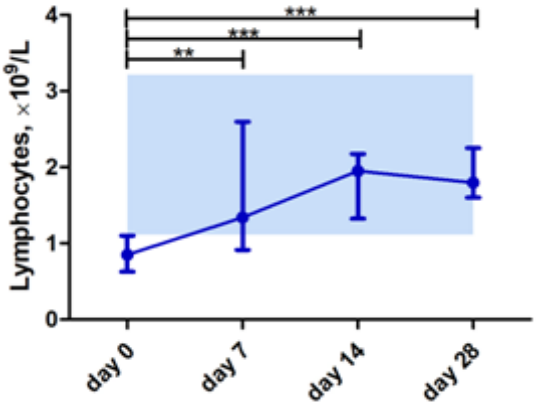


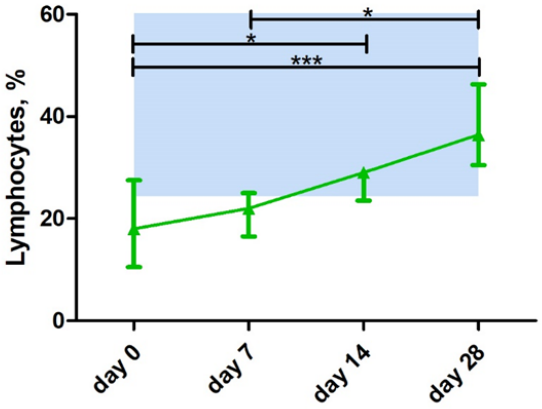
Продовження рис.2

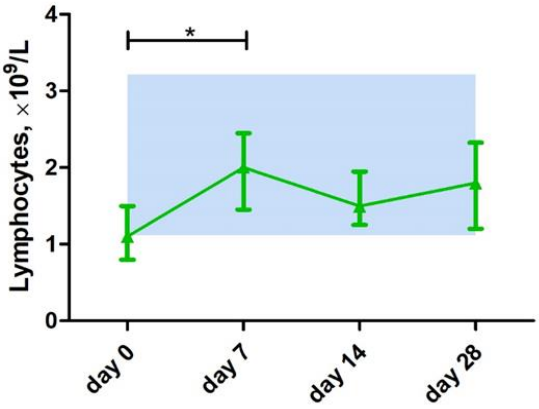
% лімфоцитів

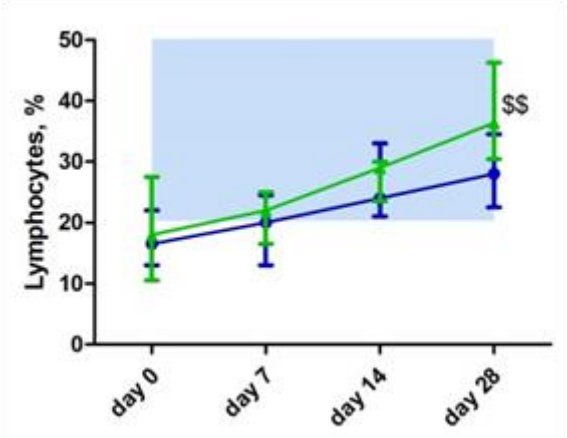
Кількість лімфоцитів

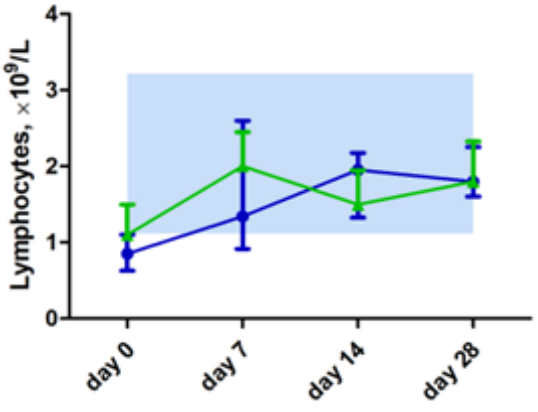








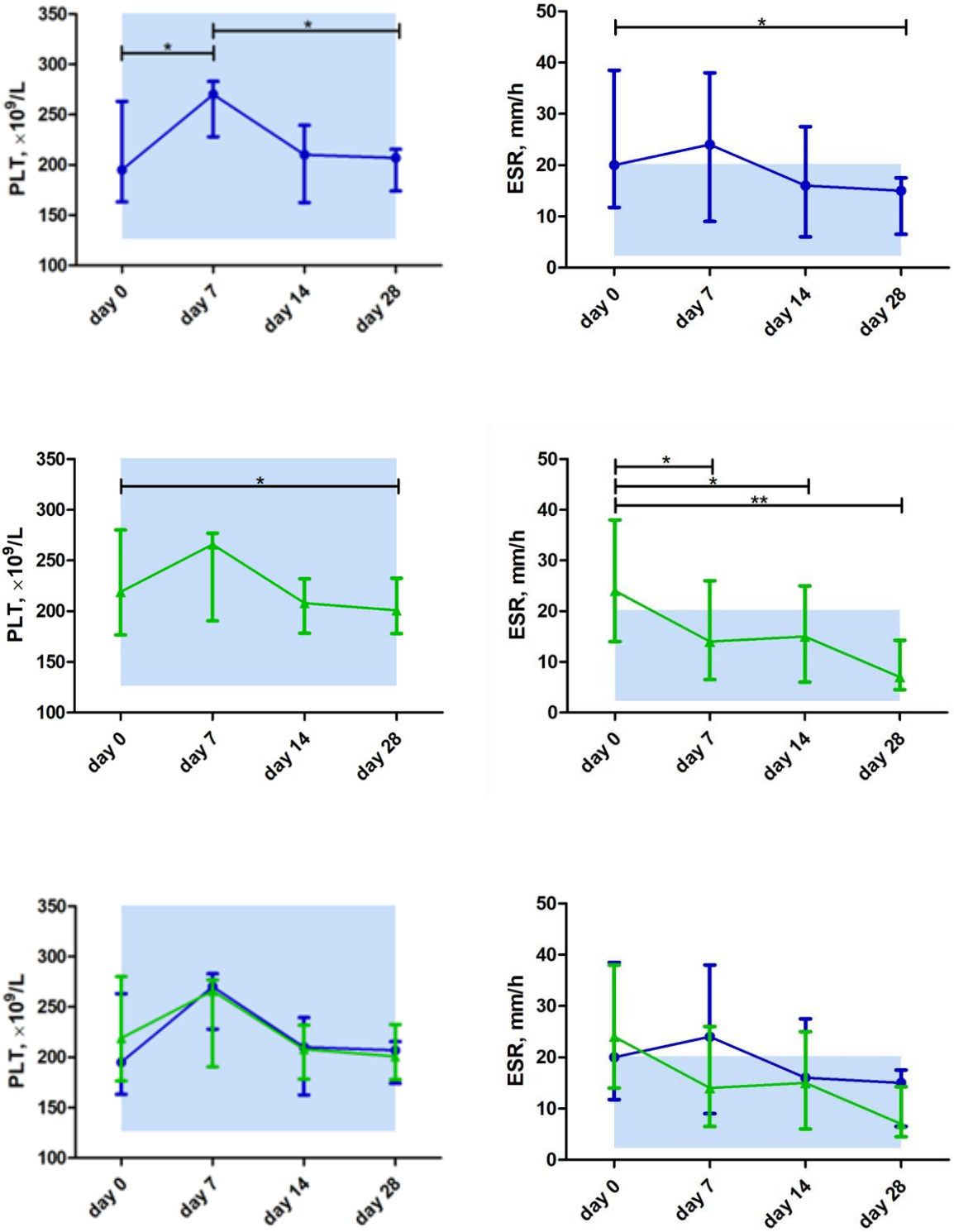




Продовження рис.2

Кількість тромбоцитів

ШОЕ



Продовження рис.2

% моноцитів

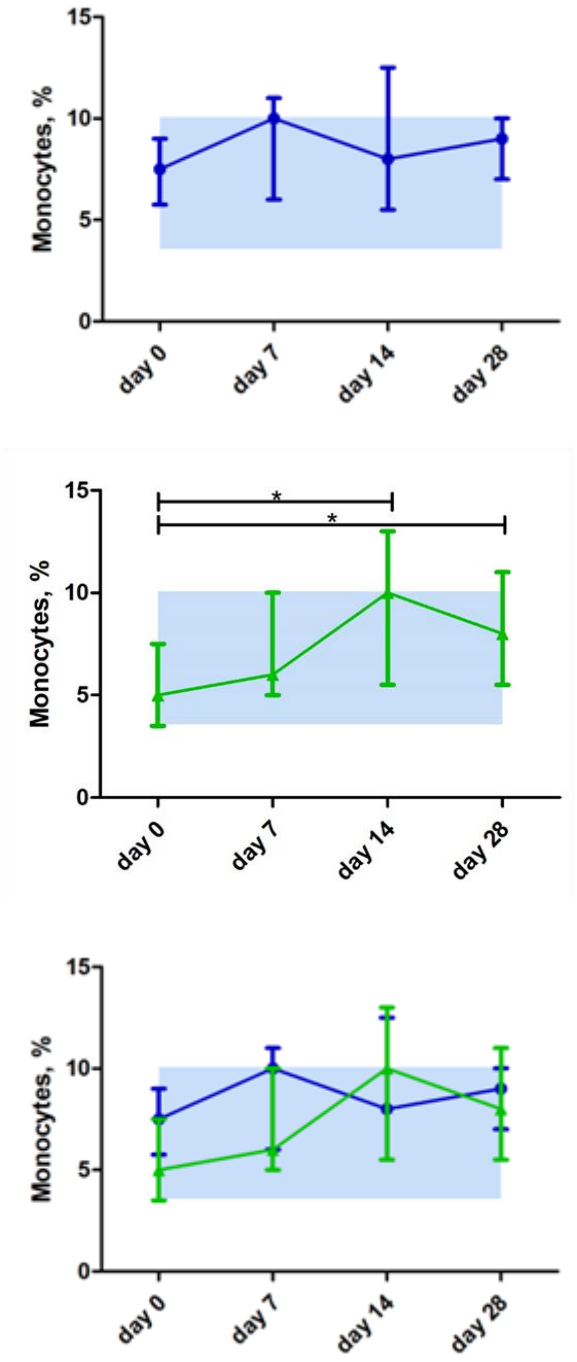
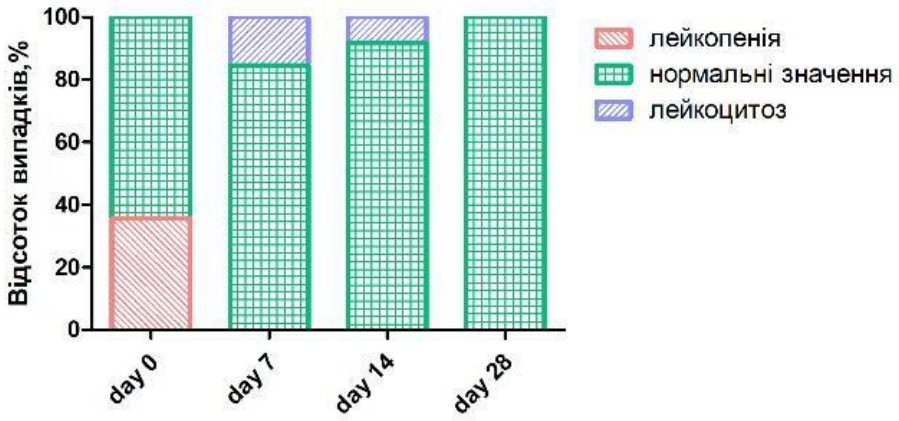
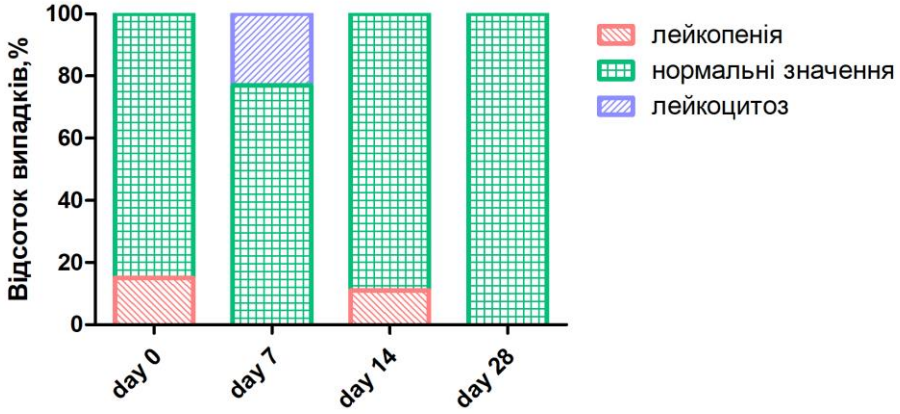


Рис 2. Зміни гематологічних показників у пацієнтів COVID-19 та МСК груп в динаміці. Дані представлені як медіана та міжквартильний інтервал. Блакитною зоною відображено інтервал, в межах якого знаходяться нормальні значення показників. Критерій Вілкоксона: * - p≤0.05; ** - p≤0.01; *** - p≤0.001. Синя лінія (коло) - група контролю COVID-19, зелена лінія (трикутник) - МСК група.

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, тоді як на 7-й день лейкоцитоз мали 2 з 13 (15,38 %) пацієнтів в COVID-19 групі та 3 з 13 (23,07 %) пацієнтів в МСК групі. Лімфопенія (<1,1 × 10^9/л) спостерігалася у 12 з 14 (85,71 %) пацієнтів з COVID-19 на 0-й день і не була відмічена на 28-му дні, в той час як в МСК групі лімфопенію мали 7 з 13 (53,84 %) пацієнтів на 0 день (рис 3-4) і лише 1 з 10 (10 %) пацієнтів на 28-му добу.

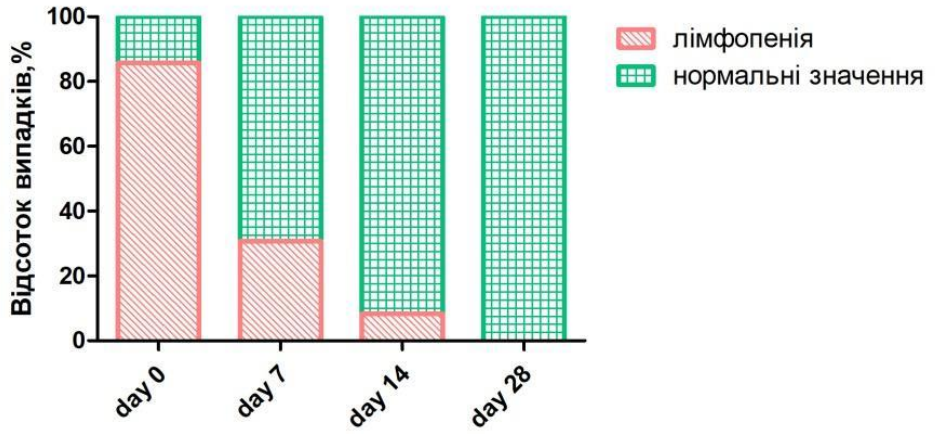


A

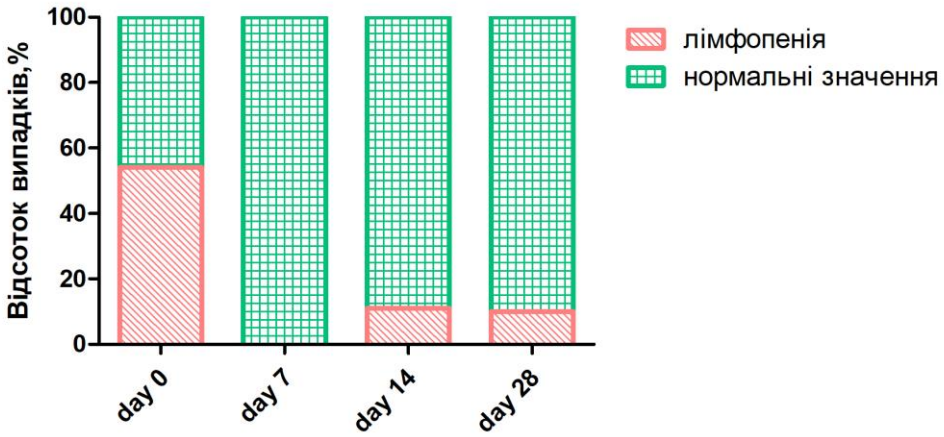


B

Рис 3. Відсоток хворих з лейкопенією або лейкоцитозом в контрольній COVID-19 (A) та МСК (B) групі в залежності від прогресування COVID-19



A



B

Рис 4. Відсоток хворих з лімфопенією в контрольній COVID-19 (A) та МСК (B) групі в залежності від прогресування COVID-19

Подібну динаміку у підвищених нейтрофілах порівняно зі зниженням лімфоцитів у важких пацієнтів з COVID-19 раніше повідомляли Liu *et al* [65]. Інші дослідження також показали, що важкі пацієнти з пневмонією COVID-19 мають імунну недостатність, що в свою чергу призводить до серйозної інфекції та смерті [66]. Зниження лімфоцитів може бути спричинено розрегульованою продукцією цитокінів [1], руйнуванням лімфатичних органів [67] та міграцією циркулюючих CD8+ лімфоцитів у легені [68-69].

Таким чином нами встановлено, що COVID-19 супроводжується в більшості випадків лейопенією, 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 (юних) нейтрофілів.

3.3 Рівні цитокінів у плазмі крові хворих на COVID-19

Результати аналізу рівнів цитокінів і хемокінів у плазмі крові у групах МСК, контрольній COVID-19 та групі здорових волонтерів представлені на рис. 5. Протягом першого тижня госпіталізації вміст С-реактивного білку (СРБ) у плазмі хворих на COVID-19 у контрольній групі був значно вищим порівняно з групою здорових волонтерів і знижувався з 7-го по 28-й день спостереження. 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 з коефіцієнтами кореляції $r=0.905$ ($p\leq0.002$, $n=8$) та $r=0.741$ ($p\leq0.006$, $n=12$) відповідно. Цікаво, що рівень СРБ знижувався на 7 добу в МСК групі на відміну від контрольної групи хворих. Таким чином ми припускаємо, що трансплантація МСК супресувала запалення спричинене COVID-19. Потрібно відмітити, що подібні результати були отримані іншими групами [18, 25, 31]. Рівень СРБ в крові хворих на ковід в МСК групі позитивно корелював з ШОЕ ($r=0.604$, $p\leq0.001$, $n=41$) та зрілими нейтрофілами ($r=0.463$, $p\leq0.005$, $n=42$) та негативно з відсотком лімфоцитів ($r=-0.577$, $p\leq0.001$, $n=42$) та кількістю NT-proBNP ($r=-0.588$, $p\leq0.001$, $n=39$). В COVID-19 групі було виявлено позитивну кореляцію між СРБ і мієлоїдною підгрупою CD45+CD14+ ($r=0,343$, $p\leq0,001$) і негативну з плазмоцитоїдними дендритними клітинами ($r=-0,434$, $p\leq0,001$).

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, 14 та 28 доби. Достовірно

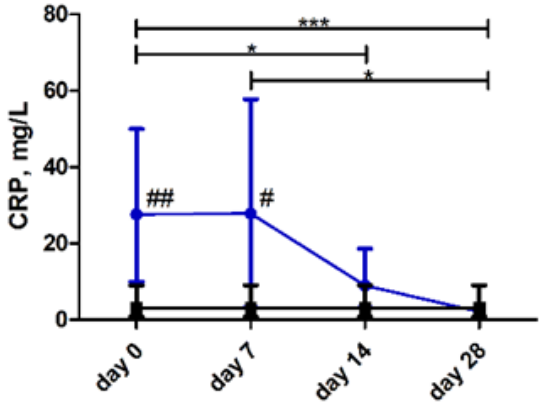
вищий рівень IP-10 в МСК групі а у порівнянні з контрольною групою на 28 добу. Рівні TNF-α та IP-10 у плазмі корелювали з клітинами CD45+CD3+ (r=0,378, p≤0,003 та r=0,471, p≤0,001 відповідно). IP-10 корелював з клітинами CD45+CD3-CD19+ (r=−0,413, p≤0,05) і регуляторними дендритними клітинами (r=0,375, p≤0,01), тоді як TNF-α негативно корелював із кількістю лімфоцитів (r=−0,372 , p≤0,01) та відсоток еозинофілів (r=−0,388, p≤0,01).

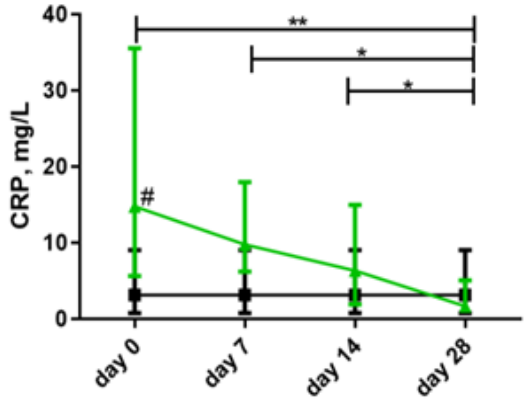
IP-10 є прогностичним маркером при COVID-19 [92], його зростання відмічається у складних випадках [93-94], і цей показник позитивно корелює з коагуляційним факторами такими як тромбіновий час та активований частковий тромбопластиновий час [95]. Також відомо, що експресія IP-10 зростає при впливі шипікового білку на ендотелій людини [96], при розвитку захворювань коронарних артерій [97], позитивно корелює зі ступеня оклюзії коронарних судин [98], при атеросклерозі коронарних судин та захворюваннях серця [99]. Підвищення рівня цього хемокіну властиво при порушенні ендотеліального бар'єру в головному мозку людини [100-102] при різних інфекційних захворюваннях.

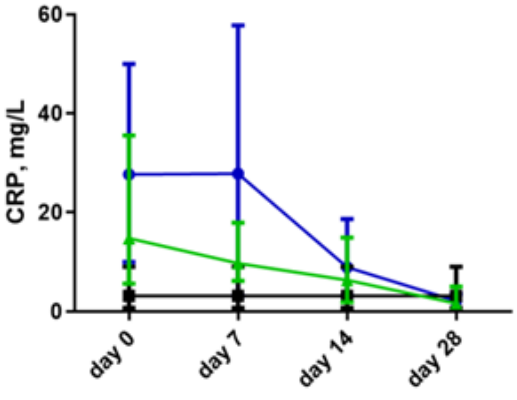
Цікаво, що високий рівень IP-10 асоціюється з високим титром антитіл після вакцинування. Також транзиторне підвищення CXCL10, IFN-g, IP-10/, IL-6 та CRP було відмічено на 2 день після COVID-19 вакцинування BNT162b2 mRNA (Pfizer/BioNtech) [103].

Таким чином підвищення IP-10 у МСК групи може свідчити про негативний вплив МСК на серцево-судинну систему, барєрну функцію ендотелію та запалення ендотелію, в якому головну роль відіграє гіперактивування коагуляційної системи [104]. Подібно до цього цитокіну MCP-1 та TNF-α також піднімається в крові пацієнтів хворих на з порушеннями ендотеліального бар'єру головного мозку [105-106] . У пацієнтів з високим рівнем в крові MCP-1 при коронавірусній хворобі також достовірно вищі показники підвищеного тромбоутворення [107].

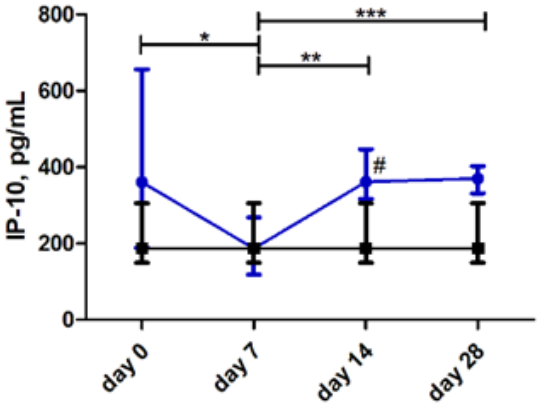
СРБ

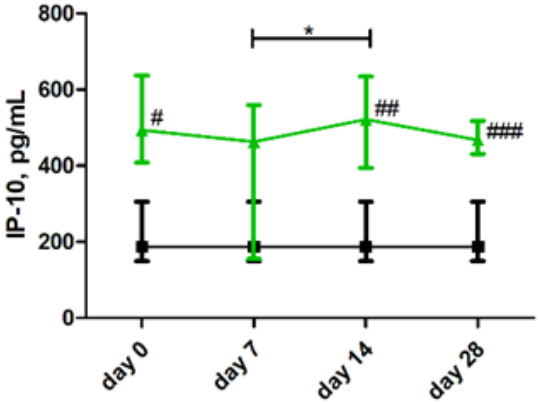

CRP, mg/L
80
60
40
20
0
***
*
*
##
#
day 0
day 7
day 14
day 28

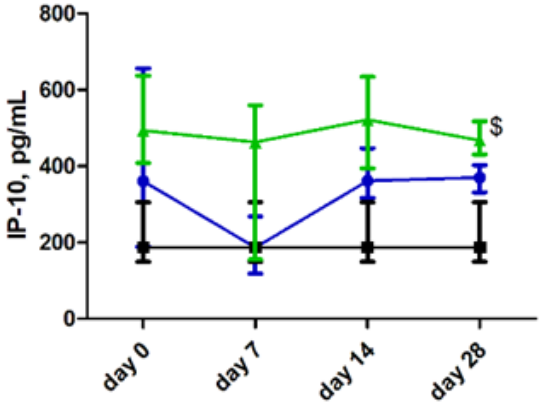

CRP, mg/L
40
30
20
10
0
**
*
*
#
day 0
day 7
day 14
day 28


CRP, mg/L
60
40
20
0
day 0
day 7
day 14
day 28

IP-10

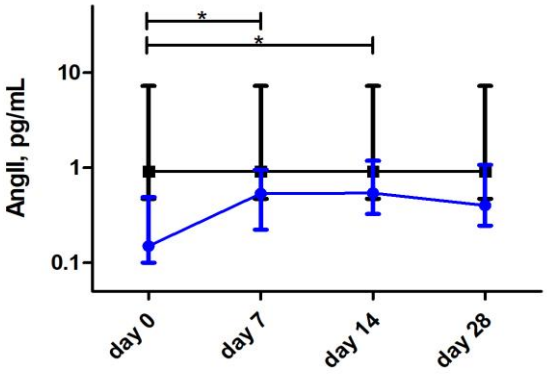

IP-10, pg/mL
800
600
400
200
0
*
***
**
#
day 0
day 7
day 14
day 28

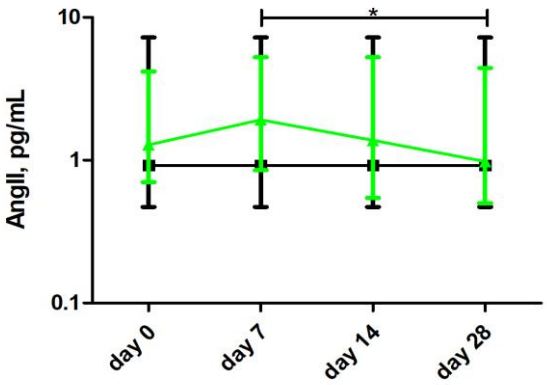

IP-10, pg/mL
800
600
400
200
0
*
#
##
###
day 0
day 7
day 14
day 28

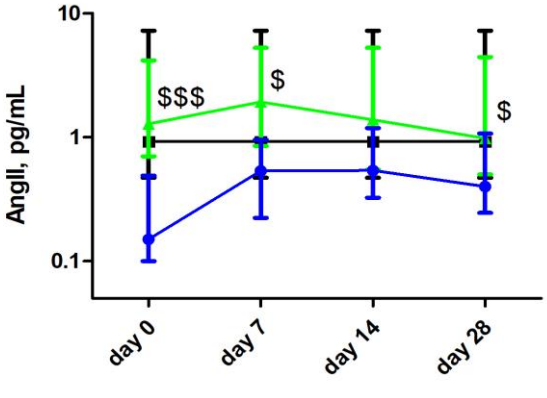

IP-10, pg/mL
800
600
400
200
0
$
day 0
day 7
day 14
day 28

Продовження рисунку 5.

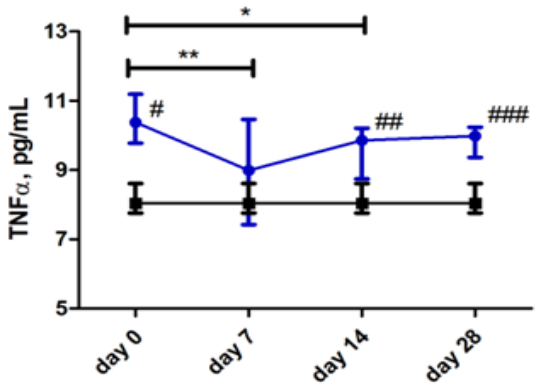
Ang II

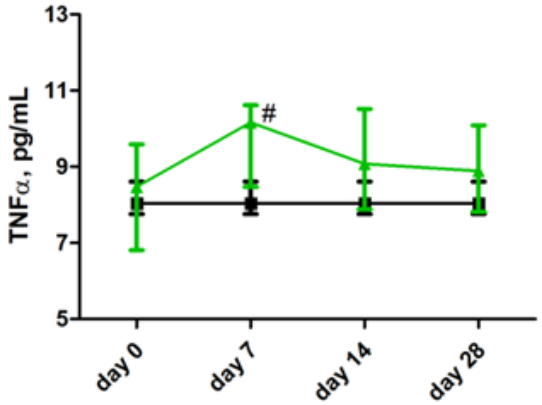


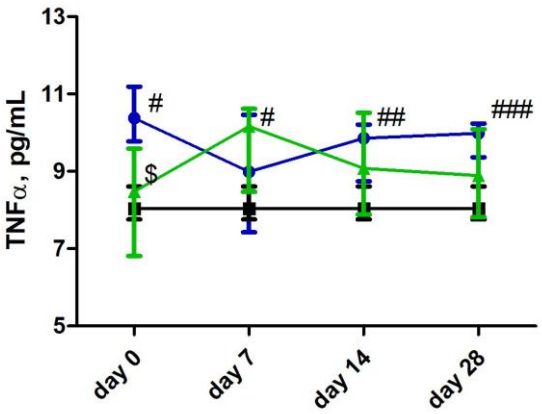




TNFα

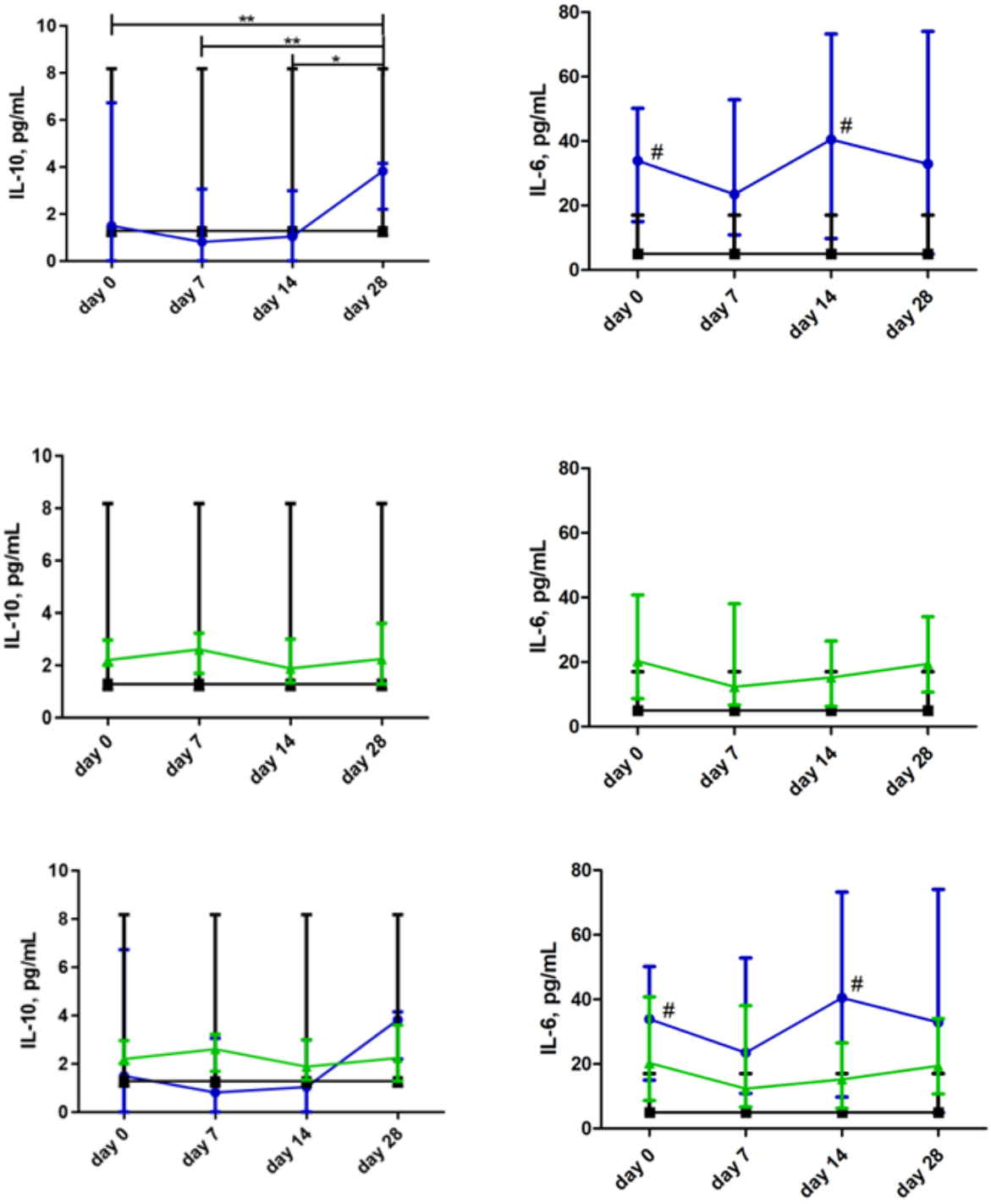






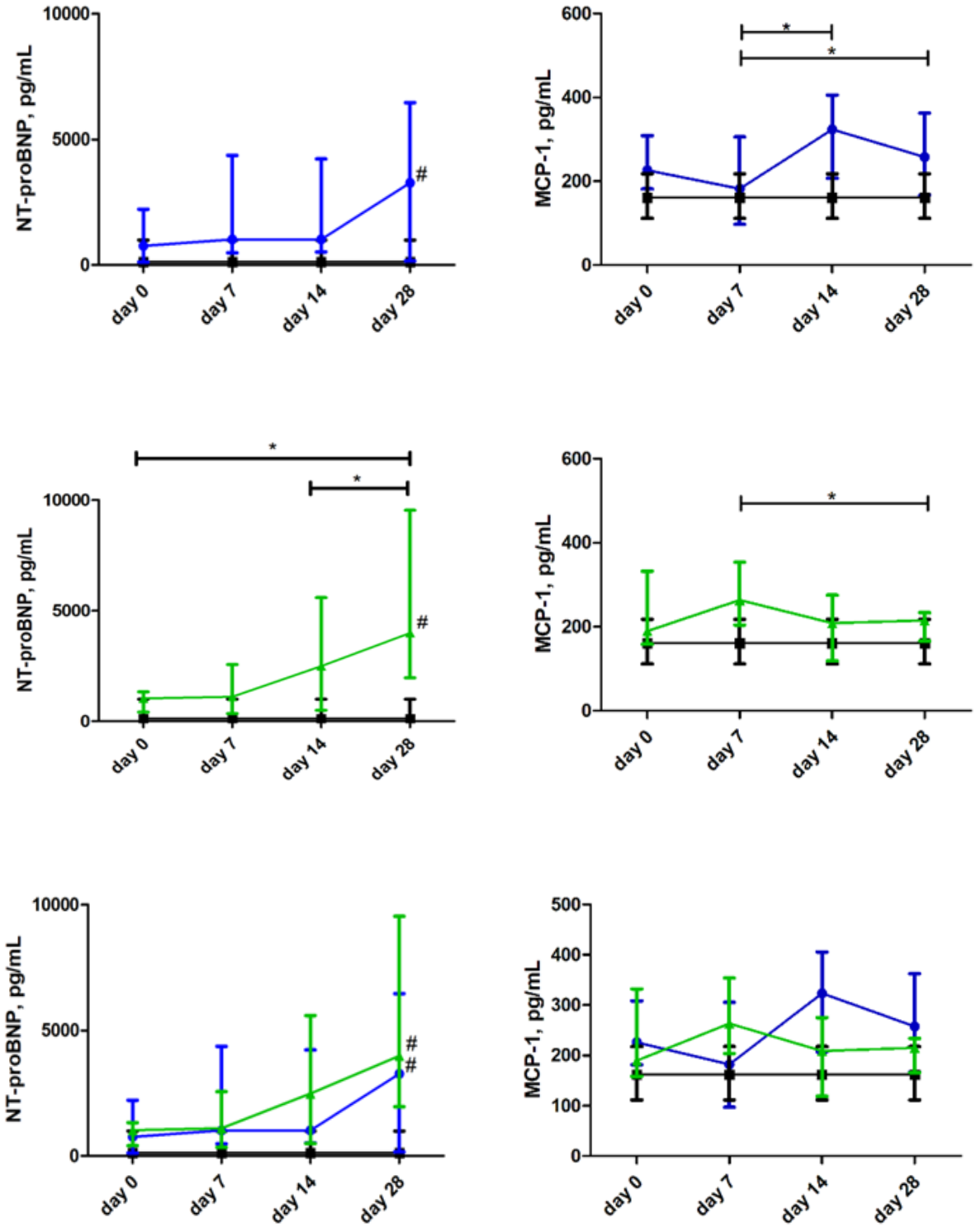
Продовження рисунку 5.

IL-10 IL-6



Продовження рисунку 5.

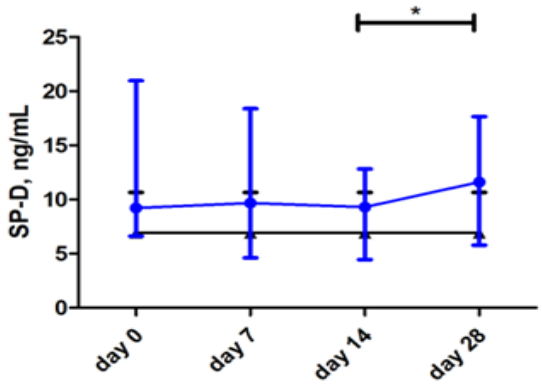
NT-proBNP MCP-1

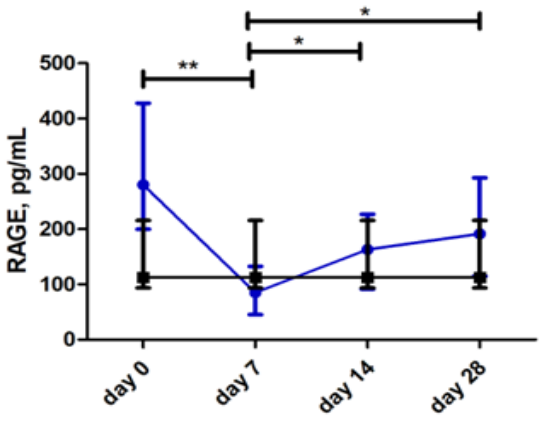


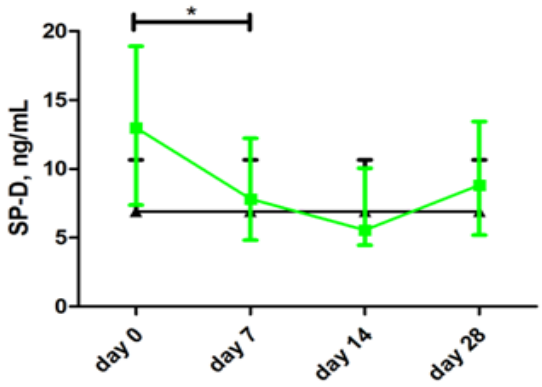
Продовження рисунку 5.

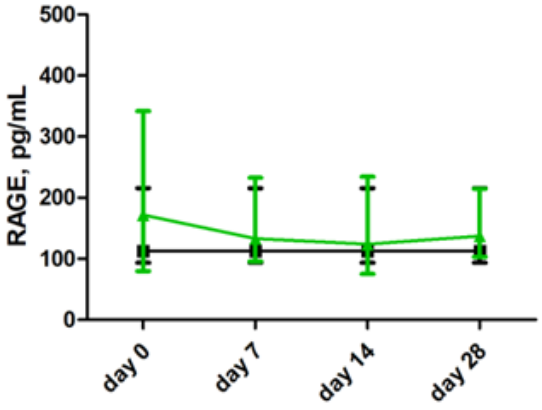
Сурфактант D

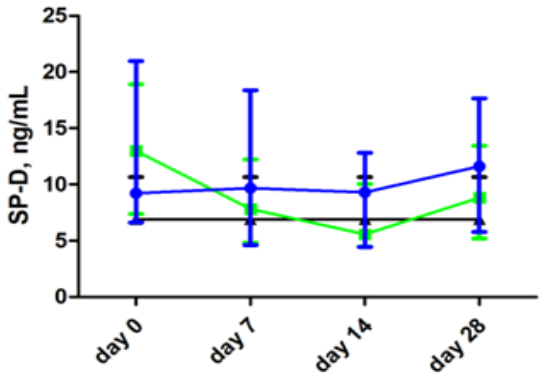
RAGE

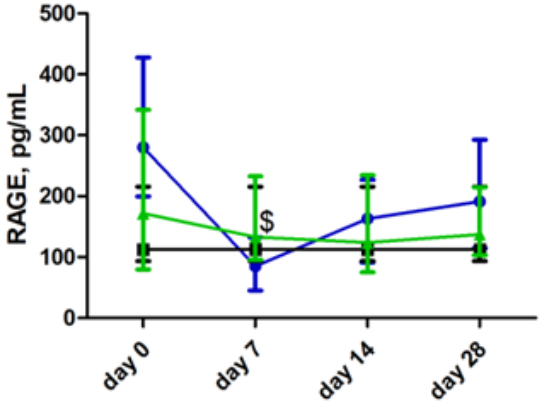












Продовження рисунку 5.

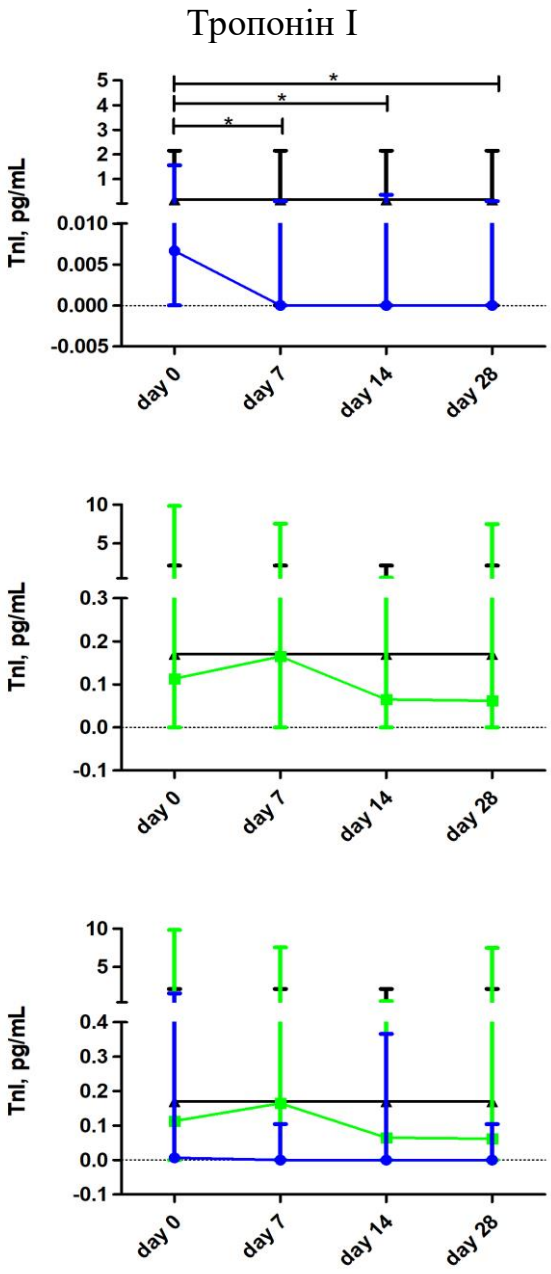


Рис 5. Зміни рівнів цитокінів в залежності від часу спостереження у хворих на COVID-19. Критерій Вілкоксона: * - p≤0.05; ** - p≤0.01; *** - p≤0.001. Тест Манна-Уітні був використаний для порівняння значень між дослідними групами (контроль або МСК) та групою здорових волонтерів у кожній точці спостереження: # - p≤0,05; ## - p≤0,01; ### - p≤0,001. Тест Манна-Уітні був використаний для порівняння значень між дослідними групами (контроль та МСК): $ - p≤0,05; $$ - p≤0,01; $$$ - p≤0,001Синя лінія (коло) зображує групу контролю; зелена лінія (трикутник) - МСК група; чорна лінія (квадрат) - група здорових волонтерів.

В нашому досліджені 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 контрольній групі цей показник спадав на 7 добу і зростав до кінця спостереження.

В МСК групі спостерігається зростання рівня TNF-α в крові пацієнтів на 7 добу госпіталізації, при цьому значення цього показника досягає достовірних відмінностей від значень здорових волонтерів. В той же час в контрольної групи хворих цей показник знижується на 7 добу з наступним зростанням на 14 добу. На кінець госпіталізації рівень TNF-α у обох груп достовірно не відрізняються від початку лікування, хоча у пацієнтів контрольної групи цей показник достовірно відрізнявся від значень здорових волонтерів. Потрібно відмітити, що рівень TNF-α зріс через добу після першої трансплантації МСК пацієнтам і досягнув достовірних відмінностей після другого та третього введення препарату клітин відносно початку госпіталізації та значень здорових волонтерів відповідно. Цікаво, що рівень TNF-α знижувався в крові хворих після одно [24], двох [17] та трьохкратної трансплантації МСК [27] через три, шість та п’ять діб від початку терапії відповідно.

Рівень ангіотензину II в крові пацієнтів зростає через добу після трансплантації МСК та тримається на достовірно вищому рівні на 7 та 28 доби порівняно з контрольною групою. Потрібно відмітити, що рівень ангіотензину II знижується в обох групах на 28 добу, хоча в контролі він залишається в два рази підвищеним, а в МСК групі дещо меншим за значення, що відповідають початку госпіталізації. Ангіотезин II відіграє важливу роль в атрактуванні нейтрофілів в легені [108], мононуклеарів, він стимулює виділення хемокінів та адгезивних молекул на ендотеліальних клітинах та клітинах гладеньких м'язів, що покращує адгезію нейрофілів та мононулеарів [109]. Також цей білок стимулює Т-лімфоцити до проліферації, диференціювання, ефектроної функції, міграції та адгезії [110-111]. 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 канальців нирок [112]. Зростання рівня ангіотензину II спостерігається в критично хворих пацієнтів на COVID-19 [113-114].

В контрольній групі пацієнтів спостерігається достовірне зростання рівня інтерлейкіна-10 (IL-10) в крові пацієнтів з 14 доби на відміну від МСК-групи. IL-10 піднімається у хворих COVID-19 з зростанням тяжкості перебігу захворювання [115, 116]. Зростання IL-10 в пацієнтів з синдромом цитокінової бурі, позитивна кореляція з про-запальними цитокінами та С-реактивним білком , вмістом IFN-γ-продукуючими ефекторними CD4+ та CD8+ Т-клітинами, та виснаженими CD8+ Т-клітинами свідчить про його про-запальні властивості, вважається, що він стимулює до проліферації цитотоксичні Т-лімфоцити [117].

Концентрація G-CSF поступово зменшувалися протягом періоду спостереження у групі COVID-19. Беручи до уваги, що учасники, включені до нашої контрольної групи, могли мати деякі запальні супутні захворювання та очікувані значення G-CSF та IL-2, які, як вважається, не можуть бути виявлені у плазмі здорових добровольців, ми припускаємо, що рівень G-CSF та IL-2 залишався підвищеним у групі COVID-19.

В COVID-19 групі було виявлено позитивну кореляцію між концентрацією G-CSF і ШОЕ ($r=0,491$, $p\leq0,001$) і відсотком нейтрофілів ($r=0,474$, $p\leq0,001$) і негативну кореляцію з відсотком лімфоцитів ($r=-0,419$, $p\leq 0,005$). Крім того, G-CSF високо корелює з експресією miR-27a-3p ($r=0,57$, $p\leq0,001$), miR-21-5p ($r=0,447$, $p\leq0,001$), miR-146a-5p ($r=0,485$, $p\leq0,001$) і miR-221-3p ($r=0,401$, $p\leq0,005$). Наші результати узгоджуються з тим фактом, що СРБ є важливим біомаркером запалення на ранніх стадіях розвитку COVID-19 [118-120]. Однак, виходячи з отриманих даних, коли рівень СРБ досяг нормального значення на 28 день у пацієнтів з COVID-19, рівень Т-клітин, в особливості Т-хелперів і Т-цитотоксичних клітин залишався підвищений.

Тому рівень про-запальних цитокінів IL-6, IP-10 або TNFα слід додатково оцінювати для контролю загального стану запалення у пацієнтів з COVID-19.

Високий рівень G-CSF був виявлений у пацієнтів з COVID-19, які перебували у відділенні інтенсивної терапії, а також у пацієнтів, які не потребували інтенсивною терапії, порівняно зі здоровими добровольцями [121]. Зниження концентрації IP-10 у плазмі крові на 7 день та повернення до вихідного рівня протягом другого тижня також може бути пов'язане з припиненням терапії кортикостероїдами [122]. Було виявлено, що призначення кортикостероїдів може значно знизити концентрацію IP-10 у плазмі крові пацієнтів з COVID-19 на відміну від рівня IL-6 та CRP [122].

У нашому дослідженні рівень IL-2 та IL-6 достовірно не змінювався протягом періоду спостереження в МСК та контрольній групах. Однак значення IL-6 значно відрізнялися в контрольній групі відносно здорових волонтерів на 0 та 14 дні. Хоча, рівень IL-6 дещо знижувався в обох групах на 7 добу, однак в контрольній групі спостерігалося повторне зростання його на 14 та 28 добу, тоді як в МСК групі такого не відбувалося. Більшість досліджень повідомляли про збільшення рівня IL-2 у пацієнтів з тяжким перебігом COVID-19 [66,123, 124], тоді як у деяких дослідженнях рівень IL-2 залишався в межах норми протягом періоду лікування [125, 126]. Як повідомлялося в [99], рівень IL-6 був вищим, ніж у здорових донорів, і подібні до наших даних істотно не змінилися за час спостереження. Високий рівень TNFα у сироватці та/або плазмі пацієнтів з COVID-19, про які раніше повідомлялося [1, 115, 126] узгоджується з нашими даними, що вказують на аномально активовані імунні клітини господаря.

Після трансплантації МСК у крові хворих на 7 день спостерігалося достовірне зниження вмісту сурфактанту D, що є маркером загибелі альвеоцітів 2 типу [127]. Потрібно відмітити, що альвеоцити 2 типу є основною мішенню інфікування SARS-CoV-2 [128], тому зниження їх загибелі є позитивним процесом у одужанні пацієнтів за клітинної терапії.

Цікаво, що у хворих, що лікувались за класичним протоколом відбувається зростання рівня сурфактанту D з 14 по 28 доби.

Також нами показано позитивну достовірну кореляцію (r=0.786, p≤0.036, n=7) між вмістом сурфактанту D в крові пацієнтів на початок госпіталізації та ступенем фіброзування легень на 14 добу за даними комп'ютерної томографії (КТ). Вміст сурфактанту D в крові пацієнтів 7 добу позитивно корелює з показником розширення дихальних шляхів на КТ (r=0.788, p≤0.035, n=7). Ці дані додатково свідчать, що зниження рівня сурфактанту D на 7 добу є позитивним показником при трансплантації МСК.

Другий маркер пошкодження легень receptor of advanced glycation endproducts (sRAGE), що є специфічним до альвеоцитів першого типу [127] сильно знижується на 7 добу у хворих на COVID-19 контрольної групи та підвищується на 14 та 28 доби. В МСК групи спостерігається незначне зниження sRAGE протягом усього періода госпіталізації, при чому на 7 добу цей показник достовірно вищий відносно контрольної групи. Підвищення рівня sRAGE у пацієнтів контрольної групи на 14 та 28 доби свідчить про активізацію процесів запалення в легенях, високий вміст цього білка є прогностичним біомаркером розвитку ГРДС, тяжким перебігом COVID-19 та необхідністю підключення хворих до систем штучної вентиляції [128-129]. Значне зниження sRAGE у контрольних пацієнтів співпадає з періодом призначення кортикостероїдної терапії. Відомо, що терапія з використанням кортикостероїдів призводить до зниження sRAGE в крові пацієнтів дитячого віку з гострим респіраторним дистрес синдромом (ГРДСУ) [130]. Вміст sRAGE в крові пацієнтів позитивно корелює з рівнем прозапального цитокіна MCP-1a (r=0.502, p≤0.008, n=27). sRAGE є інгібітором лігандів HMGB1-RAGE/TLR4 сигнального шляху в ендотеліальних клітинах, що призводить до зниження виділення ними про-запальних цитокінів TNF-α, IL-1, та IL-6 [131]. Таким чином sRAGE компенсаторно виділяється в кров на зростання запалення в легенях.

Таким чином трансплантація МСК призвела до швидкого падіння СРБ, як основного маркера запалення, до більш тривалого зниження таких прозапальних цитокінів як IL-6 та IL-10, до транзиторного підняття рівнів TNF-α та MCP-1 та до зростання P-10. Іншими авторами було встановлено, що запальні цитокіни знижуються (IL-6, TNF-α) в крові пацієнтів після МСК терапії, тоді як інші автори цього не спостерігали (https://doi.org/10.1101/2021.07.01.21259838), що може бути обумовлена різним дизайном досліджень (дозою клітин, кратністю введень, критеріями включення пацієнтів, тощо). Цікаво, що трьох разове введення МСК на IIa стадії досліджень встановили відсутність достовірних змін в таких цитокінах, як IL-6, IL-8, IFN-γ, IL-1Ra, IL-18, MCP-1, MIP-1α, and IP-10, хоча показники запалення легень на КТ покращилися (https://doi.org/10.1038/s41392-021-00488-5). Маркери пошкодження легеневого епітелію сурфактант Д та RAGE знижується відразу після клітинної терапії та тримаються на низькому рівні протягом наступних трьох тижнів. Ці дані можуть свідчити про те, що МСК знижують запальний процес в легенях.

3.4 Рівні мікро РНК у плазмі крові хворих на COVID-19

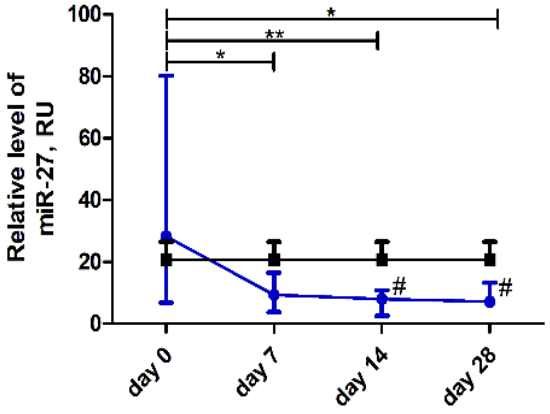
Відносний рівень експресії miR-27a-3p та miR-133a-3p у пацієнтів з контрольної групи значно знизився протягом першого тижня і залишався на низькому рівні до 28 дня порівняно з 0 днем. Більш того, експресія miR-27a-3p у контрольній групі статистично значимо відрізнялися від значень здорових волонтерів на 14 та 28 день. В МСК групі рівень експресії miR-27a-3p та miR-133a-3p достовірно відрізнявся на 28 та 7 добу у порівняння з початком госпіталізації. 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. Наприклад, рівень відносної

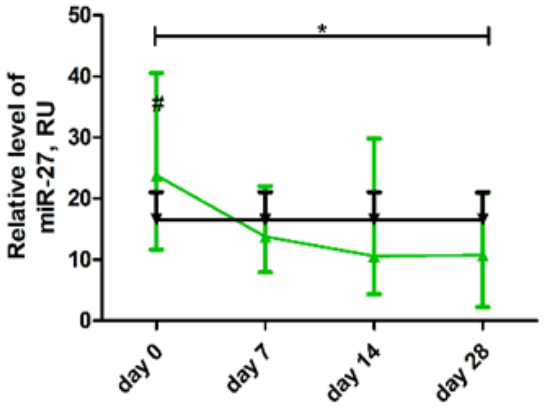
експресії для miR-21-5p та miR-146a-5p знизився більш ніж у чотири рази, а для miR-221-3p-більш ніж у три рази в контрольній групі, тоді як в МСК групі лище в два рази. Відносний рівень експресії miR-126-3p значно відрізнявся від дня 0 лише на 14 день спостереження в контрольній групі, тоді як в МСК групі він не змінювався протягом 28 діб (рис. 6).

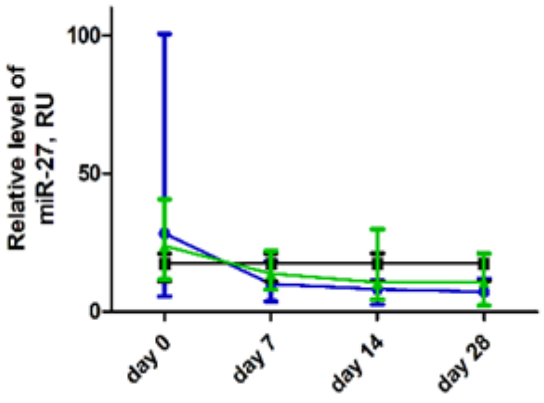
Експресія miR-126-3p негативно корелювала з виснаженими CD8 Т-клітинами ($r=-0,466$, $p\leq0,0001$) і CD25+ лімфоцитами ($r=-0,376$, $p\leq0,005$). Відносний рівень експресії miR-21-5p у плазмі пацієнтів із тяжким перебігом COVID-19 негативно корелював із дендритними клітинами ($r=-0,444$, $p\leq0,001$). Відносний рівень miR-221-3p корелював із підгрупою CD3+PD1low ($r=-0,346$, $p=0,007$). Також цікаво, що miR-221-3p негативно корелював з сумарним показником фіброзних змін в легенях хворих, що лікувалися з МСК ($r=-0,929$, $p=0,001$).

Ми виявили, що відносні рівні експресії miR-21-5p, miR-221-3p, miR-27a-3p, miR-146a-5p були значно вищими на початку госпіталізації та зменшилися протягом двох тижнів лікування. Раніше повідомлялося, що miR-146a є важливим молекулярним супресором запалення через його здатність регулювати ланки TLR та NFκB внутрішньоклітинної сигналізації, а також на сімейство протеогліканів [132]. Повідомлялося, що miR-146a зменшує вивільнення NFκB-залежних прозапальних цитокінів моноцитами, стимульованими TNF-α [133]. Крім того, було помічено, що збільшення рівня експресії miR-146a-5p зменшує пошкодження легеневих клітин шляхом пригнічення запальних реакцій [134]. Високий рівень експресії miR-146a-5p у плазмі крові у обох груп порівняно зі здоровими волонтерами був також показаний Donyavi *et al.* [135]. Раніше повідомлялося, що концентрація miR-21-5p у сироватці крові була значно підвищена у пацієнтів з COVID-19 порівняно зі здоровими контролями [136]. Підвищення рівня miR-21-5p сприяло, тоді як зменшення miR-21 послаблювало профіброгенну активність TGF-β1 у фібробластах [136].

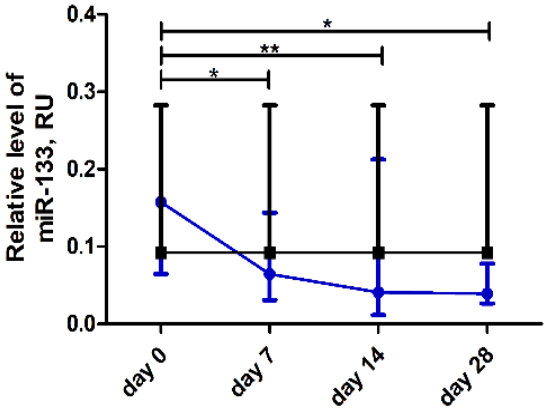
miR-27a-3p

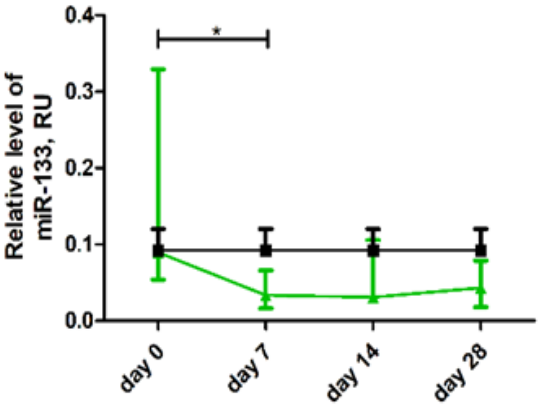


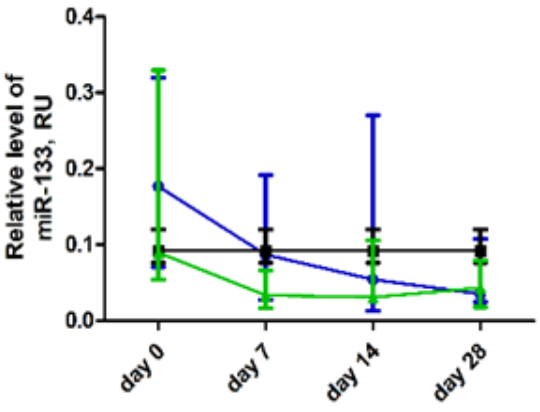




miR-133a-3p

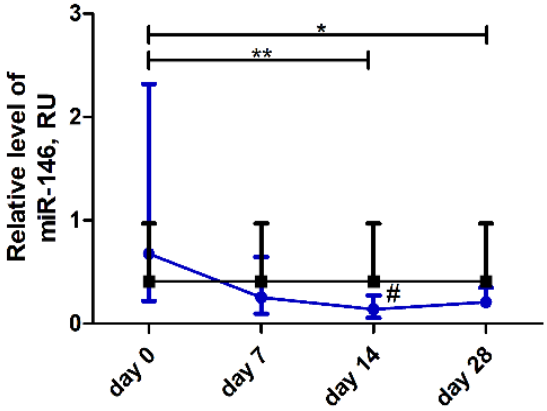


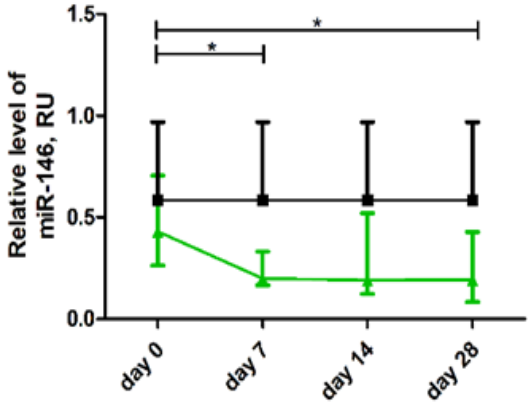


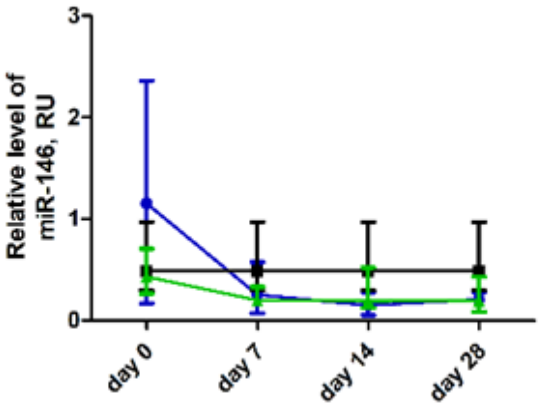


Продовження рисунку 6.

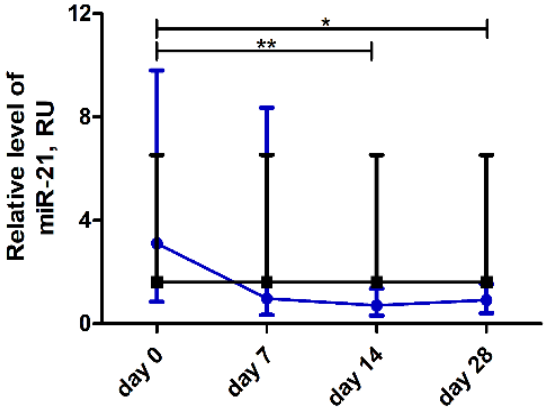
miR-146a-5p

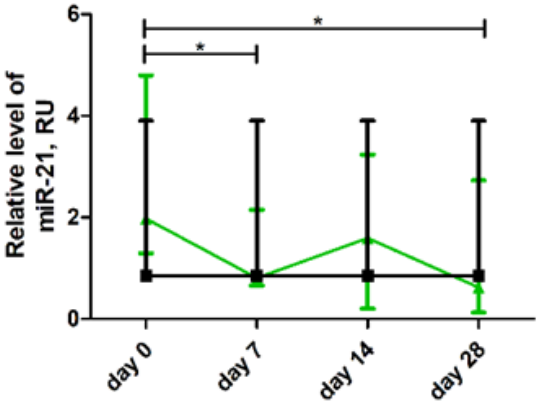


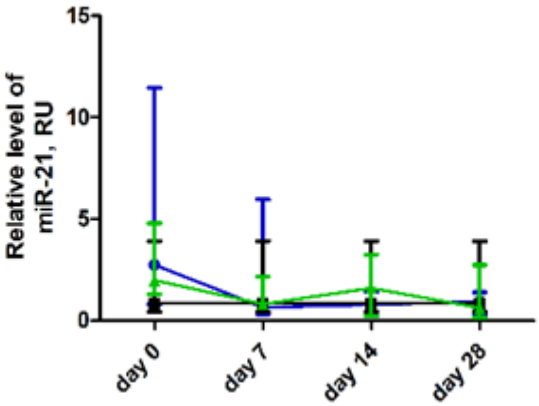




miR-21-5p

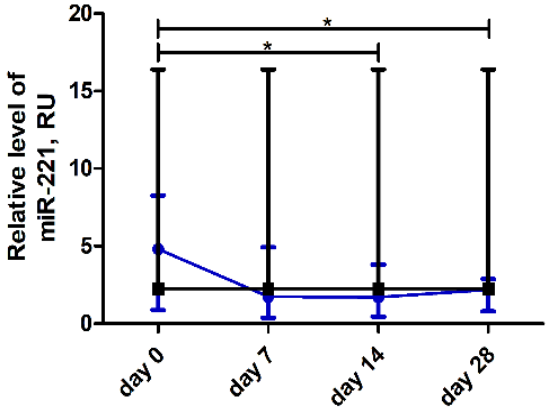


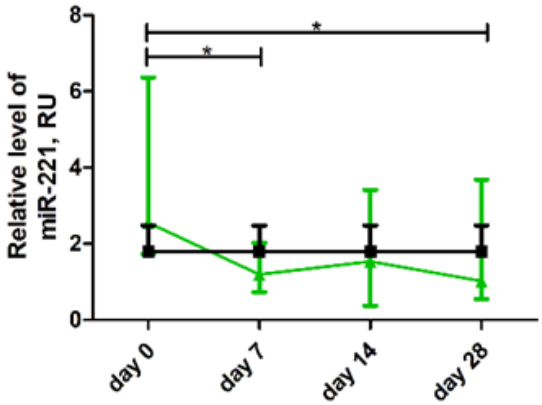


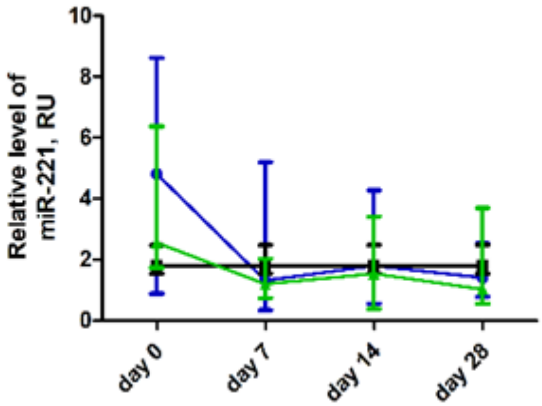


Продовження рисунку 6.

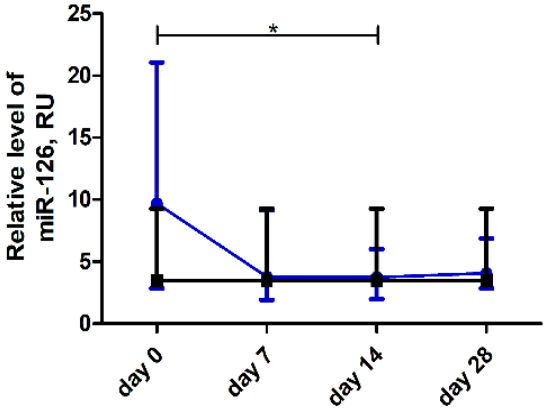
miR-221-3p

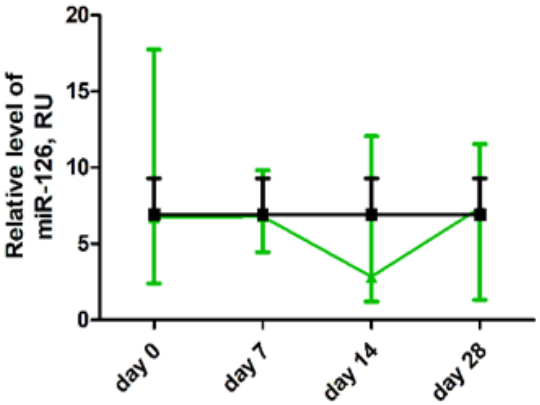


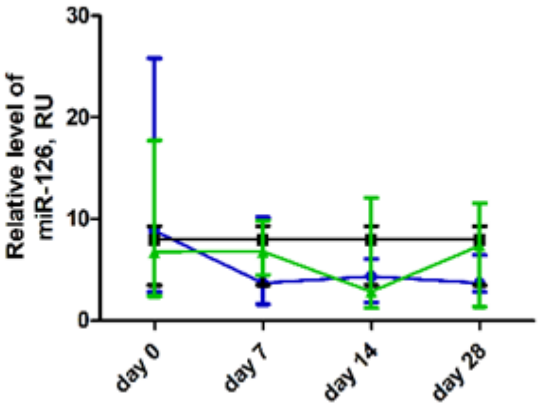




miR-126-3p

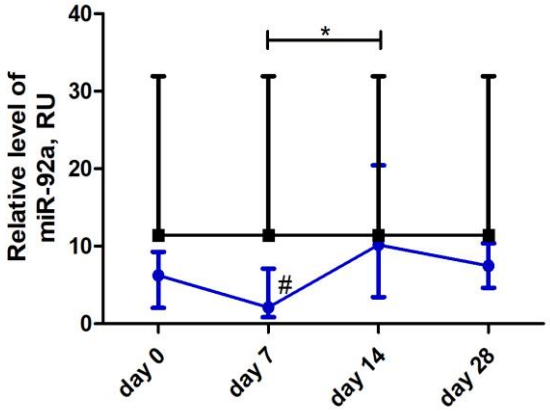


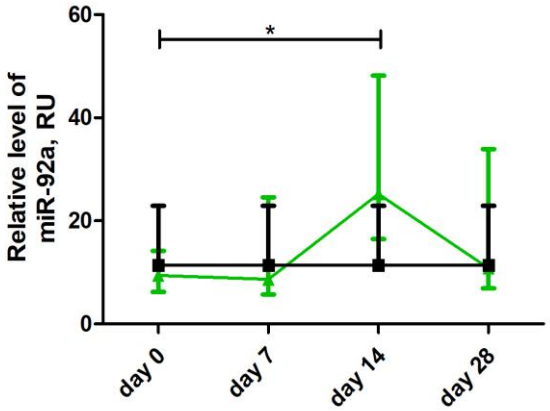


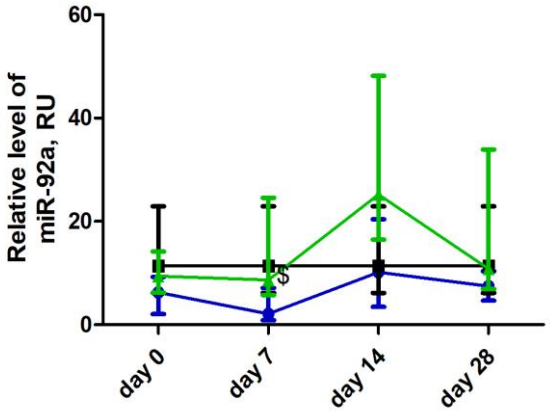


Продовження рисунку 6.

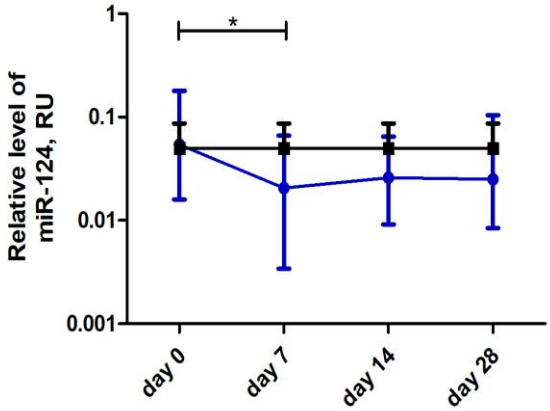
miR-92a-3p

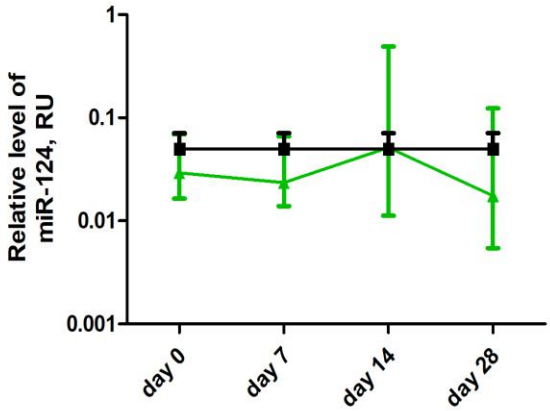


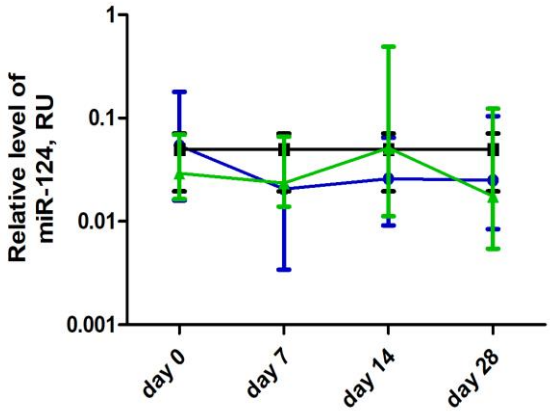




miR-124-3p







Продовження рисунку 6.

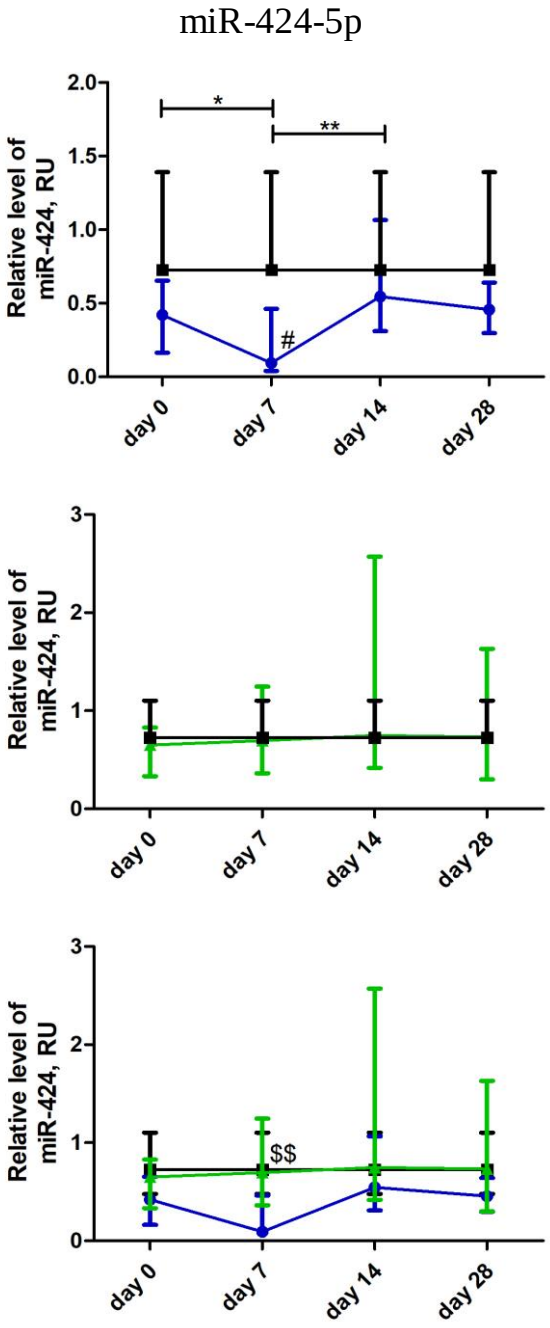


Рис 6. Зміни рівнів цитокінів в залежності від часу спостереження у хворих на COVID-19. Критерій Вілкоксона: * - p≤0.05; ** - p≤0.01; *** - p≤0.001. Тест Манна-Уітні був використаний для порівняння значень між дослідними групами (контроль або МСК) та групою здорових волонтерів у кожній точці спостереження: # - p≤0,05; ## - p≤0,01; ### - p≤0,001. Тест Манна-Уітні був використаний для порівняння значень між дослідними групами (контроль та МСК): $ - p≤0,05; $$ - p≤0,01; $$$ - p≤0,001Синя лінія (коло) зображує групу контролю; зелена лінія (трикутник) - МСК група; чорна лінія (квадрат) - група здорових волонтерів.

Крім того, рівень miR-21-5p збільшувався в легеневій тканині з розвитком гострої травми легень, викликаної ліпополісахаридом, та був пов'язаний зі зменшенням вентиляції та дихальним об’ємом легень [137]. miR-221-3p був значно підвищений у легеневій тканині мишей з гострим пошкодженням легенів, викликаним ліпополісахаридом. Крім того, Wang *et al.* показали, що захисний ефект miR-221-3p при ліпополісахарид-індукованому гострому пошкодженні легень може бути опосередкований з пригніченням NF-κB шляху [138]. Зокрема, miR-221-3p сприяє активації тучних клітин при стимуляції комплексу IgE-антиген, стимулюючи адгезію клітин, вироблення цитокінів та дегрануляцію [139]. На 7 та 14 дні спостереження ми виявили, що рівень відносної експресії miR-133a-3p зменшився у 2 та 4 рази порівняно з днем 0 у пацієнтів контрольної гурупи. В МСК групі ця мікро РНК знизилася в три рази на 7 добу.

Підвищення рівня експресії miR-133a-3p було зареєстровано при сепсисі, при хронічному обструктивному захворюванні легень [140] є властивим для фіброзної дегенерації серця при ішемічній хворобі серця та гострому ураженні міокарда [141]. Рівень miR-133a-3p позитивно корелює з продуктами розпаду нейтрофілів, які гинуть в тканинах де йде запалення [140]. У нашому дослідженні рівень відносної експресії miR-126-3p в крові пацієнтів суттєво знижувався на 14 добу у пацієнтів контрольної групи на відміну від МСК групи. Підвищений рівень цієї міРНК спостерігається при розвитку серцевої недостатності, інфаркту міокарду [142-143], захворюванням коронарних судин [144]. Наші дані узгоджуються з даними інших досліджень, де рівень miR-126-3p не відрізнявся у пацієнтів із COVID-19 та у здорових добровольців [112].

Зростання рівня miR-92a-3p спостерігається при COVID-19 [145] та при розвитку гострого пошкодження легень ліпосахаридами у тварин [146], та при інших патологіях судинної системи [147]. miR-92a-3p знижується в крові пацієнтів, що хворіють на фіброз легень [148], а також при тяжких випадках COVID-19, які мали летальний ефект [149]. Зниження miR-92a-3p призводить

до нормалізації дисфункції ендотеліального бар'єру легень, та зменшує виділення прозапальних цитокінів IL-6 і TNF-α цими клітинами [150] та до нормалізації архітектоніки легень [151]. Однак в нашому досліджені ми спостерігали негативну кореляцію між рівнем miR-92a-3p та IL-6 (r=-0.457, p=0.005, n=36) після трансплантації МСК. Цікаво, що miR-92a-3p негативно регулює імунну відповідь опосередковану TLR і призводить до зниження експресії IL-6 [152].

Достовірно нижчий вміст miR-92a-3p в пацієнтів контрольної групи на 7 добу госпіталізації у порівнянні з МСК-групою може свідчити про знижений запальний процес в легенях. Зростання miR-92a-3p та IL-6 з 7 по 14 доби госпіталізації в обох групах пацієнтів вказує про повторний розвиток ендотеліальної дисфункції у пацієнтів. Більш того, було встановлено, що мікровезикули, 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 [153]. В нашому досліджені ми спотерігали негативну кореляцію між рівнем miR-92a-3p та тропоніну I (r=-0.535, p=0.003, n=28) після трансплантації МСК. Відомо, що miR-92a-3p піднімається в крові пацієнтів на серцево-судинні захворювання та інфаркт міокарду [154-155]. Таким чином вищий рівень miR-92a-3p в крові пацієнтів з COVID-19 на 7 добу після трансплантація МСК може вказувати про більший рівень пошкодження судин та ендотеліальну дисфункцію.

Нами показано, що miR-424-5p у хворих контрольної групи знижується на 7 добу, і є достовірно нижчим ніж у здорових волонтерів та МСК групи.

Цікаво, що ця міРНК включена в розвиток артеросклерозу шляхом активування диференціювання моноцитів в макрофаги [156] та дендритні клітини [157]. Велика кількість експериментальних робіт встановила, що miR-424-5p експресується на вищому рівні в ендотеліальних клітинах при ушкодженнях судин, гіпоксії та ішемії серця [158-159]. Циркуляторна miR-424-5p є маркером запалення та детектується після пробігів марафонів [160]. Також ця міРНК піднімається при гострих інфарктах міокарду [161] та при

аутоіммуному захворюванні пемфігусі [162]. Таким чином вищий рівень miR-424-5p в крові пацієнтів з COVID-19 на 7 добу після трансплантація МСК може вказувати про більший рівень пошкодження судин та розвиток ендотеліальної дисфункції.

Хоча, виходячи з того, що miR-424-5p, подібно до miR-126-3p може зв'язуватися з геномом SARS-CoV-2, і потенційно інгібувати його його реплікацію в клітинах господаря [163-165] зниження їх рівня в крові хворих контрольної групи може мати негативний ефект на одужання.

Консервативне медикаментозне лікування, та поєднання з МСК терапією призводить до падіння прозапальних мікроРНК в плазмі крові пацієнтів хворих на COVID-19. Трансплантація МСК призводить до зростання рівня miR-92a-3p та miR-424-5p в плазмі крові пацієнтів, асоційованих з дисфункцією ендотеліального бар'єру.

3.5 Динамічний профіль змін субпопуляцій клітин лімфоцитів у пацієнтів з COVID-19

Для розуміння змін в встановлені клітинного імунітету при розвитку коронавірусної хвороби було проведено цитофлуориметричний аналіз різних субпопуляцій лейкоцитів в хворих на COVID-19 та здорових волонтерів.

Відсоток основних підгруп лімфоцитів у периферичній крові пацієнтів з COVID-19 групи показано на рисунку 5. Відсоток CD45+ лейкоцитів на 7 день був значно нижчим, ніж у контрольній групі, але відновився до 28 дня. Середнє значення вмісту CD45+CD3+ Т-клітин серед CD45+ клітин у групі COVID-19 було вище значень у контрольній групі на день 0, потім нормалізувався на 7 день і повернувся до підвищеного рівня на 14 та 28 день. Відсоток CD19+ В-клітин серед CD45+ клітин досяг максимуму на 7 день порівняно з 14-28 днями, але не суттєво відрізнявся від показників контрольної групи. Вміст CD3-CD16+CD56+ NK-клітин серед CD45+ клітин був зниженим протягом 28 днів спостереження порівняно з контрольною

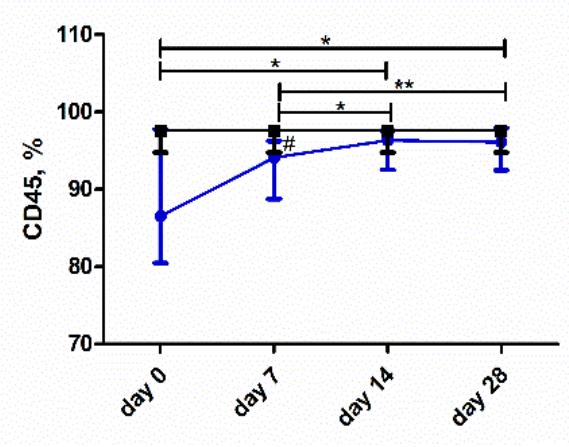
групою, при цьому найнижчий рівень було зафіксовано на 7 день від початку госпіталізації (рис. 7).

Вміст подвійно позитивних Т-клітин CD3+CD4+CD8+ серед лейкоцитів був недостатньо представлений на 0 і 7 день і відновлювався до значень контрольної групи на 14 та 28 день. Частота клітин, що експресують PD-1, як у CD3+, так і в CD3- популяціях Т-клітин поступово збільшувалася протягом 4 тижнів спостереження. Значне зростання CD3+PD-1low експресуючих клітин відбулося з 7 до 14-й день; тоді як частка CD3-PD-1low клітин збільшувалася починаючи з першого тижня госпіталізації і досягала плато починаючи з 7-го дня спостереження. Вміст CD25+ Т-клітин серед клітин CD45+ збільшувався протягом 28 днів спостереження, тоді як відсоток CD127+ Т -клітин не змінився.

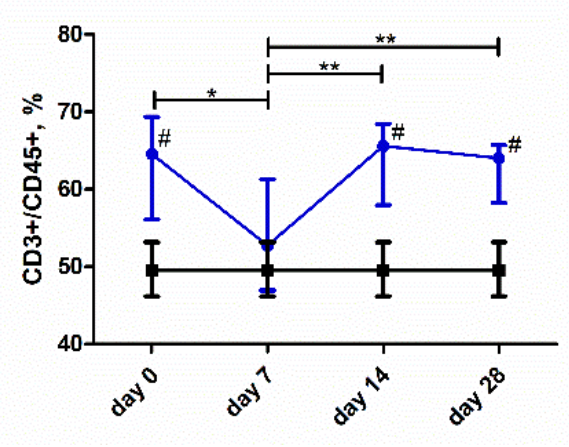
Вміст NK-клітин корелював із вмістом регуляторних дендритних клітин ($r=0,733$, $p\leq0,001$), тоді як смугасті нейтрофіли негативно корелювали з плазмоцитоїдними дендритними клітинами ($r=-0,373$, $p\leq0,01$). Регуляторні CD8 Т-клітини сильно корелювали з вмістом CD3+CD25+ ($r=0,954$, $p\leq0,001$), CD127low ($r=-0,405$, $p\leq0,001$) та підгрупами CD8 Т-клітин: ефекторними ($r=0,822$, $p\leq0,001$), активованими ($r=0,821$, $p\leq0,001$), старіючими ($r=0,65$, $p\leq0,001$), старіючими клітинами пам’яті ($r=0,695$, $p\leq0,001$) і виснаженими CD8 Т-клітинами ($r=0,845$, $p\leq 0,001$). Аналіз виявив негативну кореляцію між мієлоїдними клітинами CD14+ і популяціями Т-клітин: подвійно позитивними CD4+CD8+ ($r=-0,412$, $p\leq0,001$), Th-клітинами ($r=-0,778$, $p\leq0,001$), цитотоксичними Т-клітинами ($r=-0,386$, $p\leq0,005$), PD-1low ($r=-0,499$, $p\leq0,001$) і CD127low субпопуляціями($r=-0,479$, $p\leq0,001$).

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 [70, 71]. Загалом, інші групи авторівне виявили змін у популяції В-лімфоцитів [72, 73]. В нашому дослідженні відсоток NK-клітин (CD3-CD56+CD16+) серед CD45+ клітин у пацієнтів з COVID-19 був нижчим у порівнянні з контрольною групою, як вже повідомлялось раніше [74, 75].

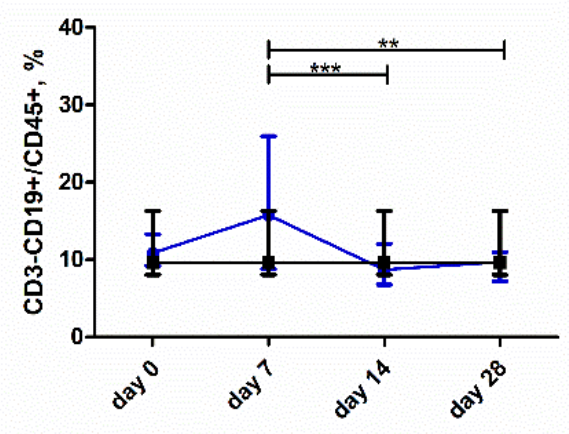
Лейкоцити



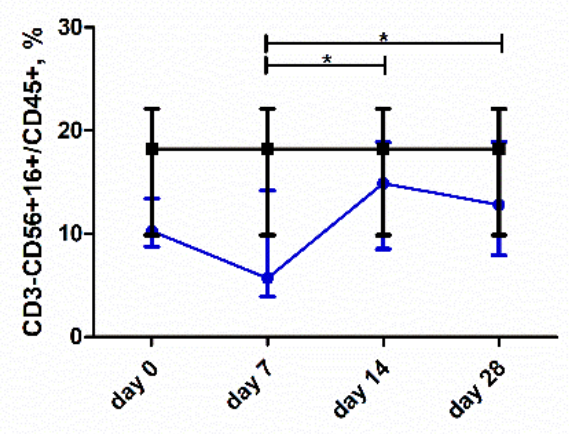
Т клітини



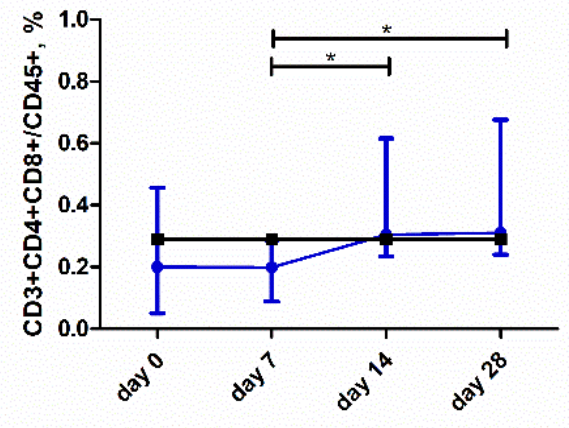
В клітини



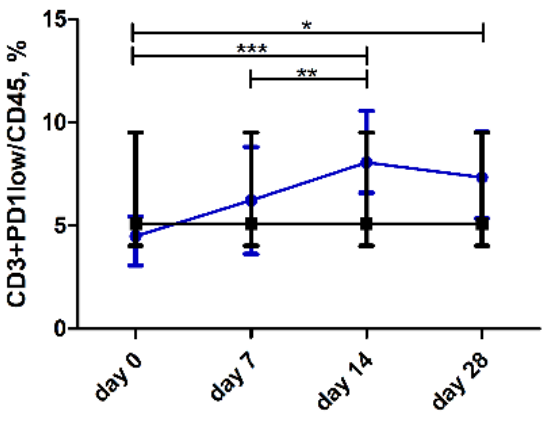
NK



Подвійно позитивні Т-клітини

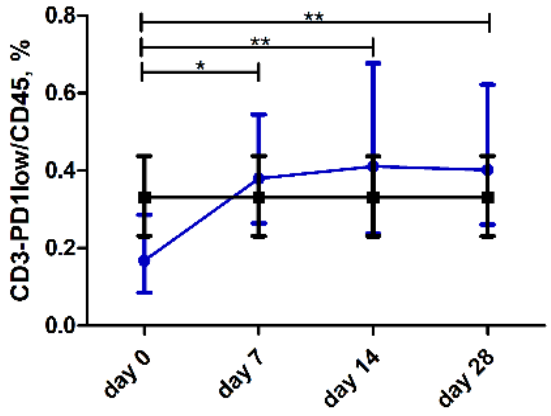


PD1^{low} Т клітини

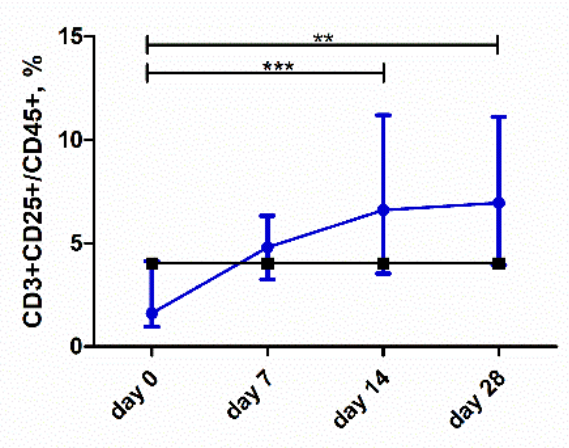


Продовження рисунку 7.

PD1^{low} non-T клітини



CD25+ T клітини



CD127^{low} T клітини

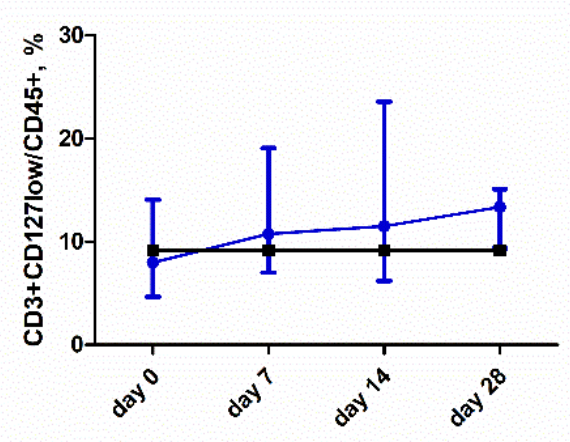


Рис 7. Зміни субпопуляцій лімфоцитів. Критерій Вілкоксона: * - p≤0.05; ** - p≤0.01; *** - p≤0.001. Тест Манна-Уітні був використаний для порівняння значень між групами COVID-19 та контролем у кожній точці спостереження: #-p≤0,05. Синя лінія (коло) зображує групу COVID-19; чорна лінія (квадрат) - група контролю.

PD-1 знижує регуляцію проліферації та продукування цитокінів Т-клітинами та контролює пошкодження нормальних тканин під час інфекції [76]. Більш того, раніше повідомлялося, що при аутоімунних захворюваннях відсоток та абсолютна кількість PD-1-експресуючих CD3+CD4+ та CD3+CD8+ Т-клітин значно підвищувався [77]. Наші результати показали

більш високу частоту PD-1 позитивних Т та non-Т-клітин у різні точки спостереження порівняно з 0-м днем у пацієнтів з COVID-19.

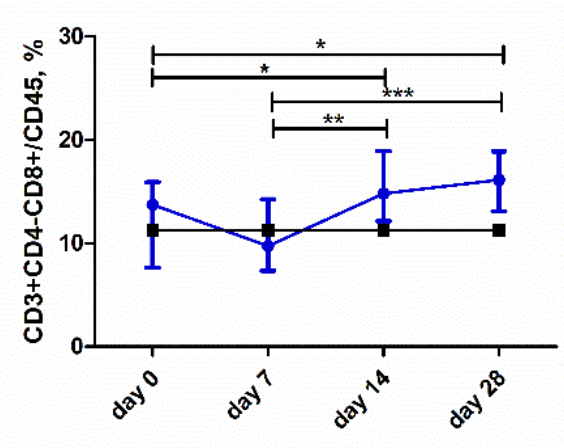
CD3+CD4+CD8+ подвійно-позитивні Т клітин - це окрема незначна популяція клітин, яка особливо відокремлюється при розвитку вірусної інфекції і можуть проявляти як цитотоксичні, так і імуносупресивні властивості [78-80]. Підвищення рівня подвійно-позитивних Т клітин з імунофенотипом CD3+CD4+CD8+ серед 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 [80].

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 [81, 82], 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 [83].

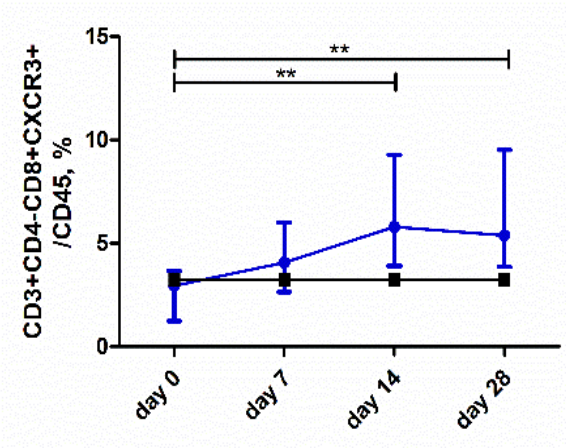
3.6 Динамічний профіль змін субпопуляцій Т-клітин у пацієнтів з COVID-19

CD8 Т-клітини. Вміст цитотоксичних CD3+CD4-CD8+ Т-клітин серед CD45+ лейкоцитів нормалізувався на 7 день, але після цього збільшився, тоді як вміст ефекторних CD3+CD4-CD8+CXCR3+ та активованих CD3+CD4-CD8+HLA-DR+ Т-клітин неухильно зростав з 0-го до 28-го дня (рис. 8)..

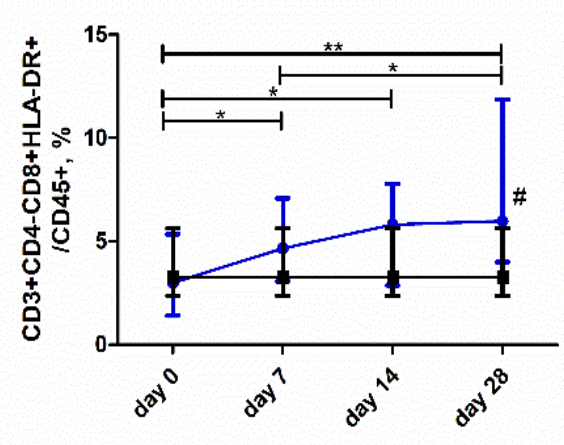
Цитотоксичні Т клітини



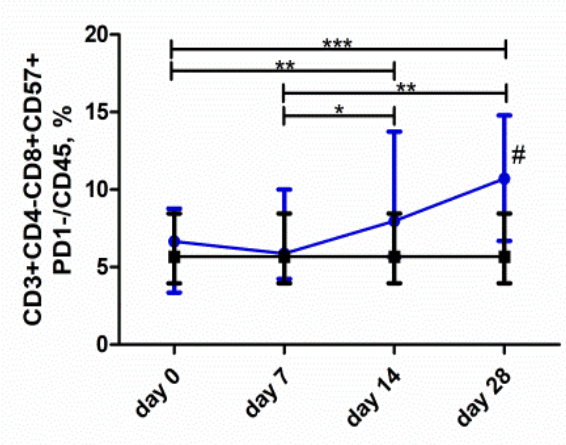
Ефекторні CD8+ Т клітини



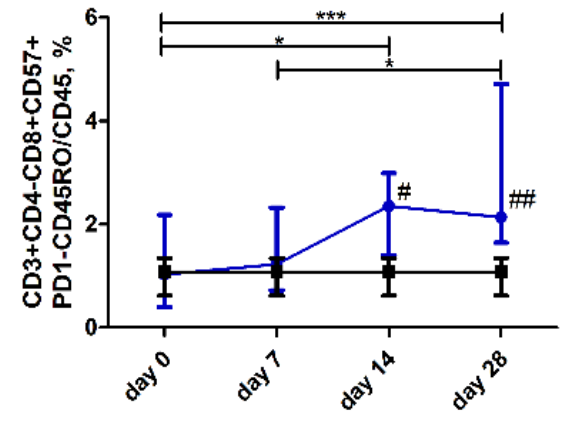
Активовані CD8+ Т клітини



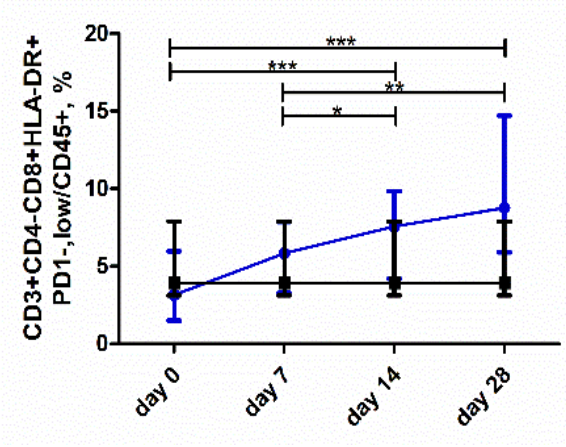
Зрілі CD8+ Т клітини



Зрілі CD8+ Т клітини памяті



Виснажені CD8+ Т клітини памяті



Регуляторні CD8+ Т клітини

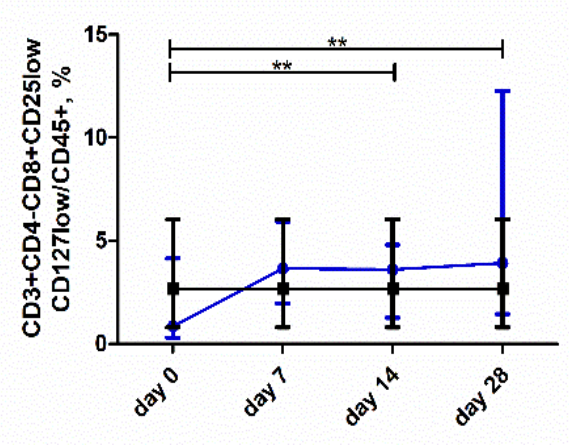


Рис 8. Зміни субпопуляцій CD8+ лімфоцитів. Критерій Вілкоксона: * - p≤0.05; ** - p≤0.01; *** - p≤0.001. Тест Манна-Уітні був використаний для порівняння значень між групами COVID-19 та контролем у кожній точці спостереження: #-p≤0,05; ##-p≤0,01. Синя лінія (коло) зображує групу COVID-19; чорна лінія (квадрат) - група контролю.

Цікаво, що вміст активованих Т-клітин на 28-й день залишався значно вищим у групі COVID-19 порівняно з контрольною групою.

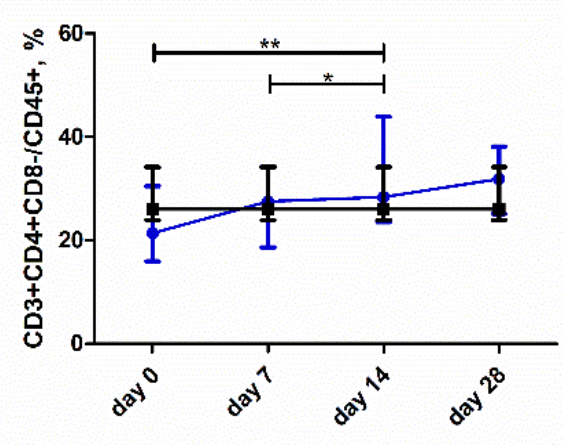
Відсоток старіючих CD8 CD3+CD4-CD8+CD57+PD-1- Т-клітин та їх субпопуляція пам'яті CD3+CD4-CD8+CD57+PD-1-CD45RO+, а також відсоток виснажених CD8 клітин CD3+CD4-CD8+HLA-DR+PD-1- починав зростати з 7 дня і досягав своїх максимальних значень на 28 день.

Порівняно з контрольною групою, вміст зрілих CD8 Т-клітин у COVID-19 групи досяг статистично значимої різниці на 28 день, у той час як субпопуляція пам’яті зрілих CD8 Т-клітин була значно вищою на 14 та 28 день. Понижений відсоток регуляторних CD8 Т-клітин CD3+CD4-CD8+CD25+CD127low 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. 8).

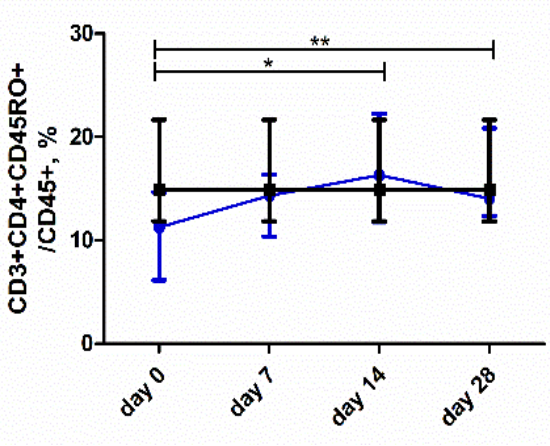
CD4 Т-клітини. Відсоток Th-клітин CD3+CD4+CD8- серед популяції CD45+ значно збільшився з дня 0 до 14-го дня. Субпопуляція CD4 Т-клітин

пам'яті CD3+CD4hiCD45RO+ серед клітин CD45+ неухильно зростала протягом 4 тижнів (рис. 9). 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. Виснажені CD4 Т клітини пам'яті CD3+CD4+CD8-HLA-DR+PD-1-/low та зрілі клітини пам'яті CD3+CD4+CD8-CD57+PD-1-CD45RO+ поділяли таку саму поведінку, що і ефекторні CD4 Т-клітини. Кількість зрілих CD4 Т-клітин CD3+CD4+CD8-CD57+PD-1- серед CD45+ клітин збільшувалася протягом 28 днів. Вищезгадані субпопуляції CD4 Т -клітин не відрізнялися в порівнянні з контрольною групою.

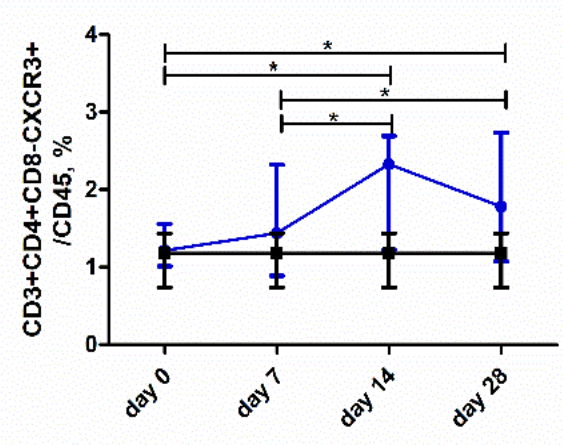
Th клітини



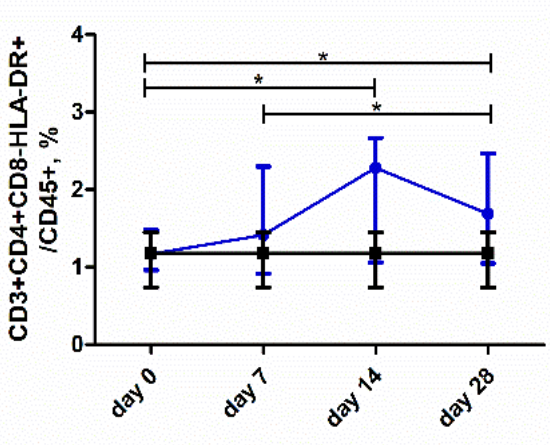
CD4+ Т клітини пам’яті



Ефекторні CD4+ Т клітини

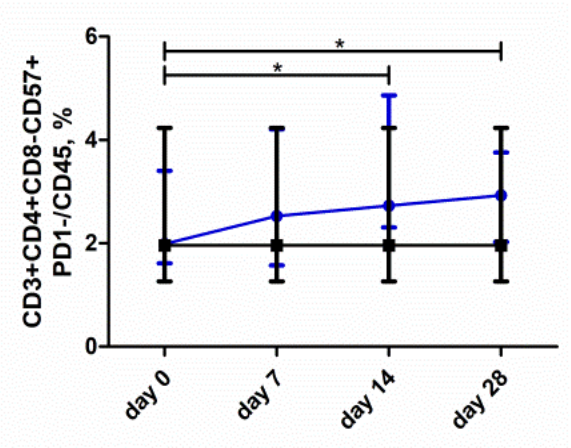


Активовані CD4+ Т клітини

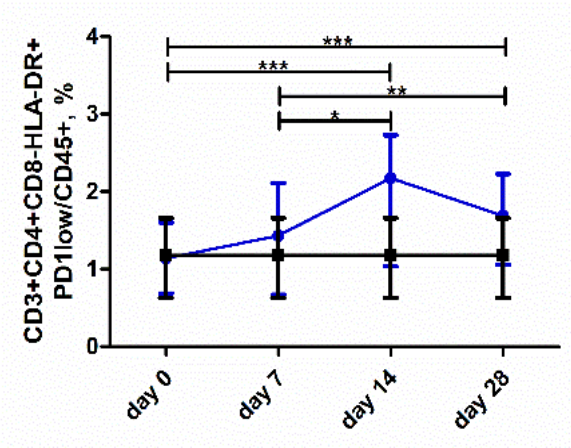


Продовження рисунку 9.

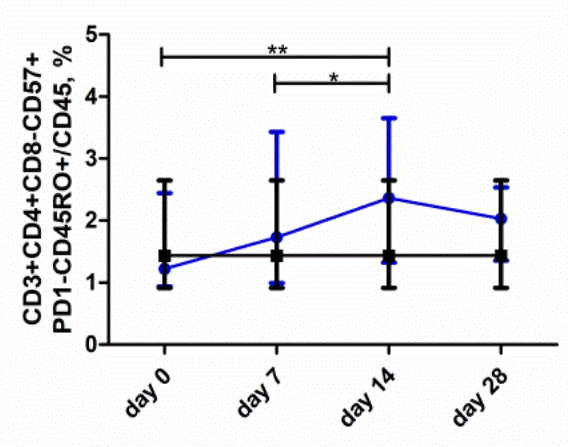
Зрілі CD4+ Т клітини



Виснажені CD4+ Т клітини пам’яті



Зрілі CD4+ Т клітини памяті



Регуляторні CD4+ Т клітини

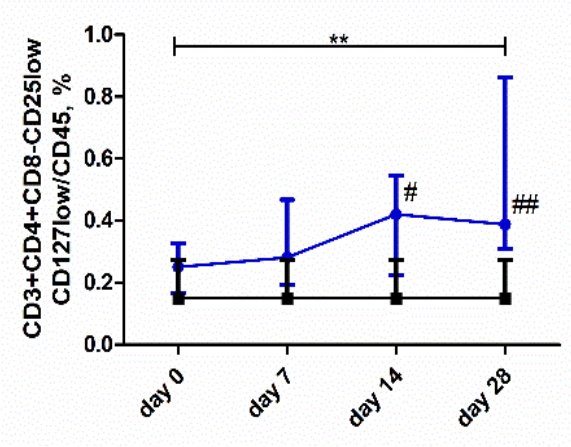


Рис 9. Зміни субпопуляцій CD4+ лімфоцитів. Критерій Вілкоксона: * - p≤0.05; ** - p≤0.01; *** - p≤0.001. Тест Манна-Уітні був використаний для порівняння значень між групами COVID-19 та контролем у кожній точці спостереження: #-p≤0,05; ##-p≤0,01. Синя лінія (коло) зображує групу COVID-19; чорна лінія (квадрат) - група контролю.

Цікаво, що відсоток регуляторних CD4 Т-клітин CD3+CD4+CD8-CD25lowCD127low серед CD45+ клітин збільшувався і залишався значно вищим на 14 та 28 день порівняно з контрольною групою (рис 7).

Порушення регуляції в реактивних CD8 і CD4 Т-клітинах було описано на ранній стадії розвитку імунної відповіді [84, 85]. На 14-й день від початку

госпіталізації пацієнтів, ми спостерігали підвищений вміст ефекторних, активованих, старіючих клітин-пам’яті та виснажених CD4 Т-клітин, а також цитотоксичних, клітин-пам’яті та виснажених CD8 Т-клітин, 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 [86].

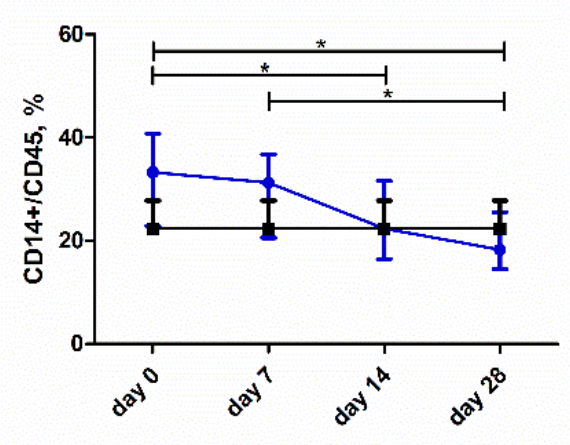
У нашому дослідженні ми виявили сильну кореляцію між активованими CD4 або CD8 Т-клітинами та рівнем експресії PD-1. У той же час раніше відзначалася висока кореляція між клітинами, що експресують PD-1, та активованими CD4 Т-клітинами CD38+HLA-DR+, але не активованими CD8 Т-клітинами [87]. Регуляторні CD8 Т-клітини мають важливі імуносупресивні функції і здатні ефективно блокувати надмірну реакцію імунної відповіді [88]. Ми виявили позитивну кореляцію між регуляторними CD8 Т-клітинами та різними субпопуляціями цитотоксичних Т-клітин у пацієнтів з COVID-19, тоді як Gao et al. [89] показали, що регуляторні CD8 Т-клітини негативно корелюють з частотою цитотоксичних CD8 Т-клітин у крові пацієнтів з легкою та помірною інфекцією COVID-19 [88].

3.7 Зміни у субпопуляціях мієлоїдних клітин у пацієнтів з COVID-19 в динаміці

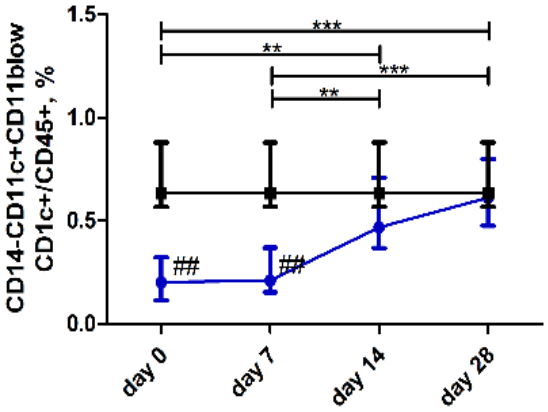
Відсоток CD45+CD14+ моноцитів серед CD45+ клітин крові поступово зменшувався протягом 28 днів. Вміст дендритних клітин CD14-CD11c+CD11blowCD1c+ та CD14-CD1c+ був статистично значимо нижчим на 0 та 7 день порівняно з контрольною групою та мав тенденцію до нормалізації на 14 та 28 день. Вміст плазмоцитарних дендритних клітин CD303+HLA-DR+ серед CD45+ клітин не змінювався протягом 7 днів, а

потім значно збільшився з 7 по 28 день порівняно з 0 днем. Відсоток регуляторних дендритних клітин CD14+CD11bdimCD11clow серед CD45+ клітин крові був зниженим протягом всього періоду спостереження. Відсоток дендритних клітин CD14+CD1c+CD11c+, що беруть участь у запаленні, почав поступово зростати з 7 по 28 день (рис. 10).

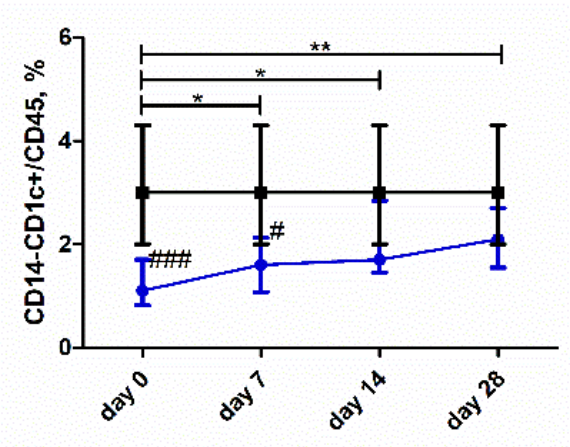
Моноцити



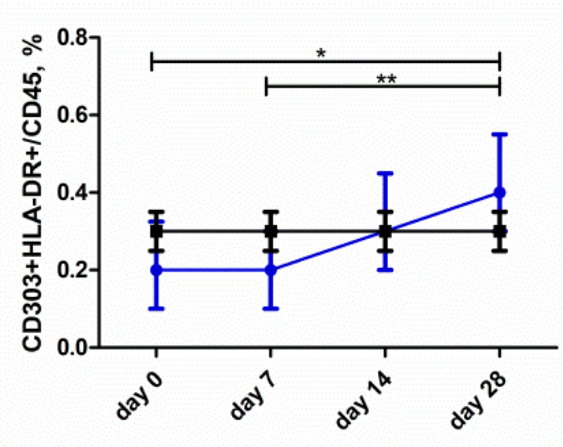
Класичні дендритні клітини



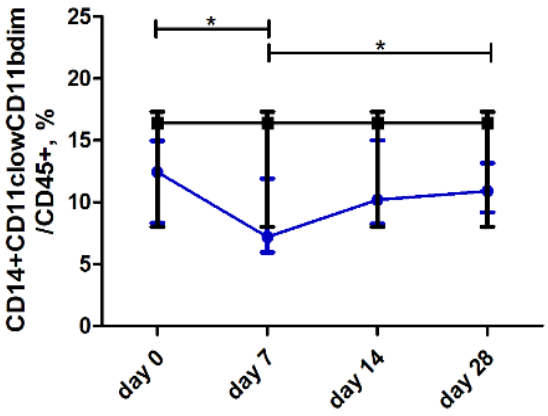
Дендритні клітини



Плазмоцитарні дендритні клітини



Регуляторні дендритні клітини



Дендритні клітини запалення

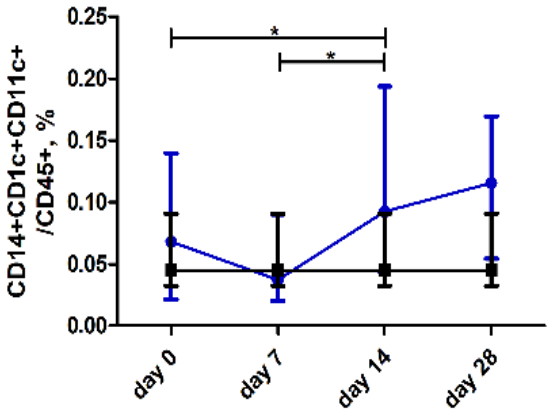


Рис 10. Зміни субпопуляцій CD4+ лімфоцитів. Критерій Вілкоксона: * - p≤0.05; ** - p≤0.01; *** - p≤0.001. Тест Манна-Уітні був використаний для порівняння значень між групами COVID-19 та контролем у кожній точці спостереження: #-p≤0,05; ##-p≤0,01; ###-p≤0,001. Синя лінія (коло) зображує групу COVID-19; чорна лінія (квадрат) - група контролю

Ми припускаємо, що виявлений нами знижений вміст дендритних клітин з одночасним підвищенням відсотка плазмоцитарних дендритних клітин може бути викликаний кортикостероїдною терапією [90]. 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 [72]. Низька частота клітин CD1c+ у периферичній крові у важких пацієнтів з COVID-19 може бути наслідком їх посиленої міграції до легенів [91].

ВИСНОВКИ

Таким чином, в результаті виконання проекту охарактеризовано зміни у рівнях про- та протизапальних цитокінів, рівнях мікро РНК у динаміці протягом 28 діб від початку розвитку захворювання у пацієнтів з COVID-19 після трансплантації МСК та порівняно дані з групами контролю та відносно здорових донорів. Детально проаналізовано субпопуляції ключових популяцій імунних клітин у COVID-19 пацієнтів у динаміці протягом 28 діб від початку розвитку захворювання. Проведено кореляційний аналіз для визначення взаємозв'язку рівнів біомаркерів у периферійній крові та рівнів активованих імунних клітин. Проведено аналіз рівнів біомаркерів та клінічних показників стану пацієнтів з COVID-19 після введення МСК.

1. Розроблено протоколи досліджень вмісту міРНК, білкових біомаркерів та клітинних популяцій в зразках крові пацієнтів з тяжким перебігом пневмонії COVID-19.
2. Встановлено, що COVID-19 супроводжується в більшості випадків лейкопенією, лімфопенією та мієлоцитозом. Отримані нами дані вказують на імунодефіцитний стан та розвиток синдрому «цитокінової бурі» у хворих на COVID-19 на 0 день спостереження.
3. 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 (юних) нейтрофілів.
4. Показано зниження маркерів пошкодження легеневого епітелію сурфактант Д та RAGE після трансплантації МСК протягом всього періоду спостереження.
5. Рівень про-запальних цитокінів IL-6, IP-10 або TNFα слід додатково оцінювати для контролю загального стану запалення у пацієнтів з

COVID-19, через те що рівень СРБ не відображає стану імунної системи у пацієнтів з COVID-19 у фазі відновлення.

6. Виявлено, що трансплантація МСК призводила до більш тривалого зниження таких прозапальних цитокінів як IL-6 та IL-10, транзиторного підняття рівнів TNF-α та MCP-1 та зростання P-10.
7. Створені та валідовані протоколи визначення та документування вмісту міРНК в крові пацієнтів з COVID-19.
8. Визначені відносні рівні експресії miR-21-5p, miR-221-3p, miR-27a-3p, miR-146a-5p, miR-133a-3p, miR-126-3p, miR-92a-3p, miR-124-3p miR-424-5p у хворих на COVID-19 важким перебігом хвороби та хворих на COVID-19 після трансплантації МСК.
9. Встановлено падіння прозапальних мікроРНК (miR-21-5p, miR-221-3p, miR-27a-3p, miR-146a-5p, miR-133a-3p) в плазмі крові пацієнтів хворих на COVID-19 протягом видужання.
10. Трансплантація МСК призводить до зростання рівня miR-92a-3p та miR-424-5p в плазмі крові пацієнтів, асоційованих з дисфункцією ендотеліального бар'єру, що вказує на специфічний ефект клітинної терапії.
11. Підібрано сім панелей антитіл та розроблено і валідовано протокол імунофенотипування окремих субпопуляцій лейкоцитів хворих з тяжким перебігом пневмонії COVID-19.
12. Встановлено підвищений вміст ефекторних, активованих, старіючих і виснажених CD4 Т-клітин, а також цитотоксичних, пам’яті та виснажених CD8 Т-клітин виявлено на 14-ту добу від початку госпіталізації пацієнтів, що свідчить про активацію імунної відповіді проти прогресування запалення в легенях.
13. Вперше описані динамічні зміни CD3+CD4+CD8+ клітин, CD127-експресуючих Т-клітин, CD25-експресуючих Т-клітин, CD3+PD-1low і CD3-PD-1low Т-клітин у хворих з важкою пневмонією COVID-19.

14. Виявлено, що старіючі CD8+ Т-клітини, виснажені CD8+ Т-клітини та класичні дендритні клітини мали найбільш помітний вплив на рівні прозапальних цитокінів та мікроРНК.
15. Встановлено значну кореляцію між ступенем фіброзування легень та такими маркерами запалення як СРБ, ШОЕ, вміст лімфоцитів та нейтрофілів, еозинофілів, miR-221-3p, miR-92a-3p.

НАУКОВІ ДОРОБКИ АВТОРІВ ПРОЄКТУ

1. Bukreieva T., Nikulina V., Skrypkina I., Kyryk V., Vega A., Chybisov O., Duda O., Shablii V. Dynamic alterations of immunophenotype, C reactive protein and interleukine-6 levels in peripheral blood of severe COVID-19 patients. XV annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine. *Biopolymers and Cell.* 2021. Vol. 37. N 3. P. 47.

2. Bukreieva T., Kyryk V., Viktoriia Nikulina V., Svitina H., Vega A., Chybisov O., Shablii Yu, Mankovska O., Lobyntseva G., Nemtinov P., Skrypkina I., Shablii V. Dynamic changes of immunological parameters, selected miRNAs, and cytokines levels in peripheral blood of severe COVID-19 patients**.** Frontiers in Immunology. Frontiers in Immunology, *подано на розгляд до друку.*

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Huang C., Wang Y., Li X. [et al.]. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020. Vol. 10223. P. 497-506.
2. Giamarellos-Bourboulis E.J., Netea M.G., Rovina N. [et al.]. Complex immune dysregulation in COVID-19 patients with severe respiratory failure. *Cell Host Microbe*. 2020. Vol. 27. P. 992-1000.
3. Tavakolpour S., Rakhshandehroo T., Wei E.X. [et al.]. Lymphopenia during the COVID-19 infection: What it shows and what can be learned. *ImmunolLett.* 2020. Vol. 225. P. 31-32.
4. Chen Z., John Wherry E. T cell responses in patients with COVID-19. *NatRevImmunol*. 2020. 20. P. 529-536.
5. Mathew D., Giles J.R., Baxter A.E. [et al.]. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science.* 2020. Vol. 369. P. eabc8511.
6. Kuri-Cervantes L., Pampena M.B., Meng W. [et al.]. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci. Immunol.* 2020. Vol. 5. P. eabd7114.
7. Alosaimi B., Mubarak A., Hamed M.E. [et al.]. Complement Anaphylatoxins and Inflammatory Cytokines as Prognostic Markers for COVID-19 Severity and In-Hospital Mortality. *Front Immunol.* 2021. Vol. 12. P. 668725.
8. Weiskopf D., Schmitz K.S., Raadsen M.P. [et al.]. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *SciImmunol.* 2020. Vol. 5. P. eabd2071.
9. Li M., Guo W., Dong Y. [et al.]. Elevated Exhaustion Levels of NK and CD8+ T Cells as Indicators for Progression and Prognosis of COVID-19 Disease. *Front Immunol.* 2020. Vol. 11. P. 580237.
10. Rodriguez-MoralesA.J., Cardona-OspinaJ.A., Gutiérrez-OcampoE.

[etal.]. Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Travel MedInfectDis.* 2020. Vol. 34. P. 101623.

11. Wang J., Huang R., Xu Q. [et al.]. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Alleviate Acute Lung Injury Via Transfer of miR-27a-3p. *Critical Care Medicine.* 2020. Vol. 48. P.599-610.
12. De Melo P., Pineros Alvarez A.R., Ye X. [et al.]. Macrophage-Derived MicroRNA-21 Drives Overwhelming Glycolytic and Inflammatory Response during Sepsis via Repression of the PGE2IL-10 Axis. *J Immunol.* 2021. Vol. 207, No 3. P. 902-912.
13. Andrzejewska A., Lukomska B., Janowski M. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *StemCells.* 2019. Vol. 37, No 7. P. 855-864.
14. Sharma A., Chakraborty A., Jaganathan B.G. Review of the potential of mesenchymal stem cells for the treatment of infectious diseases. *World J StemCells.* 2021. Vol. 13, No 6. P. 568-593.
15. Sengupta V., Sengupta S., Lazo A. [et al.] Exosomes Derived from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells as Treatment for Severe COVID-19. *StemCellsDev.* 2020. Vol. 29. P. 747-754.
16. Shu L., Niu C., Li R. [et al.]. Treatment of severe COVID-19 with human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2020. Vol. 11, No 1. P. 361.
17. Lanzoni G., Linetsky E., Correa D. [et al.] Umbilical cord mesenchymal stem cells for COVID-19 acute respiratory distress syndrome: A double-blind, phase 12a, randomized controlled trial. *Stem Cells Transl Med.* 2021. Vol. 10, No 5. P. 660-673.
18. Meng F., Xu R., Wang S. [et al.]. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell therapy in patients with COVID-19: a phase 1 clinical trial. *SignalTransduct Target Ther.* 2020. Vol. 5. P. 172.
19. Tang L., Jiang Y., Zhu M. [et al.]. Clinical study using mesenchymal stem cells for the treatment of patients with severe COVID-19. *Front Med.*

2020. Vol. 14. P. 664-673.

20. Feng Y., Huang J., Wu J. [et al.] Safety and feasibility of umbilical cord mesenchymal stem cells in patients with COVID-19 pneumonia: A pilot study. *Cell Prolif.* 2020. Vol. 53. P. e12947.

21. Gorman E., Shankar-Hari M., Hopkins P. [et al.]. Repair of Acute Respiratory Distress Syndrome by Stromal Cell Administration in COVID-19 (REALIST-COVID-19): A structured summary of a study protocol for a randomised, controlled trial. *Trials.* 2020. Vol. 21. P. 462.

22. Kouroupis D., Lanzoni G., Linetsky E. [et al.]. Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells modulate TNF and soluble TNF Receptor 2 (sTNFR2) in COVID-19 ARDS patients. *EurRevMedPharmacolSci.* 2021. Vol. 25, No 12. P. 4435-4438.

23. Saleh M., Vaezi A.A., Aliannejad R. [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. Vol. 12, No 1. P. 410.

24. Shi L., Huang H., Lu X. [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. *SignalTransduct Target Ther.* 2021. Vol. 6, No 1. P. 58.

25. Adas G., Cukurova Z., Yasar K.K. [et al.] The Systematic Effect of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Critical COVID-19 Patients: A Prospective Double Controlled Trial. *Cell Transplant.* 2021. Vol. 30. P. 1-14.

26. Hashemian S.R., Aliannejad R., Zarrabi M. [et al.]. Mesenchymal stem cells derived from perinatal tissues for treatment of critically ill COVID-19-induced ARDS patients: a case series. *Stem Cell Res Ther.* 2021. Vol. 12. P. 91.

27. Xu X., Jiang W., Chen L. [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.

ClinTranslMed. 2021. Vol. 11. P. e297.

28. Hashmi S., Ahmed M., Murad M.H. [et al.] Survival after mesenchymal stromal cell therapy in steroid-refractory acute graft-versus-host disease: systematic review and meta-analysis. *Lancet Haematol.* 2016. Vol. 3. P. e45-52.
29. Zhou T., Li H.Y., Liao C. [et al.]. Clinical Efficacy and Safety of Mesenchymal Stem Cells for Systemic Lupus Erythematosus. *StemCells Int.* 2020. Vol. 2020. P. 6518508.
30. Galipeau J., Galipeau J., Sensébé L. Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell.* 2018. Vol. 22. P. 824-833.
31. Leng Z., Zhu R., Hou W. [et al.] Transplantation of ACE2-Mesenchymal Stem Cells Improves the Outcome of Patients with COVID-19 Pneumonia. *Aging Dis.* 2020. Vol. 11. P. 216-228.
32. Ruan Q., Yang K., Wang W. [et al.] Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med.* 2020. Vol. 46. P. 846-848.
33. Koning J.J., Kooij G., de Vries H.E. [et al.]. Mesenchymal stem cells are mobilized from the bone marrow during inflammation. *Front Immunol.* 2013. Vol. 4. P. 49.
34. Li N., Hua J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. *Cell Mol Life Sci.* 2017. Vol. 74. P. 2345-2360.
35. Abomaray F.M., Al Jumah M.A., Kalionis B. [et al]. Human Chorionic Villous Mesenchymal Stem Cells Modify the Functions of Human Dendritic Cells, and Induce an Anti-Inflammatory Phenotype in CD1+ Dendritic Cells. *Stem Cell RevandRep.* 2015. Vol. 11. P. 423-441.
36. Mázló A., Kovács R., Miltner N. [et al.] MSC-like cells increase ability of monocyte-derived dendritic cells to polarize IL-17-IL-10-producing T cells via CTLA-4. *iScience.* 2021. Vol. 24. P. 102312.
37. Maqbool M., Algraittee S.J.R., Boroojerdi M.H. [et al.]. Human

mesenchymal stem cells inhibit the differentiation and effector functions of monocytes. *InnateImmun.* 2020. Vol. 26. P. 424-434.

38. Melief S.M., Schrama E., Brugman M.H. [et al.]. Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *StemCells.* 2013. Vol. 31. P. 1980-1991.
39. Park H.H., Lee S., Yu Y. [et al.]. TGF-β secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells ameliorates atopic dermatitis by inhibiting secretion of TNF-α and IgE. *StemCells*. 2020. Vol. 38. P. 904-916.
40. Jiang D., Muschhammer J., Qi Y. [et al.]. Suppression of Neutrophil-Mediated Tissue Damage-A Novel Skill of Mesenchymal Stem Cells. *StemCells*. 2016. Vol. 34. P. 2393-2406.
41. MahmoudiM., Taghavi-FarahabadiM., NamakiS. [etal.]. Exosomes derived from mesenchymal stem cells improved function and survival of neutrophils from severe congenital neutropenia patients in vitro. *HumImmunol.* 2019. Vol. 80. P. 990-998.
42. Luz-Crawford P., Kurte M., Bravo-Alegría J. [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. Vol. 4. P. 65.
43. Bernardo M.E., Fibbe W.E. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell.* 2013. Vol. 13. P. 392-402.
44. Fiori A., Uhlig S., Klüter H. [et al.]. Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells Inhibit CD4+ T Cell Proliferation and Induce Regulatory T Cells as Well as CD127 Expression on CD4+CD25+ T Cells. *Cells.* 2021. Vol. 10. P. 58.
45. Miao R., Lim V.Y., Kothapalli N. [et al.]. Hematopoietic Stem Cell Niches and Signals Controlling Immune Cell Development and Maintenance of Immunological Memory. *Front Immunol.* 2020. Vol. 11. P. 600127.

46. Traggiai E., Volpi S., Schena F. [et al.]. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients. *StemCells*. 2008. Vol. 26. P. 562-569.

47. Feng B., Zhu J., Xu Y. [et al.]. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells on lung B cell gene expression in LPS-induced acute lung injury. *Stem Cell Res Ther*. 2020. Vol. 11. P. 418.

48. Schena F., Gambini C., Gregorio A. [et al.]. Interferon-γ-dependent inhibition of B cell activation by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a murine model of systemic lupus erythematosus. *ArthritisRheum.* 2010. Vol. 62. P. 2776-2786.

49. Liu J., Liu Q., Chen X..The Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells on Regulatory B Cells. *Front Immunol.* 2020. Vol. 11. P. 1843.

50. Park J., Pabon M., Choi A.M.K. [et al.]. Plasma surfactant protein-D as a diagnostic biomarker for acute respiratory distress syndrome: validation in US and Korean cohorts. *BMC PulmMed*. 2017. Vol. 17. P. 204.

51. Ware L.B., Zhao Z., Koyama T. [et al.]. Derivation and validation of a two-biomarker panel for diagnosis of ARDS in patients with severe traumatic injuries. *TraumaSurgAcute Care Open*. 2017. Vol. 2. P. e000121.

52. Hendrickson C.M., Matthay M.A. Endothelial biomarkers in human sepsis: pathogenesis and prognosis for ARDS. *PulmCirc*. 2018. Vol. 8. P. 2045894018769876.

53. Shi S., Qin M., Shen B. [et al.]. Association of Cardiac Injury With Mortality in Hospitalized Patients With COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Cardiol*. 2020. Vol. 5. P. 802-810.

54. Guo T., Fan Y., Chen M. [et al.]. Cardiovascular Implications of Fatal Outcomes of Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol*. 2020. Vol. 5. P. 811-818.

55. Akhmerov A., Marbán E. COVID-19 and the Heart. *Circ Res*. 2020. No 126. P. 1443-1455.

56. Li X., Pan X., Li Y. [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. Vol. 24. P. 468.

57. Baba M., Yoshida K., Ieda M. Clinical Applications of Natriuretic Peptides in Heart Failure and Atrial Fibrillation. *Int J MolSci*. 2019. Vol. 20. P. 2824.

58. Flores-Solís L.M., Hernández-Domínguez J.L. Cardiac troponin I in patients with chronic kidney disease stage 3 to 5 in conditions other than acute coronary syndrome. *Clinical Laboratory*. 2014. Vol. 60. P. 281-290.

59. Arunachalam G., Upadhyay R., Ding H. [et al.]. MicroRNA Signature and Cardiovascular Dysfunction. *J CardiovascPharmacol*. 2015. Vol. 65. P. 419-429.

60. CoskunpinarE., CakmakH.A., KalkanA.K. [etal.]. Circulating miR-221-3p as a novel marker for early prediction of acute myocardial infarction. *Gene*. 2016. Vol. 591. P. 90-96.

61. Liu X., Dong Y., Chen S. [et al.]. Circulating microRNA-46a and microRNA-21 predict left ventricular remodeling after ST-elevation myocardial infarction. *Cardiology*. 2015. Vol. 132. P. 233-241.

62. Townley-Tilson W.H., Callis T.E., Wang D. MicroRNAs 1, 133, and 206: Critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010. Vol. 42. P. 1252-1255.

63. Widera C., Gupta S.K., Lorenzen J.M. [et al.]. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *J Mol Cell Cardiol.* 2011. Vol. 51. P. 872-875.

64. Yao Y., Du J., Cao X. [et al.]. Plasma levels of microRNA-499 provide an early indication of perioperative myocardial infarction in coronary artery bypass graft patients. *PLoS One*. 2014. Vol. 9. P. e104618.

65. Liu J., Li S., Liu J. [et al.]. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine*. 2020. Vol. 55. P. 102763.

66. Shi H., Wang W., Yin J. [et al.]. The inhibition of IL-2IL-2R gives rise to CD8 + T cell and lymphocyte decrease through JAK1-STAT5 in critical patients with COVID-19 pneumonia. *Cell Death&Disease*. 2020. Vol. 11. P. 1-8.

67. Lax S.F., Skok K., Zechner P. [et al.]. Pulmonary Arterial Thrombosis in COVID-19 With Fatal Outcome: Results From a Prospective, Single-Center, Clinicopathologic Case Series. *AnnInternMed*. 2020. Vol. 173. P. 350-361.

68. Liao M., Liu Y., Yuan Y. [et al.]. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *J Nature Medicine*. 2020. Vol. 26. P. 842-844.

69. Xu Z., Shi L., Wang Y. [et al.]. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *LancetRespirMed*. 2020. Vol. 8. P. 420-422.

70. Marté J.L., Toney N.J., Cordes L. [et al.]. Early changes in immune cell subsets with corticosteroids in patients with solid tumors: implications for COVID-19 management. *J ImmunotherCancer*. 2020. Vol. 8. P. e001019.

71. AbdinS.M., ElgendyS.M., AlyammahiS.K. [etal.]. Tackling the cytokine storm in COVID-19, challenges and hopes. *Life Sci*. 2020. Vol. 257. P. 118054.

72. Tomić S., Đokić J., Stevanović D. [etal.]. 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. Vol. 12. P. 614599.

73. Deng Z., Zhang M., Zhu T. [et al.]. Dynamic changes in peripheral blood lymphocyte subsets in adult patients with COVID-19. *International Journal ofInfectiousDiseases.* 2020. Vol. 98. P. 353-358.

74. Demaria O., Carvelli J., Batista L. [et al.]. Identification of druggable inhibitory immune checkpoints on Natural Killer cells in COVID-19. *Cell MolImmunol*. 2020. Vol. 17. P. 995-997.

75. Wang J., Jiang M., Chen X. [et al.]. Cytokine storm and leukocyte

changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. *J LeukocBiol.* 2020. Vol. 108. P. 17-41.

76. Riley J.L. PD-1 signaling in primary T cells. *ImmunolRev.* 2009. Vol. 229. P. 114-125.

77. PyzikA., GrywalskaE., Matyjaszek-MatuszekB. [etal.]. 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. *MolecularandCellularEndocrinology.* 2017. Vol. 448. P. 28-33.

78. Nascimbeni M., Shin E.C., Chiriboga L. [et al.]. Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions *Blood.* 2004. Vol. 104. P. 478-486.

79. Overgaard N.H., Jung J-W., Steptoe R.J. [et al.]. CD4+CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *Journal ofLeukocyteBiology.* 2015. Vol. 97. P. 31-38.

80. Iannetta M., Buccisano F., Fraboni D. [et al.]. Baseline T-lymphocyte subset absolute counts can predict both outcome and severity in SARS-CoV-2 infected patients: a single center study. *SciRep.* 2021. Vol. 11. P. 12762.

81. Yang X., Dai T., Zhou X. [et al.]. Naturally activated adaptive immunity in COVID-19 patients. *J Cell MolMed*. 2020. Vol. 24. P. 12457-12463.

82. Kalfaoglu B., Almeida-Santos J., Tye C.A. [et al.]. T-Cell Hyperactivation and Paralysis in Severe COVID-19 Infection Revealed by Single-Cell Analysis. *Front Immunol.* 2020. Vol. 11. P. 589380.

83. Neidleman J., Luo X., FrouardJ. [et al.]. SARS-CoV-2-Specific T Cells Exhibit Phenotypic Features of Helper Function, Lack of Terminal Differentiation, and High Proliferation Potential. *Cell ReportsMedicine*. 2020. Vol. 1 P. 100081.

84. KusnadiA., Ramírez-SuástequiC., FajardoV. [etal.]. Severely ill COVID-19 patients display impaired exhaustion features in SARS-CoV-2-reactive CD8+ T cells. *SciImmunol*. 2021. Vol. 6. P. eabe4782.

85. Peng Y., Mentzer A.J., Liu G. [et al.]. Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *NatImmunol*. 2020. Vol. 21. P. 1336-1345.

86. De Biasi S., Meschiari M., Gibellini L. [et al.]. Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. *NatCommun*. 2020. Vol. 11. P. 3434.

87. Zenarruzabeitia O., Astarloa-Pando G., Terrén 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. Vol. 12. P. 655934.

88. Yu Y., Ma X., Gong R. [et al.]. Recent advances in CD8+ regulatory T cell research. *OncolLett*. 2018. Vol. 15, No 6. P. 8187-8194.

89. Gao M., Liu Y., Guo M. [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. *Journal ofLeukocyteBiology*. 2021. Vol. 109. P. 91-97.

90. Boor P.P.C., Metselaar H.J., Mancham S. [et al.]. Prednisolone Suppresses the Function and Promotes Apoptosis of Plasmacytoid Dendritic Cells. *American Journal ofTransplantation.* 2006. Vol. 6. P. 2332-2341.

91. Campana P., Parisi V., Leosco D. [et al.]. Dendritic Cells and SARS-CoV-2 Infection: Still an Unclarified Connection. *Cells*. 2020. Vol. 9. P. 2046.

92. Yang Y, Shen C, Li J. [et al.]. Plasma IP-10 and MCP-3 levels are highly associated with disease severity and predict the progression of COVID-19. JACI. Vol.146 91). P.119-127.

93. Wang G-L, Gao H-X, Wang Y-L. [et al.]. Serum IP-10 and IL-7 levels are associated with disease severity of coronavirus disease 2019. Cytokine. 2021. Vol. 142. P. 155500.

94. Kleymenov DA., Bykonia EN, Popova LI. A Deep Look Into COVID-19 Severity Through Dynamic Changes in Blood Cytokine Levels. Fron Imm.

2021. Vol. 12. P. 4508.

95. Chen, Y., Wang, J., Liu, C. [et al.]. IP-10 and MCP-1 as biomarkers associated with disease severity of COVID-19. *Mol Med* . 2020. Vol. 97.

96. Rotoli BM, Barilli A, Visigalli R. [et al.]. Endothelial Cell Activation by SARS-CoV-2 Spike S1 Protein: A Crosstalk between Endothelium and Innate Immune Cells. *Biomedicines*. 2021. Vol. 9(9). P. 1220.

97. Ardigo D, Assimes TL, Fortmann SP. [et al.]. Circulating chemokines accurately identify individuals with clinically significant atherosclerotic heart disease. *Physiol Genomics*. 2007. Vol. 31(3). P. 402-9.

98. Tavakolian FV, Mohammadi M, Hassanshahi G. [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. Vol. 233. P. 23-28.

99. 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. Vol.2016. P. 4396368.

100. Shimizu F, Nishihara H, Sano Y. [et al.] Markedly increased IP-10 production by blood-brain barrier in neuromyelitis optica. *PLoS One*. 2015. Vol. 10(3). P. e0122000.

101. Wang K, Wang H, Lou W. [et al.]. IP-10 Promotes Blood-Brain Barrier Damage by Inducing Tumor Necrosis Factor Alpha Production in Japanese Encephalitis. *Front Immunol*. 2018. Vol. 9. P. 1148.

102. Svarraj, J., Park, E.S., Colpo, G.D. [et al.]. Brain injury, endothelial injury and inflammatory markers are elevated and express sex-specific alterations after COVID-19. *J Neuroinflammation* . 2021. Vol. 18. P. 277.

103. Karimabad MN, Kounis NG, Hassanshahi G. [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. Vol. 9(11). P.

1224.

104. Perico, L., Benigni, A., Casiraghi, F. [et al.]. Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19. *Nat Rev Nephrol* . 2021. Vol. 17**. P.** 46–64.

105. Wang K, Wang H, Lou W. [et al.]. IP-10 Promotes Blood-Brain Barrier Damage by Inducing Tumor Necrosis Factor Alpha Production in Japanese Encephalitis. *Front Immunol*. 2018. Vol. 9. P. 1148.

106. Svarraj, J., Park, E.S., Colpo, G.D. [et al.]. Brain injury, endothelial injury and inflammatory markers are elevated and express sex-specific alterations after COVID-19. *J Neuroinflammation* . 2021. Vol. 18. P. 277.

107. Chen, Y., Wang, J., Liu, C. [et al.]. IP-10 and MCP-1 as biomarkers associated with disease severity of COVID-19. *Mol Med* . 2020. Vol. 97.

108. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y. [et al.]. Proinflammatory actions of angiotensins. CurrOpin Nephrol Hypertens. 2001. Vol. 10(3). P. 321–9.

109. Pastore L, Tessitore A, Martinotti S. [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. Vol. 100(15). P. 1646–52.

110. Silva-Filho JL, Caruso-Neves C, Pinheiro AAS. Angiotensin II type-1 receptor (AT1 R) regulates expansion, differentiation, and functional capacity of antigen-specific CD8+ T cells. Sci Re. 2016. Vol. 6. P. 1–17.

111. Xavier LL, Neves PFR, Paz LV. [et al.]. Does Angiotensin II Peak in Response to SARS-CoV-2? Fron. in Imm. 2021. Vol. 11. P. 3562.

112. Rysz, S., Al-Saadi, J., Sjöström, A. [et al.]. COVID-19 pathophysiology may be driven by an imbalance in the renin-angiotensin-aldosterone system. Nat Commun. 2021. Vol. 12. P. 2417.

113. Wu, Z., Hu, R., Zhang, C. [et al.]. Elevation of plasma angiotensin II level is a potential pathogenesis for the critically ill COVID-19 patients. Crit Care. 2020. Vol. 24. P. 290.

114. 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. Vol. 43. P. 648–654.

115. Han H., Ma Q., Li C. [et al.]. Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. EmergMicrobesInfect. 2020. Vol. 9. P. 1123-1130.

116. Zhao Y, Qin L, Zhang P. [et al.]. Longitudinal COVID-19 profiling associates IL-1RA and IL-10 with disease severity and RANTES with mild disease JCI Insight. 2020. Vol. 5(13). P. 139834.

117. Lu L, Zhang H, Dauphars D.J., He Y.-W. A Potential Role of Interleukin 10 in COVID-19 Pathogenesis. Trends in Imm. 2021. Vol. 42: 1. P. 3-5.

118. Haroun R.A-H., Osman W.H., Eessa A.M. Interferon-γ-induced protein 10 (IP-10) and serum amyloid A (SAA) are excellent biomarkers for the prediction of COVID-19 progression and severity. *Life Sciences.* 2021. Vol. 269. P. 119019.

119. Chen W., Zheng K.I., Liu S. [et al.]. Plasma CRP level is positively associated with the severity of COVID-19. *AnnClinMicrobiolAntimicrob*. 2020. Vol. 19. P. 18.

120. Aggravation G., Wang C., Wu Q. [et al.], C-Reactive Protein Level May Predict the Risk of COVID-19, *Open Forum Infect Dis*. 2020. Vol. 7. P. ofaa153.

121. MeizlishM.L., PineA.B., BishaiJ.D. [etal.]. A neutrophil activation signature predicts critical illness and mortality in COVID-19. *BloodAdv*. 2021. Vol. 5. P. 1164-1177.

122. Lev S., Gottesman T., Sahaf Levin G. [et al.]. Observational cohort study of IP-10's potential as a biomarker to aid in inflammation regulation within a clinical decision support protocol for patients with severe COVID-19. *PLoS One.* 2021. Vol. 16. P. e0245296.

123. Tjan L.H., Furukawa K., Nagano T. [et al.]. Early Differences in Cytokine Production by Severity of Coronavirus Disease 2019. *The Journal ofInfectiousDiseases*. 2021. Vol. 223. P. 1145-1149.

124. YangA.P., LiH.M., TaoW.Q. [etal.]. Infection with SARS-CoV-2 causes abnormal laboratory results of multiple organs in patients. *Aging (Albany NY)*. 2020. Vol. 12. P.10059-10069.

125. Liu Y., Tan W., Chen H. [et al.]. Dynamic changes in lymphocyte subsets and parallel cytokine levels in patients with severe and critical COVID-19. *BMC InfectiousDiseases*. 2021. Vol. 21. P. 1-10.

126. Leisman D.E., Ronner L., Pinotti R. [et al.]. Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes. *The LancetRespiratoryMedicine*. 2020. Vol. 8. P. 1233-1244.

127. 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. Vol. 146. P.110412.

128. Lim, A., Radujkovic, A., Weigand, M.A. [et al.]. 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. Vol. 11. P. 50

129. Mokra D, Mikolka P, Kosutova P, Mokry J. Corticosteroids in Acute Lung Injury: The Dilemma Continues. Int J MolSci. 2019. Vol. 20(19). P.4765.

130. Kimura D, Saravia J, Rovnaghi C. R. [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. FrontiersinPediatrics 2016. Vol. 4. P. 31.

131. Jin, Y., Ji, W., Yang, H.[et al.]. Endothelial activation and dysfunction in COVID-19: from basic mechanisms to potential therapeutic approaches. Sig Transduct Target Ther. 2020. Vol. 5. P. 293.

132. Lambert K.A., Roff A.N., Panganiban R.P. [et al.]. MicroRNA-146a

is induced by inflammatory stimuli in airway epithelial cells and augments the anti-inflammatory effects of glucocorticoids. *PLoS One.* 2018. Vol. 13. P. e0205434.

133. Taganov K.D., Boldin M.P., Chang K-J. [et al.]. NF-κB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006. Vol. 103. P. 12481.

134. Zeng Z., Gong H., Li Y. [et al.]. Upregulation of miR-146a contributes to the suppression of inflammatory responses in LPS-induced acute lung injury. *ExpLung Res*. 2013. Vol. 39. P. 275-282.

135. DonyaviT., Bokharaei-SalimF., BaghiH.B. [etal.]. 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. Vol. 97. P. 107641.

136. Garg A., Seeliger B., Derda A.A. [et al.]. Circulating cardiovascular microRNAs in critically ill COVID-19 patients. *European Journal of Heart Failure.* 2021. Vol. 23. P. 468-475.

137. Vaporidi K., Vergadi E., Kaniaris E. [et al.]. Pulmonary microRNA profiling in a mouse model of ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012. Vol. 303. P. L199-207.

138. Wang T., Jiang L., Wei X. [et al.]. Inhibition of miR-221 alleviates LPS-induced acute lung injury via inactivation of SOCS1NF-κB signaling pathway. *Cell Cycle.* 2019. Vol. 18. P. 1893-1907.

139. Sessa R., Hata A. Role of microRNAs in lung development and pulmonary diseases. *Pulm Circ.* 2013. Vol. 3. P. 315-328.

140. Gutmann C, Khamina K, Theofilatos K. [et al.]. Association of cardiometabolic microRNAs with COVID-19 severity and mortality. *Cardiovasc Res*. 2021. Vol. 10. P.cvab338.

141. Adamcova, M.; Kawano, I.; Simko, F. The Impact of microRNAs in Renin–Angiotensin-System-Induced Cardiac Remodelling. *Int. J. Mol. Sci*.

2021. Vol.22. P. 4762.

142. Xue S, Liu D, Zhu W. [et al.]. Circulating MiR-17-5p, MiR-126-5p and MiR-145-3p Are Novel Biomarkers for Diagnosis of Acute Myocardial *Infarction. Front physiol*. 2019. Vol.10. P. 123.

143. Yamada, H., Suzuki, K., Fujii, R. [et al.]. Circulating miR-21, miR-29a, and miR-126 are associated with premature death risk due to cancer and cardiovascular disease: the JACC Study. *Sci Rep*. 2021. Vol. 11**.** P**.** 5298.

144. Zhong Z, Hou J, Zhang Q. [et al.]. Circulating microRNA expression profiling and bioinformatics analysis of dysregulated microRNAs of patients with coronary artery disease.*Medicine*. 2018. Vol. 97 (27). P. e11428.

145. Fayyad-Kazan M, Makki R, Skafi N. [et al.]. Circulating miRNAs: Potential diagnostic role for coronavirus disease 2019 (COVID-19). Infect Genet Evol. 2021. Vol. 94. P. 105020.

146. Fu L, Zhu P, Qi S. [et al.]. MicroRNA-92a antagonism attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced pulmonary inflammation and injury in mice through suppressing the PTEN/AKT/NF-κB signaling pathway. Biomed Pharmacother. 2018. Vol. 107. P. 703-711.

147. Shang F , Wang S-C, Hsu Ch-Y. [et al.]. MicroRNA-92a Mediates Endothelial Dysfunction in CKD JASN. 2017. Vol. 28 (11). P. 3251-3261.

148. Wuttge DM, Carlsen AL, Teku G. [et al.].Specific autoantibody profiles and disease subgroups correlate with circulating micro-RNA in systemic sclerosis. *Rheumatology. 2015*. Vol. 54 (11). P. 2100–2107.

149. de Gonzalo-Calvo D, Benítez ID, Pinilla L. [et al.]. Circulating microRNA profiles predict the severity of COVID-19 in hospitalized patients. *Transl Res*. 2021. Vol. 236. P. 147-159.

150. Xu F, Zhou F. Inhibition of microRNA-92a ameliorates lipopolysaccharide-induced endothelial barrier dysfunction by targeting ITGA5 through the PI3K/Akt signaling pathway in human pulmonary microvascular endothelial cells. Int Immunopharmacol.2020. Vol. 78. P. 106060.

151. Fu L, Zhu P, Qi S. [et al.]. MicroRNA-92a antagonism attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced pulmonary inflammation and injury in mice through suppressing the PTEN/AKT/NF-κB signaling pathway. Biomed Pharmacother. 2018. Vol. 107. P. 703-711.

152. Lai L, Song Y, Liu Y. [et al.]. MicroRNA-92a negatively regulates Toll-like receptor (TLR)-triggered inflammatory response in macrophages by targeting MKK4 kinase. J Biol Chem. 2013. Vol.288(11). P. 7956-7967.

153. Cui J, Li Q, Luo M . [et al.]. Leukemia cell-derived microvesicles induce T cell exhaustion via miRNA delivery. Oncoimmunology. 2018. Vol. 7(7). P. e1448330.

154. Zhang Y, Cheng J, Chen F. [et al.]. Circulating endothelial microparticles and miR-92a in acute myocardial infarction. Biosci Rep. 2017. Vol.37(2). P. BSR20170047.

155. Niculescu LS, Simionescu N, Sanda GM. [et al.]. MiR-486 and miR-92a identified in circulating hdl discriminate between stable and vulnerable coronary artery disease patients. PLoS ONE. 2015. Vol. 10(10). P. e0140958.

156. Muñoz-Pacheco P, Ortega-Hernández A, Miana M. [et al.]. Ezetimibe inhibits PMA-induced monocyte/macrophage differentiation by altering microRNA expression: a novel anti-atherosclerotic mechanism. Pharmacol Res. 2012. Vol.66(6). P.536-43.

157. Zyulina V, Yan K-K, Ju B. [et al.]. The miR-424(322)/503 gene cluster regulates pro- versus anti-inflammatory skin DC subset differentiation by modulating TGF-β signaling. Cell Reports. 2021. Vol. 35 (4). P. 109049.

158. Merlet E, Atassi F, Motiani RK. [et al.]. miR-424/322 regulates vascular smooth muscle cell phenotype and neointimal formation in the rat. Cardiovasc Res. 2013. Vol. 98(3). P.458-68.

159. Ghosh G, Subramanian IV, Adhikari N. [et al.]. Hypoxia-induced microRNA-424 expression in human endothelial cells regulates HIF-α isoforms and promotes angiogenesis. J Clin Invest. 2010. Vol. 120 (11). P.

4141-54.

160. de Gonzalo-Calvo D, Dávalos A, Montero A. [et al.]. Circulating inflammatory miRNA signature in response to different doses of aerobic exercise. J Appl Physiol (1985). 2015. Vol. 119(2). P. 124-34.

161. Bye A, Røsjø H, Nauman J, Silva GJ. [et al.]. Circulating microRNAs predict future fatal myocardial infarction in healthy individuals - The HUNT study. J Mol Cell Cardiol. 2016. Vol.97. P. 162-8.

162. Wang M, Liang L, Li L. [et al.]. Increased miR-424-5p expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with pemphigus. Mol Med Rep. 2017. Vol. 15. P. 3479-3484.

163. Sardar R, Satish D, Birla S, Gupta D. Comparative analyses of SAR-CoV2 genomes from different geographical locations and other coronavirus family genomes reveals unique features potentially consequential to host-virus interaction and pathogenesis. Heliyon. 2020. Vol. 6 (9). P. E04658.

164. Nersisyan S, Engibaryan N, Gorbonos A. [et al.]. Potential role of cellular miRNAs in coronavirus-host interplay. PeerJ. 2020. Vol. 8. P. e9994.

165. Sevgin O, Sevgin K Systematic Review of microRNAs in the SARS-CoV-2 Infection: Are microRNAs Potential Therapy for COVID-19?. J Genet Genome Res. 2021. Vol. 8. P. 053.