

На правах рукописи

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
Гематологический научный центр  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Макарова Полина Михайловна

Применение мультипотентных мезенхимных стромальных клеток для лечения  
септического шока у больных в состоянии агранулоцитоза.

14.01.21 – гематология и переливание крови

14.01.20 – анестезиология и реаниматология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель,

д.м.н.

Научный руководитель,

д.м.н.

Галстян Г.М.

Паровичникова Е.Н.

Москва 2016

## **Оглавление**

|   |       |
|---|-------|
| Введение  | 6-10  |
| Глава 1. Обзор литературы   | 11-37 |
| 1.1. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки при сепсисе                                 | 11-28 |
| 1.2. Биомаркеры при сепсисе   | 28-37 |
| Глава 2. Материалы и методы   | 38-54 |
| 2.1. База исследования  | 38-38 |
| 2.2. Дизайн исследования  | 38-47 |
| 2.3. Основные понятия   | 47-49 |
| 2.4. Получение мультипотентных мезенхимных стромальных клеток                                   | 49-51 |
| 2.5. Характеристика больных в группах   | 51-53 |
| 2.6. Статистический анализ  | 53-54 |
| Глава 3. Результаты собственных исследований  | 55-98 |
| 3.1. Клинико-лабораторная характеристика септического шока у больных в состоянии агранулоцитоза | 55-55 |
| 3.2. Течение сепсиса и септического шока у больных в состоянии агранулоцитоза                   | 55-86 |
| 3.2.1. Изменения тяжести состояния больных, оцененной по шкале SOFA                             | 55-57 |
| 3.2.2. Изменения неврологического статуса у больных с септическим шоком                         | 57-58 |
| 3.2.3. Острая дыхательная недостаточность у больных с септическим шоком                         | 58-60 |
| 3.2.4. Сердечно-сосудистая недостаточность у больных с септическим шоком                        | 60-61 |
| 3.2.5. Острая почечная недостаточность у больных с септическим шоком                            | 62-63 |
| 3.2.6. Параметры полиорганной дисфункции у больных с септическим шоком                          | 63-65 |
| 3.2.7. Динамика показателей гемограммы у больных с септическим шоком                            | 65-68 |
| 3.2.8. Безопасность терапии мультипотентными мезенхимными стромальными клетками                 | 68-68 |

|  |         |
|--|---------|
| 3.2.9. Клиническая картина течения септического шока   | 68-69   |
| 3.2.10. Изменения шкалы APACHE II у больных с септическим шоком  | 69-71   |
| 3.2.11. Выживаемость больных с септическим шоком   | 71-72   |
| 3.3. Этиология септического шока   | 72-73   |
| 3.4. Изменения воспалительных маркеров в крови у больных с септическим шоком   | 73-96   |
| 3.4.1. Концентрации воспалительных маркеров в крови у больных в состоянии агранулоцитоза без инфекционных осложнений                           | 73-73   |
| 3.4.2.Изменения плазменной концентрации пресепсина   | 73-79   |
| 3.4.3.Изменения сывороточной концентрации прокальцитонина  | 79-82   |
| 3.4.4.Изменения сывороточной концентрации С-реактивного белка  | 83-86   |
| 3.4.5. Изменения плазменной концентрации интерлейкина-6  | 86-89   |
| 3.4.6. Изменения плазменной концентрации интерлейкина-10   | 89-91   |
| 3.4.7. Сравнение диагностической значимости провоспалительных маркеров у больных с септическим шоком в состоянии агранулоцитоза                | 91-96   |
| 3.5. Клиническое наблюдение: применение мультипотентных мезенхимных стволовых клеток для лечения септического шока у больной с агранулоцитозом | 96-98   |
| Глава 4. Обсуждение  | 99-106  |
| Заключение   | 107-108 |
| Выводы   | 109-109 |
| Практические рекомендации  | 110-111 |
| Приложение №1. Информированное согласие  | 112-115 |
| Приложение №2. Протокол проспективного клинического исследования по оценке эффективности терапии мультипотентными мезенхимными                 | 116-125 |
| Список литературы  |         |

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АД – артериальное давление
- АТ III – антитромбин III
- АЧТВ – активированное частичное тромбиновое время
- БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж
- ИГКДО - индекс глобального конечно-диастолического объема левого желудочка
- ИВЛ - искусственная вентиляция легких
- ИЛ-6 – интерлейкин-6
- ИЛ-10 – интерлейкин-10
- ЗПТ – заместительная почечная терапия
- КОЕ - колониеобразующие единицы
- ЛПС - липополисахарид
- МКИ – межквартильный интервал
- ММСК – мультипотентные мезенхимные стромальные клетки
- ОДН - острая дыхательная недостаточность
- ОПН - острая почечная недостаточность
- ИОПСС – индекс общего периферического сосудистого сопротивления
- ПКТ – прокальцитонин
- ССВО - синдром системного воспалительного ответа
- СРБ - С-реактивный белок
- СШ - септический шок
- ФБС - фибробронхоскопия
- ЦВД – центральное венозное давление
- ЭДТА - этилендиаминтетраацетат
- APACHEII – Acute Physiology And Chronic Health Evaluation (шкала клинической оценки тяжести состояния пациента)
- AUC – area under curve (площадь под кривой)
- CASP- colon ascendens stent peritonitis (перитонит, вызванный установкой стента в восходящую толстую кишку)
- CLP- cecaligation & puncture (пункция и перевязка слепой кишки)
- COX2- cyclooxygenase-2 (циклооксигеназа 2)
- CTLs- cytotoxic T cells (цитолитические Т-клетки)

FACS- fluorescence-activated cell sorting (сортировка клеток с активированной флуоресценцией)

INOS – inducible nitricoxidesynthase (индуцибельная синтаза оксида азота)

HIF-1- hypoxia-inducedfactor 1 (индуцируемый гипоксией фактор 1)

HGF- hepatocyte growth factor (фактор роста гепатоцитов)

MCP-1- monocyte chemoattractant protein 1(моноцитарный хемоаттрактантный протеин 1)

MyD88 – myeloiddifferentiation primary response gene 88 (белок первичного ответа миелоидной дифференцировки 88)

NO - nitricoxide (оксид азота)

NF-κB - nuclear factor κB (нуклеарныйфактор κB)

PAI-1 - plasminogen activator inhibitor-I (ингибитор активатора плазминогена I типа)

ScvO2 - central venous oxugen saturation (сатурация центральной венозной крови)

SCF- stem cell factor (фактор роста стволовых клеток)

SDF-1 - stromal cell-derived factor (стромально-клеточныйфактор)

sIL2rR - soluble IL-2 receptors (растворимые рецепторы интерлейкина-2)

sHLA-G - soluble human leukocyte antigen G (растворимый человеческий лейкоцитарный антиген G)

SNAP - S-nitroso-N-acetylpenicillamine (С-нитро-N-ацетилпеницилламин)

SOFA - Sepsis-related Organ Failure Assessments Score / Sequential Organ Failure Assessment (шкала оценки органной недостаточности, связанной с сепсисом)

TGF-β- Transforming growth factor β (трансформирующий ростовой фактор β)

Th1- T-helper 1 (Т-хелпер 1)

TLR4 - toll-like receptor 4 (толл-подобный рецептор 4)

TNF-α- tumor necrosis factor- α (фактор некроза опухолей α)

VCAM-1- vascular cell adhesion molecule-1 (молекула сосудистой клеточной адгезии 1 типа)

VEGF- vascular endothelial growth factor (фактор роста сосудистого эндотелия)

## **Актуальность темы исследования**

Сепсис регистрируется у 30% онкогематологических больных после проведения курсов химиотерапии [58] и является одной из наиболее частых причин перевода их в отделения реанимации и интенсивной терапии [117]. Одним из наиболее тяжелых проявлений сепсиса является септический шок, являющийся независимым предиктором летального исхода [17]. Выживаемость при септическом шоке у больных в состоянии агранулоцитоза составляет всего 27% [17]. Увеличение выживаемости при сепсисе и септическом шоке в последние десятилетия достигнуто не за счет принципиально новых методов лечения, а благодаря организационным мероприятиям - созданию международных рекомендаций [14, 36] по лечению сепсиса и септического шока, в которых прописана последовательность действий, целевые показатели. Принципиальными алгоритмами лечения сепсиса и септического шока являются: назначение эмпирической терапии антибиотиками широкого спектра действия; проведение вolemической нагрузки под контролем центрального венозного давления и индекса глобального конечного диастолического объема; вазопрессорная терапия норадреналином; внутривенная инфузия гидрокортизона в дозе 200-300 мг в сутки; проведение заместительной почечной терапии при развитии острой почечной недостаточности; проведение искусственной вентиляции легких при развитии острой дыхательной недостаточности. В то же время резервы подобного подхода во многом исчерпаны и необходимы принципиально новые методы лечения. Одним из таких перспективных методов является применение для лечения сепсиса и септического шока мультипотентных мезенхимных стволовых клеток.

Обоснованием для применения мультипотентных мезенхимных стволовых клеток при сепсисе являются данные о механизмах их действия, полученные как в исследованиях на клеточных культурах, так и в экспериментах на животных. При

внедрении в организм инфекционного агента мультипотентные мезенхимные стромальные клетки выделяют факторы роста, которые регулируют иммунный эффект Т- и В-клеток, дендритных клеток, моноцитов, нейтрофилов, макрофагов, влияя тем самым на эндотелиальную и эпителиальную проницаемость, продукцию противовоспалительных и провоспалительных цитокинов и уменьшая выраженность воспаления клетки (увеличение синтеза простагландина E2, активация рецепторов простагландина E2 на макрофагах, увеличение синтеза интерлейкина-10 и уменьшение синтеза интерлейкина-6 и фактора некроза опухолей  $\alpha$ ), способствуя бактериальному киллингу и клиренсу [63, 101, 132].

В настоящее время клиническая эффективность мультипотентных мезенхимных стволовых клеток при сепсисе не изучена. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки применяются в клинической практике для лечения реакции «трансплантат против хозяина» у больных после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, доказана безопасность и эффективность их применения у этой категории больных [10, 40, 60, 76, 78, 118, 147]. Терапия мультипотентными мезенхимными стромальными клетками обеспечивает эффективную профилактику острой реакции «трансплантат против хозяина» при трансплантации аллогенного костного мозга.

Исследования по применению мультипотентных мезенхимных стволовых клеток при септическом шоке только начаты в нескольких центрах, результаты этих исследований пока не опубликованы.

В связи с вышеизложенным, исследование эффективности мультипотентных мезенхимных стволовых клеток при септическом шоке у больных с агранулоцитозом представляется актуальным и своевременным.

## **Цель исследования**

Изучить эффективность применения мультипотентных мезенхимных стромальных клеток в лечении септического шока у больных в состоянии агранулоцитоза в рамках рандомизированного контролируемого проспективного исследования.

## **Задачи исследования**

1. Охарактеризовать клиническое течение септического шока у больных в период агранулоцитоза: сроки возникновения, этиологические факторы, развитие инфекционных осложнений, длительность вазопрессорной терапии, развитие полиорганной недостаточности.
2. Оценить эффективность и безопасность применения мультипотентных мезенхимных стромальных клеток в лечении септического шока в рамках рандомизированного исследования.
3. Сравнить диагностическую значимость и возможность применения воспалительных маркеров для мониторинга терапии у больных септическим шоком в состоянии агранулоцитоза.
4. Провести сравнительный анализ клинических и лабораторных параметров септического шока у больных, у которых применялись и не применялись мультипотентные мезенхимные стромальные клетки.
5. Оценить краткосрочную и отдаленную выживаемость после применения мультипотентных мезенхимных стромальных клеток для лечения септического шока у больных в состоянии агранулоцитоза.

## **Научная новизна работы**

Впервые выполнено рандомизированное исследование, которое показало, что введение мультипотентных мезенхимных стромальных клеток больным в состоянии агранулоцитоза в первые десять часов развития септического шока приводит к увеличению выживаемости в течение 28 дней более чем в три раза по сравнению с больными, получавшими стандартную терапию при септическом шоке. Лечение с



помощью мультипотентных мезенхимных стромальных клеток позволило в два раза быстрее вывести больного из состояния шока, стабилизировать артериальное давление и прекратить терапию вазопрессорами и инотропами.

Выявлены два возможных пути реализации благоприятного действия мультипотентных мезенхимных стромальных клеток при септическом шоке - уменьшение выраженности ассоциированной с сепсисом полиорганной дисфункции и уменьшение продукции провоспалительных цитокинов.

Продемонстрировано, что на следующий день после введения мультипотентных мезенхимных стромальных клеток у больных уменьшались выраженность полиорганной дисфункции, тяжесть дыхательной и сердечно-сосудистой недостаточности.

Отмечено, что терапия мультипотентными мезенхимными стромальными клетками ассоциируется с уменьшением продукции прокальцитонина, С-реактивного белка, интерлейкина-6, пресепсина.

Впервые показано, что пресепсин является эффективным диагностическим маркером сепсиса у этой категории пациентов.

Подана заявка на изобретение № 2015121543/15 (033496) от 19.06.2015: Способ лечения септического шока в состоянии агранулоцитоза.

### **Практическая значимость**

Предложен эффективный и безопасный метод лечения септического шока у больных в состоянии агранулоцитоза. Изучение показателей воспалительных маркеров и маркеров полиорганной недостаточности у больных септическим шоком в течение длительного времени позволило предложить повторное использование мультипотентных мезенхимных стромальных клеток для профилактики возможных инфекционных осложнений и прогрессии полиорганной недостаточности.

Предложено использовать такие маркеры как пресепсин, прокальцитонин, С-реактивный белок, интерлейкин-6 для диагностики сепсиса и септического шока у больных в состоянии агранулоцитоза.

Выявлены наиболее диагностически и прогностически значимые маркеры сепсиса (пресепсин) и септического шока (интерлейкин-6) у больных в состоянии агранулоцитоза.

Впервые показано, что пресепсин может применяться в клинической практике у онкогематологических больных.

### **Внедрение в практику**

- полученные результаты представлены на ведущих отечественных и зарубежных конгрессах, съездах и конференциях в виде устных и стендовых докладов

- материалы исследования опубликованы в российских медицинских периодических изданиях

- создан алгоритм диагностики и мониторинга септического шока у больных гемобластозами с помощью лабораторных маркеров

### **Публикации:**

По теме диссертации опубликовано 4 статьи в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК РФ, и 2 тезисов.

Работа выполнена в ФГБУ Гематологический научный центр МЗ РФ (генеральный директор - академик РАН, д.м.н., профессор В.Г. Савченко) на базе научно-клинического отделения анестезиологии и реаниматологии (заведующий отделением д.м.н. – Г.М. Галстян).

### **Объем и структура диссертации:**

Диссертация изложена на 138 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов, практических рекомендаций и библиографического указателя, включающего 151 работу. Текст диссертации проиллюстрирован 13 таблицами и 46 рисунками.

## Глава 1. Обзор литературы.

### 1.1. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки при сепсисе

Ежегодно в мире регистрируется 18 миллионов случаев сепсиса, 30% из них заканчиваются летальным исходом [58]. До 2020 года прогнозируется увеличение случаев заболевания сепсисом ежегодно на 1,5% [117].

Сепсис — это системный воспалительный ответ организма на инфекцию, проявляющийся комплексом ответных реакций на значимые антигены микробных тел: липополисахарид (ЛПС), пептидоглюкан и липотейхоевую кислоту, ряд внеклеточных ферментов и токсинов. Воспалительный ответ при сепсисе реализуется за счет лейкоцитов, гуморальных факторов (цитокины, простагландины, факторы коагуляции) и сосудистого эндотелия. Этот процесс складывается из взаимодействия про- и противовоспалительных медиаторов, модулирующих состояние эндотелия. Избыточная продукция цитокинов и других медиаторов воспаления нарушает баланс между провоспалительными (фактор некроза опухоли  $\alpha$ -tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), интерлейкины (ИЛ)-1, -6, -8 и др.) и противовоспалительными (ИЛ-4, -10, -11, -13) медиаторами, повреждает контролирующую функцию иммунной системы, что может осложниться септическим шоком (СШ) и полиорганной недостаточностью [99]. Однако при сепсисе возникает не просто гиперпродукция про- и противовоспалительных медиаторов и активация других регуляторных систем (от апоптоза и коагуляции до выброса гормонов), а дисрегуляция системной воспалительной реакции, которая позволяет ее обозначить как “медиаторный хаос” [84]. Эта реакция может быть автономной, неконтролируемой и независимой от иницирующего фактора. При этом диссеминация микробных тел, экзо- и/или эндотоксинов может быть кратковременной или отсутствовать, однако и в такой ситуации возможен “запуск” цитокинового взрыва [51, 109].

Самое тяжелое проявление сепсиса, СШ, занимает одну из лидирующих позиций в мире по уровню смертности [17, 36]. Особенно прогностически неблагоприятно протекает СШ у больных в состоянии агранулоцитоза, среди таких пациентов

летальность достигает 50-90% [124, 136], что почти в 1,7 раз выше, чем у неиммунокомпromетированных больных.

Диагноз СШ устанавливается при выявлении сепсиса, протекающего с признаками нарушения органной перфузии и артериальной гипотензией, сохраняющейся, несмотря на инфузию адекватных объемов жидкости, и требующей для своей коррекции введения инотропных и/или вазопрессорных препаратов [58].

Успехи, достигнутые в последние десятилетия в лечении СШ, носят, в основном, «тактический» характер и связаны с применением новых антибиотиков и организационных мероприятий, систематизации принципов лечения [21, 116]. В то же время стратегия лечения сепсиса, СШ только как микробиологического феномена себя исчерпала. Необходимы новые технологии, которые могли бы улучшить выживаемость при СШ, воздействуя не на патогены, а на изменения в организме, вызванные этими патогенами.

Таким направлением в терапии тяжелого сепсиса и СШ может явиться применение клеточной терапии, в частности мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК).

Впервые термин «мезенхимные стволовые клетки» для обозначения прилипающих к пластику стромальных клеток костного мозга, способных к дифференцировке в остеобласты, адипоциты и хондробласты, ввел Арнольд Каплан [24]. Поскольку способность к самоподдержанию этих клеток не была подтверждена, мировое сообщество договорилось называть их ММСК [82, 86]. Описаны эти клетки были в 1968 г. отечественными учеными А.Я. Фриденштейном, К.В. Петраковой, А.И. Куролесовой и Г.П. Фроловой [46]. Отличительными критериями ММСК являются: 1) прилипание пластику при стандартных условиях культивирования; 2) экспрессия CD105, CD73 и CD90, отсутствие экспрессии CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79, CD19 и HLA-DR; 3) способность дифференцироваться в адипоциты, остеоциты и хондроциты *in vitro* [24, 57]. ММСК интенсивно изучаются в последние годы в связи с их использованием в клеточной терапии и тканевой инженерии [46, 111] и возможным дальнейшим клиническим применением [84]. Выявлены иммуномодулирующие

способности ММСК [151,48], их участие в регенерации тканей скелета [73, 96, 110]. Показана роль ММСК в поддержании кроветворения [38, 39, 50, 52, 64].

Считается, что ММСК не подвергаются аллогенному отторжению у человека [15] и поэтому могут быть трансплантированы реципиенту без специальной иммуносупрессии [88]. Имеются данные об их слабой иммуногенности [95, 100].

Применение ММСК с лечебной целью основано на том, что они выделяют факторы роста, которые регулируют иммунный эффект Т- и В-клеток, дендритных клеток, моноцитов, нейтрофилов, макрофагов, влияя тем самым на эндотелиальную и эпителиальную проницаемость, продукцию противовоспалительных и провоспалительных цитокинов и уменьшая выраженность воспаления [63, 132]. Клинические и экспериментальные исследования показали, что ММСК могут оказывать терапевтический эффект при остром инфаркте миокарда [80, 89, 94], сахарном диабете [81], печеночной недостаточности [112], острой почечной недостаточности [135], для лечения и профилактики острой реакции «трансплантат против хозяина», возникающей после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток [10, 59, 60, 76, 82], при блеомицининдуцированном фиброзе легких [108, 146], некротическом энтероколите [133], остром повреждении легких [31, 33, 53, 79, 127] и других патологических состояниях. Одним из перспективных направлений применения ММСК является их использование для лечения сепсиса. Обоснованием для применения ММСК при сепсисе являются данные о механизмах их действия, полученные как в исследованиях на клеточных культурах, так и в экспериментах на животных.

На модели смешанных культур ММСК и макрофагов показано, что компонент стенки бактерий липополисахарид (ЛПС), попадая в кровоток, действует на толл-подобные рецепторы 4 (toll-like receptor –TLR), расположенные на ММСК. TLR4 - это рецепторы, необходимые для реализации эффекта ЛПС на ММСК, через них - на макрофаги. В экспериментах, в которых макрофаги культивировали с ММСК, полученными от Tlr4-/- мышей, т.е. мышей, дефицитных по TLR4, добавление ЛПС не сопровождалось активацией макрофагов, оцениваемой по увеличению содержания ИЛ-10 в культуральной среде [101]. В неактивном состоянии TLR4 находятся в мембране в

мономерном состоянии. Активация TLR4 происходит при их связывании с ЛПС, при этом они димеризуются, что приводит к последующей передаче сигнала внутрь клетки. После активации рецептора он связывается в цитоплазме с TIR домен-содержащим адаптерным белком MyD88 - белком первичного ответа миелоидной дифференцировки 88. Этот белок необходим для активации нуклеарного фактора  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). MMCK от MyD88<sup>-/-</sup> мышей не стимулируют секрецию ИЛ-10 (рис.1) [101].

Второй сигнал MMCK получают от произведенного макрофагами TNF- $\alpha$ . На поверхности MMCK презентированы два типа рецепторов к TNF -TNFR-1 и TNFR-2. Для активации MMCK с помощью TNF- $\alpha$  необходимы TNFR-1 [101].TNF- $\alpha$  связываясь с TNFR1 на поверхности MMCK, как и ЛПС, дает сигнал к активации MyD88, который активирует NF- $\kappa$ B.В результате через 30 мин после воздействия ЛПС в MMCK отмечается активация NF- $\kappa$ B, что приводит к продукции циклооксигеназы 2 (COX2)[22, 101, 137]. COX2 является важным ферментом в дальнейшей цепи взаимодействия MMCK и макрофагов. О влиянии ЛПС и TNF- $\alpha$  на продукцию COX2 свидетельствует то, что повышенные экспрессия и активация COX2 в MMCK, наблюдаемые через 3 ч и 5 ч после ЛПС стимуляции, исчезают, если MMCK предварительно обработать антителами к TNF- $\alpha$  или собрать от TLR4<sup>-/-</sup> мышей, т.е. мышей, у которых отсутствуют рецепторы к ЛПС [101].

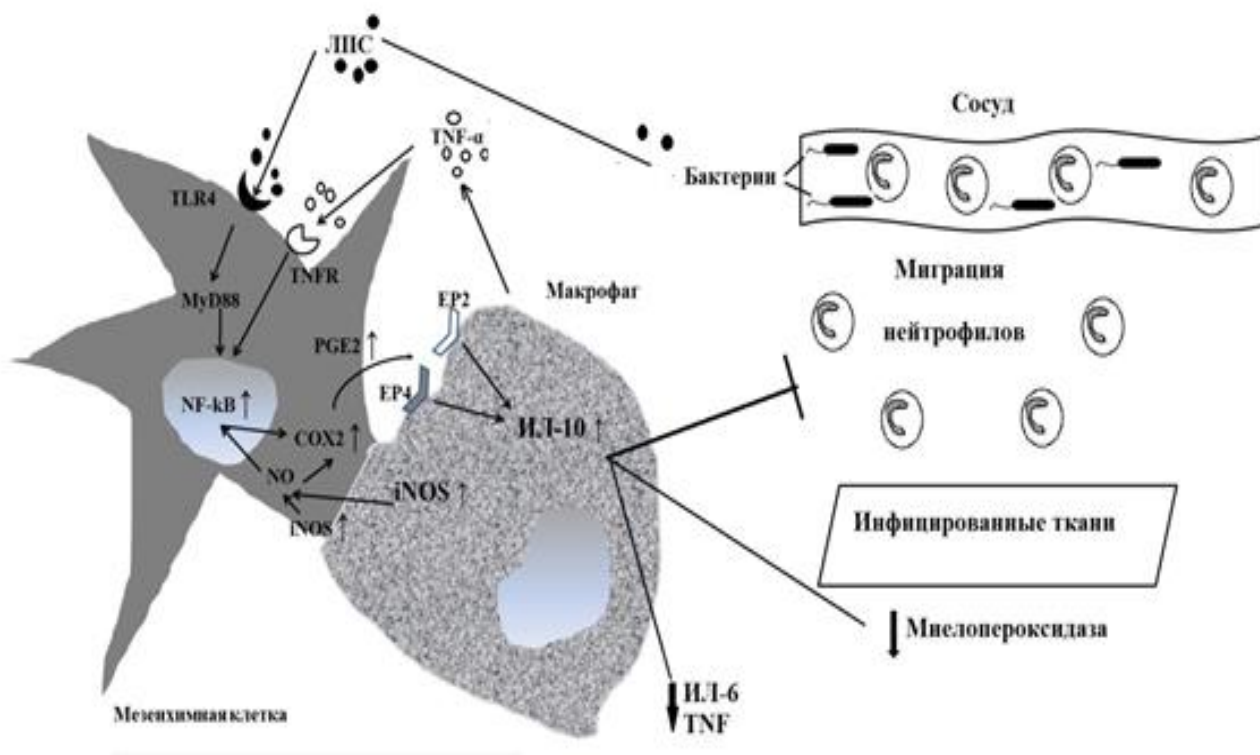


Рисунок 1. Молекулярные механизмы взаимодействия ММСК и макрофагов при сепсисе (переработанный и дополненный по работам А. Tyndall и V. Pistoia [137] и К. Németh и соав. [101]).

COX2 катализирует повышенный синтез простагландина E2. Роль ЛПС и TNF-α в продукции простагландина E2 макрофагами подтверждают эксперименты, в которых обнаружили, что повышение содержания простагландина E2 в культуральной среде после ЛПС стимуляции исчезает, если ММСК предварительно инкубировать с антителами к TNF или ММСК получить от TLR4<sup>-/-</sup> мышей [101].

Помимо опосредованного через рецепторы TNFR-1 и TLR4 в ММСК существует еще один механизм индукции COX2- действие оксида азота (NO), продуцируемого ММСК и/или макрофагами. Ингибирование индуцируемой в ММСК NO-синтазы (iNOS) приводит к уменьшению активности фермента COX2 через 1ч, 3 ч и 5 ч после ЛПС стимуляции [101]. Влияние NO подтверждено также в экспериментах, в которых использовали клетки, полученные от Nos2<sup>-/-</sup> мышей, т.е. мышей, дефицитных по ферменту индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS-2). Установлено, что при использовании только костномозговых ММСК или только макрофагов от Nos2<sup>-/-</sup>

мышей под действием ЛПС продукция ИЛ-10 сохранялась. Однако, когда использовали одновременно и ММСК, и макрофаги от *Nos2*<sup>-/-</sup> мышей, ЛПС не индуцировал продукцию ИЛ-10, т.е. существует два источника iNOS-2 - ММСК и макрофаги, а NO может быть продуцирована либо ММСК, либо макрофагами. Чтобы показать, что этот эффект связан с потерей iNOS активности и прекращением продукции NO, добавляли S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) - внешний донор NO, к системе. SNAP полностью восстанавливал способность *Nos2*<sup>-/-</sup> клеток повышать продукцию ИЛ-10 в ответ на ЛПС [101].

Простагландин E2 влияет на продукцию цитокинов макрофагами, действуя на специфические рецепторы EP2 и EP4, расположенные на поверхности ММСК, которые перепрограммируют макрофаги [27]. В результате уменьшается высвобождение макрофагами провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$  и ИЛ-6 и повышается высвобождение противовоспалительного цитокина ИЛ-10. ИЛ-10 снижает экстравазацию и миграцию нейтрофилов в инфицированные ткани и нейтрофил-опосредованное повреждение тканей за счет уменьшения продукции миелопероксидазы [108]. Для изучения этого взаимодействия использовали антагонисты различных рецепторов простагландинов и макрофаги от мышей, дефицитных по различным рецепторам простагландинов. В этих экспериментах использование антагонистов рецепторов EP1 и EP3, на которые не действует простагландин E2, либо макрофагов от *Ptger1*<sup>-/-</sup> и *Ptger3*<sup>-/-</sup> мышей, т.е. животных, у которых отсутствуют ген, кодирующий, соответственно, рецепторы EP1 и EP3, не влияло на ЛПС-индуцированную секрецию ИЛ-10 макрофагами [101]. Применение в культуре клеток антагонистов рецепторов EP2 и EP4, специфичных для простагландина E2, либо макрофагов от *Ptger2*<sup>-/-</sup> и *Ptger4*<sup>-/-</sup> мышей, т.е. мышей у которых отсутствуют ген, кодирующий, соответственно, рецепторы EP2 и EP4, предупреждало повышение секреции ИЛ-10, вызванное ЛПС. Таким образом, именно EP2 и EP4 рецепторы ответственны за опосредованное ММСК повышение секреции ИЛ-10 макрофагами под действием ЛПС. Для реализации этого эффекта необходимо взаимодействие ЛПС с TLR4 рецепторами, поскольку добавление ЛПС в среду, где культивировались макрофаги совместно с ММСК, полученными от *Tlr4*<sup>-/-</sup> мышей, не увеличивало продукцию ИЛ-10 [101].



Таким образом, ММСК отвечают на наличие инфекционного агента увеличением синтеза простагландина E2, активацией рецепторов простагландина E2 на макрофагах, увеличением синтеза ИЛ-10 и уменьшением синтеза ИЛ-6 и TNF- $\alpha$ . Схема взаимодействия ММСК и макрофагов представлена на рисунке 1.

ММСК взаимодействуют и с другими клетками, отвечающими за иммунный ответ. ММСК способствуют бактериальному киллингу и клиренсу через паракринные взаимодействия с локальными иммунными клетками. S.H. Mei и соавт. [92] показали, что ММСК способны регулировать гены в макрофагах, ответственные за фагоцитоз, в результате отмечено значимое улучшение бактериального клиренса. При сепсисе происходит активация нейтрофилов, которые высвобождают провоспалительные цитокины, мигрируют в ткани, где выделяют ферменты, реактивный кислород, что приводит к органной дисфункции [144]. Паракринные сигналы из ММСК ослабляют продукцию провоспалительных цитокинов макрофагами и ингибируют нейтрофильный хемотаксис, уменьшают трансмиграцию нейтрофилов и вызванные сепсисом повреждения легких, печени, почек [144].

ММСК замедляют созревание В-клеток и нарушают в них переключение синтеза антител, подавляя хемотаксис и регулируя тем самым синтез антител [144]. Секретируемые ММСК растворимые факторы (трансформирующий ростовой фактор- $\beta$  (Transforming growth factor  $\beta$  – TGF- $\beta$ ), фактор роста гепатоцитов (hepatocyte growth factor – HGF), простагландин E2 и NO) ингибируют пролиферацию Т-клеток и продукцию цитокинов [76]. ММСК подавляют секрецию провоспалительных цитокинов Т-хелперами (Th1) и повышают секрецию ИЛ-4 Th2 клетками, способствуют образованию Т-регуляторных клеток [37, 68], уменьшают цитотоксический эффект цитолитических Т-клеток (CTLs) [86]. ММСК подавляют также секрецию TNF дендритными клетками, и ингибируют созревание клеток [63, 144]. ММСК ингибируют активацию цитотоксического эффекта натуральных киллеров [130]. Иммуномодулирующий паракринный эффект ММСК - это обоюдоострый меч. Если при развитии сепсиса подавление продукции цитокинов позволяет редуцировать воспаление и повреждение органов, то избыточная супрессия В- и Т-клеток может быть

вредна при позднем сепсисе. Поэтому важно определить временной интервал, когда наиболее целесообразно использовать ММСК в лечении сепсиса.

Помимо исследований на клеточных культурах, действие ММСК при сепсисе изучено в экспериментах на животных. Различают [144] три основных модели сепсиса, воспроизводимых на мышах: – 1) лигирование и пункция слепой кишки (cecal ligation & puncture- CLP), когда одно или два пункционных отверстия, сделанных дистальнее места перевязки слепой кишки, позволяет поступать кишечному содержимому в перитониальную полость, создавая картину полимикробного сепсиса; 2) перитонит, вызванный установкой стента в восходящую толстую кишку (colon ascendens stent peritonitis - CASP), также воспроизводит полимикробный сепсис, при котором тяжесть сепсиса определяется диаметром стента и количеством утекающего в брюшную полость кишечного содержимого; 3) эндотоксемия, вызванная инъекцией ЛПС в брюшную полость или хвостовую вену, воспроизводит грамотрицательный сепсис [144]. Основные работы по применению ММСК при различных моделях сепсиса приведены в таблице 1.

В ряде работ показано, что при различных моделях сепсиса введение ММСК способно увеличить выживаемость подопытных животных. В работе А. Krasnodembskaya и соавт. [74] перитонит у мышей вызывали при помощи интраперитониального введения *Pseudomonas aeruginosa*. Через 1 ч после индукции сепсиса внутривенно вводили ММСК  $1 \times 10^6$  клеток, в контрольных группах вместо ММСК вводили фибробласты или фосфатный буфер. Животных наблюдали в течение 48 ч. Выживаемость оказалась больше в группе мышей, получивших инъекции ММСК, чем в контрольных группах: 75% в основной группе и  $\leq 40\%$  в контрольных группах.

В исследовании S.R. Hall и соавт. [54] на CLP модели сепсиса показано, что введение ММСК приводит к уменьшению смертности у мышей по сравнению с животными из контрольной группы, получившими вместо ММСК фибробласты.

В мета-анализе канадских исследователей [77], посвященном преคลินิกескому использованию ММСК при СШ, отобрали 9 из 3016 опубликованных работ: в 3 из них использовали CLP-модель сепсиса, в 6 - модель эндотоксинемии. Лечение ММСК по сравнению с контролем приводило к уменьшению смертности во всех точках

Таблица 1. Эффекты ММСК в моделях сепсиса на животных.

| Авторы   | Модель сепсиса | Время введения ММСК       | Длительность исследования                         | Эффекты  |
|--|----------------|---------------------------|---|--|
| Nemeth K,<br>Leelahavanichkul<br>A, Yuen PS [101]  | CLP            | 1 ч после CLP             | 4 суток для оценки выживаемости                   | ↑выживаемость<br>↓провоспалительные цитокины   |
|  |                |                           | 6 ч для оценки ex vivo функций макрофагов         | ↑ ИЛ-10<br>Улучшение функций печени, почек, поджелудочной железы   |
|  |                |                           | 24 ч - оценка цитокинов, сосудистой проницаемости | ↓ некрозы в селезенке<br>↓ сосудистая утечка в печени<br>↓ сосудистая утечка в почках<br>↓ трансмиграция нейтрофилов                   |
| Gonzalez-Rey E,<br>Anderson P,<br>Gonzalez MA [49] | CLP            | 4 ч после CLP             | 10 суток для оценки выживаемости                  | ↑выживаемость  |
|  |                |                           | 24 ч оценка бактериальной нагрузки                | ↓провоспалительные цитокины<br>↓ трансмиграция нейтрофилов<br>↓ бактериальная нагрузка в печени / селезенке                            |
| Gonzalez-Rey E,<br>Anderson P,<br>Gonzalez MA [49] | ЛПС            | 30 мин после введения ЛПС | 4 суток оценка выживаемости                       | ↑выживаемость  |
|  |                |                           | 24 ч для прочего                                  | ↓провоспалительные цитокины<br>↑ ИЛ-10<br>↓ трансмиграция нейтрофилов  |
| Mei SH, Haitzma JJ, Dos Santos CC[92]              | CLP            | 6 ч после CLP             | 28 ч  | ↑выживаемость<br>↓провоспалительные цитокины<br>↓ воспаление в легких<br>Улучшение функции почек<br>↑бактериальный клиренс в селезенке |
| Weil BR,<br>Manukyan MC,<br>Herrmann JL [145]      | ЛПС            | 1ч после введения ЛПС     | 6 ч   | ↓провоспалительные цитокины<br>↑ ИЛ-10<br>Улучшение функции сердца   |
| Yagi H, Soto-Gutierrez A,<br>Kitagawa Y [150]      | ЛПС            | сразу после ЛПС           | 24 ч  | Улучшение функций печени/почек<br>↑ ИЛ-10<br>↓ повреждение легких  |
| Manukyan MC,<br>Weil BR, Wang Y [89]               | ЛПС            | 1ч после введения ЛПС     | 6 ч   | ↓провоспалительные цитокины<br>Улучшение функции сердца  |

| Авторы  | Модель сепсиса | Время введения ММСК   | Длительность исследования | Эффекты  |
|---|----------------|-----------------------|---------------------------|--|
| Weil BR, Herrmann JL, Abarbanell AM [145].  | ЛПС            | 1ч после введения ЛПС | 6 ч                       | ↓провоспалительные цитокины<br>↑ ИЛ-10<br>Улучшение функции сердца |
| Krasnodembskaya A, Samarani G, Song Y, Zhuo H, Su X, Lee JW, Gupta N, Petrini M, Matthay MA.[74]. | ЛПС            |                       |                           | ↑выживаемость<br>↑количество тромбоцитов<br>↑РАI-1                 |

Примечания. CLP - лигирование и пункция слепой кишки, ЛПС - модель сепсиса с введением ЛПС, PAI-1 - ингибитор активатора плазминогена I типа.

наблюдения: <2 дней (OR 0.24, 95% CI 0.10-0.61; n=5 исследований), 2-4 дня (OR 0.19, 95% CI 0.07-0.53; n=4 исследования), и >4 дней (OR 0.27, 95% CI 0.08-0.91; n=2 исследования).

В исследовании К. Nemeth и соавт.[101] использовали CLP модель сепсиса у мышей. В группе, в которой в момент проведения операции внутривенно вводили  $10^6$  ММСК, выживаемость спустя 4 суток составила 50%, в группе, в которой вместо ММСК вводили фосфатный буфер, умерли все животные. Положительный эффект на выживаемость был получен и в случаях, когда ММСК вводили за 24 ч или 1 ч спустя после выполнения CLP. В противоположность этому внутривенное введение фибробластов, цельного костного мозга или убитых нагреванием ММСК не влияло на выживаемость мышей.

В рандомизированном исследовании С.Л. Luo и соавт. [85] при CLP модели сепсиса на 7-ые сутки выживаемость среди мышей, получивших внутривенно через 3 ч после операции CLP  $1 \times 10^6$  ММСК, составила 58%, в то время как в контрольной группе, в которой вводили 0,9% раствор натрия хлорида, - только 30% [85].

Поскольку смертность при сепсисе определяется, прежде всего, полиорганной дисфункцией, исследовали функции отдельных органов. В исследовании S. Shin и соавт. [127] эндотоксинемия была индуцирована внутривенным введением ЛПС 10 мг/кг. В зависимости от метода лечения животных делили на три группы: 1) солевой

раствор (n=5); 2) ЛПС + солевой раствор (n=5), 3) ЛПС + ММСК ( $2 \times 10^6$ ) из жировой ткани (n=5). Лечение ММСК уменьшало воспалительные изменения в легких, предупреждало апоптоз в почках и уменьшало полиорганные повреждения. Функция почек, оцененная по концентрации сывороточного креатинина, была лучше в группе мышей, которым вводили ММСК за 24 ч до выполнения CLP, чем в контрольной группе [101]. В другом исследовании [85] при острой почечной недостаточности, ассоциированной с сепсисом, вызванным CLP, внутривенное введение ММСК  $1 \times 10^6$  клеток через 3 ч после операции приводило к уменьшению сывороточных концентраций креатинина, мочевины, улучшению функций канальцев, а также экспрессии мРНК ИЛ-6, ИЛ-17, TNF- $\alpha$  и нейтрофильной инфильтрации почек по сравнению с контрольной группой, получившей 0,9% раствор хлорида натрия. Считают [85], что ММСК оказывают протективное влияние на почки за счет паракринного действия, а не прямого межклеточного взаимодействия.

Во многих работах показано благоприятное влияние ММСК на индуцированное эндотоксином острое повреждение легких. ММСК уменьшали проявления острого воспаления легких, вызванного эндотоксином [37, 68], причем даже в тех случаях, когда не достигалось уменьшения выживаемости животных [68]. Одно из первых исследований, использовавших ММСК у мышей с эндотоксинемией, было выполнено J. Хи и соавт. в 2007 г. [148]. Они показали, что ММСК значительно уменьшают эндотоксин-индуцированное повреждение легких: в легких мышей, получивших эндотоксин, выявляли нейтрофильную инфильтрацию, в то время как в легких мышей, получивших вместе с эндотоксином ММСК, через 6 ч и 48 ч почти полностью исчезала нейтрофильная инфильтрация. В проспективном рандомизированном контролируемом исследовании [86] 25 мкл ЛПС или стерильного 0,9% хлорида натрия вводили интратрахеально мышам. Спустя 20 мин мыши были рандомизированы на две группы и получали либо  $3 \times 10^5$  ММСК, либо фосфатный буфер. В группе ММСК было менее выражено ЛПС-индуцированное легочное воспаление, что доказывалось уменьшением концентрации белка и количества нейтрофилов в альвеолярной жидкости, уменьшением эндотелиальной и альвеолярной проницаемости, а также менее выраженной нейтрофильной (экспрессия LybG) и макрофагальной (экспрессия CD68)

инфильтрации. Лечение с помощью ММСК редуцировало количество циркулирующих макрофагов/нейтрофилов (CD11b-экспрессирующие клетки), а также снижало уровень системных провоспалительных хемокинов, таких как макрофагальный воспалительный протеин-1- $\gamma$ , В-лимфоцитарный хемоаттрактант, ИЛ-12.N. Gupta и соавт. [53] обнаружили, что при индуцированном эндотоксином острым повреждении легких интрапультмональное введение ММСК улучшало выживаемость по сравнению с мышами, которым вводили солевые растворы (соответственно 80% и 42%), а также фибробласты и апоптотические ММСК. По сравнению с мышами, которым инъецировали фибробласты, у мышей, которым вводили ММСК, был менее выражен отек и гистологические изменения в легочной ткани [53]. Была исследована способность человеческих аллогенных ММСК разрешать отек легких на *ex vivo* перфузируемых человеческих легких, поврежденных эндотоксином [79]. Легочное повреждение вызывали инстилляцией эндотоксина *Escherichia coli* в среднюю долю правого легкого. Сравнивали эффекты капельного введения ММСК или культуральной среды от ММСК, в качестве контроля использовали человеческие фибробласты. Эндотоксин вызывал картину острого нейтрофильного воспаления в правой средней доле, трехкратное увеличение сосудистой проницаемости, увеличение внесосудистой воды легких, снижение альвеолярного клиренса жидкости до нуля (в норме 18-20% в час.). ММСК, введенные через час после эндотоксина в ту же долю легкого, восстанавливали до нормы нарушенную сосудистую проницаемость, содержание внесосудистой воды легких, альвеолярный клиренс жидкости и уменьшали нейтрофильную инфильтрацию и утолщение легочных септ.

ММСК уменьшали проявления энтероколита при сепсисе. В рандомизированном исследовании С. Тауман и соавт. [133] у крыс с некротизирующим энтероколитом интраперитонеальное введение ММСК позволило получить не только большую прибавку в весе, но и менее выраженные гистологические признаки повреждения кишечника по сравнению с животными, не получивших ММСК.

Отмечено влияние ММСК на функции печени, поджелудочной железы при сепсисе. В группе мышей, которым вводили ММСК за 24 ч до выполнения CLP, сывороточные концентрации трансаминаз и амилазы были ниже, чем в контрольной

группе. Значимо было снижено и количество апоптотических и некротических клеток в селезенке у мышей, получивших ММСК, по сравнению с контролем [101]. При мета-анализе 9 исследований применения ММСК для лечения СШ у животных [77] через 24 ч после индукции сепсиса введение ММСК по сравнению с контролем приводило к меньшей легочной нейтрофильной инфильтрации (OR 0.59, 95% CI 0.37-0.96; n = 2 исследования), уменьшению концентрации креатинина (OR 0.66, 95% CI 0.50-0.89, n = 3 исследования), тенденции к снижению активности аспаратаминотрансферазы (OR 0.81, 95% CI 0.64-1.02, n = 3 исследования).

Каким же образом реализуется терапевтический эффект ММСК при сепсисе? Этому феномену может быть дано несколько объяснений.

Отмечается вклад нейтрофилов в реализацию терапевтического эффекта ММСК при сепсисе: положительный эффект ММСК на выживаемость исчезал, если перед CLP у животных проводилась деплеция нейтрофилов, введение ММСК сопровождалось повышением в 5-6 раз фагоцитарной активности нейтрофилов, в то время как введение фибробластов не влияло на фагоцитарную активность нейтрофилов [54].

В то же время по другим данным [74] при сепсисе у мышей, вызванном *Pseudomonas aeruginosa*, фагоцитарная активность нейтрофилов не менялась после введения ММСК по сравнению с контролем. В то же время фагоцитарная активность моноцитов, изолированных из крови обработанных ММСК мышей, была выше, чем моноцитов мышей в контрольных группах. Была повышена также активность макрофагов в селезенке (экспрессирующие CD163 и CD206 спленоциты) у мышей, которым инъецировали ММСК, по сравнению с животными из контрольных групп [74]. Повышение фагоцитарной активности моноцитов сопровождалось значимым уменьшением бактериальных колониеобразующих единиц (КОЕ) *Pseudomonas aeruginosa* в крови у получавших ММСК мышей. E. Gonzalez-Rey и соавт. [49] показали, что введение ММСК значительно улучшает бактериальный клиренс из поврежденных органов за счет повышения фагоцитарной активности резидентных макрофагов.

Помимо изменения фагоцитарной активности отмечен прямой антимикробный эффект ММСК у мышей *in vivo*. При исследовании пневмонии A. Krasnodembskaya и

соавт. [75] показали, что ММСК секретируют антимикробные пептиды LL37 в ответ на стимуляцию *Escherichia coli*, которые обладают бактерицидным действием. Anti-LL37 антитела частично редуцируют антимикробную активность ММСК, потому что у мышей, получавших антитела anti-LL37, только уменьшался рост патогенов в жидкости бронхоальвеолярного лаважа. В то же время в экспериментах *invitro* было показано, что ММСК не способны убивать *Escherichia coli* [49]. Несоответствие результатов этих исследований отражает различия в моделях сепсиса *invitro* и *in vivo*.

Повышенный бактериальный клиренс отмечен в рандомизированном исследовании [85], в котором при CLP модели сепсиса у мышей, которым вводили ММСК, через 3 часа после CLP выявлялось значительно меньше бактериальных колоний в крови, чем у тех животных, которые не получали эти клетки [85]. При мета-анализе [77] у экспериментальных животных с сепсисом при введении ММСК по сравнению с контролем бактериальные КОЕ были снижены в крови (OR 0.37, 95% CI 0.25-0.54; n = 2 исследования), в селезенке (OR 0.37, 95% CI 0.22-0.63; n=2 исследования) и в брюшной полости (OR 0.69, 95% CI 0.63-0.75; n=2 исследования).

Чтобы понять, где действуют ММСК, вводимые клетки поместили специальным флуоресцентным красителем (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester). ММСК определялись в крови в течение первого часа после их введения, затем большое их количество было обнаружено в легочной паренхиме, селезенке и почках. Меченные ММСК в легких были окружены макрофагами. Количество ММСК в легких со временем постепенно уменьшалось, и спустя 24 ч после введения определялось лишь небольшое их количество [101]. В другой CLP модели сепсиса также отмечено, что инъецированные ММСК обнаруживаются в легких, селезенке и абдоминальных лимфатических узлах, но не в почках [85].

Исследования на животных показали, что введение ММСК улучшает репарацию тканей. Они обладают «эффектом дома» (хоминг-эффектом). Поврежденный орган посылает сигналы в кровотоке, которые распознаются мезенхимными клетками, и они мигрируют с током крови к поврежденной ткани, встраиваются в нее, и либо перерождаются в специфические клетки конкретного органа, либо оказывают трофическое действие. Это свойство получило название «хоминг-эффект»



(homingeffect). При внутривенном введении ММСК способны мигрировать вдоль хемотаксического градиента к поврежденным тканям, таким как легкие, миокард, мозг, печень и почки. Одна из важнейших молекул этого эффекта – это молекула сосудистой клеточной адгезии 1 типа (vascular cell adhesion molecule-1 -VCAM-1). Экспрессия VCAM-1 индуцируется TNF- $\alpha$ . Способность ММСК трансмигрировать через экстрацеллюлярный матрикс зависит от индуцированных воспалительными цитокинами матриксных металлопротеаз и тканевых ингибиторных матриксных протеаз. Возможно, эндогенные ММСК подвергаются мобилизации, хомингу и трансмиграции. В качестве хемоаттрактантов в хоминг-эффекте ММСК участвуют моноцитарный хемоаттрактантный протеин (Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) и MCP-3), фактор роста стволовых клеток (StemCellFactor – SCF), сосудистый эндотелиальный фактор роста (vascular endothelial growth factor - VEGF), ИЛ-6, ИЛ-8 [144]. В хоминге ММСК участвуют также медиаторы: стромально-клеточный фактор (Stromalcell-derived factor -- SDF-1/CXCL12, фактор, индуцируемый гипоксией фактор 1 (hypoxia-induced factor 1 -- HIF-1). Эта способность ММСК к хомингу, когда они достигают поврежденного органа, делает их потенциально пригодными для лечения полиорганной дисфункции при сепсисе. Однако не количество введенных или мигрировавших в ту или иную ткань ММСК определяет их терапевтический эффект. При индуцированном сепсисом повреждении легких спустя 48 ч в легочной ткани приживаются лишь 5% введенных ММСК [53]. Поэтому терапевтический эффект ММСК при сепсисе опосредован, прежде всего, их паракринным действием, сдвигом от провоспалительного к противовоспалительному ответу [53].

В эффектах ММСК при сепсисе большое значение придается макрофагам и ММСК-макрофагальному взаимодействию. Это подтверждено в экспериментах [101], в которых деплеция моноцитов и макрофагов у мышей, выполненная с помощью клодронат нагруженных липосом до CLP, нивелировала благоприятный эффект ММСК на выживаемость при сепсисе.

Лечение с помощью ММСК приводило у мышей к уменьшению количества циркулирующих моноцитов вследствие их инвазии в ткани и увеличению количества циркулирующих нейтрофилов [101]. В эксперименте [101] с помощью

иммуноцитохимического исследования обнаружили значительное увеличение количества легочных моноцитов и макрофагов у мышей после CLP по сравнению с неоперированными животными. Это увеличение полностью исчезало, если предварительно выполнялась деплеция циркулирующих моноцитов с помощью клондронат-нагруженных липосом. Чтобы подтвердить эти гистологические изменения, использовали сортировку клеток с активированной флуоресценцией (fluorescence-activated cell sorting - FACS) у обработанных и необработанных ММСК мышей [101]. Обнаружили увеличение моноцитов, но не лимфоидных клеток в легких. Моноциты и макрофаги (CD11b<sup>+</sup>) выделяли из легких мышей, которым инъецировали и не инъецировали ММСК [143], их помещали в культуру и повторно стимулировали ЛПС. Спустя 3 и 5 часов после ЛПС стимуляции *ex vivo* моноциты и макрофаги мышей, которым вводили ММСК, продуцировали больше ИЛ-10, чем эти же клетки, выделенные из необработанных ММСК мышей. Чтобы подтвердить увеличение продукции ИЛ-10 вследствие непосредственного взаимодействия ММСК, моноцитов и макрофагов, ММСК и макрофаги культивировали вместе или помещали в систему Transwell, позволяющую отделить их друг от друга проницаемой мембраной, затем помещали макрофаги в кондиционированную среду от ММСК. Если макрофаги напрямую контактировали с ММСК, продукция ИЛ-10 в ответ на ЛПС стимуляцию была значительно больше, чем, когда они культивировались в системе Transwell без прямого контакта с ММСК или были помещены в кондиционированную ММСК среду.

Введение ММСК приводит к уменьшению секреции провоспалительных цитокинов. У мышей с CLP моделью сепсиса через 24 ч после инъекции ММСК отмечено значимое снижение сывороточных концентраций TNF- $\alpha$  и ИЛ-6 по сравнению с неинъецированными мышами [101]. Сывороточная концентрация интерферона- $\gamma$  не изменялась после введения ММСК, в то время как концентрация ИЛ-10 повысилась спустя 3 ч после введения ММСК, удвоилась через 6 ч и сохранялась повышенной через 12 ч [101]. При мета-анализе [77] показано, что в большинстве экспериментов на животных в результате лечения ММСК по сравнению с контрольными группами через 6 ч после индукции сепсиса в крови были снижены концентрации TNF- $\alpha$  (OR 0.71, 95% CI 0.57-0.90; n=4 исследования) ИЛ-1 $\beta$  (OR 0.73,

95% CI 0.57-0.93; n=3 исследования), интерферона- $\gamma$  (OR 0.53, 95% CI 0.34-0.83, n=2 исследования), а концентрация ИЛ-10 была повышена (OR 1.19, 95% CI 1.03-1.38; n=3 исследования). В то же время имеются отдельные работы [74], в которых не выявили различий в плазменных уровнях TNF- $\alpha$ , ИЛ-10 между группами животных, обработанных и необработанных ММСК.

Важный компонент протективного действия ММСК при сепсисе – это ИЛ-10. Если в эксперименте [101] до выполнения CLP мышам предварительно вводили антитела к ИЛ-10 или антитела к рецепторам ИЛ-10, то введение ММСК не влияло на выживаемость животных. Чтобы доказать, что в данном случае ИЛ-10 продуцируется макрофагами, а не вводится вместе с ММСК, использовали ММСК от IL-10<sup>-/-</sup> мышей. Введение этих ММСК по-прежнему позволило улучшить выживаемость животных после CLP, что свидетельствует о том, что источником ИЛ-10 является эндогенная популяция клеток.

Выработавшийся в результате взаимодействия ММСК и макрофагов ИЛ-10 способен ингибировать качение, адгезию и проникновение в ткани нейтрофилов [25]. После CLP у инъецированных ММСК мышей в крови было значительно больше циркулирующих нейтрофилов, чем у неинъецированных мышей, что может способствовать клиренсу бактерий из крови [101]. В то же время количество миелопероксидазы в тканях было значительно меньше у неполучавших, чем у получивших ММСК мышей, что свидетельствует о меньшей инвазии нейтрофилов в ткани у последних [101]. Таким образом, внутривенная инъекция ММСК в экспериментальной модели сепсиса позволяет достичь баланса между увеличением количества циркулирующих нейтрофилов, обеспечивая тем самым бактериальный киллинг, и уменьшением органного повреждения вследствие инвазии лейкоцитов в ткани.

В процессе ответа на введение ММСК имеет значение половая принадлежность ММСК. В ответ на стимуляцию ЛПС ММСК от самок по сравнению с ММСК от самцов мышей вырабатывают больше фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF). На ММСК от самок меньше экспрессия TNF- $\alpha$ , чем на ММСК от самцов [34]. Это может

быть одним из объяснений феномена меньшей смертности от сепсиса среди женщин, чем мужчин.

Клиническая эффективность ММСК при сепсисе не изучена. Хотя существуют примеры использования ММСК в клинической практике для лечения, например, реакции «трансплантат против хозяина» у больных после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, в которых доказана безопасность их применения [118], исследования по применению ММСК при СШ только запланированы, их результаты пока не опубликованы. В настоящее время зарегистрированы 2 исследования по изучению применения ММСК при септическом шоке: голландское исследование NTR3495 из университета Роттердама, канадское исследование из университета Оттавы, целью одного из которых является оценить безопасность терапии ММСК, а второго – эффективность ММСК при СШ. Однако эти исследования пока не закончены и результаты их неизвестны. В то же время ни в одном из них не запланировано изучения эффективности ММСК для лечения СШ у больных в состоянии агранулоцитоза, которые представляют собой одну из наиболее проблемных категорий больных. Решение этой проблемы и запланировано в настоящей работе.

## **1.2. Биомаркеры при сепсисе**

Исследование биомаркеров позволяет не только диагностировать сепсис, но и дифференцировать бактериальную от вирусной или грибковой инфекции, системную от локальной инфекции, с большой долей вероятности дифференцировать грамотрицательную и грамположительную инфекцию, оценить ответ на проводимую антибиотическую терапию. На сегодняшний день в клинической практике наиболее часто используются несколько маркеров сепсиса – С-реактивный белок (СРБ), прокальцитонин (ПКТ), ИЛ-6 [61, 66, 114], а с недавнего времени и новый маркер – пресепсин [16, 29, 105, 129]. Такие известные маркеры воспаления, как ПКТ, СРБ, ИЛ-6 хорошо изучены при сепсисе у больных в агранулоцитозе [9, 119]. Значительно меньше известно о пресепсине.

Пресепсин был открыт в 2005 г. группой исследователей из Медицинского университета Иватэ в Японии, впервые он был выявлен в крови больных с сепсисом [16]. Пресепсин – это производное CD 14 [16, 29, 129]. CD 14 - это мембранный белок макрофагов. Он является рецептором, распознающим сигнал о наличии бактериального агента, и запускает систему неспецифического иммунитета. mCD14 — мембранный гликопротеин (m — membrane) с молекулярной массой 55 кДа, имеет на С-конце «якорный» гликозилфосфатидилинозитол. В норме mCD14 экспрессируется на поверхности моноцитов/макрофагов, нейтрофилов, хондроцитов, В-клеток, дендритных клеток и других зрелых миелоидных клеток [129, 149]. mCD14 связывается с бактериальными лигандами (ЛПС, клеточными стенками грамположительных бактерий, грибов) [134]. Однако активация воспалительного процесса гораздо быстрее протекает в присутствии ЛПС-связывающего белка, который считается белком острой фазы воспаления, синтезируется преимущественно в печени и поступает в кровоток в гликозилированном состоянии. При инфекции синтез ЛПС-связывающего белка повышается. Он является основным белком плазмы, ответственным за связывание эндотоксинов с mCD14 моноцитов/макрофагов [104]. Кроме эндотоксина грамотрицательных бактерий, ЛПС-связывающий белок специфически связывается с компонентами клеточной стенки: грамположительных бактерий (липотехойевые кислоты, пептидогликаны), микобактерий (липопротеины, липоманнаны), микоплазм (липопептиды), спирохет (гликолипиды и липопротеины), грибов. Таким образом, спектр микроорганизмов, активирующих воспалительный ответ, а при его недостаточности — вызывающих сепсис, весьма широк. Весь комплекс mCD14-ЛПС-связывающий белок-бактерия активирует другой рецептор макрофага, расположенный трансмембранно, - TLR4, который посылает сигнал о бактериальной инфекции внутрь макрофага, где активируется специфический каскад провоспалительных реакций. После выполнения сигнальной функции mCD14 утрачивает свой «якорь» (гликозилфосфатидилинозитол), отсоединяется от мембраны посредством сдвигания CD14 с клеточной мембраны, становится свободным (растворимым, s — soluble) и выходит в циркуляцию. sCD14 — это маркер ответа моноцитов на действие ЛПС. Повышение уровня sCD14 в крови ассоциируется с тяжестью воспаления и развитием

СШ [55]. У циркулирующего sCD14 и мембранного mCD14 функции отличаются: sCD14 в отсутствие эндотоксина способен индуцировать в моноцитах синтез важнейшего провоспалительного цитокина — TNF-альфа [55]. sCD14 является сигналом индукции воспаления для клеток, не имеющих mCD14 и поэтому не реагирующих на эндотоксины. Это так называемые «CD14-отрицательные клетки» — эндотелиальные, эпителиальные, гладкомышечные и некоторые другие; в них воспалительный процесс «включается» циркулирующим комплексом sCD14-ЛПС-ЛПС-связывающий белок [55]. Активируется фагоцитоз, в циркуляцию выходят протеиназы лизосом. С помощью протеазы лизосомы от sCD14 отщепляется пептидный фрагмент (С-терминальный участок), ответственный за связывание с ЛПС, и образуется sCD14-ST, содержащий только N-терминальный фрагмент CD14, или пресепсин [128]. Масса его 13 кДа, он состоит из 64 аминокислотных остатков. Его продукция связана с фагоцитозом (расщепление микроорганизмов лизосомальными ферментами) [128]. Время полужизни пресепсина в циркуляции составляет от 30 мин до 1 ч [123].

В экспериментах на животных показано, что при развитии сепсиса уровень пресепсина в крови резко повышается [55,123,128]. При CLP-модели сепсиса [6] у кроликов выполнялся забор крови перед операцией, сразу после операции и потом каждый час в течение суток. Оценивались концентрации воспалительных маркеров (пресепсин, ИЛ-6) в крови. Уровень пресепсина начинал повышаться через 1,5 ч после операции, в то время как ИЛ-6 - только через 6 ч. Таким образом, концентрация пресепсина возрастала еще до повышения концентрации ИЛ-6, а ПКТ — после пика ИЛ-6, поскольку концентрация пресепсина характеризует фагоцитоз, а концентрация ИЛ-6 — воспаление. Для образования пресепсина лейкоцитами одного лишь действия эндотоксина недостаточно, необходима активация фагоцитоза [6]. Результаты опытов на животных позволяют полагать, что в образовании пресепсина большую роль играют лизосомальные протеазы [6, 120]. Под действием провоспалительных агентов (ЛПС, интерферон гамма, формил-метионин-лейцин-фенилаланин, форбол-12-миристат-13-ацетат) образование sCD14-ST в гранулоцитах кролика не индуцировалось, но ускорялось при прибавлении жизнеспособных клеток *Escherichia coli* [120]. Это еще раз подтверждает тот факт, что sCD14-ST образуется при фагоцитозе. Ингибиторы

фагоцитоза (цитохалазин D и вортоманин) угнетают образование пресепсина, а протеаза (катепсин D) способствует образованию пресепсина из CD14 *in vitro* [102, 142]. Факторы, стимулирующие фагоцитоз, активируют и образование пресепсина, а ингибирующие факторы, напротив, подавляют его образование. Таким образом, пресепсин — это гуморальный фактор, специфичный для фагоцитоза [102, 120]. Хотя для активации mCD14 *in vivo* требуется присутствие ЛПС или компонентов грамположительных и грибковых патогенов, инъекция животным стерильных препаратов ЛПС к синтезу пресепсина не приводит, в то время как сепсис, индуцированный с помощью перевязки и пункции слепой кишки, резко повышает концентрацию пресепсина в крови [120]. Это свидетельствует о том, что активация лейкоцитов эндотоксином для образования пресепсина не достаточна, для образования пресепсина необходим фагоцитоз жизнеспособных бактерий [123].

Пресепсин может иметь прогностическое значение. Показано, что кролики с высокой концентрацией пресепсина в плазме крови погибли, а с низкой – выжили [6].

При обследовании 144 пациентов, поступивших в 117 различных отделений интенсивной терапии и не имевших острых инфекционных заболеваний, установлено, что медиана уровня пресепсина у мужчин была 443 пг/мл, а у женщин 430 пг/мл [120]. У пациентов старше 70 лет по сравнению с пациентами моложе этого возраста уровни пресепсина были повышены (медиана 470 пг/мл против пг/мл 300 пг/мл). Также уровни пресепсина были повышены у пациентов со сниженной скоростью клубочковой фильтрации [120].

Концентрация пресепсина повышается пропорционально тяжести заболевания, достигая больших значений при тяжелом сепсисе [6, 71, 72, 102, 105, 120, 128]. При синдроме системного воспалительного ответа (ССВО) уровень пресепсина ниже, чем при локальной инфекции, так как увеличение концентрации пресепсина связано с фагоцитозом, а не с воспалительным процессом [6]. Концентрация пресепсина в крови повышается при грамположительной, грамотрицательной и грибковой инфекции, в то время как при вирусных инфекциях пресепсин не продуцируется [6, 55, 120, 142]. В многоцентровом исследовании, в которое было включено 207 пациентов, поступивших с подозрением на сепсис, обнаружено, что значения площади под кривой для

диагностики сепсиса составляли: для пресепсина — 0,908, для ПКТ — 0,905 и для ИЛ-6 — 0,825 [142]. Оптимальный пограничный уровень для выявления сепсиса для пресепсина составил 600 пг/мл, клиническая специфичность — 87,8%. При этом концентрация пресепсина не дискриминировала между грамположительным и грамотрицательным сепсисом. Чувствительность гемокультур составил 35,4%, а чувствительность уровня пресепсина — 91,4% [142].

Аналогичные результаты были получены и Y. Fukui и соавт. [47] при наблюдении за 43 пациентами, у 19 из которых была грамотрицательная, у 20 — грамположительная и у 4 — грибковая инфекция. Показатели пресепсина повышались при бактериальном и грибковом сепсисе. При этом совпадение повышенных уровней пресепсина с данными гемокультур было значительно выше такового для ПКТ. Более того, повышение концентрации пресепсина в большей степени, чем повышение концентрации ПКТ, отражало тяжесть сепсиса [47].

M. Ulla и соавт. [138] в многоцентровом исследовании, в которое было включено 93 больных, показали, что медианы концентраций пресепсина и ПКТ были при ССВО пресепсин — 517 пг/мл; ПКТ — 1,0 нг/мл; при сепсисе - пресепсин — 875 пг/мл, ПКТ — 9 нг/мл; при тяжелом сепсисе и СШ пресепсин — 1460 пг/мл; ПКТ — 19 нг/мл. У пациентов с системными инфекциями концентрация пресепсина была максимальной при поступлении и снижалась через 24 ч и 48 ч, в то время как максимальное повышение ПКТ наблюдалась лишь через 24 и 48 ч. При этом пограничное значение концентрации пресепсина для выявления сепсиса составляло 600 пг/мл; чувствительность — 78,95%, специфичность — 61,9%; для ПКТ — 0,18 нг/мл, чувствительность — 89,47%, специфичность — 75,9% [138].

По данным T. Shozushima и соавт. [129], уровни пресепсина составили: в норме —  $294,2 \pm 121,4$  пг/мл, при локальной инфекции —  $721 \pm 611$  пг/мл; при ССВО —  $333,5 \pm 130,6$  пг/мл; при сепсисе —  $817,9 \pm 572,7$  пг/мл; при тяжелом сепсисе —  $1992,9 \pm 1509,2$  пг/мл. Более высокий уровень пресепсина при локальной инфекции, чем при ССВО указывал на отсутствие реакции пресепсина на воспалительные процессы, не связанные с инфекцией, в то время как такие маркеры, как СРБ и ИЛ-6 реагируют и на воспаление, и на инфекцию. Чувствительность исследования пресепсина составила



80,1%, специфичность - 81%. В сравнительном исследовании с другими диагностическими маркерами сепсиса на основе кривых ROC, площадь под кривой (AUC) у пресепсина была 0,845, что выше, чем AUC прокальцитонина (0,652), СРБ (0,815) или ИЛ-6 (0,672) [129]. Y. Yaegashi и соавт [149] получили такие же результаты, сравнивая пресепсин с ИЛ-6 и ПКТ.

L.G. Romualdo и соавт. [120] также показали, что у пациентов с ССВО и бактериемией уровни пресепсина были значительно выше, нежели у больных только с симптомами ССВО. Площадь под кривой составила 0,750 для пресепсина, примерно такая же для ПКТ (0,787), что было выше, чем для СРБ (0,602).

Схожие данные получены при обследовании хирургических пациентов, у которых периоперационный период осложнился сепсисом [90,102]. У пациентов после трансплантации трупных органов уровни пресепсина составляли  $3034,4 \pm 2280,8$  пг/мл. При этом в момент взятия крови для определения ПСП у 70% этих пациентов не было признаков инфекции, наличие которой было подтверждено гемокультурами через  $69 \pm 2,5$  ч после поступления. Средний уровень пресепсина у 50 пациентов с впоследствии положительными гемокультурами составил 3957,4 пг/мл (от 225 до 20000 пг/мл). У 15 пациентов, перенесших хирургическое вмешательство на брюшной полости, уровни пресепсина были нормальными (345 пг/мл), свидетельствуя об отсутствии сепсиса, что через  $67 \pm 1,8$  ч было подтверждено отрицательными гемокультурами [102].

В. Liu и соавт. [83] показали, что пресепсин является более эффективным маркером сепсиса по сравнению с ПКТ. Они обследовали 859 больных с ССВО и 100 здоровых добровольцев. Пациенты были разделены на 4 группы – ССВО, сепсис, тяжелый сепсис и СШ. Уровни ПКТ и пресепсина, количество баллов по шкалам APACHE и MEDS были значительно выше у пациентов, чем у здоровых добровольцев. Уровни маркеров и баллы по шкалам были выше у больных с сепсисом и СШ, чем у больных с ССВО, а у больных с СШ – выше, чем у больных с сепсисом. Чувствительность и специфичность пресепсина (соответственно 70,8% и 85,8%) была выше по сравнению с ПКТ (соответственно 60% и 77,7%). Для предсказания тяжелого сепсиса наиболее эффективной было использование комбинации пресепсина и шкал, нежели оценка только шкал [83].

Е. Spanuth и соавт. [131], обследуя 146 пациентов с ССВО, также обнаружили корреляцию между концентрацией пресепсина и тяжестью состояния больных, оцененной по шкалам APACHE II, SOFA, MEDS. Этим данным соответствуют результаты исследования [44], в котором также обнаружена корреляция между концентрацией пресепсина в крови и баллами по шкале APACHE II.

Для прогноза развития СШ была более эффективна оценка комбинации концентрации пресепсина со шкалами MEDS и APACHE II, нежели только концентрации пресепсина [90]. Чувствительность исследования концентрации пресепсина для прогнозирования СШ была 85,7%, специфичность 63,6%. При баллах по шкале APACHE II от 0 до 10 (n = 23) уровень пресепсина составлял  $430 \pm 269$  пг/мл; при 11–20 (n = 59) —  $866,1 \pm 823,4$  пг/мл, при >21 (n=22) —  $1322,4 \pm 1286,8$  пг/мл [90]. Чувствительность исследования концентрации пресепсина для предсказания 28-дневной смертности составила 62,2%, специфичность – 66,8%. Уровень пресепсина был значительно выше у умерших, нежели у выживших (соответственно 748 пг/мл (385 - 1386 пг/мл) и 412 пг/мл (243 - 744 пг/мл);  $P < 0.0001$ ) [90].

Если сравнить пресепсин с другими используемыми для диагностики сепсиса маркерами, такими как ПКТ, ИЛ-6, СРБ, то пресепсин обладал большей чувствительностью и специфичностью [90]. В исследовании S. Endo и соавт. [44] включены 103 пациента с сепсисом, которые были разделены на три группы - сепсис, тяжелый сепсис и СШ. Период наблюдения за больными составил 28 дней, из которых в течение первых 7 дней изучались биомаркеры сепсиса (пресепсин, ПКТ, СРБ, ИЛ-6). Далее все пациенты были разделены на группы благоприятного и неблагоприятного прогноза на основании показателей тяжести сепсиса (шкалы SOFA и APACHE II). У пациентов из группы с благоприятным прогнозом отмечалось снижение уровней всех маркеров сепсиса, начиная с 3 по 7 дни. В группе с неблагоприятным прогнозом в течение всего времени наблюдения только концентрация пресепсина оставалась значительно повышенной. В группе с неблагоприятным прогнозом была значительно ниже 28-дневная выживаемость. Таким образом, концентрация пресепсина больше коррелирует с тяжестью сепсиса, чем другие воспалительные маркеры [44]. Так как выработка пресепсина индуцируется при фагоцитозе бактерий независимо от ЛПС

и цитокинов, механизм продукции пресепсина отличается от таковых для ИЛ-6, ПКТ и СРБ.

М. Ulla и соавт. [138] в многоцентровом исследовании, включавшем 106 пациентов с ССВО, показали, что повышенные при поступлении в клинику показатели пресепсина позволяли достоверно прогнозировать 60-дневную выживаемость, в то время как показатели ПКТ такой прогностической способностью не обладали [90]. При поступлении исходный средний уровень пресепсина, составлявший 4232,4 пг/мл, был связан со смертностью, а 3451,2 пг/мл — с выживанием. Уровни ПКТ, измеренные в первый и на второй день поступления больных в отделения интенсивной терапии, прогностической ценностью не обладали [90].

В другом многоцентровом исследовании [6], включавшем 100 пациентов, поступивших в отделение интенсивной терапии с сепсисом и СШ, показано, что у выживших больных концентрация пресепсина снижалась, а у умерших сохранялась повышенной. Концентрация ПКТ снижалась и у выживших, и у умерших. Медиана концентрации пресепсина, составлявшая в первый день 2269 пг/мл (колебания от 1171 до 4300 пг/мл), была связана с 28-дневной смертностью, а медиана концентрации 1184 пг/мл (875–2113 пг/мл) — с выживанием. Уровень ПКТ, составлявший в первый день 18,5 нг/мл (3,4–45,2), прогностическим значением не обладал. Прогностическая эффективность (AUC ROC) для пресепсина составляла: в первый день — 0,69; во второй — 0,70; на седьмой день — 0,74, для ПКТ — 0,56; 0,55 и 0,64, соответственно. Прогностическая эффективность шкалы SOFA в указанные дни составляла: 0,69; 0,65 и 0,75 соответственно [6]. 28-дневную смертность прогнозировали только уровни пресепсина, но не ПКТ [6].

Однако все эти работы были выполнены у пациентов вне состояния цитопении. Будет ли вырабатываться пресепсин при сепсисе у больных в состоянии агранулоцитоза, когда у больного нет не только нейтрофилов, но и резко снижено количество циркулирующих моноцитов, лимфоцитов, является ли пресепсин диагностическим и прогностическим биомаркером при СШ у больных в состоянии агранулоцитоза, не известно. В литературе в последние годы опубликованы единичные работы по этой проблеме. По данным иранских авторов [106], наблюдавших 71 эпизод

нейтропении у 39 онкогематологических и онкологических больных, sCD14 был значимо выше при фебрильной нейтропении, в частности у больных с мукозитом, катетерассоциированной инфекцией и токсическим эпидермальным некролизом, сепсисом, чем у больных, у которых нейтропения протекала без инфекционных осложнений. Авторы [106] не нашли корреляции между уровнем лейкоцитов и уровнем sCD14. Наиболее высокий уровень sCD14 был у больных с положительной гемокультурой, в частности *Pseudomonas spp.*

Египетские исследователи [91] сравнили уровни пресепсина у 40 больных острым миелоидным лейкозом, получивших химиотерапию, и 10 здоровых лиц. Среди больных острыми лейкозами у 11 (27,5%) был ССВО, у 8 (20%) – сепсис и у 12 (30%) – СШ. У больных острыми лейкозами концентрация пресепсина в плазме колебалась от 73 до 4550 пг/мл, а СРБ - от 12 до 809 мг/л, в то время как у здоровых лиц уровень пресепсина не превышал 210 пг/мл и СРБ – 5 мг/л. Уровень пресепсина отражал тяжесть сепсиса у больных острыми лейкозами и был наибольшим при СШ (в среднем 1882 пг/мл). Авторы [91] установили пороговые уровни пресепсина при острых лейкозах для ССВО - 198 пг/мл (чувствительность 95%, специфичность 55%), для сепсиса – 272 пг/мл (чувствительность 90%, специфичность 70%) и СШ – 1043 пг/мл (чувствительность 85%, специфичность 100%), причем чувствительность и специфичность пресепсина были выше, чем СРБ. В то же время в своей работе авторы не приводят данные о числе лейкоцитов у больных острыми лейкозами после курса химиотерапии, не известно, какое количество из них было в состоянии лейкопении.

В исследовании из Литвы [139] изучали уровень пресепсина, ПКТ, растворимых рецепторов ИЛ-2 (sIL2rR) и растворимого человеческого лейкоцитарного антигена G (sHLA-G) у педиатрических онкологических больных в состоянии фебрильной нейтропении, развившейся после химиотерапии. Всего было 62 эпизода фебрильной нейтропении у 37 детей. В этом исследовании измерение в крови пресепсина и sHLA-G не позволило отличить лихорадку без выявленного очага инфекции от доказанных бактериемии и сепсиса, в то время как уровни ПКТ и sIL2rR были значимо выше при бактериемии и сепсисе, чем при лихорадке без очага инфекции.

## **Заключение**

Таким образом, применение ММСК, согласно патофизиологическим данным, многочисленным экспериментам на животных, может оказаться эффективным для лечения сепсиса и СШ. Особенно это актуально у больных в состоянии агранулоцитоза, у которых эффективность стандартной терапии септического шока невысока, а трансплантация стволовых клеток представляется даже патогенетически оправданной. Несмотря на проведенные ранее исследования применения ММСК для профилактики и лечения «реакции трансплантат против хозяина» у больных после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, в которых была показана безопасность применения ММСК у больных гемобластозами [2], данные об их применении для лечения инфекционных осложнений у этой категории пациентов отсутствуют. Более того, у больных после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток ММСК использовались только вне инфекционных осложнений. Поэтому исследование эффективности ММСК при СШ у больных с агранулоцитозом представляется актуальным и своевременным. Эффективность терапии СШ может быть оценена с помощью биомаркеров. Однако если данные об использовании при сепсисе у больных с агранулоцитозом таких известных биомаркеров, как ПКТ, СРБ и ИЛ-6 хорошо известны, то данные о применении нового маркера сепсиса пресепсина у больных в состоянии нейтропении противоречивы и требуют уточнения.

## **Глава 2. Материалы и методы**

### **2.1. База исследования**

Работа выполнена в ФГБУ Гематологический научный центр МЗ РФ (генеральный директор – акад. РАН проф., д.м.н. Савченко В.Г.).

Определение биохимических показателей, подсчет форменных элементов крови, исследование кислотно-щелочного состояния и газового состава артериальной крови, сывороточных концентраций ПКТ, СРБ и пресепсина проводились в экспресс-лаборатории научно-клинического отделения реаниматологии и анестезиологии (заведующий – д.м.н. Галстян Г.М.), коагулологические показатели исследовали в клинко-диагностической лаборатории ФГБУ ГНЦ МЗ РФ (заведующая – к.м.н. Двирнык В.Н.). Определение сывороточных концентраций ИЛ-6 и ИЛ-10 выполняли в научной лаборатории вирусной безопасности трансфузий крови и её компонентов ФГБУ ГНЦ МЗ РФ (с.н.с. Тихомиров Д.С., заведующая – к.б.н. Гаранжа Т.А.), микробиологические исследования производились в лаборатории клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии ФГБУ ГНЦ МЗ РФ (заведующая – проф., д.м.н. Г.А. Клясова).

### **2.2. Дизайн исследования**

В работу, выполненную с декабря 2012 г. по август 2015 г., был включен 41 больной гемобластозами (23 мужчины и 18 женщин) в состоянии агранулоцитоза, находившихся на лечении в ФГБУ Гематологический научный центр (ГНЦ) МЗ РФ. Из них 29 больных были включены в проспективное рандомизированное исследование по изучению эффективности ММСК при СШ у больных в состоянии агранулоцитоза (ClinicalTrials.gov) и 12 больных - в исследование по определению референсных значений сывороточных и плазменных концентраций про-и противовоспалительных маркеров у больных в состоянии агранулоцитоза без инфекционных осложнений.

Исследование одобрено Этическим комитетом ФГБУ ГНЦ МЗ РФ от 26.12.2012 года (протокол № 89) и Ученым Советом ФГБУ ГНЦ МЗ РФ от 18.12.2012 года (протокол № 8).

Критериями включения в проспективное рандомизированное исследование по изучению эффективности ММСК при СШ были:

- установленный диагноз СШ;
- наличие в момент развития СШ миелотоксического агранулоцитоза;
- промежуток времени не более 10 ч от начала развития СШ;
- подписанное больным информированное согласие;
- вероятная продолжительность жизни по заболеванию системы крови более 1 мес.
- в течение 28 дней после включения в исследование не должна была проводиться циторедуктивная или иммуносупрессивная терапия

Критерии исключения

- беременность
- отказ от участия в исследовании и подписания информированного согласия;
- больные с рефрактерным к химиотерапии течением опухолевого заболевания системы крови,
- больные с рецидивом опухолевого заболевания системы крови
- больные, получающие паллиативную химиотерапию
- больные с СШ, возникшим вне агранулоцитоза.

После включения в исследование (см. приложение 2) и подписания информированного согласия (см. приложение 1) больные были рандомизированы в соотношении 1 к 1 на две группы:

- 1) контрольную группу, получавшую стандартную терапию СШ.
- 2) группу, в которой наряду со стандартной терапией СШ использовались ММСК.

### **2.2.1. Основные принципы терапии септического шока.**

Все больные получали стандартную терапию СШ, соответствующую международным рекомендациям [14, 36].

Больным назначалась эмпирическая терапия антибиотиками широкого спектра действия, последующая коррекция антибиотической терапии проводилась по результатам микробиологических исследований. Все больные получали один из препаратов группы карбапенемов (имипенем, дорипенем, меропенем), 80%

больных получали колистин, 26% больным – амикацин, 44% - тигециклин. Терапия ванкомицином, кубистином, линезолидом проводилась у 44% пациентов. Противогрибковая терапия (вориконазол, каспофунгин, флюконазол, амфотерицин В) проводилась у 77% больных. Противовирусную терапию (ацикловир, ганцикловир) получали 22% пациентов. 22% больных проводилась терапия пневмоцистной пневмонии сульфаметоксазолом/ триметопримом, 22% пациентов - терапия легионеллезной пневмонии моксифлоксацином.

Больным проводилась волевическая нагрузка под контролем центрального венозного давления (ЦВД) до достижения 8-12 мм рт.ст. и индекса глобального конечного диастолического объема (ГКДО), вазопрессорная терапия норэдреналином, внутривенная инфузия гидрокортизона в дозе 200-300 мг/сут. Заместительная почечная терапия (ЗПТ) (гемодиализ или гемодиализация) выполнялась при развитии острой почечной недостаточности (ОПН) либо выраженных метаболических нарушениях (лактат-ацидоз, гипергидратация, электролитные нарушения). При развитии острой дыхательной недостаточности (ОДН), некорректируемой с помощью неинвазивных методов респираторной поддержки, у больных интубировали трахею, и они переводились на искусственную вентиляцию легких (ИВЛ).

Больные в ММСК-группе при включении в исследование наряду со стандартной терапией получали однократно внутривенно донорские ММСК в количестве  $1-1,5 \times 10^6$  клеток на кг массы тела в первые 10 часов с момента развития СШ. ММСК донора, полученные из костного мозга, выращенные на среде с плазмой крови человека, обогащенной лизированными тромбоцитами, вводили внутривенно в количестве  $1-1,5 \times 10^6$  трансплантируемых клеток на кг массы тела больного однократно в первые 10 ч от момента развития СШ.

После включения в исследование больные в обеих группах обследовались ежедневно в течение первых трех суток, затем раз в неделю на протяжении 28 дней (рис. 2). Обследование больных включало в себя: исследование клинического анализа крови, биохимических показателей сыворотки крови (общий белок, глюкоза, билирубин, мочевины, креатинин, амилаза, аспаратаминотрансфераза (АЛТ),



аланинаминотрансфераза (АЛТ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), калий, натрий, кальций, хлор), газового состава артериальной крови, концентрации лактата артериальной крови, сывороточных концентраций ИЛ-6, ПКТ, СРБ, пресепсина и ИЛ-10 (табл. 2). В плазме исследовали показатели гемостаза (активированное частичное тромбопластиновое время, концентрацию фибриногена, протромбиновый индекс по Квику, концентрацию антитромбина III (АТ III), продолжительность XIIa-зависимого фибринолиза).

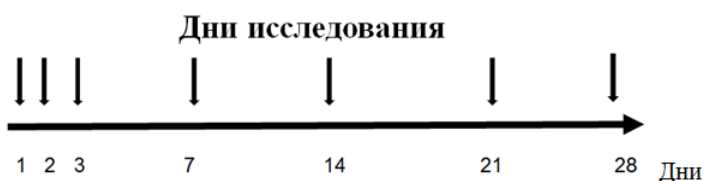


Рисунок 2. Обследование больных СШ.

Таблица 2. Объем работы: методы исследования\*

| Показатель | Число исследований |
|------------|--------------------|
| ПКТ        | 124                |
| СРБ        | 124                |
| ИЛ-6       | 124                |
| ИЛ-10      | 124                |
| Пресепсин  | 144                |
| Всего      | 640 исследований   |

Примечания \* - указаны лишь специальные методы, стандартные (лабораторные, рентгенологические, микробиологические, цитологические) не включены в таблицу.

До выхода больных из состояния СШ оценивались показатели центральной гемодинамики, полученные методом транспульмональной термодилуции [121]. Для этого всем больным устанавливался центральный венозный катетер (Certofix Duo; B Braun Melsungen AG, Германия) во внутреннюю яремную вену. Инфузия катехоламинов проводилась через отдельный просвет центрального венозного катетера. Выполняли катетеризацию бедренной артерии катетером «Pulsio cath» 5 Fr (PV2015L20, «Pulsion Medical Systems», Германия). Артериальный катетер и центральный венозный катетер были подключены к прикроватному монитору фирмы Philips (IntelliVue MP40,

Philips Medical Systems), снабженным модулем для проведения измерений по технологии PiCCO (PiCCO-Technology Module M3012A). Для проведения транспульмональной термодилуции в центральный венозный катетер болюсно вводили 20 мл 5% раствора глюкозы, охлажденного до температуры 0-8<sup>0</sup> С. Термистор бедренного артериального катетера регистрировал изменение температуры. По параметрам температурной кривой рассчитывались сердечный выброс, глобальный конечный диастолический объем, внутригрудной объем крови [121]. После стабилизации состояния больного и при отсутствии необходимости в инвазивном мониторинге артериальный катетер удалялся.

На основании полученных параметров рассчитывали тяжесть состояния больных по шкале APACHE II [70] в день поступления, а также баллы по шкале SOFA [141] в каждой точке исследования. В анализ включались: уровень сознания по шкале ком Глазго, температура, очаги инфекции (данные компьютерной и/или магниторезонансной томографии), результаты микробиологических исследований (посевы крови, жидкости бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), со слизистой ротоглотки, мочи, ран, ликвора), гемодинамические показатели, выраженность ОДН, необходимость проведения заместительной почечной терапии (гемодиализа / гемодиафильтрации), длительность инотропной / вазопрессорной поддержки, длительность ИВЛ, оценивалась 28-дневная выживаемость, учитывались все исходы больных, причины неблагоприятных исходов. Умершими считались пациенты, у которых смерть наступила в течение 28 дней.

Кровь для исследования на маркеры и медиаторы СШ забирали в стерильные силиконированные пробирки с этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА), цитратом натрия и сухие пробирки, немедленно центрифугировали при скорости 2000 об./мин. в течение 15 мин., полученные плазму и сыворотку хранили при -74<sup>0</sup>С.

Определение концентрации СРБ в сыворотке крови проводили методом иммунотурбидиметрии на биохимическом анализатор «Cobas c111» фирмы «RocheDiagnostics» (Швейцария).

Концентрацию ПКТ в сыворотке крови измеряли количественным иммунолюминометрическим методом на приборе Люминометр Lumat 9507 (BRANMS

РСТ ЛИА, Германия). Принцип метода состоит в измерении интенсивности индуцированной хемилюминесценции акридиновых меток, включенных в «сэндвич» - комплексы, образованные молекулой ПКТ, содержащейся в исследуемом образце и двумя моноклональными мышинными антителами к катакальциновому и кальцитониновому фрагменту молекулы. При этом одни из антител (к катакальциновому фрагменту) исходно адсорбированы на стенке тестовой пробирки, а вторые (к кальцитониновому фрагменту), добавляемые в избытке, несут на себе люминесцентную метку. В результате взаимодействия между указанными компонентами ПКТ, присутствующий в исследуемом образце, связывается с антителами и происходит механическая фиксация комплекса на стенке пробирки. Избыточные антитела с люминесцентными метками, впоследствии удаляются путем тщательной отмывки тестовой пробирки. После завершения инкубации и удаления несвязавшихся меченых антител проводится индукция и измерение интенсивности хемилюминесцентного сигнала от исследуемого образца с помощью люминометра, имеющего высокочувствительный фотоэлектронный умножитель и два инжектора для прецизионной автоматической подачи активирующих растворов. Интенсивность регистрируемого свечения пропорциональна концентрации ПКТ в исследуемом образце. Измерение осуществлялось в полуавтоматическом режиме, после предварительной калибровки люминометра по стандартным образцам и построения калибровочной кривой, с использованием штатного комплекта программного обеспечения прибора.

Измерение концентрации пресепсина проводили с помощью хемилюминесцентного иммуноферментного анализа (CLEIA PATHFAST, Япония) на приборе MITSUBISHI Chemical PATHFAST. Тест-система для определения пресепсина является анализом для измерения пресепсина в формате хемилюминесцентного иммуноферментного анализа (CLEIA) [72, 104]. В тесте используются моноклональные и поликлональные антитела против пресепсина. Все необходимые для проведения тестирования компоненты упакованы в одном картридже. После загрузки картриджа в диагностический анализатор PATHFAST количественный результат может быть получен через 17 минут. Процедура проведения анализа основана на методе

хемилюминесцентного иммуноферментного анализа с использованием технологии MAGTRATION®. MAGTRATION® - технология разделения В/Ф (связанного/свободного материала) с промывкой магнитных частиц в наконечниках. Технология является зарегистрированной торговой маркой PrecisionSystemScience. В этой процедуре поликлональные антитела к пресепсину, связанные со щелочной фосфатазой, и моноклональные антитела к пресепсину на магнитных частицах смешиваются с образцом. Пресепсин образца связывается с антителами к нему, образуя иммунокомплекс с мечеными ферментом антителами и антителами на магнитных частицах. После удаления несвязавшегося материала к иммунному комплексу добавляется хемилюминесцентный субстрат. После короткой инкубации под воздействием ферментной реакции в смеси начинается люминесценция, интенсивность которой зависит от концентрации пресепсина в образце. Расчет результата проводится по стандартной калибровочной кривой.

Для определения концентрации пресепсина использовали плазму больных, кровь собиралась стандартной процедурой в пробирки с ЭДТА. Далее пробирки центрифугировались в течение 20 мин со скоростью 3500 оборотов/минуту, после чего плазма крови разливалась по эппендорфам и замораживалась при температуре  $-74^{\circ}\text{C}$ . При исследовании образцы размораживались в паровой ванне при температуре не выше  $37-38^{\circ}\text{C}$  до полного растворения плазмы. Перед использованием пробы убеждались, что она не содержит фибриновых нитей и других нерастворимых частиц. Образцы перед внесением осторожно перемешивались. Картридж с реагентами устанавливался в кассету для картриджей на приборе, потом вносилось примерно 100 мкл пробы в лунку для проб на картридже, в гнездо для наконечников на приборе устанавливался новый наконечник напротив картриджа. Немедленно после внесения пробы в картридж последний загружался в прибор, и начиналось тестирование. Пробы с концентрацией пресепсина  $>20\ 000$  пг/мл (верхний лимит определения анализатором PATHFAST) разводили 0,9% раствором натрия хлорида и исследовали повторно для получения точного результата. Полученные результаты пересчитывались с учетом коэффициента разведения.

Определение концентраций ИЛ-6 и ИЛ-10 в плазме крови проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа иммуноферментным методом (сэндвич-метод) по методике BMS213/2 «Bender Med Systems». Концентрации ИЛ-6 и ИЛ-10 определяли в плазме при помощи фермент-связанного иммуносорбента Human IL-6 ELISA BMS213/2/ Human IL-10 ELISA BMS215/2 (Австрия). Набор состоял из нескольких 8-луночных стрипов с рамкой с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к ИЛ-6/ИЛ-10. Использовался «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта использованы два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к ИЛ-6/ИЛ-10. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с биотином. На первой стадии анализа ИЛ-6/ИЛ-10, содержащийся в калибровочных и исследуемых пробах, связывается с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. На второй стадии анализа иммобилизованный ИЛ-6/ИЛ-10 взаимодействует с конъюгатом вторых антител с биотином. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству ИЛ-6/ИЛ-10 в исследуемом образце. После 2-х часовой инкубации несвязанные антитела к ИЛ-6/ИЛ-10, конъюгированные с биотином, удаляются во время промывки. На последней стадии анализа в лунки вносят авидин-пероксидазу. Во время инкубации с субстратной смесью происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству связавшихся меченных антител. После часовой инкубации несвязанный стрептавидин с пероксидазой хрена удаляется во время промывки, и субстрат реактив с пероксидазой хрена добавляется в лунки. Через 15 минут реакцию останавливают добавлением кислоты. После измерения оптической плотности раствора в лунках на сканирующем UV/Vis-спектрофотометре BeckmanCoulter серии DU® 700 на основании калибровочной кривой рассчитывалась концентрация ИЛ-6/ИЛ-10 в определяемых образцах. Стандартную калибровочную кривую получали из 7 стандартных разведений человеческого ИЛ-6/ИЛ-10, и далее определялась концентрация образца человеческого ИЛ-6/ИЛ-10. Все исследования выполнялись в дублях. Рассчитывались средние значения образцов и стандартов. Создавали стандартную кривую, откладывая среднюю

абсорбцию для каждого стандарта концентрации на оси ординат и концентрации ИЛ-6/ИЛ-10 на оси абсцисс. Расчет образцов с концентрацией, превышающей стандарты, производился следующим образом: такие образцы требовали дальнейшего разбавления буфером для получения точного результата, при этом учитывался коэффициент разведения.

Активированное частичное тромбиновое время (АЧТВ) определяли на автоматическом коагулометре «Sysmex CA-1500» фирмы «Sysmex Corporation» (Япония) с использованием Pathromtin\* SL фирмы «DadeBehring» (Германия) [3].

Протромбин по Квику определяли с тромбoplastином, стандартизованным по международному индексу чувствительности (МИЧ 1,1) с расчетным показателем ПИ в %. Исследование выполняли на автоматическом коагулометре «Sysmex CA-1500» фирмы «Sysmex Corporation» (Япония) с использованием реагента ThromborelR S фирмы «DadeBehring» (Германия).

Концентрацию фибриногена в плазме определяли на автоматическом коагулометре «Sysmex CA-1500» фирмы «Sysmex Corporation» (Япония) с использованием реагента Dade R Thrombin Reagent фирмы «Dade Behring» (Германия) [3]. Активность АТIII определяли фотометрическим методом с использованием хромогенного субстрата. Измеряли оптическую плотность образца на спектрофотометре «Novospec II» (Япония), длина волны 405 нм. Использовали калибровочный график и значение оптической плотности исследуемого образца для определения активности АТ III. Исследование выполняли с использованием реагента Berichrom\* Antithrombin III (A) фирмы «Dade Behring» (Германия).

Оценку фактор-ХII-а зависимого фибринолиза проводили по Г.Ф. Еремину и А.Г. Архипову (1982) [3].

Кровь для микробиологического исследования забирали из периферической вены и/или из центрального катетера в объеме 8-10 мл во флаконы, предназначенные для культивирования аэробных бактерий (ВАСТЕС PLUS Aerobic/F).

Всем больным с подозрением на пневмонию выполнялась мультиспиральная компьютерная томография грудной клетки, по результатам которой выявлялась область наибольшего поражения. В последующем выполнялись фибробронхоскопия (ФБС) с

БАЛ. Фибробронхоскоп проводили в сегментарный бронх наиболее пораженного участка легкого, выявленного при компьютерной томографии, до его заклинивания. После чего вводили подогретый до 37°C 0,9% раствор натрия хлорида с помощью одноразовых шприцов в виде 8 порций по 20 мл. С целью предотвращения коллапса альвеол отсасывание проводили при 50-80 мм рт ст. После окончания процедуры полученная жидкость перемешивалась и направлялась в лаборатории для исследования. Бактериологическое исследование включало в себя посев лаважной жидкости количественным методом на среду Сабуро с хлорамфениколом, Эндо и другие, бактериоскопию с окраской по Граму, Циль-Нильсену, калькофлюором белым. Для выделения легионелл использовали селективный буферный угольно-дрожжевой агар. Определение антигена *Aspergillus* (галактоманнан) в сыворотке крови и жидкости БАЛ проводили методом иммуноферментного анализа (PLATELIA *Aspergillus*, BioRad Laboratories, США). Антиген считали положительным при значениях индекса оптической плотности галактоманнана в крови от 0,5 и более, в жидкости БАЛ от 1,0 и более.

Диагноз пневмоцистной пневмонии устанавливали при обнаружении *Pneumocystis jirovecii* в жидкости БАЛ в реакции непрямой флуоресценции и наличия соответствующей клинической картины в сочетании с изменениями в лёгких, выявленных при компьютерной томографии.

### **2.3. Основные понятия**

Под *агранулоцитозом* понимали число гранулоцитов крови  $0,5 \times 10^9$ /л и менее.

Диагноз *СШ* устанавливался при выявлении сепсиса, протекающего с признаками нарушения органной перфузии и артериальной гипотензией, сохраняющейся, несмотря на инфузию адекватных объемов жидкости, и требующей для своей коррекции введения инотропных и/или вазопрессорных препаратов. Критериями СШ являлись гипертермия  $>38,5^{\circ}\text{C}$ , частота сердечных сокращений более 90 в 1 мин, тахипноэ более 30 в 1 мин., сывороточная концентрация СРБ  $>10$  мг/л, концентрация ПКТ сыворотки крови более 10 нг/мл при определении полуколичественным методом, наличие признаков нарушения тканевой перфузии (повышение содержания лактата в

артериальной крови более 2,5 ммоль/л, метаболический ацидоз с  $\text{pH} \leq 7,3$ , дефицит оснований больше 5 ммоль/л).

Под *артериальной гипотензией* понималось снижение систолического артериального давления (АД) ниже 90 мм рт.ст. в течение более 1 часа, сохраняющееся несмотря на адекватную инфузионную терапию. Критерием адекватности, проводимой инфузионной терапии считалось повышение ЦВД до 12 мм рт.ст., нормализацию индекса ГКДО по данным транспульмональной термодилуции.

Наличие *бактериемии* не было обязательным условием для диагностики СШ. Считали, что больной выведен из состояния СШ, если в течение суток без введения инотропных или вазопрессорных препаратов и волемической нагрузки систолическое АД стабилизировалось на цифрах не ниже 90 мм рт.ст., и исчезали признаки нарушения тканевой перфузии.

Под *ОПН* понимали олигурию (диурез  $< 0,5$  мл/кг/ч) и/или повышение концентрации креатинина сыворотки более 0,2 ммоль/л).

*Печеночная дисфункция* диагностировалась при выявлении гипербилирубинемии  $> 70$  мкмоль/л и/или повышения активности трансаминаз в два раза и более от нормы.

Критериями *ОДН* были тахипноэ (число дыханий в покое более 30 в 1 мин.), артериальная гипоксемия ( $\text{PaO}_2 < 60$  мм рт.ст.) или гиперкапния ( $\text{PaCO}_2 > 50$  мм рт.ст.) при дыхании воздухом, появление обширного двустороннего поражения легких по рентгенологическим данным при отсутствии клинических признаков первичной сердечной недостаточности и хронического заболевания легких.

Выраженность дыхательной недостаточности оценивалась у больных по уровню респираторного индекса, вычисляемого по формуле  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ , где  $\text{PaO}_2$  - это напряжения кислорода в артериальной крови, а  $\text{FiO}_2$  - процентное содержание кислорода во вдыхаемой смеси, выраженное в долях единицы. В норме этот показатель превышает 350-400 мм рт. ст.

*Некротическую энтеропатию* диагностировали при появлении метеоризма, болей в животе, диареи при отсутствии признаков острого панкреатита.



#### 2.4. Получение мультипотентных мезенхимных стромальных клеток

Все работы были проведены в стерильных условиях. ММСК были культивированы в лаборатории физиологии кроветворения ФГБУ ГНЦ МЗ РФ (с.н.с. Петинати Н.А., зав. лабораторией д.б.н. Дризе Н.И.). В исследовании были использованы только ММСК от донора костного мозга, которые никогда не соприкасались с ксеногенными материалами. Все компоненты системы были проверены на стерильность, пирогенность и токсичность. ММСК были охарактеризованы по всем параметрам необходимым для этих клеток согласно общепринятому протоколу [41]. Для устранения реагентов животного происхождения были подобраны условия культивирования ММСК на человеческой плазме, обогащенной тромбоцитами. Плазму, обогащенную тромбоцитами (концентрация тромбоцитов  $0,5-1,9 \times 10^9$ /мл) разливали в стерильные флаконы и замораживали на  $-70^\circ\text{C}$ . Размораживали для лизирования тромбоцитов и оттаявшую плазму затем откручивали при 12000 об/мин в течение 15 мин [11].

Для выделения ММСК из костного мозга доноров выделяли их из мононуклеаров костного мозга доноров после сепарации в градиенте фиколла-верографина. Костный мозг помещали в стерильные пробирки с гепарином (50 ед/мл), разводили в 2 раза средой MEM (ICN) с 0,2% метилцеллюлозы (1500 сП, Sigma) и оставляли на 40 мин при комнатной температуре. За это время большая часть эритроцитов и гранулоцитов оседала, а мононуклеарные клетки оставались во взвеси. Надосадочную жидкость собирали и осаждали центрифугированием при 1500 об./мин в течение 10 мин. Количество ядерных клеток определяли при подсчете с генциан-виолетом (1% раствор на 3% уксусной кислоте). Затем клетки взвешивали в питательной среде и рассеивали соответствующим образом. При таком методе выживает и прикрепляется большее количество стромальных клеток, чем при выделении ядерных клеток на градиенте плотности фиколла-верографина [11].

*Наращивание мезенхимных стромальных клеток.* Мононуклеары из костного мозга культивировали в среде MEM с 4% плазмой, обогащенной тромбоцитами, 200 мМ L-глутамин и антибиотиками. ММСК максимально быстро достигают субконфлуентности в культуре при посадке  $10^5$  клеток на  $\text{cm}^2$  площади дна флакона для

культивирования. По достижении конfluence культуры снимали с подложки с помощью 0,025% трипсина и пассировали в концентрации 4500 клеток на 1 см<sup>2</sup> дна флакона. ММСК максимально пролиферируют в течение первых 2 пассажей, затем индекс пролиферации падает и эффективно можно выращивать эти клетки не более чем в течение 5 пассажей.

ММСК были охарактеризованы по поверхностным маркерам и по способности к адипогенной, остеогенной и хондрогенной дифференцировкам (табл. 3). Фенотипирование ММСК проводили методом проточной цитофлуориметрии после 0-8 пассажей культуры. Клетки инкубировали с моноклональными мышинными антителами против CD105 (BD Pharmingen), FSP (FibroblastSurfaceProtein) (Sigma), 30 мин. при 40°C, отмывали 2 раза фосфатным буфером, а затем окрашивали клетки вторыми антителами, конъюгированными с флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC) - goat-anti-mouse-FITC conjugated IgG/IgM (BD Pharmingen), 30 мин. при 40°C и также отмывали 2 раза фосфатным буфером. Кроме этого клетки были напрямую окрашены FITC или PE (фикоэритрин)-конъюгированными антителами против HLA-DR (DACO), CD45 (Sigma), CD146 (MCAM), CD105 (Endoglin, SH2), CD59 (протектин), CD73 (SH3, SH4), CD90 (Thy-1), CD31 (PECAM-1), NGFR, CD34 и CD14 (BD Pharmingen). Уровень неспецифического связывания антител учитывали с помощью изотипического контроля, для этого клетки инкубировали с мышинными иммуноглобулинами IgG1 (BD Pharmingen). Для оценки жизнеспособности анализируемых клеток использовали 7-аминоактиномицин Д (7-AAD, Sigma). Анализ интенсивности флуоресценции производился на приборе FACS Calibur (BD Biosciences, США), полученные результаты были обработаны в программах Win MDI v.2.8 (© Joseph Trotter) и Flow Jo v.7.2.4 (Tree Star Inc.).

ММСК после снятия с подложки центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 минут и ресуспендировали в полиглюкине в необходимом количестве. Далее клетки замораживали в пробирках в жидком азоте. Затем ММСК доноров хранились в парах жидкого азота в криобанке ФГБУ ГНЦ МЗ РФ. При поступлении в стационар больного с септическим шоком в состоянии агранулоцитоза, удовлетворяющего критериям

Таблица 3. Фенотип ММСК (пассажи 0-8, средние значения по всем образцам).

| Маркеры ММСК                     |           | Маркеры кроветворных клеток |          |
|----------------------------------|-----------|-----------------------------|----------|
| CD105 (Endoglin)                 | 98,6±0,2% | CD31 (PECAM-1)              | 2,5±0,7% |
| CD73 (SH3, SH4)                  | 98,1±0,5% | HLA-DR                      | 3,7±0,7% |
| CD90 (Thy-1)                     | 98±0,5%   | CD34                        | 0,00%    |
| CD59 (Протектин)                 | 98,8±0,1% | CD45                        | 4,5±0,8% |
| Fibroblast Surface Protein (FSP) | 97±0,4%   | CD14                        | 2,0±0,6% |

протокола, ММСК донора были использованы после размораживания клеток, ранее замороженных в парах жидкого азота в среде с 10% диметилсульфоксидом. Непосредственно перед введением мультипотентных мезенхимных стромальных клеток в организм больного септическим шоком в состоянии агранулоцитоза пробирка с клетками размораживалась в теплой воде с температурой не более 38<sup>0</sup>С. Сразу же после размораживания ММСК вводились внутривенно пациенту в течение 10 мин.

### 2.5. Характеристика больных в группах

В ММСК-группу вошли 15больных, в контрольную группу - 14 больных. Больные в обеих группах существенно не различались по демографическим показателям, нозологическим формам заболеваний системы крови (табл. 4).

В ММСК-группе у 6 (40%) больных был острый миелобластный лейкоз, у 3 – диффузная В-крупноклеточная лимфома, по 1 больному были с острым лимфобластным лейкозом, лимфомой Беркитта, и лимфомой из клеток мантийной зоны, Т-клеточной ангиоиммунобластной лимфомой, миелодиспластическим синдромом, множественной миеломой, одна больная была с лекарственным агранулоцитозом после трансплантации аллогенной трупной почки. В контрольной группе у 4 больных был острый миелоидный лейкоз, у 3 -множественная миелома, у 3 – диффузная В-крупноклеточная лимфома, по 1 больному страдали композитной лимфомой, лимфогранулематозом, миелодиспластическим синдромом, одна больная была после трансплантации аллогенной трупной почки.

Таблица 4. Характеристика больных из ММСК-группы и контрольной группы

| Показатели                          | ММСК-группа          | Контрольная группа |
|-------------------------------------|----------------------|--------------------|
| Возраст, годы<br>медиана (мин-макс) | Ме 39,5<br>(30 – 75) | Ме 47<br>(33- 81)  |
| Пол (м/ж)                           | 6/9                  | 7/7                |
| Нозологические формы                |                      |                    |
| Острый миелоидный лейкоз            | 5                    | 4                  |
| Миелодиспластический синдром        | 1                    | 1                  |
| Неходжкинские лимфомы               | 6                    | 4                  |
| Множественная миелома               | 1                    | 3                  |
| Лекарственный агранулоцитоз         | 1                    | 1                  |
| Лимфогранулематоз                   | 0                    | 1                  |
| Острый лимфобластный лейкоз         | 1                    | 0                  |

*Примечания.* Ме - медиана

У всех больных агранулоцитоз развился после проводимой химиотерапии и/или иммуносупрессивной терапии, у 3 (20%) больных в ММСК-группе перед включением в исследование была выполнена трансплантация аллогенного костного мозга от неродственного донора.

Больные из обеих групп достоверно различались по данным лабораторного мониторинга и клиническим характеристикам (табл.5).

Поскольку референсные значения концентрации воспалительных маркеров в крови у больных в состоянии агранулоцитоза («нормальный уровень») не изучены, они были однократно исследованы у больных гемобластозами с агранулоцитозом без инфекционных осложнений. У пациентов однократно были определены показатели пресепсина, ПКТ, СРБ, ИЛ-6, ИЛ-10. В эту группу было включено 12 больных гемобластозами с миелотоксическим агранулоцитозом (9 мужчин, 3 женщины) в возрасте от 23 до 66 лет (медиана - 42 года). У 4 больных была множественная миелома, у 3 больных был острый лимфобластный лейкоз, у 2 – диффузная В-крупноклеточная лимфома, по одному больному страдали острым миелоидным

лейкозом, первичной медиастинальной В-клеточной лимфомой и неклассифицируемой В-клеточной лимфомой с лейкоемизацией.

## 2.6. Статистический анализ

Статистический анализ проводился совместно с лабораторией биostatистики и медицинских информационных систем ФГБУ ГНЦ МЗ РФ (с.н.с. Э. Г. Гемджян, рук. - к.т.н. С.М. Куликов). Данные обработаны с помощью программ «Биостат» [8] и «Origin 10.0 Professional», статистического пакета SPSS, версия 10.0.5 (SPSS Inc.). Использовали методы описательной статистики, сравнения выборок, корреляционный анализ (коэффициент корреляции Спирмена) и анализ выживаемости (метод Каплан-Мейера). Уровень статистической значимости  $p$  принят равным 0,05.

Данные представлены посредством медианы, межквартильного интервала (МКИ) - разницы между 1-м и 3-м квартилями, т.е. между 25-м и 75-м перцентилями.

Графические данные представлены в виде «боксов с усами», на которых обозначены минимальное и максимальное значения, медиана, среднее значение, 25 перцентиль и 75 перцентиль (рис. 3).



Рисунок 3. Обозначения на графике «бoкс с усами».

Таблица 5. Клинико-лабораторная характеристика больных из ММСК-группы и контрольной группы. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала.

| Показатель  | ММСК-группа              | Контрольная группа      |
|---|--------------------------|-------------------------|
| Гемоглобин, г/л   | 65 (61-70)               | 66 (64-89)              |
| Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$  | 21(13-31)                | 26 (17-46)              |
| Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$   | 0,20 (0,10-0,35)         | 0,30 (0,10-0,40)        |
| Калий, ммоль/л  | 4,30 (3,59-4,55)         | 4,00 (3,70-4,9)         |
| Натрий, ммоль/л   | 143,50 (133,5-145,75)    | 141,0 (137,0-145,0)     |
| Хлор, ммоль/л   | 109,50 (105,25-113,75)   | 112,00 (105,00-116,00)  |
| Лактат, ммоль/л   | 3,450 (2,85-4,425)       | 3,300 (2,400-4,200)     |
| Кальций, ммоль/л  | 1,165 (1,070-1,218)      | 1,120 (1,080-1,170)     |
| Глюкоза, ммоль/л  | 6,85 (6,00-8,80)         | 9,20 (5,70-10,20)       |
| Белок, г/л  | 47,500 (41,475-54,000)   | 50,100 (43,100-56,000)  |
| Мочевина, ммоль/л   | 10,435 (7,725-22,725)    | 9,900 (7,560-13,800)    |
| Креатинин, ммоль/л  | 0,120 (0,096-0,149)      | 0,132 (0,090-0,199)     |
| Протромбиновый индекс, %  | 50,50 (38,25-74,50)      | 57,00 (51,00-62,00)     |
| АЧТВ, с   | 44 (40-59)               | 49 (38-52)              |
| Фибриноген, г/л   | 3,600 (2,375-4,483)      | 3,900 (2,800-5,600)     |
| Антитромбин III, %  | 51,00 (42,25-61,00)      | 62,00 (49,00-66,00)     |
| XIIIa-зависимый фибринолиз, мин   | 108,5 (65,0-200,0)       | 150,0 (140,0-180,0)     |
| Лактатдегидрогеназа, Ед/л   | 791 (442-971)            | 773 (581-1003)          |
| Аспаратдегидрогеназа, Ед/л  | 26,0 (12,0-56,5)         | 19,0 (15,0-30,0)        |
| Аланинаминотрансфераза, Ед/л  | 26,0 (12,0-56,5)         | 19,0 (15,0-30,0)        |
| Амилаза, Ед/л   | 31,5 (21,0-66,5)         | 31,0 (23,0-45,0)        |
| Билирубин, мкмоль/л   | 33,850(11,275-52,815)    | 13,100(11,100-28,400)   |
| ПКТ, нг/мл  | 15,52 (6,42-37,00)       | 36,06 (11,26-6,10)      |
| pH  | 7,351 (7,250-7,415)      | 7,330 (7,281-7,420)     |
| BE  | -5,550 (-9,150- -3,175)  | -5,500 (-7,600- -4,800) |
| $\text{HCO}_3$ , ммоль/л  | 18,700 (16,725-23,275)   | 18,200 (17,700-19,300)  |
| $\text{SO}_2$ , мм.рт.ст.   | 87,8 (79,1-112,0)        | 98,2 (84,6-105,0)       |
| $\text{CO}_2$ , мм.рт.ст.   | 39,95 (34,65-46,25)      | 38,90 (32,50-40,10)     |
| ИЛ-6, пг/мл   | 22800,0 (2350,0-30004,5) | 3000,0 (485,0-18200,0)  |
| ИЛ-10, пг/мл  | 301,0(23,1-1470,5)       | 384 (50,9-1197,5)       |
| СРБ, мг/мл  | 242,65 (178,90-289,75)   | 232,00 (140,00-320,00)  |
| Пресепсин, пг/мл  | 3776 (1610-7410)         | 1928 (1412-8304)        |
| Индекс внесосудистой воды легких, мл/кг   | 8,700 (7,225-10,500)     | 11,000 (7,600-11,850)   |
| Длительность агранулоцитоза до СШ, дни  | 6,0 (5,0-21,5)           | 7,0 (5,0-12,0)          |
| Сердечный индекс, л/мин/м <sup>2</sup>  | 4,85 (3,54-6,88)         | 4,60 (3,54-6,40)        |
| Индекс общего периферического сопротивления, дин/с/м <sup>5</sup> /м <sup>2</sup> | 1142 (756-1359)          | 1165 (731-1578)         |
| Индекс ГКДО, мл/м <sup>2</sup>  | 716 (546-798)            | 801 (654-851)           |
| Температура тела, °С  | 39,2 (38,3-40,0)         | 39,6 (39,1-40,2)        |
| Число сердечных сокращений в минуту   | 140 (130-144)            | 130 (125-140)           |
| Число дыхательных движений в минуту   | 35 (16-40)               | 25 (14-40)              |
| Среднее АД, мм рт.ст.   | 50 (48-58)               | 53 (50-57)              |

## **Глава 3. Результаты собственных исследований**

### **3.1. Клинико-лабораторная характеристика септического шока у больных в состоянии агранулоцитоза**

В момент развития СШ больные из обеих групп статистически значимо не различались по основным физиологическим параметрам (табл. 5).

Не было различий между группами также по показателям гемограммы и биохимическим показателям (табл. 5). У многих больных из обеих групп регистрировались электролитные и метаболические нарушения (табл. 5). В день развития СШ у больных из ММСК-группы и контрольной группы показатели коагуляционного гемостаза также значимо не различались между группами (табл. 5). Концентрации всех воспалительных маркеров в день развития СШ были повышены у больных в состоянии агранулоцитоза и значимо не различались между собой (табл. 5). Длительность агранулоцитоза до развития СШ у больных, вошедших в ММСК-группу, варьировала от 3 до 68 дней, медиана составила 6 дней, и не отличалась от длительности агранулоцитоза у больных из контрольной группы, у которых она варьировала от 1 до 12 дней, медиана - 7 дней.

### **3.2. Течение сепсиса и септического шока у больных с агранулоцитозом**

#### **3.2.1. Изменения тяжести состояния больных по шкале SOFA**

На момент включения в протокол больные из обеих групп не различались по полу, возрасту и тяжести состояния (рис. 4).

В день развития СШ максимальное количество баллов по шкале SOFA составляло 20. Однако наибольшая выраженность полиорганной недостаточности зарегистрирована не в первые, а на вторые-третьи сутки после начала СШ (рис. 4). Максимальные значения по шкале SOFA в это время достигали 23 баллов.

В течение всего периода наблюдения статистически значимых различий в баллах по шкале SOFA между ММСК и контрольной группами не выявлено. Более того, даже

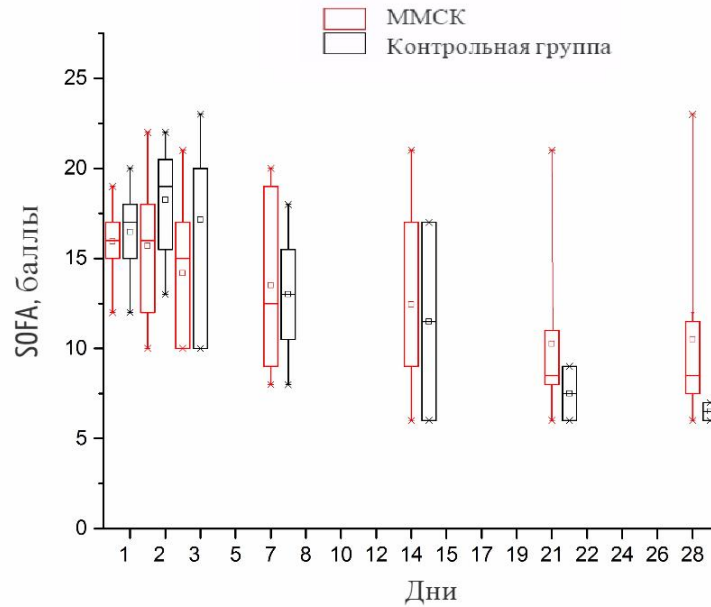


Рисунок 4. Изменения баллов по шкале SOFA у больных с СШ в состоянии агранулоцитоза в течение 28 дней наблюдения.

к 28 суткам наблюдения у многих пациентов сохранялась полиорганная недостаточность: по шкале SOFA в MMSC-группе медиана составила 8,5 баллов (МКИ 7,7-11,2 баллов), в контрольной группе -- 6,5 баллов (МКИ 6,2-6,7 баллов) (рис. 4).

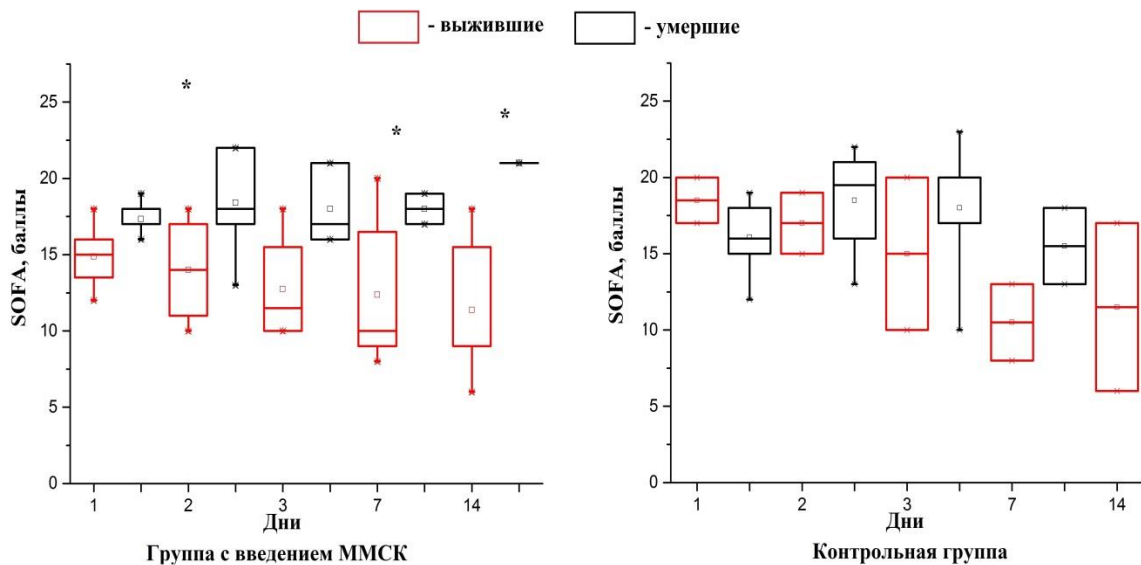


Рисунок 5. Количество баллов по шкале SOFA в течение первых двух недель с момента развития СШ.Примечания\* -  $p < 0,05$  при сравнении выживших и умерших больных.



В ММСК-группе на вторые сутки СШ выраженность полиорганной дисфункции у выживших больных достоверно снижалась по сравнению с умершими пациентами: медиана баллов по шкале SOFA составляла для выживших 14,0 (МКИ 11,0-16,5 баллов), а у умерших -18,0 баллов (МКИ 17,0-22,0 баллов) (рис. 5). Такие изменения сохранялись на протяжении всего периода наблюдения. В контрольной группе значимого снижения степени полиорганной недостаточности у выживших больных по сравнению с умершими не происходило (рис. 5).

Поскольку шкала SOFA включает в себя анализ по отдельным органам и системам [141], помимо общей оценки были проанализированы отдельно изменения этих органов и систем в процессе лечения.

### 3.2.2. Изменения неврологического статуса у больных с септическим шоком

Больные из обеих групп в момент включения в протокол не различались по баллам шкалы для оценки степени нарушения сознания и ком Глазго (рис. 6).

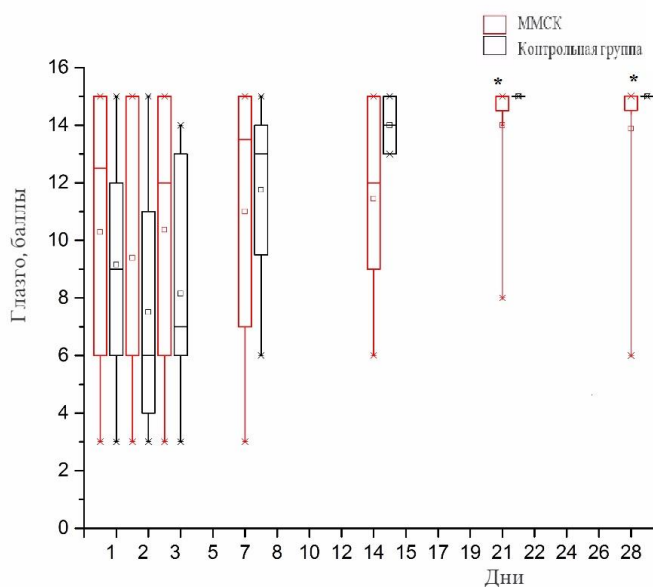


Рисунок 6. Изменения неврологического статуса у больных с СШ. Примечания. \* -  $p < 0.05$  при сравнении с первыми сутками СШ.

Достоверное увеличение баллов по шкале ком Глазго по сравнению с первыми сутками СШ в ММСК-группе происходило только к 21 дню исследования (рис. 6). Аналогичные изменения уровня сознания у больных из контрольной группы происходили к 21 дню течения СШ (рис. 6).

### 3.2.3. Острая дыхательная недостаточность у больных с септическим шоком

ОДН развилась у 24 (88%) из 27 больных, включенных в исследование, у 18 из них потребовалось проведение ИВЛ (рис. 7). В ММСК-группе ОДН была у 12 (86%) из 14 больных, 8 (57%) из них были переведены на ИВЛ. Из них выжили 4 (50%) больных. ОДН в контрольной группе развилась у 12 (92%) из 13 больных, 10 (77%) из них были переведены на ИВЛ. Выжили 2 (20%) больных.

Длительность проведения ИВЛ у выживших больных варьировала от 5 до 34 суток (медиана 28 дней), была достоверно выше ( $p=0,0001$ ), чем у умерших больных - от 2 до 14 суток (медиана 3 дня).

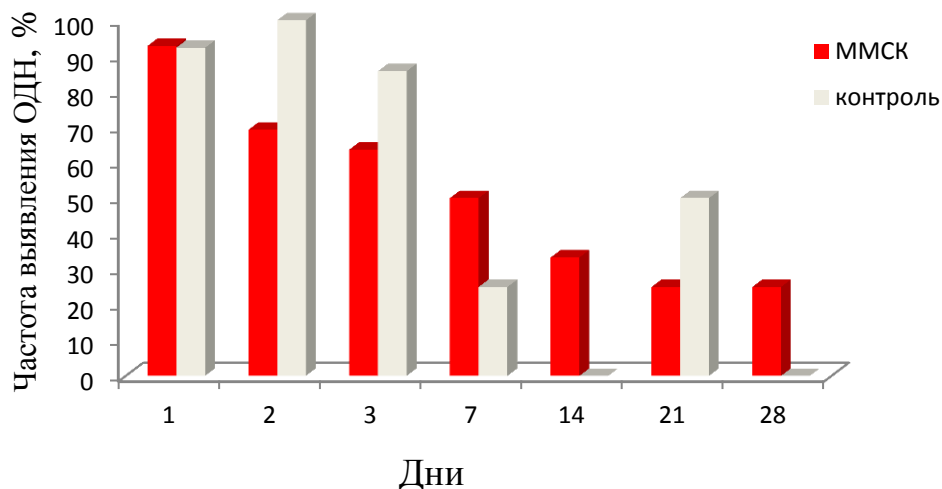


Рисунок 7. Частота встречаемости острой дыхательной недостаточности у больных с СШ в состоянии агранулоцитоза.

В день развития СШ респираторные индексы в группах значимо не различались: в ММСК-группе медиана 182 (МКИ 156-256) мм рт.ст., в контрольной группе – медиана 181 (МКИ 133-197) мм рт. ст. На следующий день после введения ММСК в ММСК-группе респираторный индекс был выше, чем в контрольной группе: соответственно

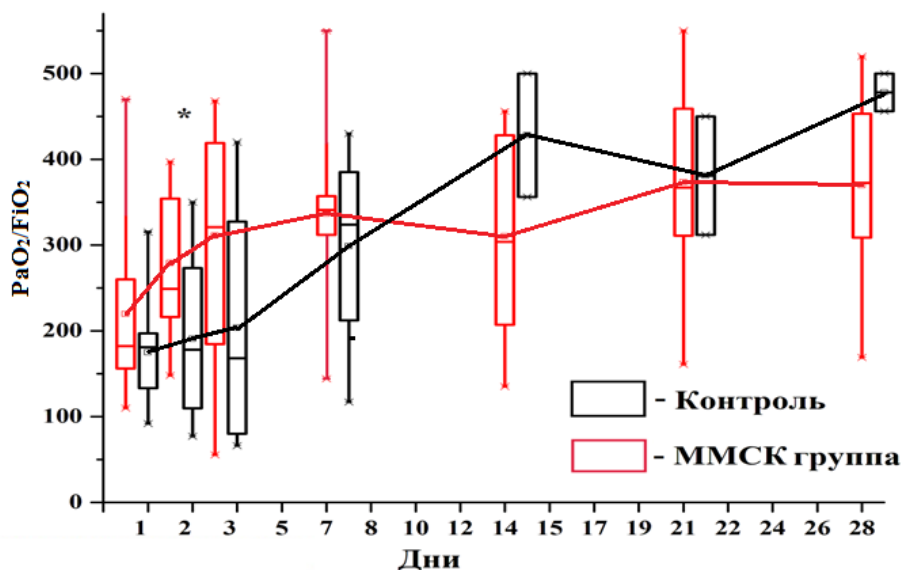


Рисунок 8. Изменения респираторного индекса у больных с СШ. Примечание.\* - $p < 0,05$  при сравнении ММСК-группы и контрольной группы.♣-  $p < 0,05$  при сравнении с данными больных этой же группы в первый день СШ.

медианы 248 (МКИ 216-354) мм рт.ст. и 178 (МКИ 110 - 257) мм рт.ст. ( $p=0,019$ ). В дальнейшем респираторный индекс не отличался у больных из ММСК и контрольной групп (рис. 8). В отличие от контрольной группы, в ММСК-группе отмечено значимое

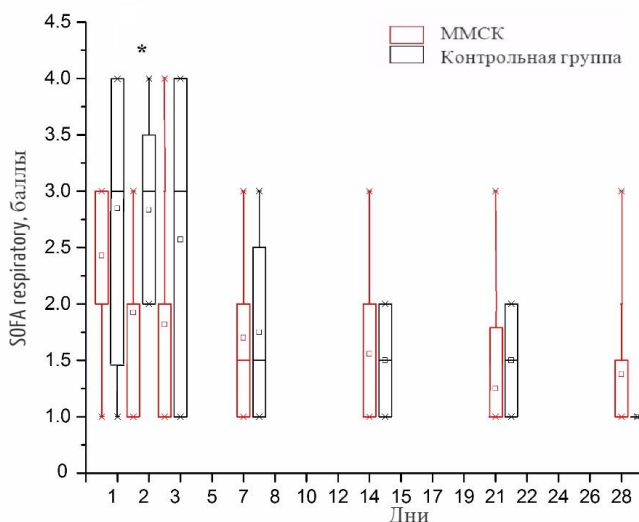


Рисунок 9. Изменения баллов респираторного компонента шкалы SOFA, у больных с СШ.Примечание.\* - $p < 0,05$  при сравнении ММСК-группы и контрольной группы.

повышение  $PaO_2/FiO_2$  по сравнению с исходными значениями уже на следующие сутки после введения ММСК, в контрольной группе значимое повышение респираторного индекса отмечалось только к 7 дню лечения (рис. 8).

При оценке баллов респираторного компонента шкалы SOFA установлено, что у больных на следующий день после введения ММСК улучшалась дыхательная функция по сравнению с контрольной группой больных ( $p=0,009$ ) (рис. 9).

### 3.2.4. Сердечно-сосудистая недостаточность у больных септическим шоком

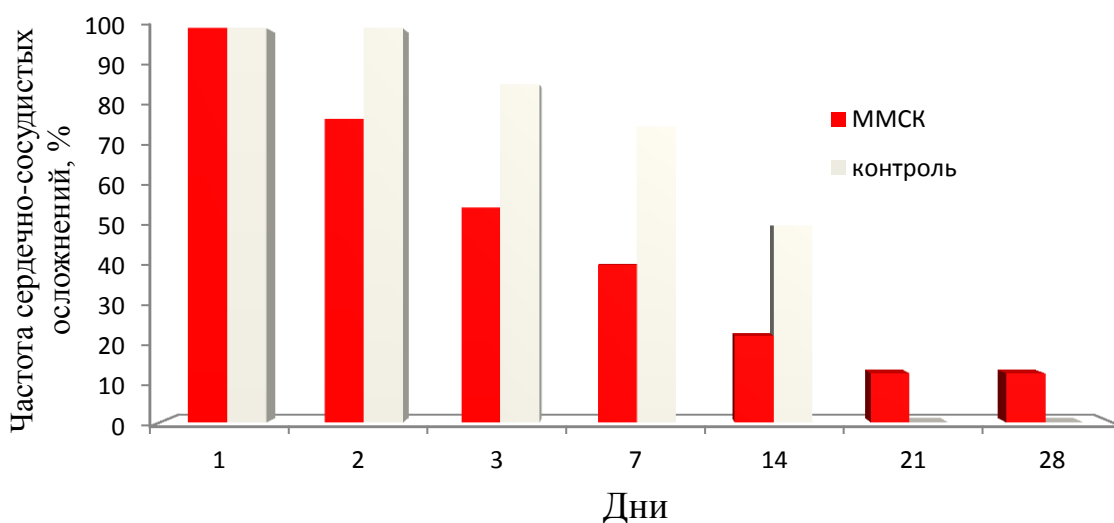


Рисунок 10. Частота встречаемости сердечно-сосудистых осложнений у больных СШ.

Динамика острой сердечно-сосудистой недостаточности у больных представлена на рисунке 10. Длительность вазопрессорной поддержки у больных варьировала от одного дня до 12 суток.

У всех больных СШ по данным транспульмональной термодилуции выявлялся гиперкинетический тип центральной гемодинамики. Больные из обеих групп в день развития СШ не различались по параметрам сердечного индекса и индекса общего периферического сопротивления сосудов (ИОПСС): у больных из ММСК-группы медиана сердечного индекса составляла  $4,85 \text{ л/мин/м}^2$  (МКИ  $3,68-6,88 \text{ л/мин/м}^2$ ), у больных из контрольной группы --  $4,60 \text{ л/мин/м}^2$  (МКИ  $3,54-6,54 \text{ л/мин/м}^2$ ), а медиана

ИОПСС 1142 дин/с/см<sup>5</sup>/м<sup>2</sup> (МКИ 756-1369 дин/с/см<sup>5</sup>/м<sup>2</sup>) для больных из ММСК-группы и медиана 1165 дин/с/см<sup>5</sup>/м<sup>2</sup>(МКИ 731-1578 дин/с/см<sup>5</sup>/м<sup>2</sup>) для больных из контрольной группы. В течение всего времени наблюдения различий между больными, леченными и нелеченными ММСК, не было.

В день развития СШ больные из обеих групп не различались по ИГКДО: соответственно для ММСК-группы медиана составила 716 мл/м<sup>2</sup>(МКИ 546-798 мл/м<sup>2</sup>) и для контрольной группы 801 мл/м<sup>2</sup>(МКИ 654-851 мл/м<sup>2</sup>). В дальнейшем различий между группами не наблюдалось.

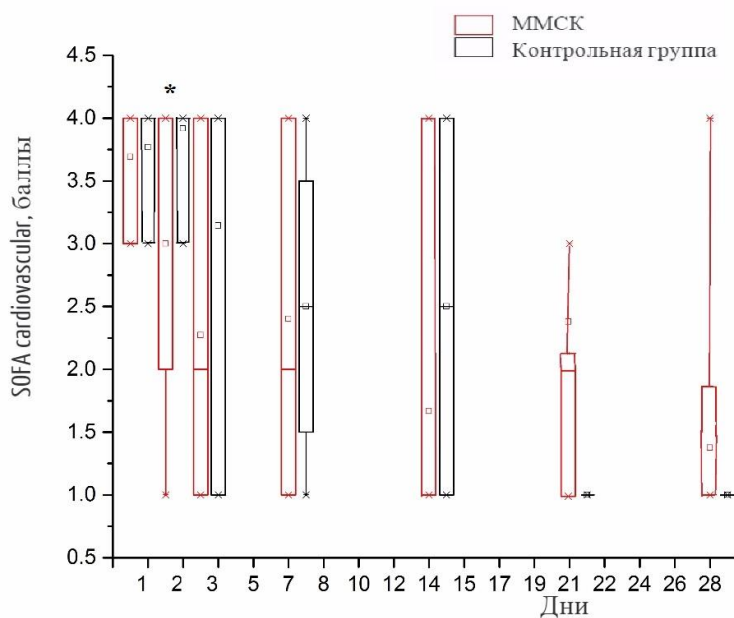


Рисунок 11. Изменения баллов сердечно-сосудистого компонента шкалы SOFA у больных с СШ в состоянии агранулоцитоза. Примечание.\* - $p < 0,05$  при сравнении ММСК-группы и контрольной группы.

На следующий день после введения ММСК у больных отмечалось уменьшение баллов по сердечно-сосудистому компоненту шкалы SOFA по сравнению с больными из контрольной группы (рис. 11).

### 3.2.5. Острая почечная недостаточность у больных септическим шоком

ОПН была у 17 (63%) из 27 больных, у 8 из них проводилась ЗПТ (гемодиализ и/или гемодиализация). В ММСК-группе ОПН развилась у 9 (64%) из 14 человек (рис. 12), в контрольной группе - у 8 (61%) из 13 больных.

В ММСК-группе ЗПТ проводилась у 7 (50%) из 14 больных, в контрольной группе - у 9 (69%) из 13 больных (рис. 13).

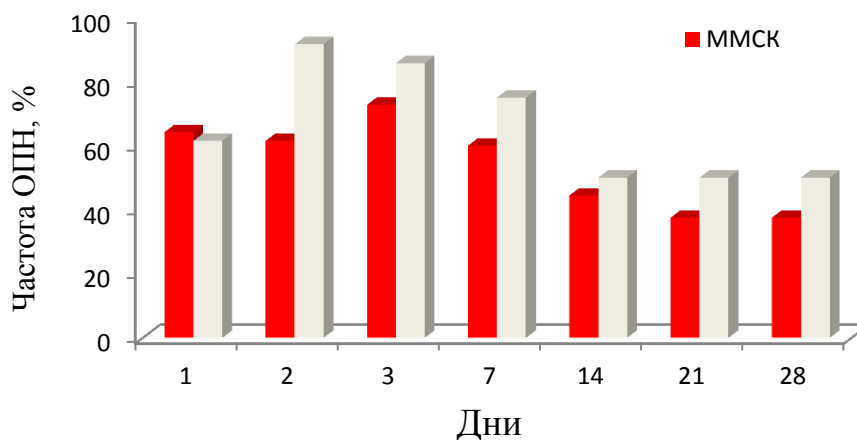


Рисунок 12. Частота встречаемости почечной недостаточности у больных с СШ.

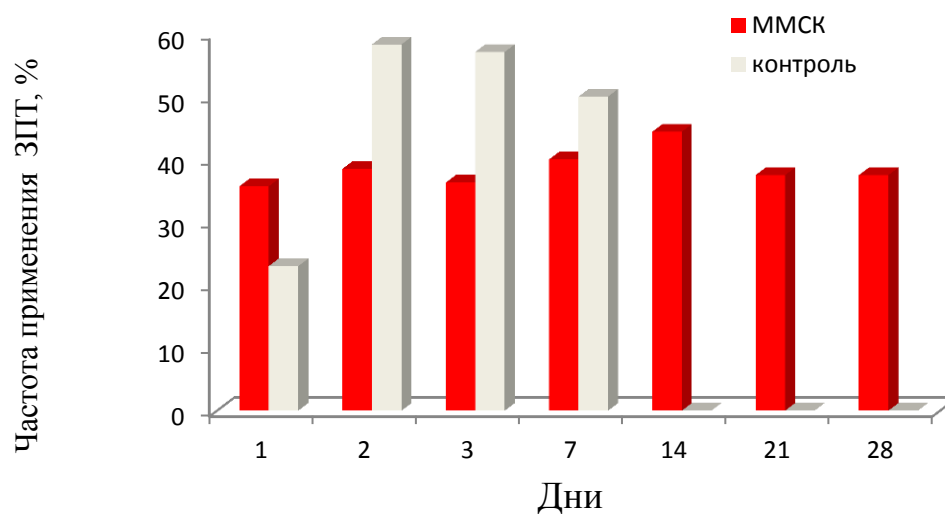


Рисунок 13. Частота проведения ЗПТ у больных с СШ.

Значимых отличий по баллам ренального компонента шкалы SOFA у больных из ММСК и контрольной групп в течение 28 дней не наблюдалось.

### 3.2.6. Параметры полиорганной дисфункции у больных с септическим шоком

Острая печеночная недостаточность развилась у 9 из 27 больных (рис. 14).

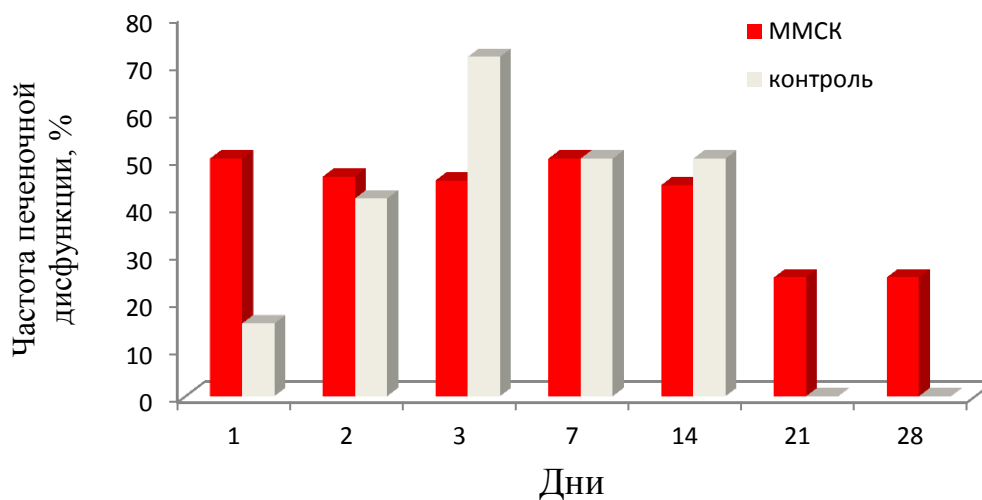


Рисунок 14. Частота встречаемости печеночной дисфункции у больных с СШ.

При сравнении компонентов SOFA (почечной, нервной системы, гематологической, печеночной) (рис.14) значимых различий между ММСК-группой и контрольной группой в течение 28 дней не выявлено.

Уровень лактата начинал нормализоваться после введения ММСК у больных к седьмому дню СШ (рис. 15), в то время как у больных из контрольной группы достоверное снижение концентрации лактата в артериальной крови наступало только к концу второй недели исследования (рис. 15).

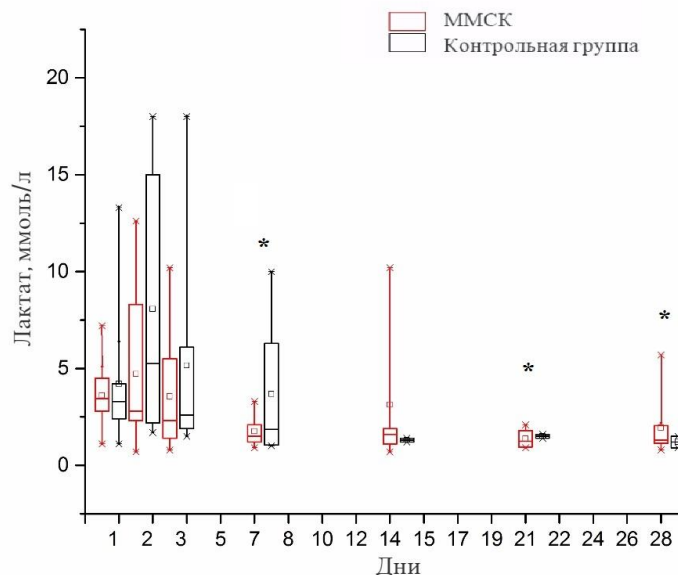


Рисунок 15. Изменения концентраций лактата в артериальной крови у больных СШ в состоянии агранулоцитоза. Примечание: \*-  $p < 0,05$  по сравнению с первым днем.

Однако концентрация лактата артериальной крови у больных ММСК- и контрольной группах значимо не различалась в течение всего времени наблюдения. Не было выявлено также значимых различий в сывороточных концентрациях общего белка, билирубина, амилазы, мочевины, активности ЛДГ, АСТ, АЛТ в контрольной группе и ММСК-группе не было.

Удлинение времени ХПа-зависимого фибринолиза наблюдалось у всех больных, начиная с дня развития СШ. В день развития СШ длительность его в ММСК- группе и контрольной группе составляла, соответственно: медиана 98 (МКИ 55-192) мин. и 150 (МКИ 140-280) мин. В течение всего времени наблюдения не было значимых различий в этом показателе между группами, и к 28 дню у двух больных из ММСК-группы длительность ХПа-зависимого фибринолиза оставалась больше нормы.

Через день после введения ММСК длительность ХПа-зависимого фибринолиза у выживших больных значимо ( $p < 0,05$ ) снижалась по сравнению с умершими: медиана составляла 170 (МКИ 111,2-191,1) мин, а у умерших - 270 (МКИ 220-280) мин (рис. 16).



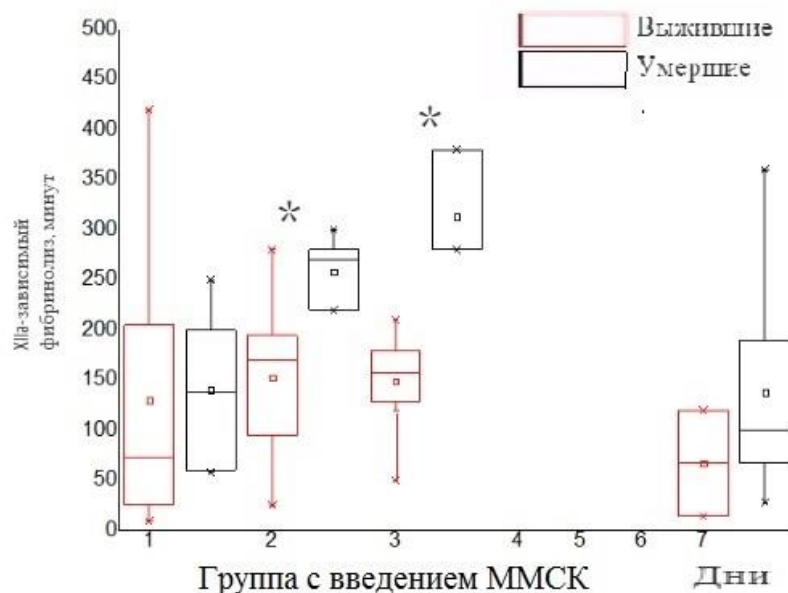


Рисунок 16. Динамика теста XIIa-зависимого фибринолиза у выживших и умерших больных в ММСК-группе в течение первой недели с момента развития СШ. Примечание. \* -  $p < 0,05$  при сравнении выживших и умерших в ММСК-группе.

Такие изменения сохранялись в течение трех дней, далее нивелировались. В контрольной группе значимого снижения длительности XIIa-зависимого фибринолиза у выживших больных по сравнению с умершими не было (рис. 16).

Концентрации фибриногена, величины протромбина по Квику, активность АТШ в плазме крови в течение всего времени наблюдения у больных из ММСК-группы и контрольной группы значимо не различались.

### 3.2.7. Динамика показателей гемограммы у больных септическим шоком

Все больные в день развития СШ находились в состоянии агранулоцитоза (рис. 17). В ММСК-группе медиана составляла  $0,2 \times 10^9/\text{л}$  (МКИ  $0,1-0,35 \times 10^9/\text{л}$  лейкоцитов), в контрольной группе –  $0,3 \times 10^9/\text{л}$  (МКИ  $0,1-0,4 \times 10^9/\text{л}$ ).

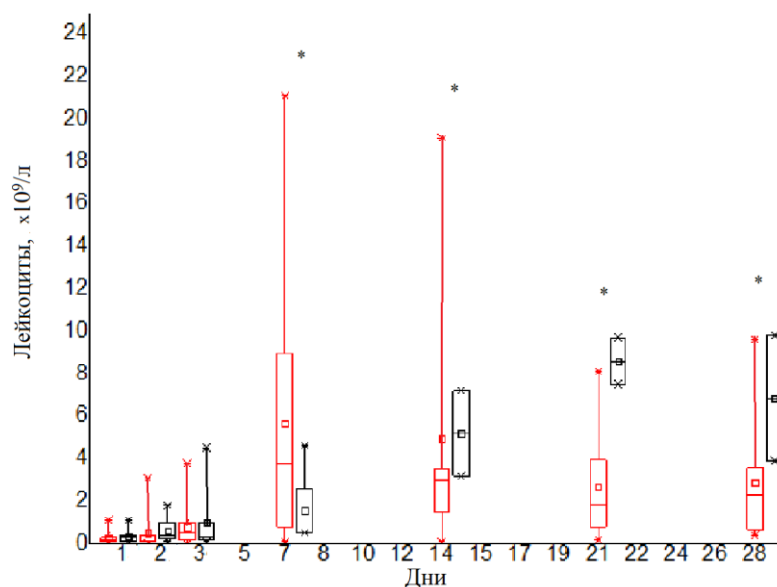


Рисунок 17. Динамика количества лейкоцитов у больных с СШ в течение 28 дней. Примечание: \*- $p < 0,05$  по сравнению с первым днем СШ.

У больных из ММСК-группы и контрольной группы значимых различий в количестве лейкоцитов в течение 28 дней не было. Даже к 28 дню наблюдения у 36% больных (4 больных из ММСК-группы) сохранялся агранулоцитоз (рис. 17).

У больных, леченых ММСК, значимое увеличение количества лейкоцитов по сравнению с первым днем СШ было зафиксировано уже к седьмым суткам: медиана  $3,8 \times 10^9/l$  (МКИ  $1,0-8,2 \times 10^9/l$ ) (рис.17). У больных из контрольной группы значимое увеличение количества лейкоцитов достигалось лишь к концу второй недели: медиана  $5,2 \times 10^9/l$  (МКИ  $4,2-6,2 \times 10^9/l$ ) (рис.17).

У всех больных при развитии СШ отмечалась анемия (рис.18). У больных в ММСК-группе медиана составила 65 г/л (МКИ 61-70 г/л), в контрольной группе 66 г/л (МКИ 64-89 г/л).

Различий между концентрацией гемоглобина у больных леченых и нелеченых ММСК в течение 28 дней наблюдения не было.

Через два дня после введения ММСК отмечено значимое повышение количества гемоглобина по сравнению с первыми сутками СШ: медиана составила 78 г/л (МКИ 75-80 г/л) (рис. 18). Такие изменения сохранялись в течение всего периода наблюдения. В контрольной группе подобных изменений в гемограмме у больных не было (рис. 18).

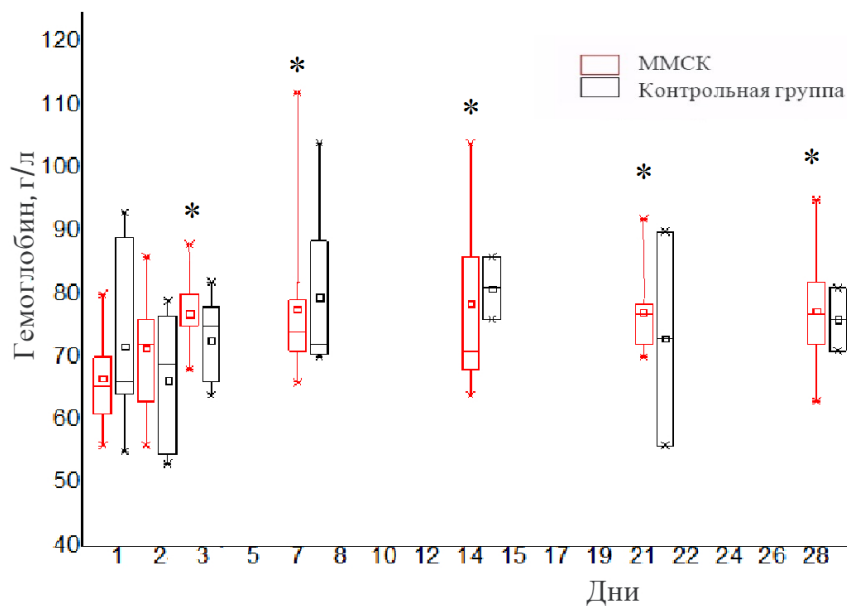


Рисунок 18. Динамика концентрации гемоглобина у больных с СШ в течение 28 дней. Примечание: \* -  $p < 0,05$  по сравнению с первым днем СШ.

У большинства больных в день развития СШ зафиксирована тромбоцитопения (рис.19). В ММСК-группе медиана составила  $21 \times 10^9/\text{л}$  (МКИ  $13-31 \times 10^9/\text{л}$ ), в контрольной группе –  $26 \times 10^9/\text{л}$  (МКИ  $17-46 \times 10^9/\text{л}$ ).

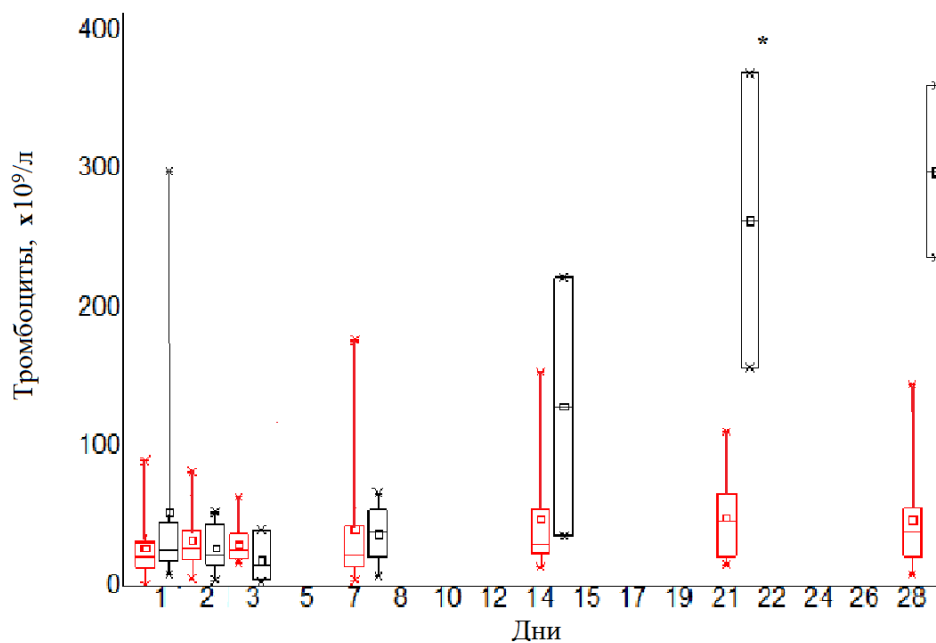


Рисунок 19. Динамика количества тромбоцитов у больных с СШ в течение 28 дней. Примечание: \* -  $p < 0,05$  при сравнении ММСК-группы и контрольной группы.

В течение первых двух недель СШ различий между количеством тромбоцитов у больных из контрольной и ММСК-группы не было (рис.19). Начиная с третьей недели СШ, отмечалось значимое повышение количества тромбоцитов у больных из контрольной группы по сравнению с ММСК-группой: соответственно  $263 \times 10^9/\text{л}$  (МКИ  $210-316 \times 10^9/\text{л}$ ), и  $47 \times 10^9/\text{л}$  (МКИ  $21-61 \times 10^9/\text{л}$ ) (рис.19).

Таким образом, у больных после введения ММСК отмечается более быстрое восстановление эритроидного и гранулоцитарного ростков кроветворения, но не тромбоцитарного роста по сравнению с контрольной группой.

### **3.2.8. Безопасность терапии мультипотентными мезенхимными стромальными клетками**

Введение ММСК, их хранение и получение проводились в стерильных условиях. Все компоненты системы с ММСК были проверены на стерильность, пирогенность и токсичность, не соприкасались с ксеногенными материалами

Введение ММСК у всех больных не приводило к развитию каких-либо осложнений, побочных эффектов, аллергических реакций. Терапия ММСК была безопасной и хорошо переносилась больными.

Случаи смертельного исхода после введения ММСК возникали только в результате прогрессии полиорганной недостаточности на фоне СШ.

### **3.2.9. Клиническая картина течения септического шока**

После стабилизации гемодинамики и нормализации метаболических и электролитных параметров у 50% больных отмечались повторные эпизоды инфекционных осложнений в течение 28 дней, сопровождавшиеся подъемом температуры тела до фебрильных значений (рис. 20). Нормализация температуры наступала к 28 суткам у всех больных из контрольной группы (2 человека) и у 4 из 9 больных из группы с введением ММСК.

Наиболее частым повторным инфекционным осложнением у больных после перенесенного СШ была пневмония (50 %), хотя нередко были случаи повторного сепсиса и СШ, а также мочевого инфекции (рис. 21).

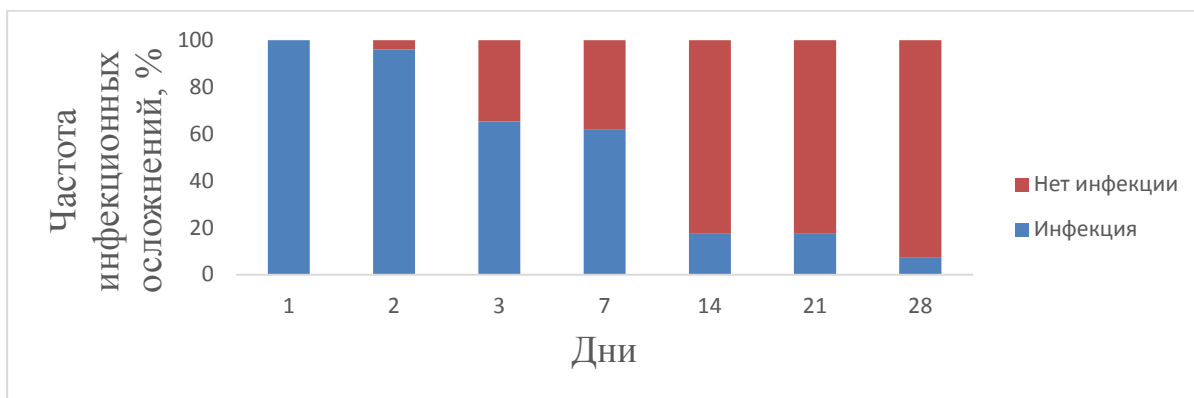


Рисунок 20. Частота инфекционных осложнений у больных с СШ в течение 28 дней.

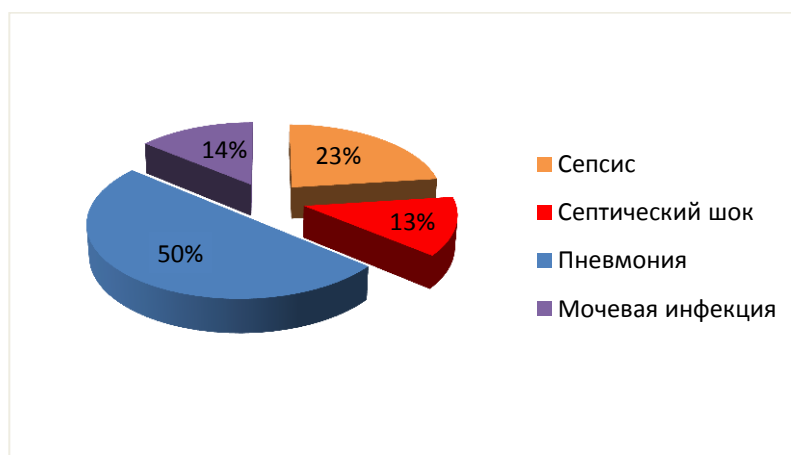


Рисунок 21. Повторные инфекционные осложнения у больных СШ в течение 28 дней.

### 3.2.10. Изменения шкалы APACHE II у больных с септическим шоком

Для оценки прогноза больных использовалась шкала APACHE II. В отличие от общепринятой практики [70, 71], когда для оценки прогноза баллы по шкале APACHE II подсчитываются только в первые сутки госпитализации больных в реанимационное отделение, в настоящем исследовании баллы по шкале APACHE II оценивались во всех точках наблюдения. Максимальная тяжесть состояния больных по шкале APACHE II при включении в исследование достигала 40 баллов. Наивысшей тяжести полиорганная недостаточность у больных достигала к третьему дню СШ, когда зарегистрировано максимальное количество баллов по шкале APACHE II- 42 балла (рис. 22).

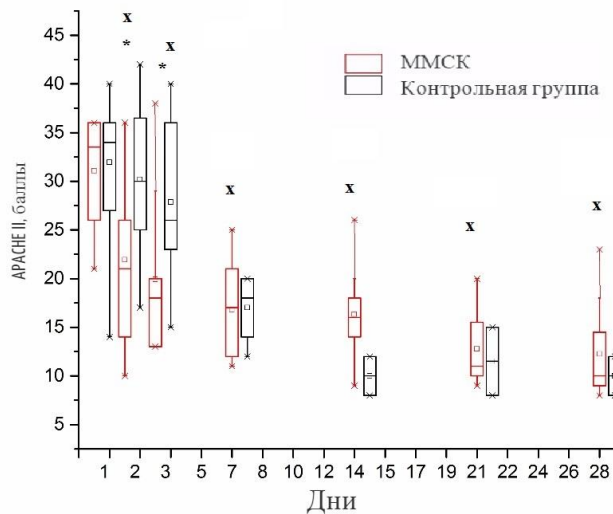


Рисунок 22. Изменения баллов по шкале АРАСНЕ II у больных СШ в состоянии агранулоцитоза в течение 28 дней. *Примечание.* \* -  $p < 0,05$  при сравнении ММСК-группы и контрольной группы. x -  $p < 0,05$  при сравнении с первым днем СШ.

В день развития СШ у больных из обеих групп было одинаковое количество баллов по шкале АРАСНЕ II: в ММСК-группе медиана 33,5 (МКИ 26,2 -36,0 баллов), в контрольной группе 34,0 балла (МКИ 27,0-36,0баллов) (рис. 22). На следующий день после введения ММСК у больных отмечалось значимое снижение количества баллов АРАСНЕ II по сравнению с контрольной группой: медиана 21,0 (МКИ 14,0 - 26,0 баллов) против 30,0 (МКИ 26,0 --35,2 балла) ( $p = 0,015$ ). К третьему дню СШ у больных ММСК-группы было 18 (МКИ 15-20) баллов по шкале АРАСНЕ II, а контрольной группы – 26 (24-33) баллов ( $p = 0,05$ ). В дальнейшем значимых различий в баллах по шкале АРАСНЕ II у больных в обеих групп не было, в то же время следует отметить, что в контрольной группе к третьим суткам умерло большинство больных.

Таким образом, введение ММСК сопровождалось уменьшением баллов по шкале АРАСНЕ II как по сравнению с их исходным уровнем, так и с контрольной группой.

### 3.2.11. Выживаемость больных с септическим шоком

При 28-дневном наблюдении в ММСК-группе умерло 6 больных: 3 больных умерло в первые 3 суток, трое -в течение двух следующих недель. Среди больных из контрольной группы умерло 12 человек: 7 человек в первые 3 суток, 5 человек в

течение 2 следующих недель (рис. 23).

Таким образом, к 28 дню исследования выживаемость в ММСК-группе составила 60%, в то время как в контрольной группе выживаемость составила всего 14%.

Однако, несмотря на большую выживаемость в течение 28 дней, при оценке более отдаленного прогноза установлено, что в ММСК группе из 9 больных, переживших 28 дней после СШ, спустя 3 месяца остались живы только четверо больных, остальные 5 умерли от вызванной сепсисом полиорганной недостаточности.

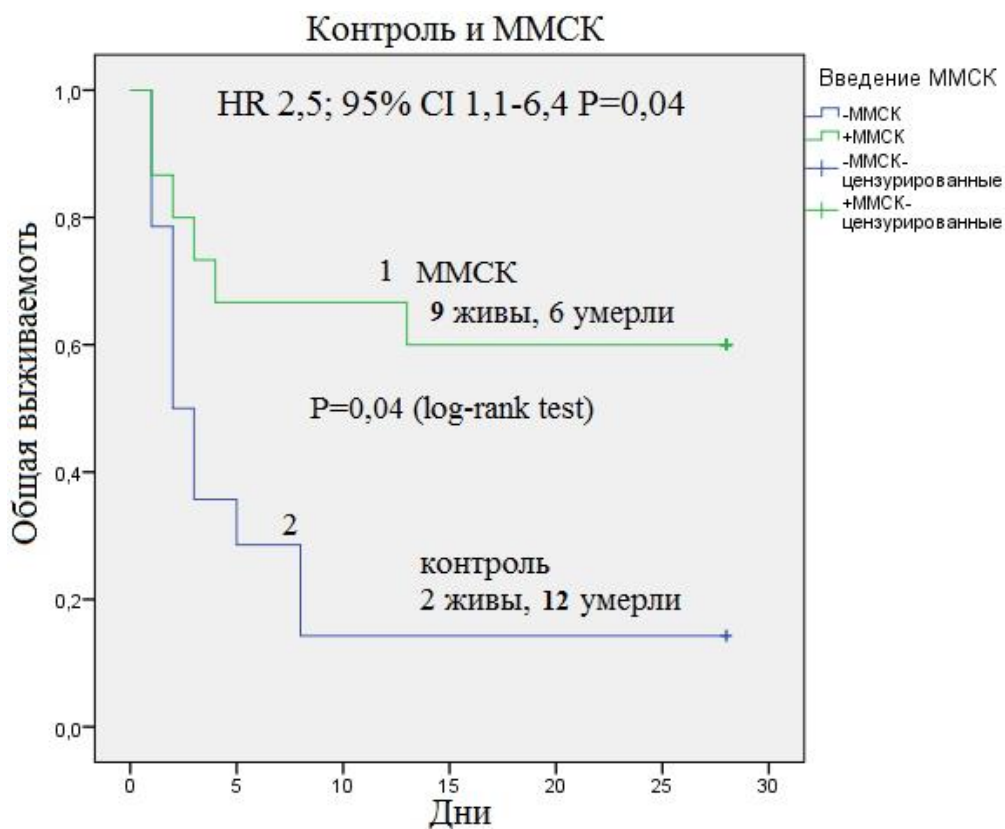


Рисунок 23. 28-суточная выживаемость больных с СШ. Кривая 1 – ММСК группа ( $n = 14$ ), кривая 2 – контрольная группа ( $n = 13$ ).

### 3.3. Этиология септического шока

Всего патогены в крови выявлены у 19 (70,3%) из 27 больных с СШ, включенных в исследование. Среди выявленных патогенов преобладали грамотрицательные бактерии, которые были выявлены в крови у 13 (48%) из 27 больных, грамположительные бактерии были обнаружены лишь у 1 (3,5%) больного, у 2 (7%) больных из крови одновременно высевались как грамположительные, так

грамотрицательные микроорганизмы. Фунгемия являлась причиной сепсиса также у 3 (11%) больных. У 9 (33%) больных с септическим шоком патогены в крови не были обнаружены.

Среди грамотрицательной флоры возбудителями были *Klebsiella pneumoniae* (8), *Pseudomonas aeruginosa* (4), *Escherichia coli* (2), *Acinetobacter baumannii* (2), *Sphingobacterium multivorum* (1), среди грамположительной – *Enterococcus faecalis* (3). Грибковый сепсис был вызван *Candida cruzei* (1), *Candida tropicalis* (1), *Acromonium* (1).

Наиболее частым первичным очагом инфекции являлись легкие: пневмония - у 51% больных, на втором месте - инфекция кровотока - у 11% больных, кишечник (некротическая энтеропатия) - у 8% больных, в 4% случаев первичным очагом инфекции явился инфицированный почечный трансплантат. В 26% случаев первичный очаг инфекции не был верифицирован.

Для верификации возбудителя пневмонии 24 больным были выполнены ФБС с БАЛ. Среди возбудителей пневмоний были выявлены *Pneumocystajirovecii* (15% случаев), инвазивный аспергиллез легких (16%), грибковые пневмонии (*Saccaromicess spp.*, *Acremonium spp.*) (7,5 %), *Pseudomonas aeruginosa* (15 %), *Esherichia coli* (3,5%), *Stenotrophomonas maltophilia* (11 %), *Klebsiella pneumonia*(3,5%), *Legionella pneumophila* (11%), *Acinetobacter baumannii* (11%), *Zygomycetes spp.*(7,5%). У одного больного могло быть выявлено одновременно несколько возбудителей.

Таким образом, наиболее часто выделяемыми из крови микроорганизмами при развитии СШ у больных в агранулоцитозе являлись грамотрицательные палочки. Наиболее частым инфекционным осложнением была пневмония.

### **3.4.Изменения воспалительных маркеров в крови у больных с септическим шоком**

#### **3.4.1. Концентрации воспалительных маркеров в крови у больных в состоянии агранулоцитоза без инфекционных осложнений**

Таблица 6. Концентрации маркеров воспаления в крови у больных в агранулоцитозе без инфекционных очагов

| Показатель | ПКТ, нг/мл | ИЛ-6, пг/мл | СРБ, мг/л | Пресепсин, пг/мл |
|------------|------------|-------------|-----------|------------------|
|------------|------------|-------------|-----------|------------------|



|                         |           |            |          |             |
|-------------------------|-----------|------------|----------|-------------|
| Медиана                 | 0,23      | 7,32       | 8,5      | 280,5       |
| Мин-макс                | 0-0,57    | 3,33-14,02 | 3-15     | 94,5-450,0  |
| Межквартильный интервал | 0,03-0,47 | 5,63-11,69 | 4,7-11,7 | 157,8-240,0 |

Для этого однократно были обследованы 12 больных, у которых после химиотерапии развился миелотоксический агранулоцитоз, и у которых на момент обследования не было инфекционных осложнений. Значения основных маркеров воспаления у больных без очагов инфекции в состоянии агранулоцитоза в целом были выше нормальных значений у здоровых людей (табл.б).

### 3.4.2.Изменения плазменной концентрации пресепсина

У всех больных с СШ в состоянии агранулоцитоза плазменная концентрация пресепсина была значительно выше референсных значений (рис. 24). Причем в 3,5% случаев она достигала значений, превышающих верхний лимит определения прибором PATHFAST, равный 20 000 пг/мл, и для измерения точной концентрации пресепсина было необходимо дополнительно разводить пробы плазмы. У одного из больных концентрация пресепсина в плазме достигла 94 400 пг/мл.

Не выявлено значимых различий в концентрациях пресепсина у 19 больных с положительными и 8 больных с отрицательными результатами посевов крови: соответственно медианы 5925 пг/мл (МКИ 1860-8934 пг/мл) и 2788,25 пг/мл (МКИ 1282-2788,25 пг/мл).

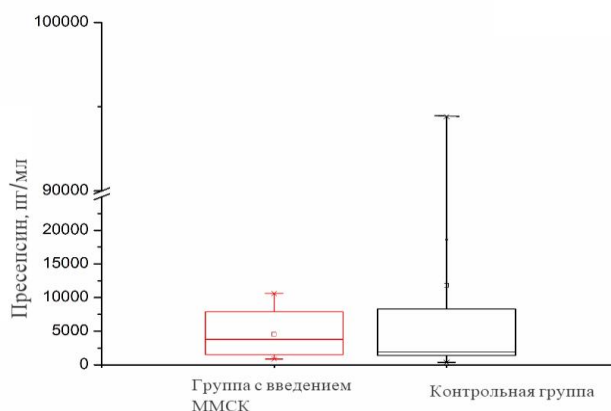


Рисунок 24. Плазменная концентрация пресепсина у больных в состоянии агранулоцитоза в первый день СШ.

Таблица 7. Плазменные концентрации пресепсина при различных возбудителях в первые сутки развития СШ.

| ФИО      | Патоген   | Принадлежность патогенов                 | Пресепсин, пг/мл |
|----------|---|--|------------------|
| А. А. О. | <i>Pseudomonasaeruginosa</i>                        | Грамотрицательные                        | 10594            |
| З. Д. А. | <i>Escherichiacoli</i>                              | Грамотрицательные                        | 868              |
| К. Н. В. | <i>Enterococcusfaecium, Pseudomonas aeruginosa</i>  | Грамположительные +<br>Грамотрицательные | 7905             |
| Л. В. П. | <i>Klebsiellapneumoniae</i>                         | Грамотрицательные                        | 7928             |
| З. И. С. | <i>Pseudomonasaeruginosa</i>                        | Грамотрицательные                        | 2553             |
| Э. А. А. | <i>Klebsiellapneumonia</i>                          | Грамотрицательные                        | 9564             |
| А. С. И. | <i>Escherichiacoli</i>                              | Грамотрицательные                        | 1141             |
| У. Ю. Х. | <i>Sphingobacteriummultivorum</i>                   | Грамотрицательные                        | 1886             |
| Д. В. В. | <i>A.baumanmii, Klebsiellapneumonia</i>             | Грамотрицательные                        | 12342            |
| А. В. В. | <i>Klebsiellapneumonia, E. faecium</i>              | Грамположительные +<br>Грамотрицательные | 1928             |
| А. В. В. | <i>Acinetobacterbaumannii, Klebsiellapneumoniae</i> | Грамотрицательные                        | 3979             |
| А. Н. Н. | <i>Pseudomonasaeruginosa</i>                        | Грамотрицательные                        | 1486             |
| С. В. В. | <i>Klebsiellapneumonia</i>                          | Грамотрицательные                        | 6108             |
| Б. В. Ф. | <i>Enterococcusfaecium</i>                          | Грамположительные                        | 8304             |
| Ш. Н. А. | <i>Candidacruzeli</i>                               | Фунгемия                                 | 94400            |
| Б. В. И. | <i>Candidatropicalis</i>                            | Фунгемия                                 | 1834             |
| К. И. В. | <i>Klebsiellapneumonia</i>                          | Грамотрицательные                        | 5925             |
| А. Е. В. | <i>Klebsiellaoxytoca</i>                            | Грамотрицательные                        | 1519             |
| Л. Н. В. | <i>Acremonium</i>                                   | Фунгемия                                 | 18613            |

Поскольку в большинстве случаев СШ был вызван грамотрицательными и лишь в единичных – грамположительными патогенами, либо их ассоциацией, не удалось установить связи между уровнем пресепсина в крови и этиологией сепсиса (табл. 7). В то же время обращают на себя внимание крайне высокие значения пресепсина в крови у двух больных с СШ, вызванном грибами (табл. 7).

При сравнении уровней пресепсина у выживших и умерших больных установлено, что плазменные концентрации пресепсина у них значимо не различались ни в первые сутки: соответственно, соответственно медиана 2302 пг/мл (МКИ 1276-

4744,75 пг/мл) и 5405 пг/мл (МКИ 1486-8304 пг/мл), ни к 3-им суткам, когда отмечено большинство летальных исходов: соответственно медиана 2084,5 пг/мл (МКИ 831,5-4436,5 пг/мл) и 3389 пг/мл (МКИ 2542,5 - 5542,5 пг/мл) (рис.25).

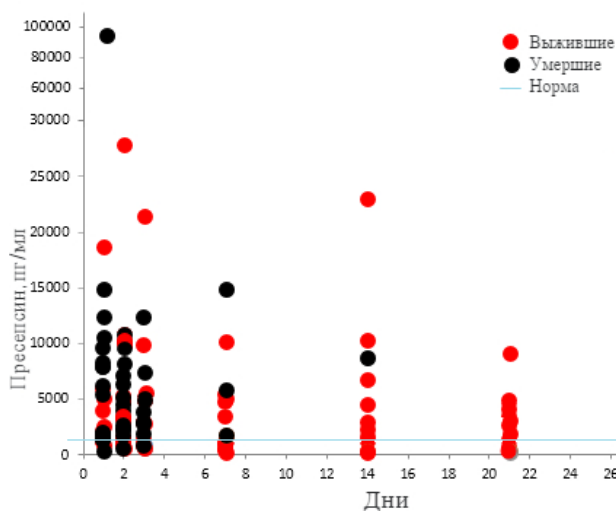


Рисунок 25. Динамика концентрации пресепсина у выживших и умерших больных.

Не выявлено статистически значимых различий в концентрациях пресепсина плазмы между больными в ММСК-группе и больными контрольной группы (рис. 26) в процессе наблюдения в течение 28 суток. В то же время улучшение состояния отдельных больных сопровождалось снижением уровня пресепсина крови и даже его нормализацией к концу периода наблюдения на 28-ые сутки (6 больных) (рис. 26).

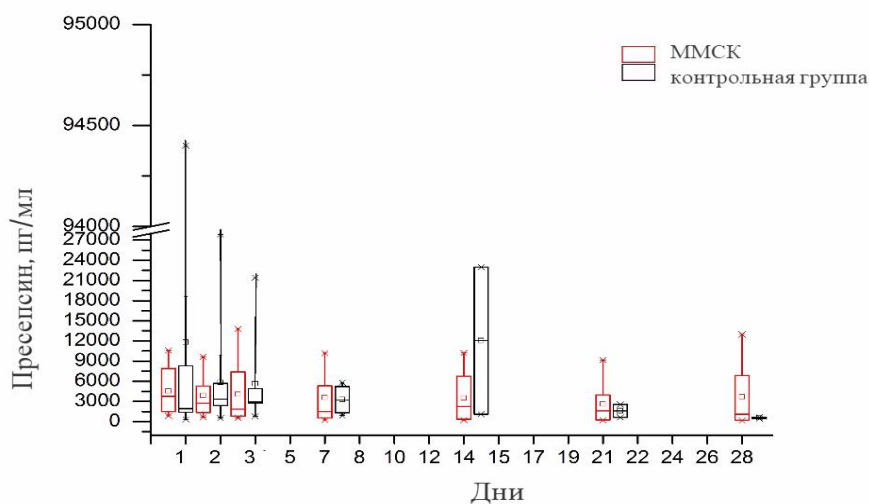


Рисунок 26. Изменения плазменной концентрации пресепсина у больных из ММСК-группы и контрольной группы.

Однако, поскольку у большинства больных даже после выхода из состояния СШ и стабилизации гемодинамики сохранялись инфекционные осложнения, а также присоединялись новые очаги инфекции, показатель пресепсина оставался высоким у большинства больных, доживших до 28 дня (рис.25, 26).

В то же время на следующий день после введения ММСК в группе выживших больных уровень пресепсина крови был значимо ниже, чем в это же время у выживших в группе контроля (соответственно медиана 1502 пг/мл,  $\sigma$  1851,8 пг/мл и медиана 15581 пг/мл,  $\sigma$  17308,5 пг/мл,  $p=0,030$ ). В дальнейшем содержание пресепсина в крови в обеих группах больных значимо не различалось.

Выявлена слабая связь между плазменной концентрацией пресепсина и тяжестью состояния больных, оцененной по шкале SOFA ( $r=0,306$ ;  $p=0,001$ ), а также по шкале APACHEII ( $r=0,22$ ;  $p=0,014$ ).

Тяжесть состояния больных сепсисом может быть также определена с помощью длительности XIIa-зависимого фибринолиза [7]. Выявлена прямая корреляция между продолжительностью лизиса сгустка и концентрацией пресепсина в плазме крови ( $r=0,36$ ;  $p=0,01$ ).

На содержание пресепсина в крови при СШ может оказывать влияние не только тяжесть сепсиса, но и функция почек. Исследована связь между концентрацией пресепсина в плазме и креатинина в сыворотке, выявлена корреляция между ними ( $r=0,232$ ;  $p=0,01$ ), что свидетельствует о том, что повышение содержания пресепсина в крови обусловлено не только тяжестью воспаления, но и возникающей при СШ ОПН.

Поскольку молекулярная масса пресепсина составляет 13 000 Да [149], следует ожидать, что проводимая у ряда больных с СШ ЗПТ могла оказывать влияние на уровень пресепсина в крови. Для проверки этой гипотезы исследована концентрация пресепсина в плазме крови у больных при проведении заместительной почечной терапии – гемодиализа или гемодиафильтрации. Поскольку фильтры для гемодиализа и гемодиафильтрации обладают разной пропускной способностью для молекул различных размеров [12, 13], оценивали содержание пресепсина в крови у больных до проведения процедуры и через 4 часа гемодиализа или гемодиафильтрации.

Одновременно исследовали концентрацию пресепсина в фильтрате аппарата для ЗПТ. Всего изменения концентрации пресепсина в крови до и после процедуры и содержание пресепсина в фильтрате оценено у 11 больных при проведении им 67 процедур заместительной почечной терапии – 15 сеансов гемодиализа и 52 сеансов гемодиафильтрации. До начала проведения гемодиализа и гемодиафильтрации содержание пресепсина в крови статистически значимо не различалось: от 1676 пг/мл до 20 000 пг/мл (медиана 5599 пг/мл) при проведении гемодиализа и от 796 пг/мл до 41769 пг/мл (медиана 8170 пг/мл) при проведении гемодиафильтрации. При проведении гемодиализа содержание пресепсина в диализате было минимальным (от 0 пг/мл до 34,1 пг/мл, медиана 4,11 пг/мл) и значимо меньше ( $p < 0,05$ ), чем в фильтрате при проведении гемодиафильтрации (от 71,1 пг/мл до 19105 пг/мл, медиана - 2005 пг/мл). Несмотря на эти различия, после проведения сеансов гемодиализа и гемодиафильтрации содержание пресепсина в крови статистически значимо не снижалось и не различалось у больных (рис. 27): от 3002 пг/мл до 21345 пг/мл (медиана 7908 пг/мл) при гемодиализе и от 678 пг/мл до 40786 пг/мл, (медиана 6890 пг/мл) при проведении гемодиафильтрации.

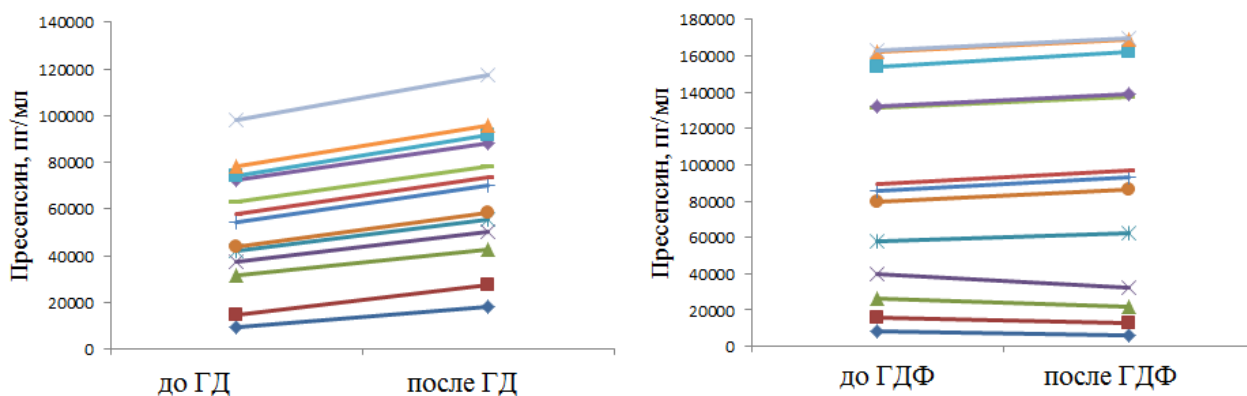


Рисунок 27. Изменение плазменной концентрации пресепсина у больных сепсисом до и после проведения сеансов гемодиализа и гемодиафильтрации.

Не выявлено связи между концентрацией пресепсина в плазме крови и в диализате у больных сепсисом при проведении сеансов гемодиализа ( $r = -0,013$ ;  $p = 0,567$ ). Но при проведении процедур гемодиафильтрации зафиксирована сильная взаимосвязь между плазменной концентрацией пресепсина и содержанием его в

фильтрате (рис. 28), т.е. чем выше была концентрация пресепсина в плазме крови до начала процедуры, тем выше было его содержание в фильтрате при проведении гемодиализа.

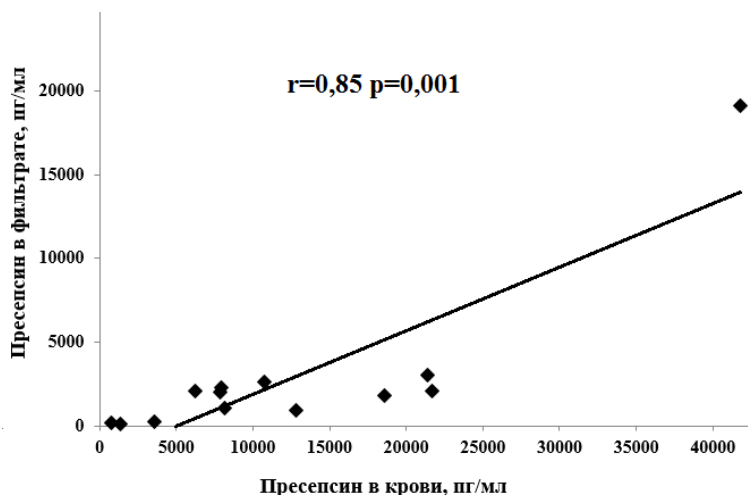


Рисунок 28. Корреляция между плазменной концентрацией пресепсина и содержанием пресепсина в фильтрате при проведении гемодиализа у больных сепсисом.

Таким образом, у больных с СШ в состоянии агранулоцитоза плазменная концентрация пресепсина значительно повышена. Не установлено связи между этиологией сепсиса и содержанием пресепсина в крови. СШ при фунгемии, также, как и при бактериемии, сопровождался значительным повышением содержания пресепсина в крови. Плазменные концентрации пресепсина у выживших и умерших больных значимо не различались. Отмечен значимо более низкий уровень пресепсина у выживших больных на следующие сутки после введения ММСК по сравнению с контролем. Концентрация пресепсина в плазме повышается пропорционально тяжести сепсиса, выраженности полиорганной дисфункции, нарушению функции почек. Гемодиализ приводит к значительно большему удалению пресепсина из крови, чем гемодиализ.

### 3.4.3. Изменения сывороточной концентрации прокальцитонина

В день развития СШ сывороточные концентрации ПКТ у больных в состоянии агранулоцитоза были повышены у большинства больных. Показатели его варьировали от 0,9 до 152,0 нг/мл, медиана 20,9 нг/мл (МКИ 7,7 - 59,8 нг/мл) (рис. 29). Достоверных

различий между сывороточными концентрациями ПКТ у больных из ММСК-группы и контрольной группы в день развития СШ не выявлено.

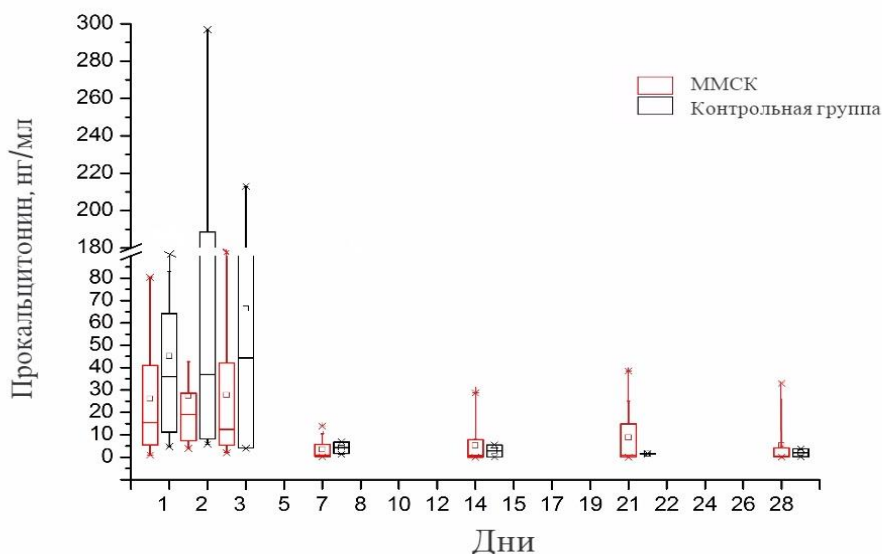


Рисунок 29. Изменения сывороточной концентрации прокальцитонина у больных с септическим шоком в течение 28 дней.

В связи с выявлением в посевах крови у большинства больных с СШ грамотрицательных патогенов и только в единичных случаях грамположительных микроорганизмов и грибов не удалось установить взаимосвязь между этиологией сепсиса и сывороточной концентрацией ПКТ. Однако обращал на себя внимание тот факт, что при фунгемии сывороточные концентрации ПКТ были значительно повышены (от 23,5 до 71,2 нг/мл).

Не выявлено статистически значимых различий в концентрациях ПКТ сыворотки крови у больных с положительными и отрицательными посевами крови: соответственно медианы 23,5 нг/мл (МКИ 8,2-64,9 нг/мл) и 14,4 нг/мл (МКИ 8,5-34,0 нг/мл). На второй и третий день с момента развития СШ у выживших больных, которым вводили ММСК, сывороточная концентрация ПКТ была значимо меньше по сравнению с таковой у выживших больных из контрольной группы (медианы 18,2 и 228,0 нг/мл соответственно во вторые сутки после развития СШ ( $p=0,009$ ) и медиана

ПКТ составляла 10,5 и 49,5 нг/мл соответственно на третий день СШ). ( $p=0,008$ ) (рис. 30). В дальнейшем все различия в сывороточных концентрациях ПКТ нивелировались.

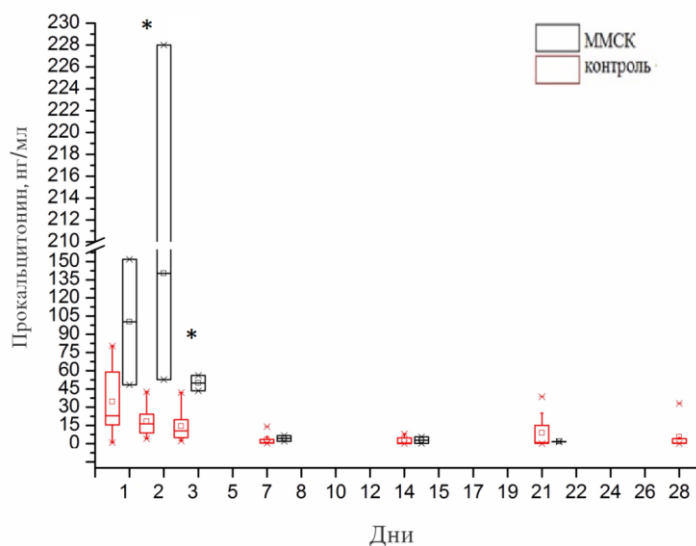


Рисунок 30. Динамика сывороточной концентрации ПКТ у выживших больных с СШ в состоянии агранулоцитоза в ММСК-группе и в контрольной группе (\*  $p < 0.05$  при сравнении выживших больных в обеих группах).



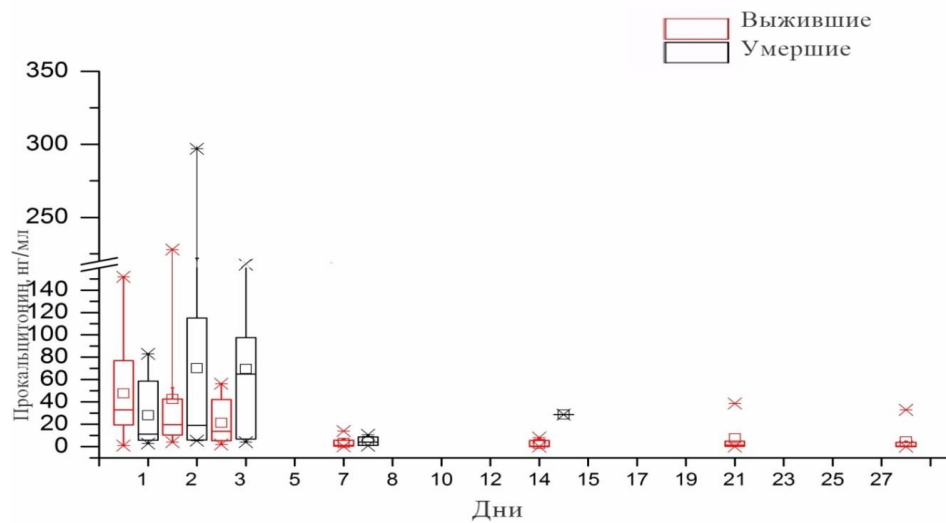


Рисунок 31. Изменения сывороточной концентрации ПКТ у выживших и умерших к 28 суткам больных.

Начиная со второго дня СШ у умерших к 28 суткам больных сывороточная концентрация ПКТ неуклонно нарастала, достигнув максимума на 3 сутки наблюдения за больными, когда регистрировалось большое количество смертельных исходов. У выживших больных сывороточная концентрация ПКТ к концу третьих суток СШ начала снижаться, но к концу первой недели все еще не достигала нормальных значений (рис.31). В дальнейшем сывороточная концентрация ПКТ менялась, отражая наличие или отсутствие повторных инфекционных осложнений. У 64% (6 больных из ММСК-группы и 1 из контрольной группы) больных к 28 суткам сывороточная концентрация ПКТ снижалась, достигая нормальных значений, у других оставалась повышенной (рис. 31).

У выживших пациентов, которым вводились ММСК, сывороточная концентрация ПКТ значительно снижались к третьему дню СШ, в то время как у умерших больных сывороточная концентрация ПКТ неуклонно нарастала к моменту смертельного исхода (медиана составляла 10,5 нг/мл и 85,5 нг/мл соответственно) (рис. 38). В дальнейшем сывороточная концентрация ПКТ в ММСК-группе у выживших больных оставалась ниже, чем у умерших (рис. 32).

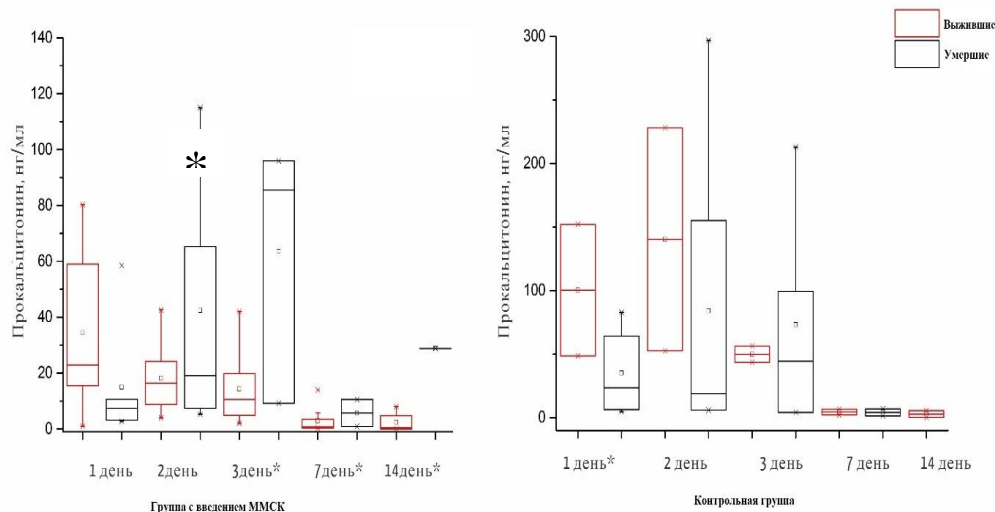


Рисунок 32. Изменение сывороточной концентрации ПКТ у выживших и умерших больных в ММСК-группе и контрольной группе в течение двух недель с момента развития септического шока. (\*- $P < 0.05$  при сравнении выживших и умерших в ММСК-группе и контрольной группе).

Выявлена слабая, но статистически значимая корреляция между сывороточной концентрацией ПКТ и баллами по шкале SOFA ( $r=0,32$ ;  $p=0,001$ ) и APACHEII ( $r=0,321$ ;  $p=0,001$ ).

Была выявлена слабая корреляция между сывороточной концентрацией ПКТ и креатинина у больных с СШ в состоянии агранулоцитоза ( $r = 0,27$ ;  $p = 0,002$ ).

Таким образом, почти у всех больных с СШ, развившимся в состоянии агранулоцитоза, отмечается повышение сывороточной концентрации ПКТ. Это повышение отмечается как при грамположительном, так и грамотрицательном сепсисе, а также при фунгемии. В первые сутки СШ уровень ПКТ не имеет прогностического значения, однако спустя три дня лечения больных с СШ отмечается снижение сывороточной концентрации ПКТ у больных с благоприятным исходом и повышение у больных с неблагоприятным исходом. У больных с благоприятным исходом терапия СШ с помощью ММСК приводит к более выраженному снижению концентрации ПКТ, чем у выживших больных, леченных без введения ММСК. Концентрация ПКТ в сыворотке крови коррелировала с тяжестью состояния больных.

### 3.4.4. Изменения сывороточной концентрации С-реактивного белка

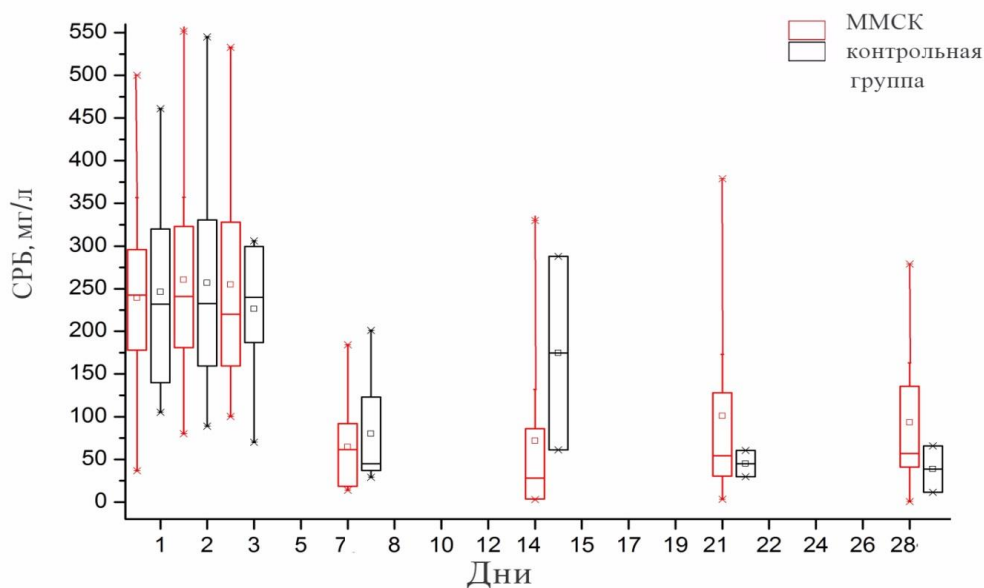


Рисунок 33. Динамика сывороточной концентрации СРБ у больных с СШ в состоянии агранулоцитоза в течение 28 дней.

Сывороточная концентрация СРБ была повышена у всех больных в состоянии агранулоцитоза в день развития СШ (рис. 33). У отдельных больных с СШ сывороточная концентрация СРБ достигала 500 мг/л при референсных значениях не более 15 мг/л (у больных в состоянии агранулоцитоза без инфекций). Не выявлено статистически значимых различий в сывороточных концентрациях СРБ плазмы между больными в ММСК-группе и больными контрольной группы (рис. 33) в процессе наблюдения в течение 28 суток. Показатель СРБ у больных в обеих группах снижался к 7 дню СШ, в дальнейшем сывороточная концентрация СРБ изменялась в зависимости от наличия или отсутствия инфекционных осложнений у больных. К 28 суткам сывороточная концентрация СРБ нормализовалась лишь у 36% (4) больных.

При сравнении показателей СРБ у выживших и умерших больных установлено, что сывороточная концентрация СРБ у них значимо не различалась ни в первые сутки: соответственно, медиана 226 мг/л (МКИ 296-382,5 мг/л) и 252,5 мг/л (МКИ 161,7-270,7 мг/л), ни к 3-им суткам, когда отмечено большинство летальных исходов: соответственно медиана 240 мг/л (МКИ 200-279 мг/л) и 207,5 мг/л (МКИ 157,75-234,5 мг/л) (рис.34).

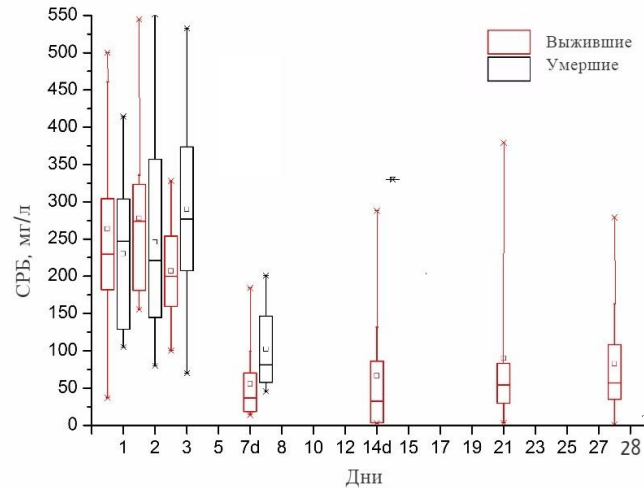


Рисунок 34. Динамика концентрации СРБ сыворотки крови у выживших и умерших к 28 дню больных с СШ в состоянии агранулоцитоза.

Учитывая преобладание грамотрицательной флоры в структуре возбудителей СШ, единичные случаи выявления грамположительной флоры и фунгемии, не удалось выявить взаимосвязь между сывороточной концентрацией СРБ и этиологией СШ. Однако при сепсисе, вызванном грибковой инфекцией, зарегистрированы высокие показатели СРБ (медиана 207,5 мг/л). Не выявлено значимых различий между сывороточной концентрацией СРБ и отсутствием или наличием возбудителя СШ. У больных с отрицательными посевами крови медиана составила 202,5 мг/л (МКИ 149,5-278,7 мг/л), у больных с положительными посевами крови - 270 мг/л (МКИ 239,5-312 мг/л).

На следующий день после введения ММСК в группе выживших больных концентрация СРБ сыворотки крови была значимо ниже, чем в это же время у выживших в группе контроля (соответственно медиана 253,3 мг/л и 431 мг/л,  $p=0,049$ ). В дальнейшем содержание СРБ в сыворотке крови в обеих группах больных значимо не различалось.

Выявлена сильная взаимосвязь между сывороточной концентрацией СРБ у больных и степенью тяжести больных, оцениваемой с помощью баллов по шкалам SOFA (рис. 35) и APACHEII (рис. 36).

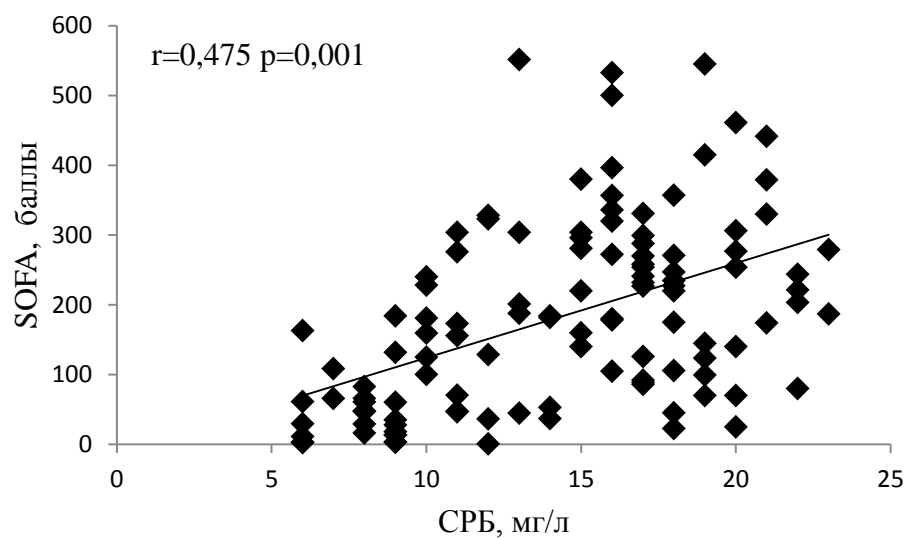


Рисунок 35. Корреляция между сывороточной концентрацией СРБ и баллами по шкале SOFA у больных с СШ в состоянии агранулоцитоза.

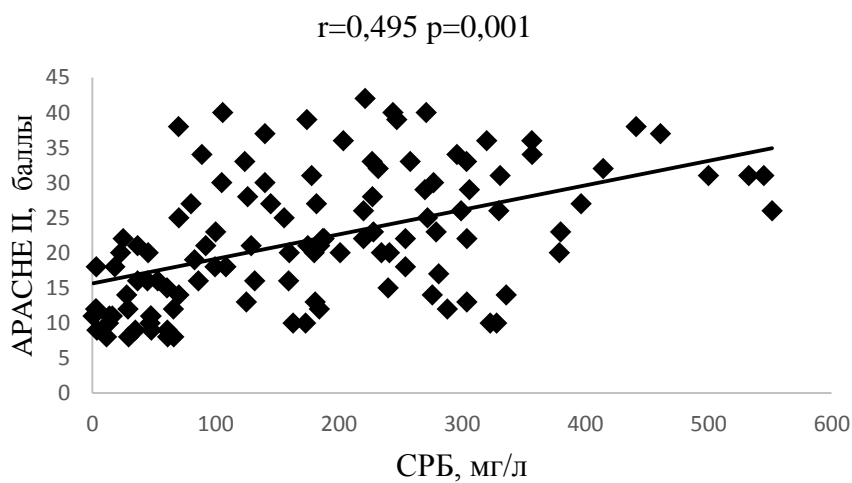


Рисунок 36. Корреляция между сывороточной концентрацией СРБ и баллами по шкале АРАСНЕ II у больных с СШ в состоянии агранулоцитоза.

Имелась связь между концентрацией СРБ в сыворотке крови больных и тяжестью сепсиса, определённой посредством длительности ХПа-зависимого фибринолиза (рис. 37). При увеличении концентрации СРБ в сыворотке крови лизис сгустка замедлялся.

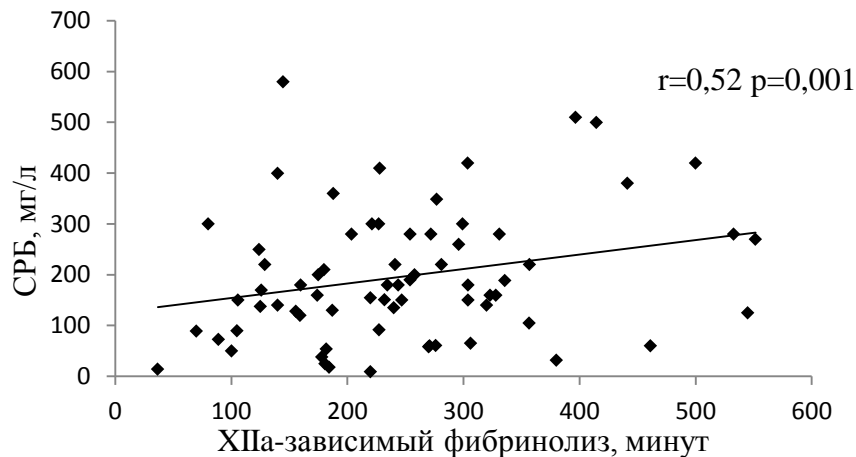


Рисунок 37. Корреляция между сывороточной концентрацией СРБ и длительностью XPa-зависимого фибринолиза у больных СШ в состоянии агранулоцитоза.

Таким образом, у всех больных с СШ в состоянии агранулоцитоза сывороточная концентрация СРБ значительно повышена не только при бактериальном сепсисе, но и при грибковом сепсисе. Концентрация СРБ в сыворотке крови повышается пропорционально тяжести сепсиса. У выживших больных на следующий день после введения ММСК отмечен более низкий уровень по сравнению с контролем.

### 3.4.5. Изменения плазменной концентрации интерлейкина-6

Концентрация ИЛ-6 в плазме крови у больных достигала очень высоких значений в первые сутки СШ, максимально 5225400 пг/мл, и в случае смертельного исхода к 2-3 суткам уровень ИЛ-6 составлял 39800-10892600 пг/мл) (рис. 38).

Плазменная концентрация ИЛ-6 была повышена в равной степени при сепсисе, вызванном различными возбудителями – грамположительными, грамотрицательными бактериями, грибами, а также у больных с доказанной и недоказанной бактериемией, соответственно, медианы 4000 пг/мл (МКИ 1486-30706 пг/мл) и 17700 пг/мл (МКИ 464-72820 пг/мл).

В день развития СШ плазменные концентрации ИЛ-6 у больных в ММСК-группе и контрольной группе не различались: медиана 2350 пг/мл (МКИ 22800-30000 пг/мл) и 3000 пг/мл (МКИ 485-182200 пг/мл). Однако у больных, получавших ММСК, к седьмому дню от момента развития СШ плазменные концентрации ИЛ-6 были

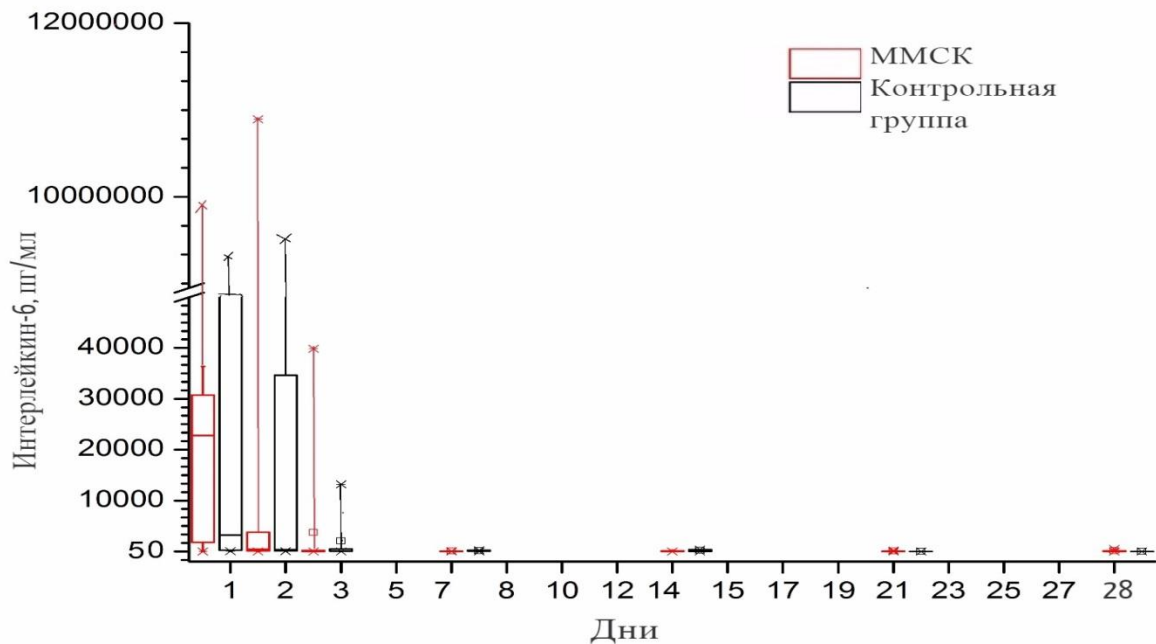


Рисунок 38. Динамика плазменной концентрации ИЛ-6 у больных с СШ в состоянии агранулоцитоза в течение 28 дней.

значимо ниже по сравнению с больными из контрольной группы: медиана 32,2 пг/мл (МКИ 18,5-44,2 пг/мл) и 159,6 пг/мл (МКИ 722,7-235,7 пг/мл) ( $p=0,012$ ) (рис. 38). Референсные значения ИЛ-6 для больных в состоянии агранулоцитоза без инфекции составляют от 3,33 до 14,02 пг/мл, медиана -7,31 пг/мл. Начиная с третьей недели исследования плазменные концентрации ИЛ-6 у больных из обеих групп достоверно не отличались, их изменения варьировали в зависимости от наличия или отсутствия у больного инфекционных осложнений. К 28 дню только у одного из наблюдавшихся к этому времени 10 больных, который был из ММСК-группы, нормализовался показатель ИЛ-6.

При сравнении плазменных концентраций ИЛ-6 у выживших и умерших больных установлено, что в день развития СШ она у них значимо не различалась: соответственно, медиана 16900 пг/мл (МКИ 3147-29485 пг/мл) и 26000 пг/мл (МКИ 2400-979800 пг/мл). Однако на следующий день после развития СШ зарегистрировано значимое снижение плазменной концентрации ИЛ-6 у выживших больных по сравнению с умершими, соответственно медиана 98 пг/мл (МКИ 81-338,5 пг/мл) и 9400

пг/мл (МКИ 490-195200 пг/мл,  $p=0,03$ ). Аналогичные изменения сохранялись и к 3-им суткам, когда отмечено большинство летальных исходов: соответственно медиана у выживших больных составляла 55,5 пг/мл (МКИ 31,5-121,2 пг/мл), а у умерших- 204,9 пг/мл (МКИ 95,3-3660,7 пг/мл,  $p=0,05$ ). Однако к концу первой недели СШ концентрация ИЛ-6 в плазме крови у умерших и выживших более значимо не отличалась (рис. 39).

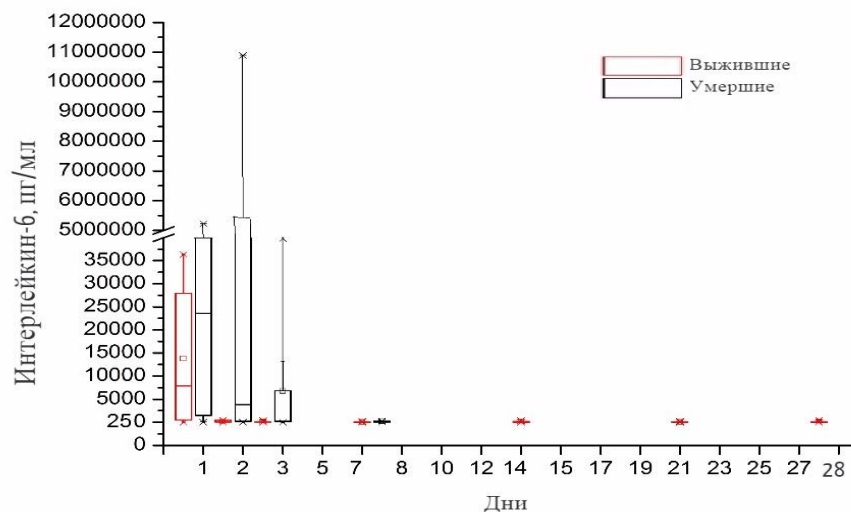


Рисунок 39. Изменения плазменной концентрации ИЛ-6 у выживших и умерших больных с СШ в состоянии агранулоцитоза в течение 28 дней.

Выявлена слабая связь между плазменной концентрацией ИЛ-6 и тяжестью состояния больных, оцениваемой по шкалам SOFA ( $r=0,272$ ;  $p=0,0032$ ) и APACHEII ( $r=0,303$ ;  $p=0,001$ ).

Не было связи между длительностью ХПа-зависимого фибринолиза, сывороточной концентрацией креатинина и плазменной концентрацией ИЛ-6 у больных с СШ.

Таким образом, концентрация ИЛ-6 в плазме крови при СШ у больных в состоянии агранулоцитоза достигала очень высоких значений. Не было установлено взаимосвязи между плазменной концентрацией ИЛ-6 и этиологией сепсиса. Плазменная концентрация ИЛ-6 при развитии СШ, вызванного как грибковой инфекции, так и бактериальными патогенами, достигала высоких значений. У больных, получавших ММСК, к концу первой недели СШ отмечалось значимое снижение



показателя ИЛ-6 по сравнению с больными из контрольной группы. У умерших больных показатель ИЛ-6 сохранялся высоким, у выживших больных на следующий день после развития СШ концентрация ИЛ-6 плазмы крови начинала снижаться.

### 3.4.6. Изменения плазменной концентрации интерлейкина-10

Плазменная концентрация ИЛ-10 в день развития СШ варьировала у больных от 4,0 до 3456,0 пг/мл, медиана составила 330,0 пг/мл (МКИ 26,2-1554,0 пг/мл) (рис. 40).

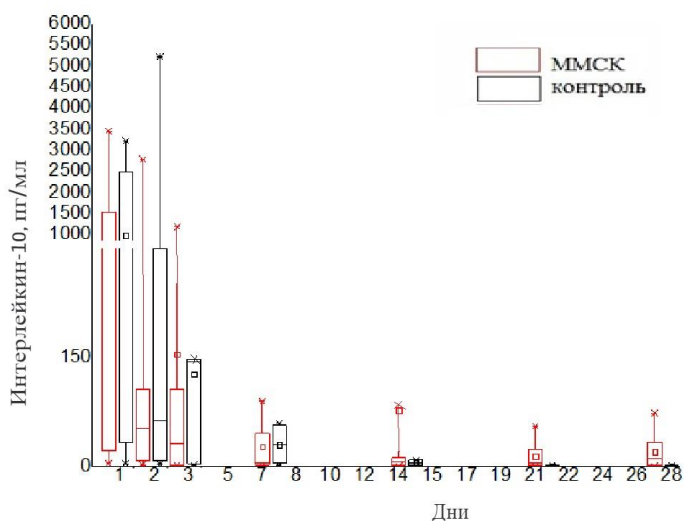


Рисунок 40. Изменения плазменной концентрации ИЛ-10 у больных с СШ.

Плазменная концентрация ИЛ-10 у больных в ММСК-группе и контрольной группе не различалась в день развития СШ: медиана 301,0 пг/мл (МКИ 23,1-1470,5 пг/мл) и 384,0 пг/мл (МКИ 42,1 - 1842,0 пг/мл). На следующие сутки после развития СШ ожидаемого увеличения показателя ИЛ-10 у больных СШ в группе с введением ММСК не отмечалось: медиана составляла 52,7 пг/мл (МКИ 7,8-107,0 пг/мл), а у больных из контрольной группы соответственно 63,5 пг/мл (МКИ 9,6-274,5 пг/мл) (рис. 40).

Далее в течение всего времени наблюдения статистически значимых различий в показателе ИЛ-10 у больных в ММСК и контрольной группах не было. К 28 дню

наблюдения у 4 больных из ММСК-группы и 2 больных контрольной группы плазменная концентрация ИЛ-10 оставалась выше референсных значений.

Плазменная концентрация ИЛ-10 у больных с СШ, этиологическим агентом которых были грибы или бактериальные патогены, достигала высоких значений, но не различались. Плазменная концентрация ИЛ-10 у больных с бактериемией или без нее также достоверно не различалась: соответственно медианы 548,5 пг/мл (МКИ 46,5-1744,3 пг/мл) и 150,0 пг/мл (МКИ 14,1-597,0 пг/мл) ( $p=0,458$ ).

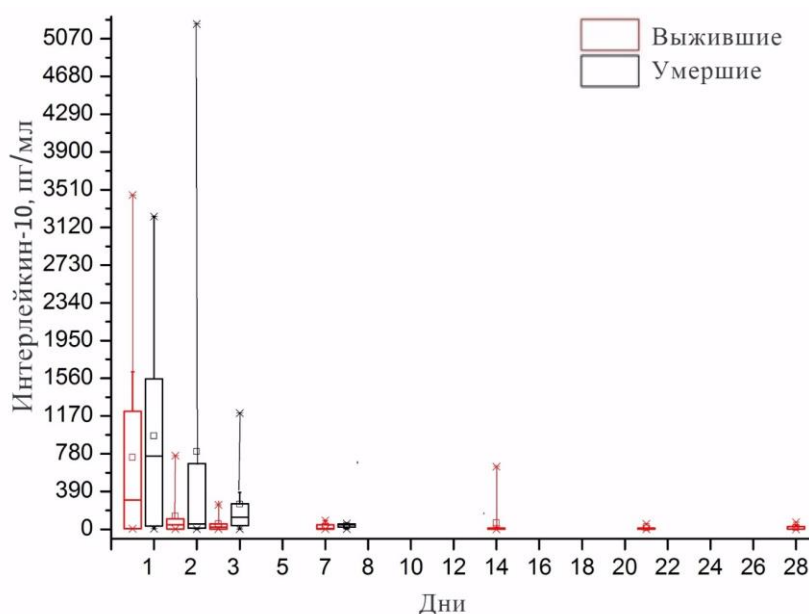


Рисунок 41. Изменения плазменной концентрации ИЛ-10 у выживших и умерших больных с СШ в состоянии агранулоцитоза в течение 28 дней.

При сравнении плазменной концентрации ИЛ-10 у выживших и умерших больных к 28-ым суткам установлено, что она у них значимо не различалась ни в день развития СШ: соответственно, медиана 301,0 пг/мл (МКИ 41,7-1000,0 пг/мл) и 757,0 пг/мл (МКИ 33,3-1554,0 пг/мл), ни в последующие 27 дней наблюдения ( $p=0,321$ ) (рис.41).

Плазменная концентрация ИЛ-10 коррелировала со степенью тяжести состояния больных, оцениваемой по шкалам SOFA ( $r=0,224$ ;  $p=0,015$ ) и APACHEII ( $r=0,32$ ;  $p=0,001$ ).

Также была выявлена слабая взаимосвязь между концентрацией ИЛ-10 плазмы крови и тяжестью сепсиса, отражаемой с помощью длительности ХПа-зависимого фибринолиза ( $r=0,317$ ;  $p=0,001$ ).

В течение всего времени наблюдения имелась хорошая корреляция между концентрацией ИЛ-6 и ИЛ-10 в группе с введением ММСК ( $r=0,533$ ;  $p=0,001$ ), а в контрольной группе такой взаимосвязи выявлено не было ( $r=0,28$ ;  $p=0,08$ ), что может свидетельствовать о возможной роли иммуномодулирующих свойств ММСК у больных с СШ, о которых мы говорили ранее.

Таким образом, концентрация ИЛ-10 в плазме крови у больных с СШ достигала высоких значений как при грибковой, так и бактериальной инфекции. Не было различий в плазменной концентрации ИЛ-10 у больных, получавших и не получавших ММСК в течение 28 дней, у умерших и выживших больных. Выявлена корреляция между плазменной концентрацией ИЛ-10 и степенью тяжести больных, между плазменными концентрациями ИЛ-10 и ИЛ-6 в ММСК-группе.

#### **3.4.7. Сравнение диагностической значимости провоспалительных маркеров у больных с септическим шоком в состоянии агранулоцитоза**

В день развития СШ концентрации всех маркеров воспаления в крови у больных в состоянии агранулоцитоза, а также уровни противовоспалительного маркера ИЛ-10 были значительно повышены (рис. 42). По мере лечения больных концентрации маркеров снижались, но даже к 28 дню у подавляющего большинства больных концентрации маркеров воспаления оставались выше референсных величин (рис. 42).

Были изучены корреляции между маркерами воспаления при СШ (табл. 8). Выявлены лишь слабые, хотя и статистически значимые корреляции (табл. 8). Сывороточная концентрация СРБ коррелировала с сывороточной концентрацией ПКТ и плазменной концентрацией пресепсина. Плазменная концентрация ИЛ-10 коррелировала с сывороточной концентрацией ПКТ и плазменной концентрацией ИЛ-6 (табл. 8). Для решения задач исследования качества диагностических тестов использовался метод ROC-анализа (Receiver Operator Characteristic) [5].

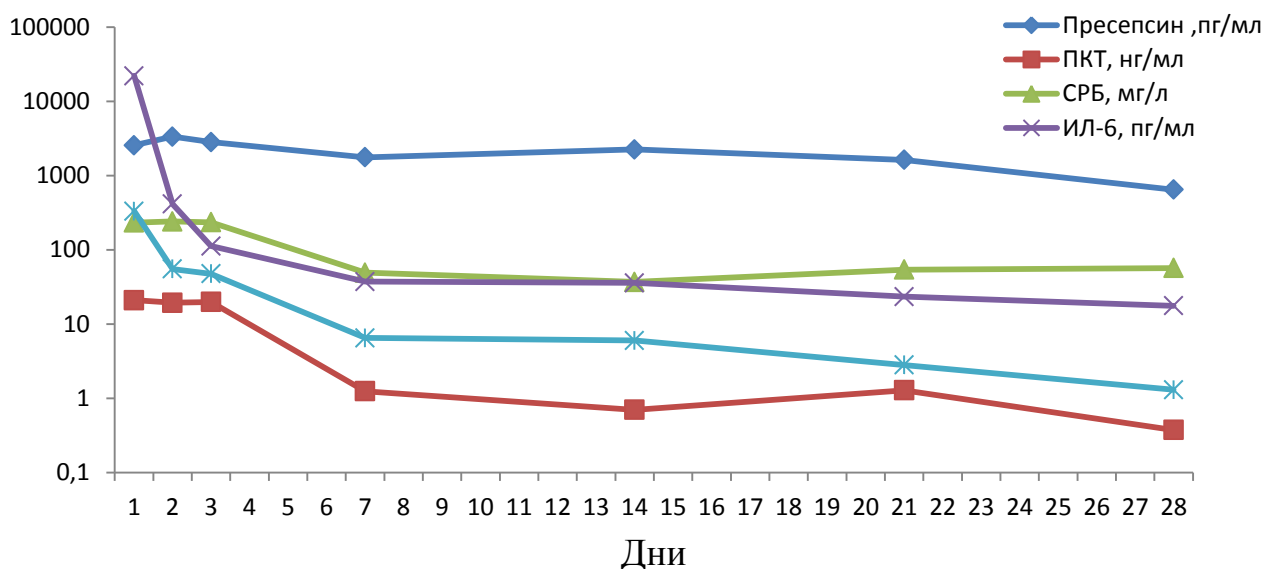


Рисунок 42. Динамика концентраций воспалительных маркеров (медианы) у больных с СШ.

Таблица 8. Корреляции между маркерами воспаления у больных с СШ в состоянии агранулоцитоза.

| Маркер    | Пресепсин                        | ПКТ                              | СРБ                              | ИЛ-6                             | ИЛ-10                            |
|-----------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Пресепсин | -                                | R=0,03<br>p=0,73                 | <b>R=0,352</b><br><b>p=0,001</b> | R=0,142<br>p=0,128               | R=0,072<br>p=0,44                |
| ПКТ       | R=0,03<br>p=0,73                 | -                                | <b>R=0,399</b><br><b>p=0,001</b> | R=0,137<br>p=0,144               | <b>R=0,317</b><br><b>p=0,001</b> |
| СРБ       | <b>R=0,352</b><br><b>p=0,001</b> | <b>R=0,399</b><br><b>p=0,001</b> | -                                | R=0,107<br>p=0,25                | R=0,068<br>p=0,469               |
| ИЛ-6      | R=0,142<br>p=0,128               | R=0,137<br>p=0,144               | R=0,107<br>p=0,25                | -                                | <b>R=0,385</b><br><b>p=0,001</b> |
| ИЛ-10     | R=0,072<br>p=0,44                | <b>R=0,317</b><br><b>p=0,001</b> | R=0,068<br>p=0,469               | <b>R=0,385</b><br><b>p=0,001</b> | -                                |

#### 4.7.1. Диагностическая значимость пресепсина

Клиническая значимость пресепсина для выявления различий между сепсисом и СШ была средней: площадь под кривой (Area Under Curve - AUC), которая оказалась равна 0,699. При концентрации пресепсина плазмы 34097 пг/мл пресепсин позволял отличить сепсис от СШ с 58% чувствительностью и 77% специфичностью. Значительно

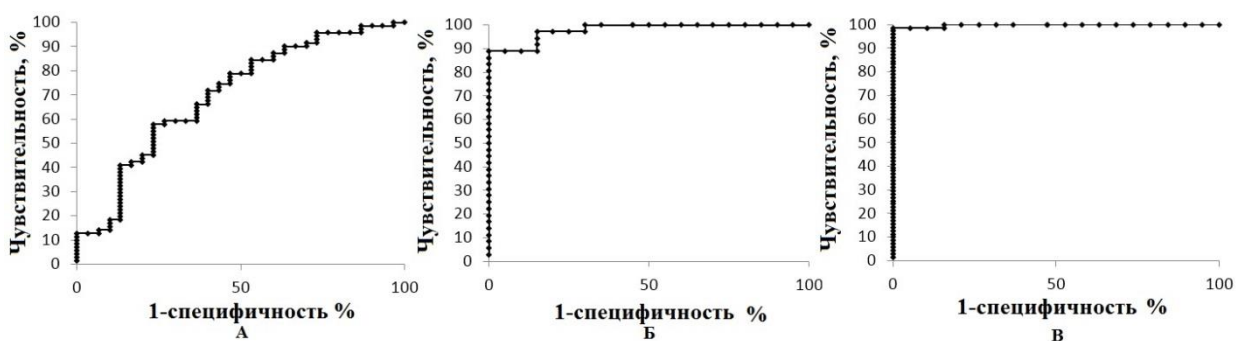


Рисунок 43. Сравнение ROC-кривых плазменных концентраций пресепсина для выявления у больных в состоянии агранулоцитоза: А. СШ и сепсиса; Б. сепсиса и отсутствие инфекционных осложнений; В. СШ и без инфекционных осложнений.

лучше он позволял дифференцировать сепсис у больных в агранулоцитозе от больных без инфекционных осложнений в агранулоцитозе (AUC 0,979) и СШ в агранулоцитозе от больных без инфекционных осложнений в агранулоцитозе (AUC 0,997)(рис. 43). При этом плазменная концентрация пресепсина, равная 531-546 пг/мл, позволяла отличить их с 89-97% чувствительностью и 100% специфичностью (табл. 9).

Таблица 9. Чувствительность и специфичность пресепсина для диагностики сепсиса.

| Пресепсин    | AUC   | Оптимальное пороговое значение, пг/мл | Чувствительность, % | Специфичность, % |
|--------------|-------|---------------------------------------|---------------------|------------------|
| СШ/сепсис    | 0,699 | 3097                                  | 58                  | 77               |
| Сепсис/норма | 0,979 | 531                                   | 89                  | 100              |
| СШ/норма     | 0,997 | 546                                   | 97                  | 100              |

### 3.4.7.2. Диагностическая значимость ПКТ

ПКТ обладал очень хорошей диагностической значимостью для отличия СШ от сепсиса (AUC 0,827) (рис. 44, табл. 10) и при концентрации в сыворотке 5,7 нг/мл позволял их различить с 83% чувствительностью и 72% специфичностью. Примерно такова же была его диагностическая значимость для отличия больных сепсисом от больных без инфекции (AUC 0,827, при пороговом значении 0,7 нг/мл чувствительность 72% и специфичность 100%), а также отличная значимость для дифференциации СШ от больных без инфекции (AUC 1,0 при пороговом значении 0,9 нг/мл чувствительность 100% и специфичность 100%).

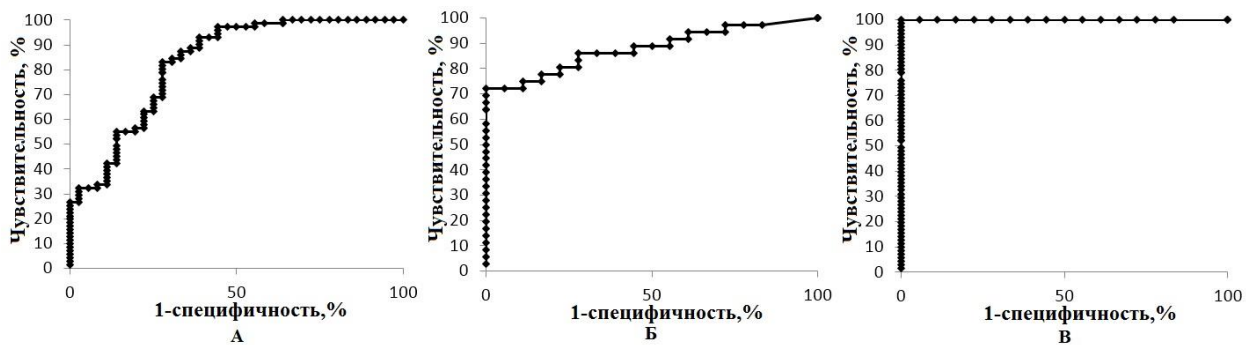


Рисунок 44. Сравнение ROC-кривых сывороточных концентраций ПКТ для выявления у больных в состоянии агранулоцитоза: А. СШ и сепсиса; Б. сепсиса и отсутствие инфекционных осложнений; В. СШ и без инфекционных осложнений.

Таблица 10. Чувствительность и специфичность ПКТ для диагностики сепсиса.

| Прокальцитонин | AUC   | Оптимальное пороговое значение, нг/мл | Чувствительность, % | Специфичность, % |
|----------------|-------|---------------------------------------|---------------------|------------------|
| СШ-сепсис      | 0,827 | 5,7                                   | 83,1                | 72,2             |
| Сепсис-норма   | 0,880 | 0,7                                   | 72,2                | 100              |
| СШ-норма       | 1,000 | 0,9                                   | 100                 | 100              |

### 3.4.7.3. Диагностическая значимость ИЛ-6

Чувствительность и специфичность этого маркера была наиболее высокой при диагностике как СШ, так и сепсиса (табл. 11, рис. 45). Оптимальное пороговое значение ИЛ-6 для диагностики сепсиса – 15 пг/мл, а для диагностики СШ -143 пг/мл.

Таблица 11. Чувствительность и специфичность ИЛ-6 для диагностики сепсиса.

| Интерлейкин-6 | AUC   | Оптимальное пороговое значение, пг/мл | Чувствительность, % | Специфичность, % |
|---------------|-------|---------------------------------------|---------------------|------------------|
| СШ/сепсис     | 0,888 | 143                                   | 77,46               | 89,28            |
| Сепсис/норма  | 0,789 | 15,3                                  | 78,57               | 73,07            |
| СШ/норма      | 0,973 | 33,6                                  | 94,36               | 88,46            |

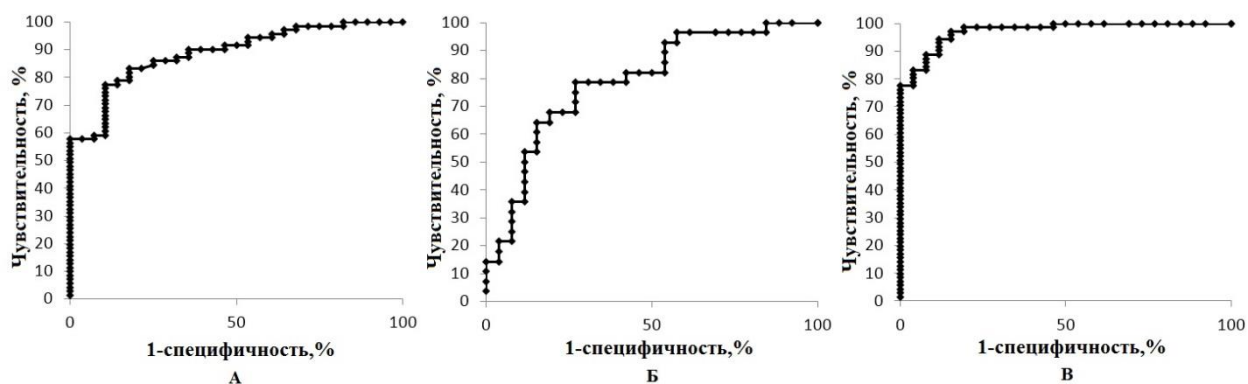


Рисунок 45. Сравнение ROC-кривых сывороточных концентраций ИЛ-6 для выявления у больных в состоянии агранулоцитоза: А. СШ и сепсиса; Б. сепсиса и отсутствие инфекционных осложнений; В. СШ и без инфекционных осложнений.

#### 3.4.7.4. Диагностическая значимость СРБ

С помощью определения содержания СРБ можно диагностировать развитие СШ у больных (табл. 12, рис. 46), оптимальное пороговое значение СРБ составило 70 мг/л.

Таблица 12. Чувствительность и специфичность СРБ для диагностики сепсиса.

| СРБ          | AUC   | Оптимальное пороговое значение, мг/л | Чувствительность, % | Специфичность, % |
|--------------|-------|--------------------------------------|---------------------|------------------|
| СШ/сепсис    | 0,824 | 184,4                                | 66,19               | 86,14            |
| Сепсис/норма | 0,864 | 16,3                                 | 88,89               | 77,77            |
| СШ/норма     | 0,990 | 70,0                                 | 95,77               | 100              |

Таким образом, по данным визуального анализ ROC-кривых и величинам AUC установлено, что все четыре изученных провоспалительных маркера позволяют с высокой специфичностью и чувствительностью диагностировать сепсис, СШ у

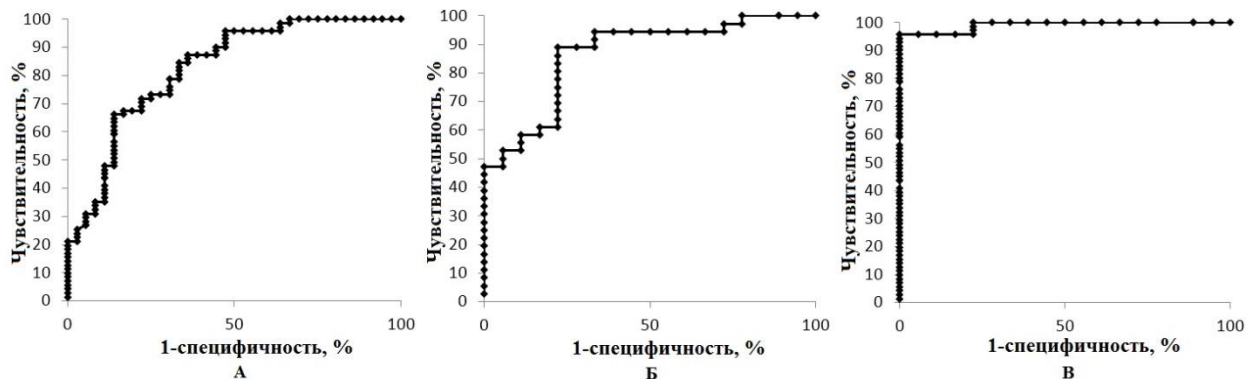


Рисунок 46. Сравнение ROC-кривых сывороточных концентраций СРБ для выявления у больных в состоянии агранулоцитоза: А. СШ и сепсиса; Б. сепсиса и отсутствие инфекционных осложнений; В. СШ и без инфекционных осложнений.

больных в состоянии агранулоцитоза. Наиболее эффективным диагностическим маркером, позволяющим отличить сепсис от отсутствия инфекционных осложнений явился пресепсин. у которого оказался наибольший AUC, специфичность и чувствительность, его ROC-кривая располагалась ближе остальных к углу графика с параметрами 0 %, 100 % (рис. 43В). Наименее эффективным оказался ИЛ-6, так как его ROC-кривая располагалась дальше других кривых от угла графика (рис. 46В) и наименьшей оказалась площадь под кривой (AUC). При диагностике СШ у пациентов в состоянии агранулоцитоза более эффективным оказался ИЛ-6, так как его ROC-кривая располагалась ближе остальных к углу графика с параметрами 0%, 100% (рис. 46А). Наименее эффективным оказался вариант пресепсина, так как его ROC-кривая располагалась дальше других кривых от угла графика (рис. 43А).

### **3.5. Клиническое наблюдение: применение мультипотентных мезенхимных стволовых клеток для лечения септического шока у больной с агранулоцитозом**

Больная З., 31 г., поступила 20 января 2014 г. в ФГБУ Гематологический научный центр МЗ РФ в связи с впервые диагностированным острым лейкозом: количество лейкоцитов крови  $66 \times 10^9/\text{л}$ , бластные клетки 50%, гемоглобин 60 г/л, тромбоциты  $30 \times 10^9/\text{л}$ , гепатоспленомегалия, субфебрилитет. По данным морфологического, цитогенетического и молекулярного исследований костного мозга диагностирован острый миеломонобластный лейкоз. В течение 3 суток проводилась циторедуктивная терапия гидроксимочевинной (4 г/сут.), выполнен один лейкоцитаферез. С 24 января 2014 г. был начат индукционный курс химиотерапии по программе «7+3» [1]. На третий день проведения курса химиотерапии у больной развился миелотоксический агранулоцитоз (лейкоциты  $0,4 \times 10^9/\text{л}$ ), появилась



фебрильная лихорадка, при компьютерной томографии выявлена двусторонняя плевропневмония с признаками интерстициального и альвеолярного отека легких. Результаты микробиологических исследований образцов крови, мочи, жидкости БАЛ были отрицательными. Больной начата эмпирическая терапия имипенемом, ванкомицином, амикацином, флюконазолом, левофлоксацином, однако сохранялась клиническая и лабораторная картина сепсиса: сывороточная концентрация ПКТ - более 10 нг/мл (полуколичественный метод), СРБ – 124 г/л, появилась ОДН ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 - 120$ ), в связи с чем больная была переведена на ИВЛ. Сохранялась лихорадка до 40<sup>0</sup>С. В повторных посевах образцов крови, мочи, жидкости БАЛ обнаружена *Pseudomonas aeruginosae*, штаммы которой были резистентны к цефалоспорином, карбапенемам, аминогликозидам, но сохраняли чувствительность к колистину, фосфомицину. Были назначены меропенем (6 г/сут), колистин (10 млн/сут), фосфомицин 12 г/сут. Несмотря на проводимую антибактериальную терапию спустя неделю у больной развился СШ: гипотензия до 65/30 мм рт.ст., лактат в артериальной крови 6 ммоль/л, по данным транспульмональной термодилуции гиперкинетический тип гемодинамики (сердечный индекс 7,2 л/мин/м<sup>2</sup>, ударный индекс 57 мл/м<sup>2</sup>, ИОПСС 480 дин сек м<sup>2</sup>/см<sup>5</sup>). Сывороточная концентрация ПКТ составила 21 нг/мл, СРБ – 227 мг/л, концентрация пресепсина в плазме – 2550 пг/мл. Начата вазопрессорная терапия норадреналином (1,4 мкг/кг/мин), гидрокортизоном (200 мг/сут). Больная была включена в исследовательский протокол терапии СШ у больных с нейтропенией (Russian Clinical Trial of Mesenchymal Cells in Patients with Septic Shock and severe Neutropenia RuMCeSS, NCT 01849237), и ей внутривенно были введены ММСК в количестве 1,28 млн/кг. ММСК были получены из костного мозга донора – женщины в возрасте 34 лет. ММСК культивировали по стандартной методике [11] в среде альфа MEM с добавлением 4% человеческой плазмы, обогащенной тромбоцитами. Клетки были использованы на 1-м

пассаже. Антибиотическая терапия была продолжена в прежнем объеме. Спустя 2-е суток после введения ММСК отмечено восстановление лейкопоза (лейкоциты крови  $1,5 \times 10^9/\text{л}$ ), стабилизация АД, нормализация сердечного индекса и ИОПСС, прекращена инфузия норадреналина, сохранялась лихорадка до  $39,6^\circ\text{C}$ . Концентрация ПКТ сыворотки снизилась до 12 нг/мл, СРБ – до 160 мг/л, концентрация пресепсина в плазме оставалась высокой - 2789 пг/мл. Отмечена положительная динамика в течении двусторонней пневмонии, регрессировала ОДН, однако развилась ОПН (сывороточные концентрации креатинина 0,21 ммоль/л, натрия 175 ммоль/л, хлора 130 ммоль/л, клубочковая фильтрация 20 мл/мин, олигурия). Начата гемодиафильтрация. В связи с плазменным дефицитом АТШ (активность в плазме 25%) с целью антикоагуляции использовался концентрат антитромбинаIII в дозе 2000 МЕ на процедуру. Всего проведено 18 процедур гемодиафильтрации. Состояние больной улучшилось: нормализовалась температура тела, регрессировали воспалительные изменения в легких. Синегнойная палочка перестала выделяться из крови спустя 23 сут, но на 28-ые сутки уровни воспалительных маркеров были все еще высокими: ПКТ - 3,4 нг/мл, СРБ- 47 мг/л, пресепсин – 3012 пг/мл. Спустя 57 сут прекращена ИВЛ, а через неделю больная переведена из отделения реанимации в гематологическое отделение. По данным исследования костного мозга констатирована ремиссия острого лейкоза. В последующем ей было проведено еще несколько курсов химиотерапии. 9 января 2015 г. больной выполнена трансплантация аллогенного костного мозга от неродственного донора. Была выписана из стационара домой.

#### Глава 4. Обсуждение.

Имеется множество теоретических обоснований и экспериментальных работ [37, 54, 77, 118, 130, 143, 148], свидетельствующих о возможной эффективности применения ММСК для лечения сепсиса и СШ. Проведенные ранее исследования применения ММСК для профилактики и лечения «реакции трансплантат против хозяина» у больных после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток доказали их безопасность у онкогематологических больных. При этом у больных после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток ММСК использовались только вне инфекционных осложнений [10, 60, 63,76, 132]. Клиническая эффективность ММСК для лечения сепсиса у онкогематологических больных не изучена. Эта проблема особенно актуальна среди пациентов с заболеваниями системы крови, в особенности у больных в состоянии агранулоцитоза. У этой категории больных с СШ, тяжесть состояния более 27 баллов по шкале APACHE II и ИВЛв 82% случаев приводят к летальному исходу [7]. В нашей работе в контрольной группе выживаемость среди больных с СШ также составила всего лишь 14%. Каковы же первые результаты применения ММСК при СШ у больных в состоянии агранулоцитоза?

Введение ММСК в первые 10 часов развития СШ статистически значимо улучшало 28-дневную выживаемость (60% в группе ММСК против 14% в контрольной группе). Эти результаты сопоставимы с данными, полученными в экспериментах на животных, которым при сепсисе вводили ММСК и сравнивали с контрольной группой: 75% против менее 40% на модели сепсиса, вызванного синегнойным перитонитом [53], 50% против 0% при CLP модели сепсиса [95].

Каковы же механизмы благоприятного действия ММСК при СШ? Фундаментальные исследования показали, что ММСК обладают иммуномодулирующим действием. В работах на клеточных культурах [37, 54, 77, 118, 130, 143] ММСК уменьшали высвобождение макрофагами провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$  и ИЛ-6, возникшее в ответ на введение ЛПС, и повышали высвобождение противовоспалительного цитокина ИЛ-10.

В настоящем исследовании, как и в работах других авторов [8, 20, 42, 78, 109], у всех больных с СШ в состоянии агранулоцитоза концентрации воспалительных маркеров (пресепсина, СРБ, ПКТ, ИЛ-6) в крови были значительно повышены. За референсные значения, чтобы исключить влияние химиотерапии и агранулоцитоза, мы принимали данные, полученные при обследовании больных в состоянии агранулоцитоза без инфекционных осложнений.

Как и в экспериментах на животных [77, 101, 137], в которых уже спустя 6 ч после введения ММСК отмечалось значимое снижение воспалительных маркеров, у больных, получавших ММСК, на следующие сутки после введения клеток происходило снижение уровня провоспалительных маркеров (пресепсина, ПКТ, СРБ) в крови по сравнению с больными из контрольной группы, а снижение плазменной концентрации ИЛ-6 отмечено к концу первой недели лечения СШ. В то же время более чем у половины больных, перенесших СШ, даже после стабилизации гемодинамических показателей к 28 суткам наблюдения уровни провоспалительных маркеров не снизились до референсных значений. Аналогичные результаты получила А.В. Кречетова [9] при наблюдении в течение 28 суток за больными с тяжелым сепсисом. Этот феномен можно объяснить тем, что в течение месяца большая часть иммунокомпрометированных больных перенесла несколько повторных инфекционных осложнений, что отразилось на концентрации провоспалительных маркеров. Более того, к 28 дню исследования у 40% больных сохранялась глубокая нейтропения.

В результате введения ММСК в настоящем исследовании не выявлено увеличения плазменной концентрации противовоспалительного цитокина ИЛ-10. Это противоречит экспериментальным данным [77, 25, 101], в которых у животных, леченых ММСК, через 6 часов отмечалось повышение концентрации ИЛ-10 в крови. В то же время в некоторых экспериментальных работах [74] также не отмечено значимых различий в плазменных концентрациях ИЛ-10 у животных, леченых и нелеченых ММСК.

Говоря о маркерах воспаления при СШ у больных в состоянии агранулоцитоза, особо стоит остановиться на их диагностической и прогностической значимости.

ПКТ был повышен у большинства больных СШ, в то же время он не может быть отнесен к «ранним» маркерам, у некоторых больных повышение ПКТ происходило не в первые, а лишь на вторые-третьи сутки после развития СШ. Считают [30], что ПКТ является более специфическим маркером воспаления, чем температура, количество лейкоцитов крови или ИЛ-6. В немногочисленных работах [62, 93, 122], посвященных значению ПКТ в диагностике сепсиса у больных с нейтропенией, показано, что уровень ПКТ повышался при развитии сепсиса, и оставался в пределах нормы при отсутствии инфекции. В нашем исследовании среди больных в состоянии агранулоцитоза концентрация его в сыворотке выше 0,7 нг/мл позволяла с 72% чувствительностью и 100% специфичностью отличать больных с сепсисом от больных без инфекции.

Имеются сообщения [23, 125] о том, что ПКТ точнее, чем шкала APACHE II, отражает тяжесть состояния больных с сепсисом, и его уровень при сепсисе выше у умерших, чем у выживших больных. Описано [65] быстрое снижение уровня ПКТ у больных с нейтропенической лихорадкой после разрешения инфекции в результате антибиотикотерапии. У обследованных нами больных в день развития СШ концентрация ПКТ не имела прогностического значения, но спустя трое суток терапии у больных с благоприятным прогнозом уровень ПКТ снижался, а у больных с нарастанием полиорганной недостаточности – повышался. Прогностическое значение имело не столько максимальное содержание в крови ПКТ, сколько изменения его концентрации в процессе лечения.

По данным литературы [4,9, 26] концентрация ПКТ в крови выше при сепсисе, вызванном грамотрицательными бактериями, чем вызванном грамположительными бактериями. В нашем исследовании у подавляющего числа больных в посевах крови выявлялась грамотрицательная флора, поэтому мы не смогли выявить подобной зависимости. Но важно отметить, что повышение ПКТ было специфично не только для бактериальной инфекции, как считалось раньше, значения этого маркера были резко повышены у больных с фунгемией, что соответствует отдельным сообщениям других авторов [32].

Менее специфичным для инфекции, чем ПКТ, являлся другой маркер – СРБ. Сывороточная концентрация СРБ была повышена у всех больных с СШ как бактериальной, так и грибковой этиологии. СРБ является менее чувствительным и специфичным маркером сепсиса и у больных с нейтропенией [67, 115], он может повышаться у них как при развитии сепсиса, так и при отсутствии инфекционных осложнений [93]. В то же время в некоторых исследованиях у больных в состоянии нейтропении [92] СРБ имел более высокую чувствительность и специфичность, чем ПКТ, а также имел прогностическое значение [9, 107]. В настоящем исследовании сывороточная концентрация СРБ повышалась пропорционально тяжести сепсиса и являлась специфичным и чувствительным маркером сепсиса и СШ. Его уровень выше 16 мг/л позволял с высокой достоверностью отличать сепсис от отсутствия инфекции у больного.

Еще один воспалительный маркер – это ИЛ-6. В настоящем исследовании при СШ в состоянии агранулоцитоза плазменные концентрации ИЛ-6 достигали крайне высоких значений (максимально более 10 миллионов пг/мл), что соответствует другим работам [9], в которых изучались его значения при сепсисе у больных в состоянии нейтропении. Ранее была показана прогностическая ценность ИЛ-6 у онкогематологических больных с бактериемией и его роль как предиктора сепсиса у лихорадящих больных с нейтропенией [35, 45, 113, 140]. В ряде исследований [103] выявлена связь между уровнем ИЛ-6 в крови и тяжестью состояния больных, их прогнозом, в то же время в других работах [9] взаимосвязи между уровнем ИЛ-6 и тяжестью состояния больных с нейтропенией не выявлено. В нашем исследовании связь между плазменной концентрацией ИЛ-6 и баллами по шкале APACHE II была очень слабой, хотя и статистически значимой. Нами отмечено снижение уровня ИЛ-6 у выживших больных на следующий день после начала СШ, в то время как у умерших больных плазменные концентрации ИЛ-6 оставались высокими. В других работах [9] концентрация ИЛ-6 в крови также оставалась высокой у умерших пациентов, а у выживших начинала снижаться.

В нашем исследовании ИЛ-6 был наиболее значимо повышен при СШ по сравнению с сепсисом у больных в состоянии агранулоцитоза, но хуже остальных

воспалительных маркеров позволял отличить сепсис от отсутствия инфекционных осложнений у больных в состоянии агранулоцитоза. По другим данным [9, 69], ИЛ-6 также был высокочувствительным, но менее специфичным маркером сепсиса у больных в нейтропении.

Особо следует остановиться на роли в диагностике сепсиса нового маркера воспаления – пресепсина. Его роль в диагностике сепсиса в условиях нейтропении к настоящему времени почти не изучена.

Поскольку ключевую роль в образовании ПСП играет активация макрофагов/моноцитов [149], то у больных с уровнем лейкоцитов крови менее  $0,5 \times 10^9/\text{л}$  ставится под сомнение значительное повышение уровня пресепсина в связи с фактически полным отсутствием субстрата для его образования. Однако в нашем исследовании у больных с СШ в состоянии агранулоцитоза плазменные концентрации пресепсина были значительно повышены. Возможным источником для формирования пресепсина у них являлись тканевые макрофаги.

Считается [6, 47, 129], что повышение уровня пресепсина в крови специфично для бактериальной инфекции. В отличие от этого сложившегося мнения, по нашим данным плазменная концентрация пресепсина значительно повышалась не только при бактериемии, но и в трех случаях, когда единственным доказанным источником инфекции была фунгемиа, вызванная соответственно *Candidatropicalis*, *Candidakrusei* и *Acremonium*.

По данным ряда авторов [43], при развитии сепсиса у больных с нейтропенией не было различий в плазменных концентрациях пресепсина при грамположительной и грамотрицательной инфекциях, а у умерших больных [106] плазменные концентрации пресепсина были выше, чем у выживших. В нашем исследовании исходное повышение пресепсина в крови не имело прогностического значения. По некоторым данным [106], у больных в состоянии агранулоцитоза чувствительность и специфичность пресепсина в диагностике сепсиса и СШ низки, а при сравнении ПКТ и пресепсина у больных в состоянии агранулоцитоза ПКТ оказался наиболее чувствительным при развитии у больных сепсиса, в то время как пресепсин существенно не отличался у больных с нейтропенией с сепсисом и без него [139]. В нашем исследовании пресепсин оказался

наиболее эффективным диагностическим маркером для диагностики сепсиса у больных с нейтропенией. Его уровень выше 530 пг/мл позволял с 89% чувствительностью и 100% специфичностью диагностировать сепсис.

По данным литературы [28, 87, 97, 98] одной из причин значительного повышения уровня пресепсина в крови при СШ может быть нарушение функции почек. Мы исследовали зависимость концентрации пресепсина от функции почек и установили, что плазменные концентрации пресепсина повышаются пропорционально уровню креатинина крови. Подобная закономерность была отмечена у больных со снижением скорости клубочковой фильтрации при развитии сепсиса [98]. У больных со сниженной скоростью клубочковой фильтрации и у больных, находящихся на программном гемодиализе даже, без инфекционных осложнений уровни пресепсина были значительно повышены по сравнению со здоровыми людьми [28, 87, 98]. Некоторые авторы считают, что пресепсин может быть использован как маркер сепсиса лишь у больных без ОПН либо с незначительными нарушениями функции почек, при продвинутой стадии почечной недостаточности пресепсин не может использоваться для диагностики сепсиса [98].

Учитывая тот факт, что молекулярная масса пресепсина составляет 13 000 Да [18, 20, 42, 56], а проницаемость мембран в фильтрах для гемодиализа составляет 1000 Да, в фильтрах для гемодиофильтрации - 30000, мы изучили влияние различных процедур ЗПТ на содержание пресепсина в крови. Концентрация пресепсина крови у больных, которым проводили гемодиализ или гемодиофильтрацию, до начала процедур значимо не различалась и была повышена. При проведении гемодиализа содержание пресепсина в диализате было минимальным, а в фильтрате при гемодиофильтрации -- очень высоким, т.е. гемодиофильтрация приводила к большему удалению пресепсина из крови, чем гемодиализ, причем чем выше была концентрация пресепсина в плазме крови до начала гемодиофильтрации, тем больше было его содержание в фильтрате. Подобной зависимости между концентрациями пресепсина в плазме крови и в диализате у больных при проведении гемодиализа не обнаружено. Несмотря на большую элиминацию пресепсина при гемодиофильтрации, чем при гемодиализе, мы не выявили значимого уменьшения содержания этого маркера в крови после



проведения процедур, и клиническая значимость обнаруженного феномена требует уточнения.

Таким образом, одним из возможных механизмов лечебного действия ММСК при СШ у больных в состоянии агранулоцитоза является уменьшение продукции провоспалительных цитокинов. Реализовываться это действие может через уменьшение полиорганной дисфункции при СШ. В исследованиях на животных показано, что после введения ММСК уменьшается выраженность индуцированной сепсисом полиорганной дисфункции: острого повреждения легких [80, 94] проявлений энтероколита [81], улучшения функции печени и поджелудочной железы [76]. В нашем исследовании введение ММСК больным СШ сопровождалось уменьшением баллов по шкале APACHEII по сравнению с исходным уровнем и контрольной группой. Вышеуказанные изменения происходили в первые 2-3 суток после введения ММСК, однако в дальнейшем группы не различались между собой по тяжести состояния.

Положительные изменения в ответ на введение ММСК проявлялись уже на следующий день в уменьшении тяжести дыхательной и сердечно-сосудистой недостаточности, оцененных в баллах по шкале SOFA, увеличении респираторного коэффициента  $PaO_2/FiO_2$ .

Положительное влияние ММСК на функцию легких можно объяснить уменьшением в них воспалительного процесса: при эндотоксин-индуцированном повреждении легких у мышей, получивших вместе с эндотоксином ММСК, полностью исчезала нейтрофильная инфильтрация, в отличие от контрольной группы, получившей только эндотоксин [148].

В экспериментах на животных после введения ММСК уменьшались признаки почечной недостаточности [85, 101]. Однако в нашем исследовании значимых отличий по баллам ренального компонента шкалы SOFA у больных леченых и нелеченых ММСК в течение 28 дней не было. Интерпретация уровней креатинина в группах была затруднена в связи с тем фактом, что большинству больных проводились процедуры заместительной почечной терапии.

В литературе описано также положительное влияние ММСК на функции печени, поджелудочной железы при сепсисе [85, 101]. В нашем исследовании при сравнении

печеночной компоненты шкалы SOFA, сывороточных концентраций общего белка, билирубина, амилазы, ЛДГ, АСТ, АЛТ, мочевины значимого снижения после введения ММСК по сравнению с контрольной группой не получено.

Улучшение тканевой перфузии можно косвенно оценить по содержанию лактата в артериальной крови [19, 126]. В настоящей работе отмечена быстрая нормализация уровня лактата артериальной крови у больных из ММСК-группы на 7 день лечения, в то время как у больных из контрольной группы достоверное снижение уровня лактата происходило только к концу второй недели исследования.

Таким образом, терапия ММСК СШ у больных в агранулоцитозе позволила увеличить у них 28-дневную выживаемость за счет уменьшения выраженности воспаления и полиорганной дисфункции в первые нескольких суток после введения ММСК. Более того, даже те случаи летальных исходов, которых наблюдались в ММСК группе были как бы «растянуты во времени» по сравнению с контрольной группой и наступали позже: если в контрольной группе в течение первых 3 суток умерло 7 человек, то в ММСК-группе – лишь трое. Хотя это выходит за рамки данного исследования, охватывающего период в 28 суток, следует отметить, что в ММСК группе из 8 человек, переживших 28 суток, в течение 3 месяцев 5 умерли от полиорганной недостаточности, развившейся вследствие СШ, и к этому периоду времени уже различий между контрольной и ММСК группой не отмечалось. Все это дает основание предположить, что терапия ММСК оказывает лишь кратковременный благоприятный эффект на течение сепсиса и полиорганной недостаточности. Для закрепления этого эффекта и лечения возникшей при сепсисе полиорганной недостаточности, возможно, необходимо повторное введение ММСК, однако время их применения и дозы нуждаются в дальнейшем изучении.

## Заключение

Настоящее исследование показало эффективность применения ММСК у больных СШ в состоянии агранулоцитоза. Введение ММСК у всех больных не привело к каким-либо осложнениям, было безопасным и хорошо переносилось. Выживаемость в течение 28 дней у больных, леченых ММСК, практически в 4 раза превышала таковую в контрольной группе: 60% против 14%. Введение ММСК в дозе 1-1,5 млн/кг массы тела больного в первые 10 часов развития СШ у больных в состоянии агранулоцитоза позволило добиться быстрой стабилизации гемодинамических показателей, прекратить введение вазопрессорных препаратов. Нам удалось установить два возможных пути реализации благоприятного действия ММСК при СШ: это уменьшение выраженности, ассоциированной с сепсисом и СШ полиорганной дисфункции и уменьшение продукции провоспалительных цитокинов.

На следующий день после введения ММСК у больных статистически значимо уменьшались выраженность полиорганной дисфункции, тяжесть дыхательной и сердечно-сосудистой недостаточности, оцененные в баллах по шкале SOFA, отмечалось увеличение респираторного коэффициента  $PaO_2/FiO_2$ . Лечение с помощью ММСК позволяло быстрее вывести больного из состояния шока, стабилизировать АД и прекратить терапию вазопрессорами и инотропами.

Увеличение 28-дневной выживаемости больных СШ при лечении ММСК ассоциировалось с уменьшением продукции таких провоспалительных цитокинов, как ПКТ, СРБ и ИЛ-6, пресепсина. Мы показали, что все вышеперечисленные маркеры с высокой специфичностью и чувствительностью могут диагностировать сепсис и СШ у больных в состоянии агранулоцитоза. Впервые показано, что пресепсин также является эффективным диагностическим маркером сепсиса у этой категории пациентов и может широко применяться в клинической практике у онкогематологических больных. Прогностическое значение имели не абсолютные значения провоспалительных маркеров у больных сепсисом, а их динамика в процессе лечения: успешная терапия сепсиса и СШ сопровождалась снижением уровня провоспалительных маркеров. Все провоспалительные маркеры повышались не только при бактериальном, но и

грибковом сепсисе, причем иногда при фунгемии уровни этих маркеров оказывались выше, чем при бактериемии.

Не все эффекты ММСК на секрецию цитокинов, показанные в эксперименте и на культурах клеток, реализуются при введении их больным. Мы не выявили повышения уровня противовоспалительного цитокина ИЛ-10 у больных с СШ в состоянии агранулоцитоза.

В целом, терапия ММСК, повышая 28-дневную выживаемость у больных с СШ в состоянии агранулоцитоза, не влияла на отдаленный прогноз этих больных и из 9 больных из группы ММСК, переживших 28 дней после СШ, в течение последующих 3 месяцев умерли 5 человек. Причем причиной смерти всех этих больных была не прогрессия гематологического заболевания, а полиорганная дисфункция и сохраняющиеся инфекционные осложнения, которые возникли в период после перенесенного СШ. Возможно, для улучшения отдаленного прогноза онкогематологических больных, перенесших СШ, необходимо повторное введение ММСК даже после стабилизации гемодинамических показателей с целью предотвращения и лечения инфекционных осложнений и органной дисфункции. Однако эта проблема требует отдельного дальнейшего изучения.

## Выводы

1. Септический шок у больных возникал на 1-68 день после развития агранулоцитоза и чаще всего вызывался грамотрицательными бактериями, у трети больных при септическом шоке бактериемия не выявлялась. У большинства пациентов развилась острая дыхательная недостаточность, 75 % потребовалось проведение искусственной вентиляции легких. У двух третей больных зарегистрирована острая почечная недостаточность, трети больных проводилась заместительная почечная терапия. Длительность вазопрессорной терапии у больных варьировала от 1 до 12 дней.
2. Применение мультипотентных мезенхимных стромальных клеток при септическом шоке в агранулоцитозе значительно увеличивает 28-дневную выживаемость по сравнению с больными, получавшими стандартную терапию (60% против 14%).
3. У всех больных в состоянии агранулоцитоза в день развития септического шока вне зависимости от его этиологии концентрация в крови прокальцитонина, пресепсина, интерлейкина-6, С-реактивного белка была значительно повышена. Чувствительность и специфичность пресепсина выше, чем интерлейкина-6, С-реактивного белка, прокальцитонина при диагностике сепсиса. При проведении заместительной почечной терапии пресепсин не может использоваться как объективный показатель воспаления.
4. Применение мультипотентных мезенхимных стромальных клеток приводило к более ранней (в течение 2-х суток) компенсации сердечно-сосудистой и дыхательной недостаточности, уменьшению тяжести состояния больных. После введения мультипотентных мезенхимных стромальных клеток у больных с септическим шоком значительно быстрее снижались концентрации воспалительных маркеров.
5. Эффект терапии мультипотентными мезенхимными стромальными клетками больных септическим шоком в агранулоцитозе краткосрочен, не влияет на 3-х месячную выживаемость больных, перенесших септический шок.

### **Практические рекомендации.**

1. У больных в состоянии агранулоцитоза в первые 10 часов с момента развития септического шока рекомендуется использовать мультипотентные мезенхимные стромальные клетки в количестве  $1-1,5 \times 10^6$  клеток на кг массы тела внутривенно наряду со стандартной терапией септического шока. При сохранении инфекционных осложнений и полиорганной дисфункции возможно повторное введение ММСК в той же дозе.
2. В качестве диагностических маркеров сепсиса и септического шока у больных в состоянии агранулоцитоза рекомендуется использовать такие воспалительные маркеры как пресепсин, прокальцитонин, С-реактивный белок и интерлейкин-6.
3. Рекомендуется исследовать плазменную концентрацию пресепсина у больных септическим шоком в состоянии агранулоцитоза. Он является самым эффективным маркером сепсиса у этой категории больных. Его минимальное пороговое значение для диагностики сепсиса равно 531 пг/мл с чувствительностью 88,8% и специфичностью 100%. Однако для диагностики септического шока у такой категории пациентов он обладает довольно низкой чувствительностью 57,7% и невысокой специфичностью 76,6% при минимальном пороговом значении 3097 пг/мл.
4. Рекомендуется использовать прокальцитонин в качестве маркера сепсиса и септического шока у больных в состоянии агранулоцитоза. При минимальном пороговом значении 5,73 нг/мл можно с чувствительностью 83% и специфичностью 72% диагностировать септический шок у больных, а пороговое значение 0,7 нг/мл позволяет со 100% специфичностью и 72% чувствительностью выявить сепсис.
5. Возможно использование сывороточной концентрации С-реактивного белка для диагностики инфекционных осложнений у больных в состоянии агранулоцитоза. При минимальном пороговом значении 16 мг/л с 88,8% чувствительностью и специфичностью 77,7% можно диагностировать сепсис у больных. При повышении минимального порогового значения до 184 мг/л с

66% чувствительностью и 86% специфичностью можно говорить о развитии у больного септического шока.

6. Рекомендовано использование плазменной концентрации интерлейкина-6 в качестве наиболее эффективного маркера развития септического шока у больных в состоянии агранулоцитоза. При минимальном пороговом значении 143 пг/мл с 77,5% чувствительностью и 89% специфичностью можно говорить о начале септического шока у данной категории пациентов. Однако при этом он является наименее эффективным маркером сепсиса. Минимальное пороговое значение для диагностики сепсиса составляет 15,3 пг/мл при 78,5% чувствительности и 73% специфичности.
7. Спустя три дня терапии сывороточная концентрация прокальцитонина у больных с благоприятным исходом снижается, а с неблагоприятным – повышается. У больных с неблагоприятным прогнозом плазменная концентрация интерлейкина-6 сохраняется высокой, а у больных с благоприятным исходом показатель интерлейкина-6 начинает снижаться на следующий день после развития септического шока.
8. Степень повышения пресепсина, прокальцитонина, С-реактивного белка, интерлейкина-6 отражает выраженность воспалительного процесса и тяжесть течения сепсиса, выраженность полиорганной дисфункции у больных. Концентрация воспалительных маркеров в крови у большинства больных остается повышенной на протяжении 28-дневного периода наблюдения.
9. Рекомендовано комплексное определение маркеров воспаления у больных септическим шоком в состоянии агранулоцитоза, необходимо оценивать динамику уровней воспалительных маркеров для своевременной коррекции проводимой терапии.

## Приложение №1. Информированное согласие

### ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПАЦИЕНТА, УЧАСТВУЮЩЕГО В КЛИНИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ

ИССЛЕДОВАТЕЛЬ \_\_\_\_\_

НАЗВАНИЕ: Сравнительное, в параллельных группах, проспективное, рандомизированное исследование эффективности и безопасности терапии донорскими мезенхимными стромальными клетками (МСК) у больных в агранулоцитозе с тяжелым сепсисом и септическим шоком

#### Уважаемый пациент!

Этот документ является информированным согласием, в нем содержится информация о препарате и клиническом исследовании, в котором Вам будет предложено участвовать. Перед тем как Вы примете решение об участии в этом исследовании, Вы должны осознать возможные риск и пользу, чтобы Ваше решение было обоснованным. Все интересующие Вас вопросы Вы можете обсудить с врачом. После того, как Вы ознакомитесь с данным документом и решите принять участие в клиническом исследовании, Вы должны поставить подпись и дату под этим согласием. Вы получите подписанный и датированный экземпляр этого документа. Если Вы примите решение не участвовать в данном клиническом исследовании, то это решение никак не повлияет на качество медицинского обслуживания, которое Вы получаете.

У больных гемобластозами в процессе специфического лечения развивается большое количество осложнений, наиболее грозным из которых является сепсис. Частота фатального исхода у больных с тяжёлым сепсисом превышает 70%, несмотря на надлежащую эмпирическую, а при верификации возбудителя, соответствующую противомикробную терапию.

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) человека представляют собой популяцию прилипающих стромальных клеток костного мозга, обладающих иммуномодулирующими свойствами. В настоящее время в нашем Центре МСК применяются для лечения и профилактики «реакции трансплантат против хозяина» у больных после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. Доказано, что терапия МСК безопасна и не вызывает клинически значимых побочных эффектов. Имеется большое количество работ, показывающих эффективность применения мезенхимных стромальных клеток при лечении тяжелого сепсиса. Таким образом, планируется исследование по выполнению терапии мезенхимными стромальными клетками как дополнительного метода лечения тяжелого сепсиса и септического шока.

**ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ:** Оценить клиническую эффективность и безопасность применения мезенхимных стромальных клеток при лечении тяжелого сепсиса и септического шока.

#### ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование будет проводиться в условиях научно-клинического отделения анестезиологии и реаниматологии. Ваше участие может продолжаться 30 дней. Этот период включает в себя 1-2



дня лечения исследуемым препаратом и последующее наблюдение за Вами после окончания лечения в нашем Центре.

### ПРОЦЕДУРЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Вам будут введены донорские мезенхимные стромальные клетки в дозе  $60-90 \times 10^6$  внутривенно медленно (в течение 10 мин). Введение будет выполнено в условиях научно-клинического отделения анестезиологии и реаниматологии. Донорские мезенхимные стромальные клетки будут получены из образца костного мозга здорового донора в стерильных условиях.

На протяжении всего периода исследования Вы будете получать лечение в соответствии с принятыми в лечебном учреждении протоколами медицинской помощи.

### РИСК, СВЯЗАННЫЙ С УЧАСТИЕМ В ЭТОМ ИССЛЕДОВАНИИ

К возможным побочным эффектам, которые могут возникнуть после переливания мезенхимных стромальных клеток донора относятся такие, как при переливании компонентов крови (тромбоцитов, эритроцитарной массы, свежзамороженной плазмы). В случае возникновения осложнений, связанных с переливанием МСК, Вам будет проведена необходимая терапия.

Для максимального снижения риска передачи инфекционного материала забор мезенхимных стромальных клеток производился только после тщательного подбора здоровых доноров.

### РАЗРЕШЕНИЕ НА ПРОСМОТР ЗАПИСЕЙ/КОНФИДЕНЦИАЛЬНОСТЬ

Участие в исследовании является анонимным. Результаты исследования могут быть опубликованы в международных научных журналах при условии полной конфиденциальности, без указания имен или каких-либо иных сведений, позволяющих установить личности участников. При необходимости в публикации могут быть указаны некоторые общие сведения об участниках, как-то: половая принадлежность, возраст, диагноз заболевания.

### ОРГАНИЗАЦИОННЫЕ ВОПРОСЫ

Если у Вас возникнут любые вопросы в отношении этого исследования, пожалуйста, позвоните Вашему врачу

Ф.И.О. Макарова Полина Михайловна  
Телефон (495) 612-48-59

По всем вопросам, касающимся ваших прав как участника исследования, пожалуйста, обращайтесь в Локальный Этический комитет:

Ф.И.О.  
Телефон

### ДОБРОВОЛЬНОСТЬ УЧАСТИЯ И ИСКЛЮЧЕНИЯ ИЗ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ваше участие в этом исследовании является абсолютно добровольным. Вы можете отказаться участвовать в исследовании или прекратить участие в нем в любое время. Исследователь может исключить Вас из исследования без Вашего согласия в любое время, если посчитает, что это в Ваших интересах. Исследователь сообщит Вам о возникновении таких обстоятельств.

## ИНФОРМИРОВАННОЕ СОГЛАСИЕ

Подписывая данный документ, я подтверждаю, что врач информировал меня обо всех планируемых процедурах и рисках, которые могут возникнуть в ходе настоящего исследования.

Необходимость введения мне донорских мезенхимных стромальных клеток (МСК) подробно обсуждена со мной врачом отделения реанимации и интенсивной терапии ФГБУ ГНЦ.

Мне известно, что мне будут внутривенно введены мезенхимные стромальные клетки в необходимом количестве с целью лечения септического шока.

Я подтверждаю, что внимательно прочитал(а) и полностью понял(а) изложенную информацию. Я заявляю, что все незнакомые специальные термины были мне разъяснены, и что у меня была возможность задать все интересующие меня вопросы. Я также подтверждаю, что получил(а) на все вопросы понятные мне ответы. Мне известно, что в любое время я могу отказаться от участия в исследовании, не лишаясь при этом никаких своих прав и преимуществ.

Я понимаю, что моя фамилия не будет фигурировать ни в публикациях, ни в докладах.

Мне известно, что все дополнительное лечение будет обсуждено со мной и будет проводиться с моего согласия.

Мне также известно, что определенная часть моей крови будет использоваться для лабораторного контроля и научных исследований, целью которых является дальнейшее совершенствование лечения заболеваний системы крови.

Я подтверждаю, что получил(а) экземпляр Информации для пациента и Формы информированного согласия.

Я даю свое добровольное согласие стать участником этого исследования.

ДАТА \_\_\_\_\_

Ф.И.О. (больного) \_\_\_\_\_

ПОДПИСЬ (больного) \_\_\_\_\_

Ф.И.О. врача \_\_\_\_\_

Подпись \_\_\_\_\_

## **ФОРМА ПОДПИСАНИЯ ИНФОРМИРОВАННОГО СОГЛАСИЯ ДЛЯ ПАЦИЕНТА, НАХОДЯЩЕГОСЯ В БЕССОЗНАТЕЛЬНОМ СОСТОЯНИИ**

Терапия мультипотентными мезенхимными стромальными клетками разработана, в том числе, для применения в неотложной ситуации (ДВС-синдром, тяжелый сепсис, септический шок), когда пациенты находятся в бессознательном состоянии и не могут самостоятельно дать согласие на участие в данном научном исследовании.

Пациентам, находящимся в таком состоянии, грозит смертельная опасность, поэтому немедленное назначение мультипотентных мезенхимных стромальных клеток может увеличить шансы на спасение жизни на данном этапе лечения.

В сложившихся обстоятельствах согласие на участие пациента в данном научном исследовании должно быть подписано консилиумом врачей (2), исследователем, независимым свидетелем и законным представителем больного, если он сопровождает пациента.

В дальнейшем, по мере прихода пациента в сознание, он сам подписывает информированное согласие.

Мы, нижеподписавшиеся, ознакомлены с информацией, касающейся участия пациента \_\_\_\_\_ (ФИО пациента) в данном научном исследовании.

Мы имели возможность задать интересующие нас вопросы и получили удовлетворившие нас ответы и сочли возможным участие данного пациента в настоящем исследовании.

Доктор \_\_\_\_\_  
ФИО, должность

\_\_\_\_\_  
Дата подписания

Подпись  
Доктор \_\_\_\_\_  
ФИО, должность

\_\_\_\_\_  
Дата подписания

Подпись

**ФИО независимого свидетеля**

Подпись

\_\_\_\_\_  
Дата подписания

**Законный представитель**

\_\_\_\_\_  
Дата подписания

Подпись

\_\_\_\_\_  
Дата подписания

**ФИО лица, получающего согласие (исследователь)**

\_\_\_\_\_  
Подпись лица, получающего согласие

\_\_\_\_\_  
Дата подписания

Номер пациента: \_\_\_\_\_

Инициалы пациента: \_\_\_\_\_

Дата рождения пациента: \_\_\_\_\_

**Приложение №2. Протокол проспективного клинического исследования по оценке эффективности терапии мультипотентными мезенхимными стромальными клетками в лечении септического шока у больных в состоянии агранулоцитоза.**

**ПРОТОКОЛ ПРОСПЕКТИВНОГО КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПО  
ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫМИ  
МЕЗЕНХИМНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ДОНОРОВ  
КОСТНОГО МОЗГА В ЛЕЧЕНИИ СЕПТИЧЕСКОГО ШОКА У БОЛЬНЫХ В  
СОСТОЯНИИ АГРАНУЛОЦИТОЗА.**

Руководители исследования: д.м.н. Паровичникова Е.Н.

д.м.н. Галстян Г.М.

Ответственный исполнитель: Макарова П.М.

## Содержание

- 1. Общая информация**
- 2. Научное обоснование клинического исследования**
  - 2.1. Септический шок**
  - 2.2. ММСК**
  - 2.3. Безопасность терапии ММСК**
  - 2.4. Получение ММСК**
- 3. Соблюдение этических принципов в ходе исследования**
- 4. Цели и задачи исследования**
- 5. План исследования**
  - 5.1. Дизайн протокола**
  - 5.2. Схема введения ММСК**
  - 5.3. Процедуры визита**
  - 5.4. Досрочное завершение исследования.**
- 6. Критерии включения и исключения больных из исследования**
  - 6.1. Критерии включения**
  - 6.2. Критерии исключения**
  - 6.3. Диагностика септического шока**
- 7. Конечный результат исследования**

## 1.Общая информация

|   |   |
|---|---|
| Номер протокола                           | -   |
| Название протокола                        | протокол проспективного клинического исследования по оценке эффективности терапии мультипотентными мезенхимными стромальными клетками доноров костного мозга в лечении септического шока у больных в состоянии агранулоцитоза.  |
| Сроки проведения исследования             | С 2012 по 2015 гг   |
| Цель исследования                         | Определить эффективность терапии мультипотентными мезенхимными стромальными клетками для лечения септического шока у больных в состоянии агранулоцитоза   |
| Схема исследования                        | Будет проведено рандомизированное клиническое испытание.  |
| Лечение                                   | <ol style="list-style-type: none"><li>1. Всем пациентам проводится стандартная терапия тяжелого сепсиса и септического шока.</li><li>2. После рандомизации пациентам из группы с введением ММСК помимо стандартной терапии при септическом шоке будут внутривенно введены мультипотентные мезенхимные стромальные клетки в количестве <math>1-1,5 \times 10^6</math> клеток на кг массы тела больного однократно в первые десять часов от момента развития септического шока.</li></ol> |
| Время участия                             | Каждый больной из данного исследования будет наблюдаться в течение 28 дней с момента развития септического шока   |
| Объект исследования                       | 30 пациентов с септическим шоком в состоянии агранулоцитоза войдут в исследование.  |
| План статистического анализа исследования | Анализ общей выживаемости, динамики воспалительных маркеров и маркеров полиорганной недостаточности в течение 28 дней будет проведен стандартными статистическими методами.   |

## 2. Научное обоснование клинического исследования

### 2.1 Септический шок.

Сепсис – патологический процесс, в основе которого лежит реакция организма в виде генерализованного (системного) воспаления на инфекцию различной этиологии (бактериальной, вирусной, грибковой). При этом происходит системная продукция ряда цитокинов клетками-эффекторами воспаления (Т-лимфоциты, макрофаги, эндотелиоциты, тромбоциты), при нарушении существующего равновесия между провоспалительными (интерлейкины-1, -6, -8, фактор некроза опухоли) и противовоспалительными (интерлейкины-4, -10, -14, растворимые рецепторы к фактору некроза опухоли) медиаторами развивается септический шок [Hotchkiss R.S., 2003].

СШ является одной из основных причин смерти больных с агранулоцитозом. У больных с агранулоцитозом СШ, искусственная вентиляция легких и тяжесть состояния больных более 27 баллов по шкале APACHE II в 82% случаев приводит к летальному исходу [Khwankeaw J., 2014]. Проблема улучшения результатов лечения септического шока у больных в агранулоцитозе остается крайне актуальной. Увеличение выживаемости при сепсисе и септическом шоке в последнее десятилетие достигается благодаря организационным мероприятиям – созданию международных рекомендаций [Surviving Sepsis Campaign, 2012; сепсис в начале XXI века, метод. рекомендации РАСХИ, Москва, 2004] по лечению, в которых прописана последовательность действий, рекомендуемые методы лечения, целевые показатели. Для лечения септического шока у больных кроме проводимой комплексной терапии применялся рекомбинантный активированный протеин С, который воздействует на систему воспаления несколькими путями: снижает присоединение селектинов к лейкоцитам, снижает высвобождение цитокинов из моноцитов, блокирует высвобождение фактора некроза опухоли- $\alpha$  из лейкоцитов, угнетает выработку тромбина, который потенцирует воспалительный ответ. В исследовании PROWES [Bernard G.R., 2001] было показано снижение смертности при введении активированного протеина С больным с сепсисом в течение 96 ч в дозе 24 мкг/кг мин. Однако одним из главных осложнений такой терапии являлся высокий риск развития геморрагических осложнений [Ranieri V. M., 2012], и в дальнейшем не было зафиксировано увеличения выживаемости у больных в выполненном позже исследовании PROWES-SHOCK [Ranieri V. M., 2012].

Терапия септического шока человеческими иммуноглобулинами, действие которых направлено непосредственно против антигенов, находящихся на поверхности микроорганизмов, против медиаторов сепсиса и нейтрализации рецепторов для этих медиаторов, расположенных на поверхности клеток, не влияет на выживаемость у пациентов с сепсисом и септическим шоком [Werdan K., 2007]. Поэтому необходимы принципиально новые методы лечения.

### 2.2. ММСК.

Одним из таких методов является применение для лечения сепсиса и септического шока мультипотентных мезенхимных стволовых клеток. Обоснованием для этого служат данные о механизмах действия мультипотентных мезенхимных стволовых клеток (ММСК), полученные в исследованиях на клеточных культурах и в экспериментах на животных. При внедрении в организм инфекционного агента ММСК выделяют факторы роста, которые регулируют иммунный эффект Т- и В-клеток, дендритных клеток, моноцитов, нейтрофилов, макрофагов, влияя тем самым на эндотелиальную и эпителиальную проницаемость, продукцию противовоспалительных и провоспалительных цитокинов и уменьшая выраженность воспаления [Jones B.J., 2008, Stagg J., 2013]. ММСК отвечают на наличие инфекционного агента увеличением синтеза простагландина E2, активацией рецепторов простагландина E2 на макрофагах, увеличением синтеза интерлейкина-10 и уменьшением синтеза интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли- $\alpha$ . ММСК способствуют бактериальному киллингу и клиренсу через паракринные взаимодействия с локальными иммунными клетками, замедляют созревание В-клеток и нарушают в них переключение синтеза антител, подавляя хемотаксис и регулируя тем самым синтез антител. Секретируемые ММСК растворимые факторы (трансформирующий ростовой фактор- $\beta$ , фактора роста гепатоцитов, простагландин E2 и NO) ингибируют пролиферацию Т-клеток и продукцию цитокинов, уменьшают цитотоксический эффект цитолитических Т-клеток [Wannemuehler T.J., 2012, Németh K., 2009].

Однако клиническая эффективность ММСК при сепсисе не изучена, а исследования по применению ММСК при септическом шоке только запланированы, их результаты пока не опубликованы. Поэтому исследование эффективности ММСК при септическом шоке у больных в агранулоцитозе представляется актуальным и своевременным.

### **2.3. Безопасность терапии МСК**

Существуют примеры использования ММСК в клинической практике для лечения реакции «трансплантат против хозяина» у больных после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, в которых доказана безопасность их применения [Introna M., 2015, Kuzmina L.A.,2012]. У больных, получающих ММСК как терапию, направленную на лечение РТПХ, не было выраженных побочных эффектов [ Ringden O.,2011; Le Blanc K.,2004]. Терапия ММСК обеспечивает эффективную профилактику острой реакции трансплантат против хозяина при аллогенной трансплантации костного мозга. Введение ММСК у всех больных не приводило к развитию каких-либо осложнений, побочных эффектов, аллергических реакций. Терапия ММСК была безопасной и хорошо переносилась больными. Случаи смертельного исхода после введения ММСК возникали только в результате прогрессии полиорганной недостаточности или онкогематологического заболевания [ Introna M.,2015; Herrmann R.,2012; Weng J.Y.,2010].

### **2.4.Получение ММСК**

Введение ММСК, их хранение и получение проводятся в стерильных условиях. Все компоненты системы с ММСК проверяются на стерильность, пирогенность и токсичность, не соприкасаются с ксеногенными материалами.

Получают ММСК донора из ядросодержащих клеток костного мозга донора [Svinareva D.A.,2010]. Ядросодержащие клетки костного мозга донора получают ресуспендированием костного мозга в питательной среде с 0,1% метилцеллюлозы, инкубацией смеси при комнатной температуре в течение 40 минут и последующим центрифугированием фракции, не содержащей эритроцитов, при 1500 об/мин в течение 10 минут. Ядросодержащие клетки культивируют в среде MEM с 4% плазмы, обогащенной тромбоцитами, 200 мМ L-глутамин и антибиотиками в концентрации 120000 клеток на один см<sup>2</sup> площади дна флакона. Плазму крови человека, обогащенную тромбоцитами (концентрация тромбоцитов 0,5-1,9×10<sup>9</sup> /мл), получают в результате размораживания, предварительно замороженного при -70°С концентрата тромбоцитов с последующим осаждением лизата тромбоцитов при 12000 об/мин в течение 15 минут. ММСК донора, достигшие конfluence, снимают с подложки с помощью 0,025% трипсина и пассируют в концентрации 4500 клеток на 1 см<sup>2</sup> площади дна флакона. ММСК донора после снятия с подложки центрифугируют при 1500 об/мин в течение 10 минут и ресуспендируют в полиглобулине в необходимом количестве. Далее клетки замораживают в пробирках в жидком азоте. ММСК донора вводят в количестве 1-1,5×10<sup>6</sup> /кг веса больного внутривенно в течение 10 мин однократно. ММСК донора могут быть использованы как непосредственно после их получения, так и после размораживания клеток, ранее замороженных в парах жидкого азота в среде с 10% диметилсульфоксида.

Непосредственно перед введением ММСК в организм больного септическим шоком в состоянии агранулоцитоза пробирка с клетками размораживается в теплой воде с температурой не более 37°С. Сразу же после размораживания ММСК вводятся внутривенно пациенту.

### **3.Соблюдение этических принципов в ходе исследования.**

Исследование будет проводиться в соответствии с этическими принципами, изложенными в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации» Рекомендации для врачей, занимающихся биомедицинскими исследованиями с участием людей»(1964-1996 гг), требованиями



Федерального закона № 86 «О лекарственных средствах»(22.06.1998) и правилами проведения качественных клинических исследований в РФ (ОСТ 42-511-99). Исследование, в частности заключительный вариант протокола, включая Информацию для пациента, участвующего в клиническом исследовании, и Информированное согласие, было одобрено Этическим комитетом ФГБУ ГНЦ МЗ РФ (заседание 26.12.2012, протокол № 89) и Ученым Советом ФГБУ ГНЦ МЗ РФ (заседание 18.12.2012, протокол № 8).

Все поправки к протоколу и Информации для пациента будут представляться в Этический комитет ФГБУ ГНЦ МЗ РФ. Также Комитет по этике будет информирован о возникающих нежелательных и побочных эффектах, связанных или возможно связанных с применением ММСК.

Информированное согласие будет получено у предполагаемых участников исследования до начала клинического исследования. Информация для пациента содержит все сведения о клиническом исследовании. Права, безопасность, благополучие участников являются приоритетными и будут превалировать над интересами науки и общества.

Полученные в ходе исследования сведения, идентифицирующие личность испытуемого, будут сохраняться в тайне и могут быть раскрыты только в пределах, установленных законом.

#### **4. Цели и задачи исследования**

##### **Цели исследования:**

Изучить эффективность применения мультипотентных мезенхимных стволовых клеток в лечении септического шока у больных в состоянии агранулоцитоза.

##### **Задачи исследования:**

1. оценить выживаемость больных септическим шоком при лечении мультипотентными мезенхимными стволовыми клетками.
2. оценить влияние терапии мультипотентными мезенхимными стволовыми клетками на содержание маркеров воспаления в крови, течение сепсиса и вызванной им полиорганной недостаточности.

##### **5. План исследования.**

Настоящее исследование является проспективным и рандомизированным.

###### **5.1. Дизайн протокола.**

Больные включаются в исследование после процедуры подписания информированного согласия. Больные, находящиеся в бессознательном состоянии, могут принять участие в исследовании в том случае, если консилиум в составе компетентных специалистов лечебного учреждения, не принимающих участия в исследовании, придет к решению о том, что назначение ММСК может существенно улучшить шансы больного на благоприятный исход. Согласие на участие в исследовании у лиц в бессознательном состоянии подписывается членами консилиума, законным представителем больного (если удастся обеспечить его присутствие) и главным исследователем.

Планируется включить в основную группу 15 больных (в дальнейшем – группа с введением ММСК) и в контрольную группу - 15 больных.

Всем больным при развитии септического шока будет проводиться стандартная терапия септического шока, включающая:

1) У всех больных устанавливается артериальная линия для инвазивного мониторинга АД и взятия проб крови для анализа кислотно-щелочного состояния, газов крови [Surviving Sepsis Campaign, 2012; Сепсис в начале XXI века, метод. рекомендации РАСХИ, Москва, 2004]. Устанавливается катетер в а. Radialis (20 G) или а. femoralis артериальным катетером размером 18 G либо катетер Picco размером 20 G. Цель – АД  $\geq$  65 мм рт. ст, ЦВД 8-12 мм рт ст, диурез  $>$  0,5 мл/кг/ч, ScvO<sub>2</sub>  $\geq$  70%.

2) Антибиотическая терапия – сразу после поступления в ОРИТ должна быть начата эмпирическая антибактериальная терапия с использованием одного или более препаратов, имеющих активность против всех потенциальных патогенов (бактерии и/или грибы) и создающих адекватную концентрацию в предполагаемых источниках сепсиса. Антибактериальная терапия должна быть

видоизменена с учетом профиля чувствительности микроорганизма к антибиотикам в наиболее ранние сроки.

3) Волемиическая нагрузка - Рекомендуется проводить инфузию с применением либо коллоидов (ГЭК 130/0.4, альбумин) 300-500 мл за 30 мин либо кристаллоидов 1000 мл за 30 мин. Начальной целью инфузии является ЦВД  $\geq 8$  мм рт. ст. (12 мм рт. ст. при проведении ИВЛ). Часто инфузия необходима и в дальнейшем. Рекомендуется продолжать инфузию до тех пор, пока продолжается гемодинамическое улучшение (АД, ЧСС, темп диуреза). Рекомендуется значительно уменьшить скорость инфузии, когда увеличение преднагрузки сердца (ЦВД) не приводит к гемодинамическому улучшению (возрастанию сердечного выброса).

4) Инотропная/вазопрессорная терапия норадреналином в стартовой дозе 0,3-0,5 мкг/кг/мин при АД систолическом менее 90 мм рт. ст. или АД среднем менее 70 мм рт. ст. в течение не менее 1 часа, сохраняющееся, несмотря на инфузию адекватных объемов жидкости. Увеличение дозы препарата продолжается до достижения целевого уровня АД среднего не менее 65 мм рт. ст. Адреналин должен использоваться как первый альтернативный препарат у пациентов с септическим шоком при плохом ответе на норадреналин или дофамин.

5) Терапия кортикостероидами септического шока: внутривенно вводится 300 мг гидрокортизона (100 мг короткая внутривенная инфузия, далее суточная доза вводимого препарата составляет 200 мг), в дальнейшем вводится 200 мг гидрокортизона в виде внутривенной суточной инфузии. Гидрокортизон отменяется после прекращения использования вазопрессоров.

6) Препараты крови - показанием для трансфузии эритроцитов является снижение гемоглобина менее 70 г/л (целевой уровень гемоглобина - 70-90 г/л) у взрослых. Трансфузию тромбоцитов рекомендовано проводить при снижении уровня тромбоцитов менее  $20 \times 10^9$ /л и высоком риске кровотечения. СЗП не должна применяться для коррекции лабораторных показателей при отсутствии кровотечения или планируемого инвазивного вмешательства.

7) Заместительная почечная терапия (гемодиализ или гемодиафильтрация) выполняется при развитии ОПН либо выраженных метаболических нарушениях (лактат - ацидоз, гипергидратация, электролитные нарушения).

8) При развитии ОДН, некоррегируемой с помощью неинвазивных методов респираторной поддержки, у больных интубируется трахею, и они переводятся на ИВЛ.

Больные в ММСК группе после включения в исследование наряду со стандартной терапией получают однократно внутривенно донорские ММСК в количестве  $1-1,5 \times 10^6$  клеток на кг массы тела в первые 10 часов с момента развития СШ.

## 5.2.Схема введения ММСК

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки донора вводят в количестве  $1-1,5 \times 10^6$  /кг веса больного внутривенно в течение 10 мин однократно. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки донора могут быть использованы как непосредственно после их получения, так и после размораживания клеток, ранее замороженных в парах жидкого азота в среде с 10% диметилсульфоксида.

Непосредственно перед введением мультипотентных мезенхимных стромальных клеток организм больного септическим шоком в состоянии агранулоцитоза пробирка с клетками размораживается в теплой воде с температурой не более 37°C. Сразу же после размораживания мультипотентные мезенхимные стромальные клетки вводятся внутривенно пациенту.

## 5.3. Процедуры визита.

Для оценки эффективности терапии ММСК предполагается проводить наблюдение за больными в течение 28 дней. За этот период у больных будет проведено 7 визитов (табл. 13). Больные в основной группе обследуются ежедневно в течение первых трех суток, а затем раз в неделю (на 7 ( $\pm$  1), 14 ( $\pm$  2), 21 ( $\pm$  3) и 28 ( $\pm$  3) дни после инфузии ММСК на протяжении 28 дней. Больные в контрольной группе обследуются таким же образом.

### **Обследование больных во время процедуры визита включает в себя:**

1. оценка соответствия больного критериям включения/исключения,
2. регистрация демографических данных (дата рождения, пол),
3. медицинский анамнез, включая сопутствующие заболевания, хирургические операции и инвазивные процедуры, выполненные в течение месяца до включения пациента в исследование,
4. регистрация медикаментозных назначений, получаемых больным на момент визита.
5. регистрация основных физиологических показателей (АД, частота сердечных сокращений, частота дыхания, пульс-оксиметрия, уровень сознания по шкале ком Глазго, температура тела, рост и вес),
6. гемодинамические показатели (параметры центральной гемодинамики по данным транспульмональной термодилуции, выполнение электрокардиографии и эхокардиографии при включении в протокол, а далее по необходимости),
7. степень острой дыхательной недостаточности ( $PaO_2/FiO_2$ ), проведение ИВЛ, причины, ее длительность, исход,
8. необходимость проведения заместительной почечной терапии (гемодиализа/гемодиафильтрации),
9. длительность инотропной/вазопрессорной поддержки (в часах), дозы препаратов,
10. расчеты по шкалам APACHE II и SOFA,
11. Лабораторные анализы - выполняются в центральной лаборатории:
  - А) исследование клинического анализа крови (эритроциты, лейкоциты, лейкоцитарная формула, гемоглобин, гематокрит, тромбоциты),
  - Б) основные биохимических показателей сыворотки крови (общий белок, глюкоза, билирубин, мочевины, креатинин, амилаза, аспартатаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза, лактатдегидрогеназа, калий, натрий, кальций, хлор),
  - В) газовый состав артериальной крови, концентрация лактата артериальной крови,
  - Г) сывороточные концентрации маркеров воспаления (ИЛ-6, ПКТ, СРБ, пресепсина и противовоспалительных маркеров (ИЛ-10),
  - Д) показатели гемостаза (активированное частичное тромбопластиновое время, концентрация фибриногена, протромбин по Квику, активность антитромбина III, продолжительность XIIIa-зависимого фибринолиза),
12. фиксирование очагов инфекции, запись результатов микробиологических исследований (посевы крови, БАЛ, зева, мочи, ран, ликвора) запись данных компьютерной томографии, магнитно-резонансной томографии различных органов,
13. регистрация исходов: 28-дневная выживаемость, исход инфекционного процесса, частота инфекционных осложнений, длительность пребывания больного в отделении реанимации, длительность применения вазопрессоров (общее количество часов).

### **5.4. Досрочное завершение исследования.**

Исследование должно быть завершено досрочно в том случае, если:

При выявлении после терапии ММСК тяжелых нежелательных явлений, делающих ее дальнейшее применение недопустимым с этической точки зрения.

При получении новой информации, свидетельствующей о высоком риске лечения для участников исследования.

При наступлении обстоятельств, расцениваемых как «форс-мажор».

Таблица 13. Расписание процедур исследования.

| Процедура  | Визит 1<br>День 1 | Визит 2<br>День 2 | Визит 3<br>День 3 | Визит 4<br>День 7 | Визит 5<br>День 14 | Визит 6<br>День 21 | Визит 7<br>День 28 |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Демографические данные   | +                 |                   |                   |                   |                    |                    |                    |
| История заболевания/<br>предшествующего лечения                      | +                 |                   |                   |                   |                    |                    |                    |
| Физикальное обследование   | +                 | +                 | +                 | +                 | +                  | +                  | +                  |
| Исход инфекционного процесса   |                   |                   |                   |                   |                    |                    | +                  |
| Гемодинамические показатели  | +                 | +                 | +                 | +                 | +                  | +                  | +                  |
| Пульс-оксиметрия, PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>                 | +                 | +                 | +                 | +                 | +                  | +                  | +                  |
| Оценка баллов по шкалам<br>APACHE II и SOFA                          | +                 | +                 | +                 | +                 | +                  | +                  | +                  |
| Клинический анализ крови   | +                 | +                 | +                 | +                 | +                  | +                  | +                  |
| Оценка свертывания крови   | +                 | +                 | +                 | +                 | +                  | +                  | +                  |
| Биохимический анализ крови   | +                 | +                 | +                 | +                 | +                  | +                  | +                  |
| Газовый состав артериальной<br>крови                                 | +                 | +                 | +                 | +                 | +                  | +                  | +                  |
| Маркеры воспаления   | +                 | +                 | +                 | +                 | +                  | +                  | +                  |
| Регистрация сопутствующей<br>терапии (ИВЛ, ЗПТ и т.д.)               | +                 | +                 | +                 | +                 | +                  | +                  | +                  |
| Регистрация очагов инфекции,<br>данных микробиологических<br>посевов | +                 | +                 | +                 | +                 | +                  | +                  | +                  |
| Регистрация нежелательных<br>явлений                                 | +                 | +                 | +                 | +                 | +                  | +                  | +                  |
| Регистрация исходов  |                   |                   |                   |                   |                    |                    | +                  |

## 6. Критерии включения и исключения больных из исследования

### 6.1. Критерии включения

Критериями включения в проспективное рандомизированное исследование по изучению эффективности ММСК при СШ:

- установленный диагноз СШ;
- наличие в момент развития СШ миелотоксического агранулоцитоза;
- промежуток времени не более 10 ч от начала развития СШ;
- подписанное больным информированное согласие;
- вероятная продолжительность жизни по заболеванию системы крови более 1 мес.
- в течение 28 дней после включения в исследование не должна была проводиться циторедуктивная или иммуносупрессивная терапия

### 6.2. Критерии исключения:

- беременность

- отказ от участия в исследовании и подписания информированного согласия;
- больные с рефрактерным к химиотерапии течением опухолевого заболевания системы крови,
- больные с рецидивом опухолевого заболевания системы крови
- больные, получающие паллиативную химиотерапию
- больные с СШ, возникшим вне агранулоцитоза.

### **6.3. Диагностика септического шока**

Диагноз СШ устанавливается при выявлении сепсиса, протекающего с признаками нарушения органной перфузии и артериальной гипотензией, сохраняющейся, несмотря на инфузию адекватных объемов жидкости, и требующей для своей коррекции введения инотропных и/или вазопрессорных препаратов [Surviving Sepsis Campaign, 2012, Сепсис в начале XXI века, метод. рекомендации РАСХИ, Москва, 2004]. Критериями СШ являются гипертермия  $>38,5^{\circ}\text{C}$ , частота сердечных сокращений более 90 в 1 мин, тахипноэ более 30 в 1 мин., сывороточная концентрация СРБ  $>10$  мг/л, концентрация ПКТ сыворотки крови более 10 нг/мл при определении полуколичественным методом, наличие признаков нарушения тканевой перфузии (повышение содержания лактата в артериальной крови более 2,5 ммоль/л, метаболический ацидоз с  $\text{pH} \leq 7,3$ , дефицит оснований больше 5 ммоль/л).

Под артериальной гипотензией понимается снижение систолического АД ниже 90 мм рт.ст. в течение более 1 часа, сохраняющееся несмотря на адекватную инфузионную терапию. Критерием адекватности проводимой инфузионной терапии считается повышение центрального венозного давления до 12 мм рт.ст., нормализацию индекса глобального конечно-диастолического объема по данным транспульмональной термодилуции.

Наличие бактериемии - не обязательное условие для диагностики СШ. Считается, что больной выведен из состояния СШ, если в течение суток без введения инотропных или вазопрессорных препаратов и волевической нагрузки систолическое АД стабилизировалось на цифрах не ниже 90 мм рт.ст., и исчезли признаки нарушения тканевой перфузии.

Под ОПН понимают олигурию (диурез  $<0,5$  мл/кг/ч) и/или повышение уровня креатинина сыворотки более 0,2 ммоль/л).

Печеночная дисфункция диагностируется при выявлении гипербилирубинемии  $>70$  мкмоль/л и/или повышения уровня трансаминаз в два раза и более от нормы.

Критериями ОДН являются тахипноэ (число дыханий в покое более 30 в 1 мин.), артериальная гипоксемия ( $\text{PaO}_2 < 60$  мм рт.ст.) или гиперкапния ( $\text{PaCO}_2 > 50$  мм рт.ст.) при дыхании воздухом, появление обширного двустороннего поражения легких по рентгенологическим данным при отсутствии клинических признаков первичной сердечной недостаточности и хронического заболевания легких.

Выраженность дыхательной недостаточности оценивается у больных по уровню респираторного индекса, вычисляемого по формуле  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ , где  $\text{PaO}_2$  - это напряжения кислорода в артериальной крови, а  $\text{FiO}_2$  - процентное содержание кислорода во вдыхаемой смеси, выраженное в долях единицы. В норме этот показатель превышает 350-400 мм рт. ст.

Некротическую энтеропатию диагностируют при появлении метеоризма, болей в животе, диареи при отсутствии признаков острого панкреатита.

## **7. Конечный результат исследования**

Оценка эффективности терапии МСК:

- оценка 28-дневной выживаемости,
- оценка жизненных показателей в течение четырех недель после включения в протокол,
- данные лабораторных исследований (гемограмма, биохимический анализ крови, коагулограмма, газы крови, лактат артериальной крови, маркеры воспаления),
- длительность применения вазопрессоров (общее количество часов),
- динамика параметров полиорганной недостаточности,
- исход инфекционного процесса, частота инфекционных осложнений,
- динамика тяжести состояния пациента, определяемая по шкалам APACHE II и SOFA.

## Список литературы.

1. Программное лечение заболеваний системы крови. Сборник алгоритмов диагностики и протоколов лечения заболеваний системы крови. Том II. Под ред. В. Г. Савченко. — М.: Практика, 2012. — 1056 с.
2. Аверьянов А.В., Коноплянников А.Г., Забозлаев Ф.Г., Сорокина А.С., Акульшин Д.А., Кузовлев О.П., Гельфанд Б.Р., Проценко Д.Н., Цыб А.Ф. Эффекты комбинированного лечения аллогенными мезенхимальными стволовыми клетками костного мозга и эритропоэтином в экспериментальной модели сепсиса. Инфекции в хирургии. 2012. N 4: С.43-48.
3. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. Издание 2-е дополненное. - М.: Издательство “Ньюдиамед”, 2001. - 296 С.
4. Белобородова Н.В., Туманян М.Р., Черневская Е.А., и др. Современные биомаркеры инфекции в кардиохирургии новорожденных. Детские болезни сердца и сосудов. 2009 г;1: 48-56.
5. Богомолов А.В., Кукушкин Ю.А. Технология ROC-анализа качества диагностических медико-биологических исследований. Материалы VII международной научной конференции «Системный анализ в медицине» (САМ 2013). Под общ.ред. В.П.Колосова. Благовещенск, 2013. 167 с.:7-11.
6. Вельков В.В. Пресепсин — ранний и высокоспецифичный маркер сепсиса: новые возможности. Научно-практический журнал «Клинико-лабораторный консилиум» №3–4 (50) декабрь 2014; стр.4-31.
7. Галстян Г.М., Городецкий В.М., Васильев С.А, Орел Е.Б. Способ диагностики сепсиса с помощью ХПа-зависимого фибринолиза. Патент на изобретение № 2185524 от 02.07 2002 г.
8. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика.1998 г. 459 с.
9. Кречетова А.В. Нарушение гемостаза при сепсисе у онкогематологических больных с миелотоксическим агранулоцитозом: автореферат дис. кандидата медицинских наук. Москва, 2011 25 с.: 9 11-2/380
10. Петинати Н. А. Профилактика реакции трансплантат против хозяина у больных гемобластозами после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток с помощью мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток донора: Автореф. дис. канд. мед. наук. М., 2013.

11. Савченко В.Г., Дризе Н.И., Ольшанская Ю.В., Момотюк К.С., Свиная Д.А., Шипунова И.Н. Основные свойства мезенхимных стромальных клеток из костного мозга доноров: поверхностные маркеры. Терапевтический архив, 2010. N 7: С.52-56.
12. Смирнов. А.В. Заместительная почечная терапия. Журнал "Нефрология", 2011, том 15, №1, с. 33-46.
13. Стецюк Е.А. Основы гемодиализа. Под ред. проф. Е.Б. Мазо. Гэотар-Мед, 2001.
14. Федоров В.Д., Воробьев А.И., Гостищев В.К., Гельфанд Б.Р., Ерюхин И.А. и др. Сепсис в начале XXI века: классификация, клиничко-диагностическая концепция и лечение. Российская ассоциация специалистов по хирургической инфекции (РАСХИ). Методические рекомендации. Москва, 2004. Стр.130.
15. Aggarwal S., Pittenger M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood. 2005 105(4): 1815–1822.
16. Agilli M., Sener I., Yesildal F. et al. A new marker for the diagnosis of sepsis: Presepsin. J Investig Biochem. 2012; 1(1):55-57.
17. Angus D.C., Linde-Zwirble W.T., Lidicker J. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Critical Care Medicine 2001, 29(7):1303-1310.
18. Antal-Szalmas P. Evaluation of cD14 in host defense. J clin Invest 2000; 30: 167–179.
19. Bakker J., Nijsten M. WN. Jansen T.S. Clinical use of lactate monitoring in critically ill patients. Annals of Intensive Care 2013, 3:12 doi:10.1186/2110-5820-3-12.
20. Bas S., Gauthier B.R., Spenato U. et al. cD14 is an acute phase protein. J Immunol 2004; 172: 4470–4479.
21. Bernard G.R., Vincent J-L., Laterre P-F., et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. N. Engl. J. Med. 2001; 344: 699-709.
22. Brandau S., Jakob M., Bruderek K. et al. Mesenchymal stem cells augment the anti-bacterial activity of neutrophil granulocytes. PLoS One. 2014 9(9): e106903.
23. Brunkhorst F.M., Wegscheider K., Forycki Z.F., Brunkhorst R. Procalcitonin for early diagnosis and differentiation of SIRS, sepsis, severe sepsis, and septic shock. Intensive Care Med. 2000; 26:148-152.
24. Caplan A. I. Mesenchymal stem cells. J. Orthop. Res. 1991 9(5): 641–650.
25. Cassatella M.A. The neutrophil: one of the cellular targets of interleukin-10. Int. J. Clin. Lab. Res 1998;28:148–161
26. Charles P.E, Ladoire S., Aho S. Serum procalcitonin elevation in critically ill patients at the onset

- of bacteremia caused by either Gram negative or Gram positive bacteria. *BMC Infect Dis.* 2008; 8:38.
27. Chen C.-P., Tsai P.-S., Huang C.-J. Antiinflammation effect of human placental multipotent mesenchymal stromal cells is mediated by prostaglandin E2 via a myeloid differentiation primary response gene 88-dependent pathway. *Anesthesiology.* 2012 117(3): 568–579.
  28. Chenevier-Gobeaux C. et al. Presepsin: analytical performances, reference values and early pattern of release of a new sepsis biomarker. *IFCC, 2013 (Poster).*
  29. Chenevier-Gobeaux C., Trabattoni E., Roelens M. et al. Presepsin (sCD14-ST) in emergency department: the need for adapted threshold values? *Clin.Chim.Acta.*2014; 427: 34–36.
  30. Cheval C., Timsit J.F., Garrouste-Orgeas M. et al. Procalcitonin (PCT) is useful in predicting the bacterial origin of an acute circulatory failure in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2000; 26:153-158.
  31. Chien M.H., Bien M.Y., Ku C.C., Chang Y.C., Pao H.Y., Yang Y.L., Hsiao M., Chen C.L., Ho J.H. Systemic human orbital fat-derived stem/stromal cell transplantation ameliorates acute inflammation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Crit Care Med.* 2012; 40(4):1245-53.
  32. Christofilopoulou S., Charvalos E., Petrikkos G. Could procalcitonin be a predictive biological marker in systemic fungal infections? Study of 14 cases. *Eur J Intern Med.*2002 Dec;13(8):493-495.
  33. Cribbs S.K., Matthay M. A., Martin G.S. Stem cells in sepsis and acute lung injury *Crit Care Med* 2010; 38: 2379 –2385.
  34. Crisostomo P.R., Wang M., Herring C.M., Morrell E.D., Seshadri P., Meldrum K.K., Meldrum D.R. Sex dimorphisms in activated mesenchymal stem cell function. *Shock.* 2006; 26 (6):571-4.
  35. de Bont ES, Vellenga E, Swaanenburg JC, Fidler V, Visser-van Brummen PJ, Kamps WA. Plasma IL-8 and IL-6 levels can be used to define a group with low risk of septicaemia among cancer patients with fever and neutropenia. *Br J Haematol* 1999;107:375-380.
  36. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb S, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R; Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including The Pediatric Subgroup. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med.* 2013 Feb; 39(2):165-228.



37. Di Ianni M., Del Papa B., De Ioanni M., Moretti L., Bonifacio E., Cecchini D., Sportoletti P., Falzetti F., Tabilio A. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Exp Hematol.* 2008; 36 (3): 309-18
38. Ding L., Morrison S.J. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature.* 2013 495(7440): 231–235.
39. Doan P.L., Chute J.P. The vascular niche: home for normal and malignant hematopoietic stem cells. *Leukemia.* 2012 26(1): 54–62.
40. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006 8(4): 315–317.
41. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., and Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy,*2006. 8, 315-317.
42. Dziarski R., Tapping R.I., Tobias P.S. Binding of bacterial peptidoglycan to cD14. *J Biol chem* 1998; 273: 8680–8690.
43. Endo S, Suzuki Y, Takahashi G, et al. Usefulness of presepsin in the diagnosis of sepsis in a multicenter prospective study. *J Infect Chemother* 2012; 18 (6): 891– 7.
44. Endo S., Suzuki Y., Takahashi G. Presepsin as a powerful monitoring tool for the prognosis and treatment of sepsis: a multicenter prospective study. *J Infect Chemother.* 2014 Jan;20(1):30-4.
45. Engel A., Mack E., Kern P., Kern W.V. An analysis of interleukin-8, interleukin-6 and C-reactive protein serum concentrations to predict fever, gram-negative bacteremia and complicated infection in neutropenic cancer patients. *Infection* 1998; 26: 213-221.
46. Friedenstein A.J., Petrakova K. V, Kurolesova A.I. et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968 6(2): 230–247.
47. Fukui Y., Okamura Y. Clinical performance of a point-of-care assay for measurement of presepsin in patients with bacteremia. *Critical Care.* 2013; 17 (Suppl 4): P58.
48. Gebler A., Zabel O., Seliger B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends Mol. Med.* 2012 18(2): 128–134.
49. Gonzalez-Rey E., Anderson P., Gonzalez M.A., Rico L., Buscher D., Delgado M. Gonzalez-Rey E., Anderson P., Gonzalez M.A. et al. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut* 2009;58:929-39

50. Greenbaum A., Hsu Y.-M.S., Day R.B. et al. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature*. 2013 495(7440): 227–230.
51. Gronlykke L., Brandstrup S.L., Perner A. Data from clinical database on septic shock are valid. *Dan Med J*. 2012 Oct;59(10):A452
52. Guerrouahen B.S., Al-Hijji I., Tabrizi A.R. Osteoblastic and vascular endothelial niches, their control on normal hematopoietic stem cells, and their consequences on the development of leukemia. *Stem Cells Int*. 2011 2011 375857.
53. Gupta N., Su X., Popov B., Lee J.W., Serikov V., Matthay M.A. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J Immunol* 2007; 179: 1855–1863
54. Hall S.R., Tsoyi K., Ith B., Padera R.F., Lederer J.A., Wang Z., Liu X., Perrella M.A. Mesenchymal Stromal Cells Improve Survival During Sepsis in the Absence of Heme Oxygenase-1: The Importance of Neutrophils Stem Cells. 2013; 31(2):397-407.
55. Hasebe A., Mu H.H., Washburn L.R. Inflammatory lipoproteins purified from a toxigenic and arthritogenic strain of *Mycoplasma arthritidis* are dependent on Toll-like receptor 2 and CD14. *Infect. Immun*. 2007; 75 (4): 1820–1826
56. Haziot A., Chen S., Ferrero E. et al. The monocyte differentiation antigen, cD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J Immunol* 1988; 141: 547–552.
57. Horwitz E.M., Le Blanc K., Dominici M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005 7(5): 393–395.
58. Hotchkiss R. S., Karl I.E. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003; 348(2):138–150.
59. Inrona M., Lucchini G., Dander E., Galimberti S., Rovelli A. Treatment of graft versus host disease with mesenchymal stromal cells: a phase I study on 40 adult and pediatric patients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Mar; 20(3): 375-81.
60. Inrona M., Rambaldi A. Mesenchymal stromal cells for prevention and treatment of graft-versus-host disease: successes and hurdles. *Curr. Opin. Organ Transplant*. 2015 20(1): 72–78.
61. Jeddi R., Achour M., Amor R.B., Aissaoui L., Bouterâa W. et al. Factors associated with severe sepsis: prospective study of 94 neutropenic febrile episodes. *Hematology*. 2010 Feb; 15(1):28-32.
62. Jimeno A., García-Velasco A., del Val O. . Assessment of procalcitonin as a diagnostic and prognostic marker in patients with solid tumors and febrile neutropenia. *Cancer*. 2004;100:2462-2469.

63. Jones B.J. and McTaggart S.J. Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic. *Exp. Hematol.* 2008 36(6): 733–741.
64. Jones B.J, Brooke G., Atkinson K., McTaggart S.J. Immunosuppression by placental indoleamine 2,3-dioxygenase: a role for mesenchymal stem cells. *Placenta.* 2007 Nov-Dec;28(11-12):1174-81.
65. Kaur K., Mahajan R., Tanwar A. A novel marker procalcitonin may help stem the antibiotic overuse in emergency setting *Int J Appl Basic Med Res.* 2013 Jul; 3(2):77-83. doi: 10.4103/2229-516X.117051.
66. Kibe S., Adams K., Barlow G. Diagnostic and prognostic biomarkers of sepsis in critical care. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* Volume 66, Issue suppl 2: 33—44.
67. Kim D.Y., Lee Y., Ahn S., Chun Y.H. The Usefulness of Procalcitonin and C-Reactive Protein as Early Diagnostic Markers of Bacteremia in Cancer Patients with Febrile Neutropenia *Cancer Res Treat.* 2011. Sep; 43(3): 176–180.
68. Kinnaird T., Stabile E., Burnett M.S., Lee C.W., Barr S., Fuchs S., Epstein S.E. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res.* 2004; 19; 94 (5): 678-85.
69. Kitanovski L., Jazbec J., Hojker S., Derganc M. Diagnostic accuracy of lipopolysaccharide-binding protein for predicting bacteremia/clinical sepsis in children with febrile neutropenia: comparison with interleukin-6, procalcitonin, and C-reactive protein. *Support Care Cancer.* 2014 Jan; 22(1):269-77.
70. Knaus W.A., Draper E.A., Wagner D.P., Zimmerman J.E. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med.* 1985;13(10):818–29.
71. Knaus W.A. Mortality risk prediction in sepsis. *Crit Care Med.* 1995 Oct; 23(10): 1793-4.
72. Kojika M., Takahashi G., Matsumoto N., Kikkawa T., Hoshikawa K., Shioya N., Shibata S, Suzuki Y, Aoki H, Shirakawa K, Endo S. Serum levels of soluble CD14 subtype reflect the APACHE II and SOFA Scores. *Medical Postgraduates* 2010 Jan; 48(1): 46-50.
73. Krampera M., Pizzolo G., Aprili G. et al. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone.* 2006 39(4): 678–683.
74. Krasnodembskaya A., Samarani G., Song Y., Zhuo H., Su X., Lee J.W., Gupta N., Petrini M., Matthay M.A. Human mesenchymal stem cells reduce mortality and bacteremia in gram-negative sepsis in mice in part by enhancing the phagocytic activity of blood monocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012; 302:L1003-L1013.

75. Krasnodembskaya A., Song Y., Fang X., Gupta N., Serikov V., Lee J.W., Matthay M.A. Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem Cells* 2010; 28:2229-38.
76. Kuzmina L.A., Petinati N.A., Parovichnikova E.N. et al. Multipotent Mesenchymal Stromal Cells for the Prophylaxis of Acute Graft-versus-Host Disease-A Phase II Study. *Stem Cells Int.* 2012 2012 968213.
77. Lalu M.M., McIntyre L., Lamontagne F., Bains J., Mei S.H.J., Fergusson D., Winston B. W., Marshall J.C., Walley K. R., Courtman D., Stewart D. J. Systematic Review And Meta-Analysis Of Mesenchymal Stromal Cells In Pre-Clinical Models Of Septic Shock *Am J Respir Crit Care Med* 185;2012:A2215, [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org)
78. Le Blanc K., Rasmusson I., Sundberg B., Gotherstrom C., Hassan M. et al Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*,2004; 363, 1439-1441.
79. Lee J.W., Fang X., Gupta N., Serikov V., Matthay M.A. Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of E. coli endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung. *Proc Nat Acad Sci U S A* 2009; 106: 16357–16362
80. Lee R.H., Pulin A.A., Seo M.J. et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell.* 2009 5(1): 54–63.
81. Lee R.H., Seo M.J., Reger R.L. et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006 103(46): 17438–17443.
82. Lim J.H., Lee M.H., Yi H.G. et al. Mesenchymal stromal cells for steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a report of two cases. *Int. J. Hematol.* 2010 92(1): 204–207.
83. Liu B., Chen YX., Yin Q. Diagnostic value and prognostic evaluation of Presepsin for sepsis in an emergency department. *Critical Care* 2013, 17:R244
84. Lolis E, Bucala R. Therapeutic approaches to innate immunity: severe sepsis and septic shock. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2:635–645.
85. Luo C.J., Zhang F.J., Zhang L., Geng Y.Q., Li Q.G., Hong Q., Fu B., Zhu F., Cui S.Y., Feng Z., Sun X.F., Chen X.M. Mesenchymal stem cells ameliorate sepsis-associated acute kidney injury in mice. *Shock.* 2014;41(2):123-9.
86. Maccario R., Podesta M., Moretta A., Cometa A., Comoli P., Montagna D., Daudt L., Ibatici A., Piaggio G., Pozzi S., Frassoni F., Locatelli F. Interaction of human mesenchymal stem cells with

- cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*. 2005 ; 90
87. Magawa A., Uozum E., Shoita Y., Shiraishi R., Kezawa A., Morita S. Presepsin level in renal dysfunction and hemodialysis patients. *Japanese Journal of Medical Technology* Vol. 64(2015)No. 2p. 169-172
  88. Majumdar M.K., Keane-Moore M., Buyaner D. et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Sci.* 10(2): 228–241.
  89. Manukyan M.C., Weil B.R., Wang Y. et al. Female stem cells are superior to males in preserving myocardial function following endotoxemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011; 300:R1506.
  90. Masson S., Caironi P., Spanuth E. et al. Presepsin (soluble CD14 subtype) and procalcitonin levels for mortality prediction in sepsis: data from the Albumin Italian Outcome Sepsis trial // *Crit. Care*. 2014. Jan 7; 18 (1): R6.
  91. Maurice M., Nafea D., Sawy M.E., Soelam R., Youssef S.. Usefulness of Presepsin (Soluble CD14 Subtype) as a Diagnostic Marker of Sepsis in Egyptian Patients with Acute Myeloid Leukemia. *American Journal of Molecular Biology*, 2014
  92. Mei S.H., Haitzma J.J., Dos Santos C.C., Deng Y., Lai P.F., Slutsky A.S., Liles W.C., Stewart D.J. Mesenchymal Stem Cells Reduce Inflammation while Enhancing Bacterial Clearance and Improving Survival in Sepsis *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182 (8):1047-5
  93. Meidani M., Khorvash F., Abolghasemi H., Jamali B.. Procalcitonin and quantitative C-reactive protein role in the early diagnosis of sepsis in patients with febrile neutropenia. *South Asian J Cancer*. 2013 Oct-Dec; 2(4): 216–219.
  94. Miyahara Y., Nagaya N., Kataoka M. et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat. Med.* 2006 12(4): 459–465.
  95. Mukonoweshuro B., Brown C.J., Fisher J. et al. Immunogenicity of undifferentiated and differentiated allogeneic mouse mesenchymal stem cells. *J. Tissue Eng.* 2014 5 2041731414534255.
  96. Murphy M.B., Moncivais K., Caplan A.I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp. Mol. Med.* 2013 45 e54.
  97. Nagata T., Yasuda Y., Ando M., Abe T., Katsuno T. Clinical Impact of Kidney Function on Presepsin Levels *PLoS ONE* 10(6): e0129159. doi:10.1371/journal.pone.0129159
  98. Nakamura Y., Ishikura H., Nishida T., Kawanno Y., Yuge R. et al. Usefulness of presepsin in the diagnosis of sepsis in acute kidney injury patients. *Crit Care*. 2013; 17(Suppl 2): P36.

99. Namendys-Silva S.A., González-Herrera M.O., García-Guillén F.J., Texcocano-Becerra J., Herrera-Gómez A. Outcome of critically ill patients with hematological malignancies *Ann Hematol.* 2013; 92: 699–705.
100. Nauta A.J., Westerhuis G., Kruisselbrink A.B. et al. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood.* 2006 108(6): 2114–2120.
101. Németh K., Leelahavanichkul A., Yuen P.S., Mayer B., Parmelee A., Doi K., Robey P.G., Leelahavanichkul K., Koller B.H., Brown J.M., Hu X., Jelinek I., Star R.A., Mezey E. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med.* 2009; 15 (1): 42-9.
102. Novelli G., Morabito V., Ferretti G. et al. Pathfast Presepsin Assay for Early Diagnosis of Bacterial Infections in Surgical Patients: Preliminary Study // *Transplant. Proc.* 2013; 45 (7): 2750–2753.
103. Oberhoffer M., Russwurm S., Bredle D., et al. Discriminative power of inflammatory markers for prediction of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 in ICU patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS) or sepsis at arbitrary time points. *Intensive Care Med.* 2000; 26:170-174.
104. Oberhoffer M, Vogelsang H, Russwurm S, Hartung T, Reinhart K. Outcome prediction by traditional and new markers of inflammation in patients with sepsis. *Clin Chem Lab Med.* 1999 Mar; 37(3): 363-8.
105. Okamura Y., Yokoi H. Development of a point-of-care assay system for measurement of presepsin (scD14-ST). *Clin chim acta* ,2011; 412 (23–24): 2157–2161.
106. Olad E., Sedighi I., Mehrvar A., Tashvighi M., Fallahzad V., Presepsin (Scd14) as a Marker of Serious Bacterial Infections in Chemotherapy Induced Severe Neutropenia *Iran J Pediatr.* 2014. Dec; 24(6): 715–722.
107. Ortega M., Rovira M., Almela M., de la Bellacasa J.P., Carreras E., Mensa J. Measurement of C-reactive protein in adults with febrile neutropenia after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2004 Apr; 33(7): 741-4.
108. Ortiz L.A., Gambelli F., McBride C. et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003 100(14): 8407–8411.

109. Osuchowski M.F., Welch K., Siddiqui J., Remick D.G. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the sirs/cars continuum in sepsis and predict mortality. *J Immunol* 2006; 177: 1967–1974.
110. Panetta N.J., Gupta D.M., Longaker M.T. Bone regeneration and repair. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 2010 5(2): 122–128.
111. Parekkadan B. and Milwid J.M. Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2010 12 87–117.
112. Parekkadan B., van Poll D., Suganuma K. et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One.* 2007 2(9): e941.
113. Parsa M., Najafi S.N., i JafariN. J., Mohraz M., Ghavamzadeh A., Bahar B., Izadi M., Radfar M.H, Ghofrani H. Diagnostic Relevance of Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor Alpha in Discriminating High Risk and Low Risk Groups in Febrile Patients with Neutropenia. *Journal of Biological Sciences*2007; 7: 338-342.
114. Pierrakos C, Vincent JL: Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care* 2010, 14(1):R15.
115. Póvoa P.,Souza-Dantas V.C.,Soares M.,Salluh J.F. C-reactive protein in critically ill cancer patients with sepsis: influence of neutropenia. *Crit Care.*2011;15(3): R129. doi: 10.1186/cc10242.
116. Ranieri V. M., Thompson B T., Philip S. B. et al. Drotrecogin Alfa (Activated) in Adults with Septic Shock. *The New England journal of medicine.*2012; vol. 366: no. 22.
117. Remick DG. Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol.* 2007; 170(5):1435–1444.
118. Ringden O., Le Blanc K. Mesenchymal stem cells for treatment of acute and chronic graft-versus-host disease, tissue toxicity and hemorrhages. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2011 24(1): 65–72.
119. Rintala EM, Aittoniemi J, Laine S., et al. Early identification of bacteremia by biochemical markers of systemic inflammation. *Scand J Clin Lab Invest* 2001; 61: 523-530.
120. Romualdo L. G., Torrella P. E., González M. V. Diagnostic accuracy of presepsin (soluble CD14 subtype) for prediction of bacteremia in patients with systemic inflammatory response syndrome in the Emergency Department. *Clin.Biochem.* 2014; 47 (7–8): 505–508.
121. Sakka S.G., Rühl C.C., Pfeiffer U.J., Beale R., McLuckie A., Reinhart K. et al. Assessment of cardiac preload and extravascular lung water by single transpulmonary thermodilution. *Intensive Care Med.* 2000; 26(2):180–7.
122. Sakr Y.,Sponholz C.,Tuche F.,Brunkhorst F,Reinhart K. The role of procalcitonin in febrile neutropenic patients: review of the literature. *Infection.*2008 Oct;36(5):396-407. doi: 10.1007/s15010-008-7374-y. Epub 2008 Aug 30.

123. Sargentini V., Ceccarelli G., D'Alessandro M. et al. Presepsin as a potential marker for bacterial infection relapse in critical care patients. A preliminary study. *Clin Chem Lab Med.* 2015 Mar;53(4):567-73.
124. Schoenberg MH, Weiss M, Radermacher P. Outcome of patients with sepsis and septic shock after ICU treatment. *Langenbecks Arch Surg.* 1998 Mar; 383(1):44-8.
125. Schuetz P., Albrich W., Mueller B. Procalcitonin for diagnosis of infection and guide to antibiotic decisions: past, present and future. *BMC Medicine* 2011, 9:107
126. Shapiro N, Howell MD, Talmor D, et al. Serum lactate as a predictor of mortality in emergency medicine patients with infection. *Ann Emerg Med.* 2005; 45:524-528.
127. Shin S., Kim Y., Jeong S., Hong S., Kim I., Lee W., Choi S. The therapeutic effect of human adult stem cells derived from adipose tissue in endotoxemic rat model. *Int J Med Sci.* 2013; 10 (1):8-18.
128. Shirakawa K. Diagnosis of Respiratory Tract Infectious Disease using urine specimens. European Patent Application EP 2 711 710 A1.
129. Shozushima T., Takahashi G., Matsumoto N. et al. Usefulness of presepsin (sCD14- ST) measurements as a marker for the diagnosis and severity of sepsis that satisfied diagnostic criteria of systemic inflammatory response syndrome. *Journal of Infection and Chemotherapy* 2011, 17(6):764-769.
130. Spaggiari G.M., Capobianco A., Abdelrazik H., Becchetti F., Mingari M.C., Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: Role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 2008; 111: 1327-33.
131. Spanuth E., Ebelt H., Ivandic B. et al. Diagnostic and prognostic value of presepsin (soluble CD14 subtype) in emergency patients with early sepsis using the new assay PATHFAST Presepsin. 21st International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2011. Poster 0333.
132. Stagg J., Galipeau J. Mechanisms of Immune Modulation by Mesenchymal Stromal Cells and Clinical Translation. *Curr. Mol. Med.* 2013 13(5): 856–867.
133. Tayman C., Uckan D., Kilic E. et al. Mesenchymal stem cell therapy in necrotizing enterocolitis: a rat study. *Pediatr. Res.* 2011 70(5): 489–494.
134. Thorgersen E.B., Pischke S.E., Barratt-Due A. et al. Systemic CD14 inhibition attenuates organ inflammation in porcine *Escherichia coli* sepsis. *Infect Immun* 2013, 81:3173–3181.
135. Tögel F., Hu Z., Weiss K. et al. Administered mesenchymal stem cells protect against



- ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2005 289(1): F31–F42.
136. Tolsma V, Schwebel C, Azoulay E, Darmon M, Souweine B, Vesin A, Goldgran-Toledano D, Lugosi M, Jamali S, Cheval C, Adrie C, Kallel H, Descorps-Declere A, Garrouste-Orgeas M, Bouadma L, Timsit JF. Sepsis severe or septic shock: outcome according to immune status and immunodeficiency profile. *Chest.* 2014; 146 (5):1205-13.
137. Tyndall A., Pistoia V. Mesenchymal stem cells combat sepsis. *Nat. Med.* 2009 15(1): 18–20.
138. Ulla M., Pizzolato E., Lucchiari M. et al. Diagnostic and prognostic value of Presepsin in the management of sepsis in the emergency department: a multicentre prospective study // *Crit. Care.* 2013; 17 (4): R168.
139. Urbonas V., Eidukaite A., Tamulienė I. The predictive value of soluble biomarkers (CD14 subtype, interleukin-2 receptor, human leucocyte antigen-G) and procalcitonin in the detection of bacteremia and sepsis in pediatric oncology patients with chemotherapy-induced febrile neutropenia. *Cytokine* 62 (2013) 34–37.
140. Urbonas V., Eidukaitė A., Tamulienė I. The diagnostic value of interleukin-6 and interleukin-8 for early prediction of bacteremia and sepsis in children with febrile neutropenia and cancer. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2012 Mar; 34(2):122-7.
141. Vincent J-L., de Mendonca A., Cantraine F., Moreno R., Takala J., Suter P. M. et al. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units. *Critical Care Medicine.* 1998. p. 1793–800.
142. Vodnik T., Kaljevic G., Tadicet T. et al. Presepsin (sCD14-ST) in preoperative diagnosis of abdominal sepsis // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013; 51 (10): 2053–2062. 1–10
143. Wang J., Wakeham J., Harkness R., Xing Z. Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. *J. Clin. Invest* 1999; 103:1023–1029.
144. Wannemuehler T.J., Manukyan M.C., Brewster B.D., Rouch J., Poynter J.A., Wang Y., Meldrum D.R. Advances in Mesenchymal Stem Cell Research in Sepsis. *J Surg Res.* 2012; 173(1):113-26.
145. Weil B.R., Herrmann J.L., Abarbanell A.M., Manukyan M.C., Poynter J.A., Meldrum D.R. Intravenous infusion of mesenchymal stem cells is associated with improved myocardial function during endotoxemia. *Shock* 2011; 36: 235-41
146. Weiss D.J., Kolls J.K., Ortiz L.A. et al. Stem cells and cell therapies in lung biology and lung diseases. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2008 5(5): 637–667.
147. Weng J.Y., Du X., Geng S.X., Peng Y.W., Wang Z., Lu Z.S. et al. Mesenchymal stem cell as

- salvage treatment for refractory chronic GVHD. *Bone Marrow Transplantation*, 2010; 45, 1732–1740.
148. Xu J., Woods C.R., Mora A.L., Joodi R., Brigham K.L., Iyer S., Rojas M. Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;293(1):L131-41
149. Yaegashi Y. SK., Sato N., Suzuki Y. et al. Evaluation of a newly identified soluble CD14 subtype as a marker for sepsis. *J Infect Chemother* 2005, 11(5):234-238.
150. Yagi H., Soto-Gutierrez A., Kitagawa Y. et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells attenuate organ injury induced by LPS and burn. *Cell Transplant* 2010;19:823.
151. Zhao S., Wehner R., Bornhäuser M. et al. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells and their therapeutic consequences for immune-mediated disorders. *Stem Cells Dev*. 2010 19(5): 607–614.