



## ارزیابی پارامترهای خونی در بیماران مبتلا به کرونا بعد از سلول درمانی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی جفت

حانیه بخشی (MSc)<sup>۱\*</sup>، مینا صوفی‌زمرد (phd)<sup>۱\*\*</sup>، مسعود سلیمانی (phd)<sup>۱</sup>،

<sup>۱</sup> گروه خون‌شناسی و بانک خون، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۸/۲۰ - پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۱۰/۲۴)

### چکیده

زمینه: با ظهور ویروس SARS COV-2 شاهد مرگ‌ومیر و آسیب‌های متعدد بودیم؛ با توجه به احتمال بروز سویه‌های جدید، نیاز به بهبود رویکردهای درمانی وجود داد. گزارش‌هایی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی جفت (p-MSCs) به عنوان یک رویکرد درمانی وجود دارد. در این مطالعه اثرات درمانی این سلول‌ها را در بیماران مبتلا COVID-19 بررسی کردیم. مواد و روش‌ها: ۹ بیمار مبتلا به COVID-19 شدید و بحرانی با وضعیت انتهایی شدید و بستری در بخش ICU کاندید سلول درمانی شدند. برای هر فرد ۳ دوز تزریق داخل وریدی ۱×۱۰<sup>۶</sup> (سلول/کیلوگرم) p-MSC صورت گرفت. تظاهرات بالینی بیماران و بروز عوارض احتمالی اولیه، سطح پارامترهای خونی و التهابی و ضدالتهابی قبل و بعد از سلول درمانی بررسی شد. یافته‌ها: تمام بیماران تحت درمان تزریق P-MSCs را تحمل کردند و عارضه جانبی حاد مرتبط با درمان مشاهده نشد. سطح PaO<sub>۲</sub>/FiO<sub>۲</sub> بیماران پس از سلول درمانی افزایش قابل توجهی داشت. نتایج تحلیل سطح پارامترهای خونی، التهابی و ضدالتهابی بیماران قبل و بعد از سلول درمانی، کاهش معنادار در سطح RBC و CRP، D-dimer، IL-۶، TNF-α و افزایش پلاکت و IL-۱۰ را نشان داد. تغییرات WBC، لنفوسیت، نوتروفیل، مونوسیت، Hb و PT و پارامترهای بیوشیمیایی سرم و انعقادی فیبرینوژن و همچنین PH، PCO<sub>۲</sub>، Po<sub>۲</sub>، HCO<sub>۳</sub> و sat O<sub>۲</sub> (درصد) از نظر آماری معنادار نبود.

نتیجه‌گیری: بر پایه نتایج، سه دوز تزریق داخل وریدی P-MSCs در بیماران COVID-19 شدید و حاد، سبب بهبود وضعیت التهابی و علائم بالینی شد و تأثیر قابل توجه و معناداری در سطح پارامترهای التهابی و خونی RBC و پلاکت بیماران داشت.

واژگان کلیدی: COVID-19، SARS-CoV-2، سلول درمانی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، P-MSCs، سلول بنیادی مزانشیمی جفت

\*\*تهران، گروه خون‌شناسی و بانک خون، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

## مقدمه

در دهه‌های گذشته ویروس‌های کرونا تهدیدی عمده برای سلامت عمومی در سراسر جهان بوده است. SARS COV-2 (COVID-19) (۱) سویه جدید ویروس کرونا است که اواخر دسامبر سال ۲۰۱۹ در ووهان چین در انسان شناسایی شد (۲ و ۳) که می‌تواند باعث بیماری‌های کشنده در انسان شود. SARS COV-2 به خانواده کرونا ویریده تعلق دارد. SARS-CoV، MERS-CoV<sup>۱</sup> نیز دو عضو دیگر بیماری‌زای این خانواده هستند (۱). SARS COV-2 عضو از جنس بتاکروناویروس بوده که می‌تواند عامل ایجاد پنومونی شدید با علائم بالینی متفاوت باشد. این ویروس عامل بیماری COVID-19<sup>۲</sup> است (۴ و ۵).

COVID-19 یک عفونت تنفسی است که طیف وسیعی از تظاهرات تنفسی و علائم عفونی شامل تب، سرفه خشک، تنگی نفس، پنومونی، ادم ریوی و سندرم زجر تنفسی حاد (ARDS)<sup>۳</sup> را نشان می‌دهد و از بیماری خفیف تا شدید و بحرانی را شامل می‌شود (۶ و ۷). حدود ۷۰ تا ۸۰ درصد بیماران خفیف و ۲۰ تا ۳۰ درصد درجات شدید یا بحرانی بیماری COVID-19 را متحمل می‌شوند. ARDS آسیب ویران‌گر ریه طی یک فرایند التهابی کنترل نشده است که باعث آسیب شدید آلوئول و نشت غشای پایه مویرگی می‌شود، عارضه کشنده COVID-19 و شایع‌ترین علت بستری مراقبت‌های ویژه است.

از نظر بیماری‌زایی، ویروس از طریق قطرات بیماران آلوده وارد بدن انسان می‌شود و عفونت ویروس به دنبال اتصال پروتئین اسپایک به ACE ۲ و سرین پروتئاز سلول میزبان صورت می‌گیرد. ACE ۲ علاوه بر سلول‌های

آلوئولار ریه، به طور گسترده در بافت‌های بدن شامل اپیتلیوم مویرگی، قلب، کبد، کلیه بیان می‌شود و تقریباً همه سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های عضلانی صاف در اندام‌ها ACE ۲ را بیان می‌کنند، بنابراین به محض ورود ویروس به گردش خون، به طور گسترده‌ای گسترش می‌یابد (۸). مشخصه اصلی بیماری‌زایی، سندرم انتشار سایتوکاین (CRS) است (۹). CRS یک پاسخ التهابی سیستمیک مهلک و کنترل نشده ناشی از ترشح مقادیر زیاد سایتوکاین‌های پیش‌التهابی (از جمله IL ۶، ۷، ۲، MCP-1، G-CSF و TNF- $\alpha$ ) است (۱۰ و ۱۱) و عوارض متعددی به دنبال دارد و ممکن است منجر به ادم ریوی، پنومونی، اختلال در عملکرد تبادل هوا، ARDS و مرگ شود (۱۲).

تا به امروز درمان خاصی برای وضعیت التهابی شدید بیماران مبتلا به COVID-19 شدید و بحرانی، که از ARDS نیز رنج می‌برند، وجود ندارد؛ رویکرد درمانی بر مبنای کاهش و تعدیل وضعیت التهابی است. طیف وسیعی از درمان‌ها از جمله سلول‌درمانی با سلول‌های بنیادی پیشنهاد شده است که از سلول‌های عوامل تنظیم کننده سیستم ایمنی هستند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی سلول‌های غیرخون‌ساز هستند که دارای ویژگی خودنوسازی و تمایز چند رده‌اند و در منابع مختلف یافت می‌شوند. این سلول‌ها ظرفیت بازسازی بالایی دارند و ترمیم بافت را تقویت می‌کنند و به دلیل خواص ضد التهابی، ضد میکروبی و تعدیل سیستم ایمنی می‌توانند اثرات درمانی متعددی را در COVID-19 ایجاد کنند (۱۳). برپایه مطالعات، این سلول‌ها ACE-۲ و TMRSS ۲ را بیان نمی‌کنند بنابراین دارای ایمنی طبیعی نسبت به ویروس کرونا

<sup>1</sup> Middle East respiratory syndrome coronavirus

<sup>2</sup> Coronavirus disease 2019

<sup>3</sup> Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)

را بهبود بخشد و مارکرهای التهابی را در برخی موارد COVID-19 بحرانی کاهش دهد (۱۵).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از جفت (P-MSCs)<sup>۴</sup> نسبت به منابع دیگر، به دلیل مزایای قابل توجه از جمله دسترسی آسان، فراوانی سلول‌های بنیادی در بافت اولیه، Cell naivety، خصوصاً ظرفیت تکثیر بالا و فعالیت تلو مرازی پایین، بسیار ایمن هستند و می‌توان با سرعت بیشتری با آن‌ها کار کرد؛ بنابراین می‌توانید مناسبی برای سلول درمانی هستند (۴). تزریق داخل وریدی MSCs حداقل تهاجم را نسبت به دیگر روش‌های سلول درمانی دارد؛ همچنین هنگامی که MSCs از راه وریدی منتقل می‌شوند، اکثر سلول‌ها در ریه‌ها محبوس شده و مقادیر محدودی به سایر اندام‌های اصلی مانند قلب، کلیه‌ها و کبد می‌رسد (اثر عبور اول ریوی) (۱۹).

استفاده از MSCs در مطالعات بالینی به چشم می‌خورد اما مطالعات کمی در مورد پتانسیل P-MSCs در کاهش و تعدیل التهاب بیماران مبتلا به COVID-19 شدید و بحرانی وجود دارد. همچنین گزارش صریحی از روند تغییرات پارامترهای التهابی و هماتولوژیک در سلول درمانی و اثرات تجویز P-MSCs بر پارامترها وجود ندارد. بنابراین این مطالعه با هدف ارزیابی پارامترهای خونی در بیماران مبتلا به کرونا قبل و بعد از سلول درمانی با P-MSCs انجام شده است.

## مواد و روش‌ها

### جمعیت مورد مطالعه

رضایت آگاهانه کتبی از بیماران واجد شرایط برای ورود به مطالعه اخذ گردید. کلیه مراحل مطابق با مقررات مصوب مربوطه، دستورالعمل‌ها و اعلامیه هلسینکی

هستند و خطر آلودگی سلول‌های پیوندی با ویروس وجود ندارد (۱۴).

مطالعات انجام شده در زمینه سلول درمانی COVID-19، تفاوت چشمگیر در منبع MSCs و دوز تجویز را نشان می‌دهند. شایع‌ترین منبع مورد استفاده، بند ناف، ژله وارتون، مغز استخوان و بافت چربی است (۱۵). به عنوان مثال طبق تحقیقاتی که توسط ژانگ (Zhang) و همکاران انجام شده است، نشان داده شد که تزریق یک دوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از وارتون ژلی بندناف انسانی (hWJCs) در غلظت (سلول در هر کیلوگرم  $1 \times 10^6$ ) منجر به کاهش CRP و عوامل التهابی می‌شود (۱۶). نتایج مطالعه لنج (Leng) و همکاران، نشان داد که یک دوز تزریق داخل وریدی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، (سلول مزانشیم در هر کیلوگرم وزن بدن  $1 \times 10^6$ ) در بیماران آلوده به درجات بالینی SARS COV-2 منجر به بهبود نتایج بالینی، افزایش لنفوسیت‌های محیطی و کاهش CRP می‌شود (۱۷). در مطالعه‌ای دیگر بیماران مبتلا به پنومونی شدید COVID-19 تحت درمان با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت آدیپوز از اهداکنندگان داوطلب (سلول مزانشیم بافت آدیپوز در هر کیلوگرم  $0.98 \times 10^6$ ) از طریق لیپوساکشن قرار گرفتند که منجر به بهبود پارامترهای التهابی و افزایش لنفوسیت‌ها شد (۱۸). مطالعه‌ای بیان داشت احتمالاً زمان ایده‌آل برای درمان و تعداد دوز تجویز بر نتیجه سلول درمانی تأثیرگذار است (۱۵). در مطالعه‌ای نشان داده شد که احتمالاً تزریق چندگانه دوز بالای سلول بنیادی مزانشیمی بندناف ( $200 \times 10^6$  سلول در هر تزریق IV) نسبتاً ایمن و قابل تحمل است و می‌تواند علائم تنفسی

<sup>4</sup> Placenta-derived Mesenchymal Stem Cells

۱۳-۲، نیاز به تهویه مکانیکی (تهاجمی یا غیرتهاجمی)، پنومونی تأیید شده توسط RT-PCR یا رادیوگرافی قفسه سینه، بویژه تأیید وضعیت التهابی شدید و سندرم انتشار سایتوکائینی با بررسی CT ریه، به عنوان بیماران واجد شرایط برای سلول درمانی در نظر گرفته شدند. معیارهای ورود و خروج مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. بیماران مدت ۳۰ روز پس از بستری به لحاظ ثبت علائم حیاتی، مرگ و میر، بهبود وضعیت بالینی (از جمله تب، سردرد، تنگی نفس)، بروز عوارض جانبی احتمالی سلول درمانی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

انجام شد. کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تربیت مدرس ۱۴۰۰.۱۵۳ IR. MODARES این مطالعه را تأیید کردند. این کارآزمایی با نام IRCT۲۰۲۰۰۲۱۷۰۴۶۵۲۶N۲ در دفتر ثبت کارآزمایی‌های بالینی ایران ثبت شده است. جامعه آماری شامل بیماران بزرگسال (۹ بیمار) مبتلا به COVID-19 حاد و شدید که التهاب سیستمیک ناشی از CRS داشته و در بخش ICU بیمارستان نیکان بستری بودند، بر اساس معیارهای ورود و خروج مطالعه جدول ۱، کاندید سلول درمانی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی شدند. بیماران با  $SpO_2 / FiO_2 \leq 315$  نمره SOFA بین

جدول ۱) معیارهای ورود و خروج مطالعه جامعه آماری	
معیار ورود به مطالعه	معیار خروج مطالعه
مرد یا زن ۱۵-۷۰ سال	آلرژی یا آلرژی شدید پس از اولین تزریق P-MSCs
رضایت آگاهانه	بیماران مبتلا به تومور بدخیم، سایر بیماری‌های سیستمیک جدی و *Psychosis
پنومونی تأیید شده با رادیوگرافی قفسه سینه (CT) یا ابتلا به عفونت COVID-19 که با qRT-PCR تأیید شده است.	بیماران با سابقه قبلی آمبولی ریه
نمره SOFA ** بین ۲-۱۳ امتیاز	نظر محققان برای شرکت در مطالعه نامناسب باشد (مرگ‌های مورد انتظار در ۲۷ ساعت، عفونت‌های کنترل نشده)
ارزیابی بالینی (شواهد رال **** یا کراکل ***** در معاینه)	امتیاز SOFA کبد یا کلیه، بیش از ۳ امتیاز باشد. همراه با نارسایی سایر ارگان‌ها) نیاز به حمایت اندام (مرحله ۴ بیماری مزمن کلیوی شدید یا نیاز به دیالیز) یعنی نرخ تخمینی فیلتراسیون گلومرولی (eGFR) ** کمتر از ۳۰)
نیاز به تهویه مکانیکی و/یا اکسیژن تکمیلی	پنومونی انسدادی ریه، فیبروز بینابینی شدید ریوی، پروتئینوز آلئولار (proteinosis) alveolar، بیماری التهابی ریه allergic(alveolitis)
تشخیص ARDS با استفاده از تعریف Berlin	استفاده مداوم از عوامل سرکوب‌کننده سیستم ایمنی یا پیوند اعضا در ۶ ماه گذشته.
$PaO_2 / (FiO_2) \leq 300 \text{mmHG}$	احتمال مرگ بیمار در طول ۲۴ ساعت
* Psychosis, ** Sequential Organ Failure Assessment, *** estimated glomerular filtration rate, **** Rales, *****Crackle	

و ادم ریه از علل ایجاد کننده کراکل هستند. اصلی‌ترین نشانه بیماری انسدادی ریه یا COPD شامل مواردی مثل تنگی نفس، سرفه و ایجاد خلط سینه است.

### جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی

تمام مراحل جداسازی، کشت، پاساژ P-MSCs در اتاق تمیز<sup>۵</sup> بیمارستان و شرایط کاملاً استریل و کنترل شده

SOFA از رایج‌ترین و معتبرترین سیستم‌های نمره‌دهی عمومی شدت بیماری در دنیا است. کراکل یا رال یکی از صداهای غیرطبیعی ریوی است که در دم به صورت ناپیوسته (غیرممتد) شنیده می‌شود. رال می‌تواند یک طرفه یا دوطرفه باشد، در قاعده ریه یا بخش‌های فوقانی آن شنیده شود و ضعیف یا شدید باشد. سینه پهلو (پنومونی)، فیبروز ریه، برونشیت، نارسایی احتقانی قلبی

<sup>5</sup> Clean room

طبق اصول GMP<sup>۶</sup> (۲۰) مشابه مطالعه سلطانی و همکاران، انجام شد (۲۱). قسمتی از جفت به اتاق تمیز منتقل شده و تحت هضم آنزیمی با کلاژناز قرار گرفت. در این مرحله P-MSCs جدا شده و سپس کشت سلول‌ها در فلاسک‌های از پیش موجود کوت شده با پلی ال لایزین، حاوی محیط کشت ۱۲ DMEM/F (Gibco) صورت گرفت و به مدت دو هفته مورد کشت و پاساژ قرار گرفتند تا به حد نصاب تعداد لازم برای تزریق برسند. کشت‌های اولیه در انکوباتورهای اتاق تمیز (دما ۳۸ درجه سانتی‌گراد، ۴۴ درصد CO<sub>2</sub>، رطوبت ۹۴ درصد) نگهداری شدند. سلول‌های غیرچسبنده با تعویض محیط کشت از فلاسک کشت سلولی حذف شدند. در تمام مراحل سلول‌ها از نظر کدورت محیط، مورفولوژی، رشد نرمال و عدم وجود آلودگی بررسی می‌شدند.

#### تعیین هویت، ارزیابی کنترل کیفی سلول‌های بنیادی مزانشیمی

بررسی مارکر سطحی به روش فلوسایتومتری و تست تمایز به چربی و استخوان به منظور تعیین هویت سلول‌ها انجام شد. ایمونوفنوتایپینگ P-MSCs از نظر بیان مارکرهای ۱۶۶ CD، ۱۰۵ CD، ۳ CD، ۴۴ CD و عدم بیان ۳۴ CD، ۴۵ CD با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری انجام شد. بطور خلاصه، سلول‌ها در پاساژ ۲ با آنزیم تریپسین (Bio-Idea) برداشت و شمارش شدند. سپس سوسپانسیون سلولی در آلبومین سرم گاو ۳ درصد (GIBCO) تهیه شد (حداقل ۱×۱۰<sup>۵</sup> سلول در ۱۰۰ میکرولیتر). سلول‌ها به مدت ۱ ساعت با آنتی بادی مونوکلونال کونژوگه به فلورسنت علیه مارکرهای سطحی

در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و پس از شست‌وشو با PBS (Sigma Aldrich)، آنالیز فلوسایتومتری نمونه‌ها انجام شد. رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز و Oil red (Sigma Aldrich) به منظور تأیید تمایز به رده استخوانی و چربی انجام شد. به این منظور پس از کشت سلول‌ها در محیط تمایزی مخصوص (محیط تمایزی استخوان و چربی Sigma Aldrich)، القای تمایز به رده استخوانی و چربی صورت گرفت و در نهایت سلول‌ها در روز ۲۱ مورد رنگ‌آمیزی قرار گرفتند و تشکیل رسوب کلسیم و واکوئل چربی ارزیابی شد. ارزیابی کنترل کیفی P-MSCs از نظر زنده ماندن، سترون بودن، سنجش وجود مایکوپلازما و سطح اندوتوکسین، در طول کشت P-MSCs و قبل از تزریق (سلول درمانی)، مشابه مطالعه هاشمیان و همکاران، (۱۵) انجام شد. به منظور ارزیابی زنده ماندن سلول‌ها از آزمایش حذف تریپان بلو<sup>۷</sup> استفاده شد. این آزمایش برای شمارش سلولی و تعیین تعداد سلول‌های زنده موجود در یک سوسپانسیون سلولی استفاده می‌شود. اساس تست بر پایه رنگ‌پذیری سلول مرده است کشت‌های معمول میکروبی و قارچی برای بررسی سترون بودن<sup>۸</sup> و شناسایی آلودگی احتمالی در محصولات نهایی انجام شد. علاوه بر این، سلول‌های کشت شده برای شناسایی گونه‌های مایکوپلازما (روش RT-PCR) و سطح اندوتوکسین (Gel Clot Endotoxin Assay Kit–Gene Script) مورد آزمایش قرار گرفتند. سطح اندوتوکسین نمونه‌ها کمتر از یونیت اندوتوکسین (EU) به ازای هر میلی‌لیتر ۰/۵ قابل قبول در نظر گرفته شد.

<sup>6</sup> Good Manufacturing Practice

<sup>7</sup> Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability

<sup>8</sup> streility

## سلول درمانی

به منظور آماده‌سازی سلول‌ها برای تزریق، در اتاق تمیز و شرایط کاملاً استریل، P-MSCs با تریپسین از کف فلاسک جدا شده و سوسپانسیون سلولی حاوی  $1 \times 10^6$  سلول در ۱۰۰ میلی‌لیتر سرم نمکی<sup>۹</sup> و ۲ درصد آلبومین سرم انسانی تهیه شد و در ظروف استریل و کاملاً سر بسته به بخش ICU بیمارستان جهت سلول درمانی منتقل شد. لازم به ذکر است سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت تازه جفت تهیه و به صورت تازه تزریق شدند. به منظور سلول درمانی بیماران واجد شرایط، سه دوز تزریق داخل وریدی سلول بنیادی مزانشیمی جفت تازه (در روزهای ۱، ۳ و ۵) صورت گرفت. دوز تجویز یک میلیون سلول به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بیماران (سلول در هر کیلو گرم  $1 \times 10^6$ ) تعیین شده بود. این غلظت با در نظر گرفتن مقدار متوسط سلول‌هایی که در متون گذشته قبلی در زمینه سلول‌درمانی COVID-19 گزارش شده بود (۱۶-۱۸) انتخاب شد. به‌طور میانگین با توجه به وزن بیماران، هر بیمار  $80 \times 10^6$  سلول در هر تزریق (سلول در هر تزریق  $240 \times 10^6$ ) و به‌طور کلی سلول در هر تزریق  $240 \times 10^6$  دریافت کرد. در روز سلول درمانی در شرایط استریل پس از ضد عفونی و آماده‌سازی موضع، سلول‌ها از طریق سرنگ ۱۰ میلی‌لیتری به ورید کوبیتال<sup>۱۰</sup> راست

بیماران با سرعت ۳۵ قطره در دقیقه تزریق شدند. لازم به ذکر است سلول درمانی توسط پزشک متخصص انجام شد. بیماران به‌طور منظم جهت ثبت علائم حیاتی و عوارض جانبی احتمالی اولیه از جمله تب، فشارخون، بثورات پوستی، کهیر، عوارض تنفسی یا قلبی عروقی، تنگی نفس ۲۴-۴۸ ساعت پس از تزریق تحت نظر پزشک قرار گرفت. در صورت بروز هرگونه واکنش شدید، مطالعه خاتمه می‌یافت.

## اندازه‌گیری پارامترهای آزمایشگاهی

سطح پارامترهای خونی و بیوشیمیایی سرم بیماران قبل و بعد سلول درمانی، قبل از اولین دوز تزریق و یک روز پس از آخرین تزریق P-MSCs، اندازه‌گیری و ارزیابی شد. آزمایش پارامترخونی شامل شمارش گلبول‌های سفید (WBC)<sup>۱۱</sup>، شمارش گلبول‌های قرمز (RBC)<sup>۱۲</sup>، شمارش پلاکت (PLT)<sup>۱۳</sup>، سطح لنفوسیت، نوتروفیل، مونوسیت، آزمایش هموگلوبین (HB)<sup>۱۴</sup>، آزمایش PT<sup>۱۵</sup> و آزمایش پارامترهای بیوشیمیایی شامل پتاسیم، سدیم، کراتینین (Cr)<sup>۱۶</sup>، نیتروژن اوره خون (BUN)<sup>۱۷</sup>، LDH<sup>۱۸</sup>، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)<sup>۱۹</sup>، آسپارات آمینوترانسفراز (AST)<sup>۲۰</sup>، آلکالن فسفاتاز (ALP)<sup>۲۱</sup>، آلبومین، بیلی‌روبین تام<sup>۲۲</sup> ارزیابی شد.

<sup>9</sup>Normal Saline

<sup>10</sup> cubital

<sup>11</sup> White Blood Cell Count

<sup>12</sup> Red Blood Cell (RBC) Count

<sup>13</sup> Platelet count

<sup>14</sup> Haemoglobin

<sup>15</sup> Prothrombin Time

<sup>16</sup> Creatinine

<sup>17</sup> Blood urea nitrogen (BUN)

<sup>18</sup> Lactate Dehydrogenase

<sup>19</sup> Alanine Aminotransferase OR Alanine transaminase

<sup>20</sup> Aspartate aminotransferase

<sup>21</sup> Alkaline phosphatase

<sup>22</sup> Total Bilirubin

پارامترهای خونی و التهابی Paired در نظر گرفته شد و از آزمون پارامتریک Paired T-test برای آنالیز اطلاعات قبل و بعد از سلول درمانی استفاده شد.

### یافته‌ها

#### جمعیت و ویژگی‌های دموگرافیک بیماران

در مجموع ۹ بیمار (۶ مرد و ۳ زن) ۶۶-۴۲ سال با میانگین سن بیماران ۵۴/۷۸ (SD: ۹/۱۲۱) با آزمودن مثبت کرونا و درجات حاد و شدید ARDS وارد پژوهش شدند. وزن بیماران در محدوده ۶۰-۱۰۳ کیلوگرم (میانگین ۸۲/۱۱) بود. ۶ بیمار به نوع شدید و ۳ بیمار به نوع حاد ARDS مبتلا بودند. در زمان بستری ۳ بیمار (۳۳ درصد) دیابت و ۳ بیمار (۳۳ درصد) پرفشاری خون داشتند. مدت بستری بیماران در بیمارستان ۲۷-۹ روز بود که به‌طور میانگین ۹ روز در ICU پذیرش شدند. یک بیمار به دلیل نبود تخت کافی در بخش بستری شد. سلول درمانی بیماران حدوداً ۹-۱ روز (به‌طور میانگین حدود ۳ روز) پس از تشخیص بیماری انجام شد. ویژگی‌های دموگرافیک بیماران در جدول ۲ نشان داده شده است.

سطح پارامترهای التهابی و ضدالتهابی (پارامترهای التهابی شامل آزمایش<sup>۲۳</sup> CRP، فیبرینوژن، D-dimer، سطح سایتوکاین پیش التهابی،<sup>۲۴</sup> TNF- $\alpha$ ،<sup>۲۵</sup> IL-۶ و سطح سایتوکاین ضدالتهابی<sup>۲۶</sup> IL-۱۰ از اولین روز تزریق (روز ۱) تا روز ۶ (یک روز پس از تزریق) با روش الایزا مورد اندازه‌گیری و ارزیابی قرار گرفت.

#### تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های توصیفی به صورت میانگین و تعداد (درصد) گزارش شد. به منظور آنالیز داده‌های کمی، ابتدا با استفاده از آزمون شاپیروویلیک<sup>۲۷</sup> نرمال بودن داده‌ها سنجیده شد و با توجه به توزیع نرمال یا غیرنرمال داده‌ها، به ترتیب از آزمون پارامتریک Paired T-test یا آزمون غیر پارامتریک ویلکاکسون در نرم‌افزار گراف پدپریسم (ویرایش ۹/۲/۰) استفاده شد. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ (P-value < ۰/۰۵) از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. همچنین مقدار معنی‌داری در نمودارها با  $P < ۰/۰۵$ ،  $P < ۰/۰۱$ ،  $P < ۰/۰۰۱$ ،  $P < ۰/۰۰۰۱$  نمایش داده شد و علامت NS به معنای عدم معنی‌داری گزارش شد. داده‌های

جدول ۲) ویژگی‌های دموگرافیک بیماران

تعداد	جنس	وزن	بیماری	شدت ARDS	روز ورود به ICU	سلول تشخیص درگیری روز پس از	ورود به بیمارستان (روز)	ویروس qRT-PCR
۱	زن	۸۰	HTN, DM	شدید	۱۵	۳	۱۵	-
۲	زن	۸۰	HTN, DM	شدید	۰	۲	۹	+
۳	زن	۶۹	NA	شدید	۴	۴	۱۴	+
۴	مرد	۶۰	-	شدید	۸	۹	۱۸	+
۵	مرد	۸۰	NA	بحرانی	۴	۵	۲۴	+
۶	مرد	۸۷	NA	بحرانی	۴	۴	۱۱	+
۷	مرد	۹۵	DM	بحرانی	۲۷	۱	۲۷	+
۸	مرد	۸۵	NA	شدید	۷	۳	۱۱	+
۹	مرد	۱۰۳	HTN	شدید	۱۹	۱	۲۱	+

<sup>23</sup> C-Reactive Protein

<sup>24</sup> Tumor necrosis factor-alfa (TNF- $\alpha$ )

<sup>25</sup> Interleukin ۶

<sup>26</sup> Interleukin ۱۰

<sup>27</sup> Shapiro-Wilk Test

تظاهرات بالینی بیماران قبل و بعد از سلول درمانی  
در جدول ۳ تظاهرات بالینی بیماران قبل از اولین دوز

تزریق و یک روز پس از آخرین تزریق P-MSCs نشان  
داده شده است.

جدول ۳) تظاهرات بالینی بیماران قبل و بعد از سلول درمانی P-MSCs										
تعداد تنفس (Rate)	سطح اکسیژن	تنگی نفس	اسهال	خلط	سرفه	دما (C)	قبل/بعد	NIV / لوله گذاری (روز)	تعداد	نوع
۴۰	۷۱	بله	خیر	خیر	بله	۳۷	قبل	NIV	۱	قبل
NA	۹۰	NA	خیر	خیر	خیر	۳۷/۹	بعد			
۴۰	۹۲	بله	خیر	خیر	بله	۳۹/۸	قبل	NIV	۲	بعد
۱۷	۹۶	خیر	خیر	خیر	خیر	۳۷				
۴۰	۸۶	بله	خیر	خیر	خیر	۳۷/۴	قبل	NIV	۳	بعد
۱۵	۹۵	خیر	خیر	خیر	خیر	۳۷				
۳۶	۸۶	بله	بله	بله	بله	۳۷/۶	قبل	NIV	۴	بعد
۱۸	۹۸	حد واسط	خیر	خیر	خیر	۳۷				
۳۸	۸۸	بله	خیر	خیر	بله	۳۸/۸	قبل	لوله گذاری	۵	بعد
NA	۹۴	NA	خیر	بله	خیر	۳۷				
۴۰	۷۷	بله	خیر	خیر	بله	۳۸/۶	قبل	NIV	۶	بعد
NA	۸۸	NA	خیر	بله	خیر	۳۷/۲				
۳۰	۸۲	بله	خیر	خیر	بله	۳۹	قبل	-	۷	بعد
۲۱	۹۲	بله	خیر	خیر	خیر	۳۷				
۳۲	۷۶	بله	خیر	خیر	بله	۳۷/۶	قبل	NIV	۸	بعد
۲۰	۹۳	خیر	خیر	خیر	خیر	۳۷				
۳۶	۹۱	بله	خیر	بله	بله	۳۸/۷	قبل	NIV	۹	بعد
۱۹	۹۴	خیر	خیر	خیر	خیر	۳۷				

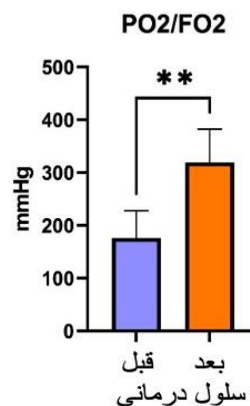
نمره SOFA در هفت بیمار پس از سلول درمانی بهبود یافت. نتایج تجزیه تحلیل SOFA قبل و بعد از سلول درمانی، عدم معنی داری ( $P > 0.05$ ) را نشان داد.  $PaO_2/FiO_2$  نسبت فشار جزئی اکسیژن شریانی (برحسب میلی‌متر جیوه) به اکسیژن دمی کسری است که به عنوان شاخص هورویتز<sup>۲۸</sup>، P/F ratio شناخته می‌شود. محدوده نرمال آن ۴۰۰-۵۰۰ میلی‌متر جیوه می‌باشد. میانگین  $PaO_2/FiO_2$  بیماران قبل از سلول درمانی میلی‌متر جیوه ۱۷۵/۹ و پس از سلول درمانی میلی‌متر جیوه ۳۱۹/۳ بود. مقدار P از نظر آماری، معنی داری را نشان داد ( $P = 0.005$ )\*\* و میانگین

نمره SOFA در هفت بیمار پس از سلول درمانی بهبود یافت. نتایج تجزیه تحلیل SOFA قبل و بعد از سلول درمانی، عدم معنی داری ( $P > 0.05$ ) را نشان داد.  $PaO_2/FiO_2$  نسبت فشار جزئی اکسیژن شریانی (برحسب میلی‌متر جیوه) به اکسیژن دمی کسری است که به عنوان شاخص هورویتز<sup>۲۸</sup>، P/F ratio شناخته می‌شود. محدوده نرمال آن ۴۰۰-۵۰۰ میلی‌متر جیوه می‌باشد. میانگین  $PaO_2/FiO_2$  بیماران قبل از سلول درمانی میلی‌متر جیوه ۱۷۵/۹ و پس از سلول درمانی میلی‌متر جیوه ۳۱۹/۳ بود. مقدار P از نظر آماری، معنی داری را نشان داد ( $P = 0.005$ )\*\* و میانگین

سطح اشباع  $\text{PH}$ ،  $\text{Po}_2$ ،  $\text{PCO}_2$ ، سطح اشباع

## اکسیژن خون

(درصد)  $\text{satO}_2$  در یک بیمار قبل از سلول درمانی ۵۹/۱ درصد بود و پس از سلول درمانی ۹۸/۸ درصد تسکین یافت. با این حال نتایج آنالیز سطح  $\text{Po}_2$ ،  $\text{HCO}_3$ ،  $\text{Po}_2$ ،  $\text{PCO}_2$ ،  $\text{PH}$  و (درصد)  $\text{satO}_2$  خون بیماران پس از سلول درمانی عدم معنی داری را نشان داد (ns) و نتایج بیانگر این است که سلول درمانی تأثیر قابل توجهی در سطح این پارامترها ندارد. (جدول ۴)



شکل (۱) نتایج ارزیابی میانگین  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  قبل و بعد از سلول درمانی (Mean±SD)

Fig 1) The results of evaluating the average  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  before and after cell therapy (Mean±SD)

جدول ۴) سطح اشباع اکسیژن خون بیماران قبل و بعد از سلول درمانی P-MSCs							
BE	$\text{HCO}_3$	Sat (%) $\text{O}_2$	$\text{pO}_2$	$\text{pCO}_2$	pH	قبل / بعد	بیمار
NA	۲۸/۵	NA	۴۲	۴۸	۷/۳	قبل	۱
NA	۳۱/۹۴	NA	۴۴	۵۶	۷/۳۸	بعد	
NA	۳۰/۲	NA	۵۲	۵۱	۷/۳۹	قبل	۲
NA	۲۹/۱	NA	۴۰	۴۷	۷/۴	بعد	
NA	۲۵/۴۲	NA	۴۵/۸	۳۱	۷/۴۴	قبل	۳
NA	۲۳/۱	NA	۸۱	۲۹	۷/۴۲	بعد	
۰/۸	۲۷/۱	۵۹/۱	۳۲/۷	۴۸/۳	۷/۳۵	قبل	۴
۴/۷	۲۸/۷	۹۸/۸	۱۳۳	۳۸/۸	۷/۴۷	بعد	
۵/۸	۳۰/۶	۹۲/۹	۶۴/۳	۴۱/۱	۷/۴۶	قبل	۵
۳/۴	۲۹/۵	۷۸/۸	۴۳/۴	۴۸/۹	۷/۴	بعد	
۴	۱۸	۷۸/۲	۴۴/۲	۵۰	۷/۳	قبل	۶
NA	۲۳/۱	۹۴	۶۳	۷۲	۷/۲۸	بعد	
NA	۲۶/۴	۸۲	۱۴	۴۹	۷/۳۴	قبل	۷
NA	۲۳/۱	۹۲	۲۹	۴۷	۷/۳	بعد	
-۱۳/۷	۱۷/۷	۶۹/۳	۵۶/۸	۷۰	۷	قبل	۸
۳/۹	۲۸/۵	۸۳/۵	۴۷/۴	۴۴/۹	۷/۴	بعد	
۲/۸	۲۶/۸	۵۹/۵	۳۰/۷	۴۱/۴	۷/۴	قبل	۹
۱/۷	۲۶/۶	۶۹/۹	۳۶/۳	۴۲/۲	۷/۴	بعد	

یک روز پس از آخرین تزریق P-MSCs نشان داده شده است. ناهنجاری آزمایشگاهی مشاهده شده در بیماران، لنفوپنی، افزایش شمارش لکوسیت، کاهش شمارش پلاکت و PT، RB طولانی، افزایش LDH بود.

## یافته‌های آزمایشگاهی (پارامترهای خونی و بیوشیمیایی سرم)

در جدول ۵ نتایج اندازه‌گیری سطح پارامترهای خونی و بیوشیمیایی سرم بیماران، قبل از اولین دوز تزریق و

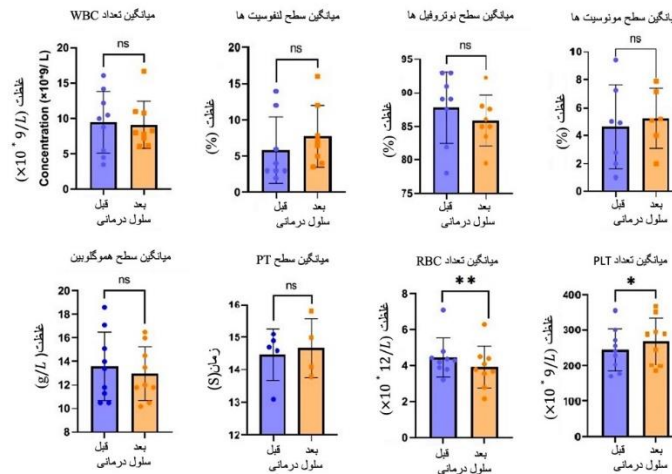
جدول ۵) نتایج یافته‌های آزمایشگاهی قبل اولین و بعد از آخرین تزریق قبل و بعد از سلول درمانی P-MSCs												
بیمار	قبل	بعد	۱-	۲-	۳-	۴-	۵-	۶-	<	>	م	
بیمار	قبل	بعد	قبل	بعد	قبل	بعد	قبل	بعد	قبل	بعد	قبل	بعد
تعداد گلبول سفید (۱۰ <sup>۹</sup> در هر (۱-))	۲/۱۴	۸	۵/۴	۶/۶	۵/۵	۱/۶	۱/۱۶	۷/۱۶	۵/۳	۵/۱۰	۸/۸	۸/۱۰
لنفوسیت (۱)	۳	۴	۲	۵/۳	۱۴	۱۶	۴	۸/۷	۵	۱/۷	na	۱/۷
نوتروفیل (۱)	۹۴	۳/۹۲	۹۳	۸۵	۸۲	۵/۷۹	۸۹	۵/۸۳	۹۳	۸۹	۴/۸۴	۶/۸۷
منوسیت (۱)	۱	۲	na	na	۵	۲	۹/۴	۲/۵	na	۲/۷	na	۱/۷
تعداد گلبول قرمز (۱۰ <sup>۱۲</sup> در هر (۱-))	۳۷/۴	۵۷/۳	۴۳/۴	۵۱/۴	۲/۴	۲۲/۳	۱۷/۲	۸/۲	۳/۴	۹/۳	۱/۷	۸/۳
هموگلوبین (۲)	۳/۱۱	۸/۱۱	۵/۱۰	۵/۱۰	۴/۱۳	۱/۱۷	۱۴	۱/۱۵	۸/۱۱	۵/۱۰	۶/۸	۸/۱۱
شمارش پلاکت	۲۴۱	۲۴۴	۱۷۶	۱۹۹	۲۵۵	۲۲۸	۲۸۷	۳۵۴	۱۶۹	۲۷۱	۳۰۰	۲۸۹
PT	na	na	na	na	na	۹/۱۴	۸/۱۵	na	na	۶/۱۴	۱/۱۳	۱۵
سندیم	۱۴۰	۱۴۱	۱۳۶	۱۳۸	۱۳۹	۱۳۸	۱۳۸	۱۵۰	۱۳۸	۱۳۷	۱۳۸	۱۳۷
پتاسیم (میلی‌مول بر لیتر)	۷/۵	۵/۴	۲/۴	۱/۵	۷/۳	۹/۳	۲/۴	۲/۴	۵/۳	۶/۴	۹/۴	۶/۴
CPK	na	na	na	na	na	۱۶۲	۵۹	۶۷	۵۵	na	na	na
CR	۷۵/۰	۹۲/۰	۹/۰	۹/۰	۶۲/۰	۶۹/۰	۸/۰	۳/۱	۳۵/۱	۱	۵/۱	۱
BUN	۲۱	۲۲	۱۸	۲۰	۱۰	۱۲	۳۰	۳۶	۴۷	۳۲	۳۸	۳۲
LDH	na	na	na	۱۴۱۸	na	۱۳۲۰	۴۶۸	۱۰۱۶	۸۹۴	۵۲۲	na	۸۲۵
ALT	na	na	۱۸۴	۱۶۸	na	na	۲۷	۲۸	۸۲۶	۵۲	۳۳	۴۴
AST (واحد در لیتر)	۵۲	۵۵	۴۹	۵۰	Na	Na	۳۹	۴۱	۸۹۴	۵۰	۲۹	۲۴
ALK	na	۶۱	na	na	na	na	۱۳۶	۱۵۷	۱۶۸	۱۷۲	۱۱۷	۱۵۵
پیتوزین نام (۰۰۰)	na	۲/۰	na	na	na	na	۱/۱	۲/۴	۸/۰	۷/۱	۸/۰	۹/۰
آلبومین	۲۰۱	۲۰۱	na	na	na	۶/۲	۴/۲	۳/۴	۳/۱۱	۳/۱۳	۳	۹/۴

## اندازه‌گیری و آنالیز سطح پارامترهای خونی قبل و بعد از سلول‌درمانی

مطابق شکل، افزایش شمارش WBC در سه بیمار (در مقایسه با محدوده نرمال  $10^9 \times 10 - 5$  در لیتر) مشاهده شد که پس از سلول‌درمانی در دو بیمار بهبود یافت و سطح نرمال برگشت اما یک بیمار همچنان لکوسیتوز داشت (در لیتر  $16/7 \times 10^9$ ) سطح نوتروفیل و مونوسیت بیماران قبل و بعد از سلول‌درمانی در محدوده نرمال به ترتیب  $50-70$  درصد و  $8-2$  درصد بود. کاهش شمارش لنفوسیت قبل و پس از سلول‌درمانی نسبت به محدوده نرمال ( $40-20$  درصد) مشاهده شد. همه بیماران درجاتی از لنفوپنی را تحمل کردند به طوری که سطح لنفوسیت در ۶ بیمار کمتر از ۱۰ درصد بود که پس از سلول‌درمانی افزایش یافت اما همچنان کمتر از حد نرمال بود. سطح RBC بیماران زن (۳ بیمار) قبل و بعد از سلول‌درمانی در محدوده نرمال (در لیتر  $4/2-5/4 \times 10^{12}$ ) بود و تنها در یک بیمار پس از سلول‌درمانی کاهش شمارش RBC مشاهده شد (در لیتر  $3/57 \times 10^{14}$ ). سطح RBC در ۴ بیمار مرد کمتر از محدوده نرمال (در لیتر  $6/1-4/7 \times 10^{12}$ ) بود که پس از سلول‌درمانی نیز به طور معنی‌داری کاهش یافت. این فرضیه بوجود آمد که جنسیت بیماران در اثرات سلول‌درمانی بر سطح RBC تأثیرگذار باشد بنابراین با نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۶ نتایج ارزیابی شد. نتایج حاصل از آنالیز عدم معنی‌داری را نشان داد و در نتیجه می‌توان گفت جنسیت بر نتیجه درمان اثر نداشت. بنابراین اگر محدوده نرمال RBC بین جنسیت تفکیک نشود و متوسط محدوده نرمال  $4/3-5/8 \times 10^{14}$  در هر لیتر در نظر گرفته شود، قبل از سلول‌درمانی مقدار

RBC در سه بیمار کمتر از محدوده نرمال و در یک بیمار بیشتر بود که پس از درمان نیز کاهش داشت. سطح پلاکت بیماران قبل و پس از سلول‌درمانی در محدوده نرمال ( $400-150 \times 10^9$  در هر لیتر) بود. تنها یک بیمار کاهش شدید شمارش پلاکت داشت که پس از درمان افزایش یافت. میزان HB در بیماران زن و مرد قبل و بعد از درمان در محدوده نرمال (مرد: گرم بر دسی‌لیتر  $14-18$  زن: گرم بر دسی‌لیتر  $12-16$ ) بود. لازم به ذکر است که نتایج PT در ۴ بیمار در دسترس بود. سطح PT بیماران قبل و بعد از درمان بیشتر از محدوده نرمال ( $12-11/5$  S) و کمتر از مقادیر بحرانی (بیشتر از ۲۰ ثانیه) بود.

همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده، در نتایج آنالیز سطح WBC، لنفوسیت، نوتروفیل، مونوسیت، HB و PT بیماران قبل و بعد از سلول‌درمانی عدم معنی‌داری را نشان داد ( $P=ns$ ). با وجود اینکه میانگین سطح WBC، نوتروفیل پس از سلول‌درمانی کاهش و سطح لنفوسیت، مونوسیت افزایش داشتند، مقدار P بزرگتر از  $0/05$  بدست آمد و اختلاف میانگین از نظر آماری معنی‌دار نبود. در نتیجه بین میزان این پارامترها قبل و بعد از سلول‌درمانی ارتباط وجود نداشت و تجویز P-MSCs در بیماران COVID-19 حاد و شدید بر سطح این پارامترها تأثیر قابل توجهی نداشت. نتایج تجزیه تحلیل RBC و پلاکت بیماران، معنی‌داری را نشان داد ( $P>0/05$ )؛ در نتیجه سلول‌درمانی تأثیر قابل توجهی بر سطح RBC و پلاکت داشت و میانگین سطح RBC بیماران پس از سلول‌درمانی به طور معنی‌داری به مقدار  $0/53 \times 10^9$  در هر لیتر کاهش و سطح پلاکت بیماران  $24/11 \times 10^9$  در هر لیتر افزایش یافت.



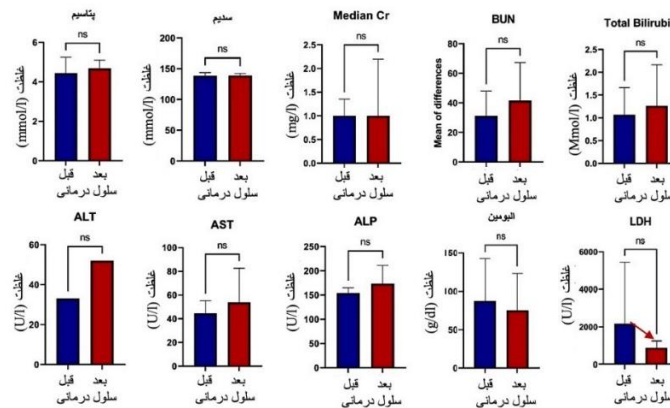
شکل ۲) نتایج آنالیز سطح پارامترهای خونی بیماران قبل و بعد از سلول‌درمانی P-MSCs

Fig 2) The results of the analysis of blood parameters of patients before and after P-MSCs cell therapy

موارد رخ می‌دهد و با پیش آگهی بد بیماری مرتبط است. در پژوهش ما سطح LDH بیماران بیشتر از محدوده نرمال (واحد در هر لیتر ۱۰۰-۱۹۰) بود. به طور میانگین سطح LDH بیماران پس از سلول درمانی، کاهش یافت اما تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود در نتیجه بین سطح LDH قبل و بعد از درمان ارتباط وجود نداشت. (شکل ۳)

### نتایج آنالیز پارامترهای بیوشیمیایی سرم

نتایج آنالیز سطح پارامترهای بیوشیمیایی سرم از جمله پتاسیم، سدیم، کراتینین، LDH، ALK، AST، ALT، BUN و آلبومین قبل و بعد از سلول درمانی عدم معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ). در نتیجه سلول درمانی بر سطح پارامترها تأثیر قابل توجه ندارد. به استناد مقالات افزایش میزان LDH در ۲۰-۹۰ درصد



شکل ۳) نتایج آنالیز سطح پارامترهای بیوشیمیایی سرم قبل و پس از سلول‌درمانی

Fig 3) The results of serum biochemical parameters analysis before and after P-MSCs cell therapy

## نتایج اندازه‌گیری و ارزیابی پارامترهای التهابی و ضدالتهابی

سطح پارامترهای التهابی از روز ۱ (قبل از اولین دوز تزریق) تا روز ۶ (یک روز پس از آخرین تزریق) افزایش آن‌ها را نسبت به محدوده نرمال نشان داد. بیماران قبل از سلول‌درمانی با وضعیت التهابی شدید مواجه بودند و سطح پارامترهای التهابی بیش از حد نرمال بود.

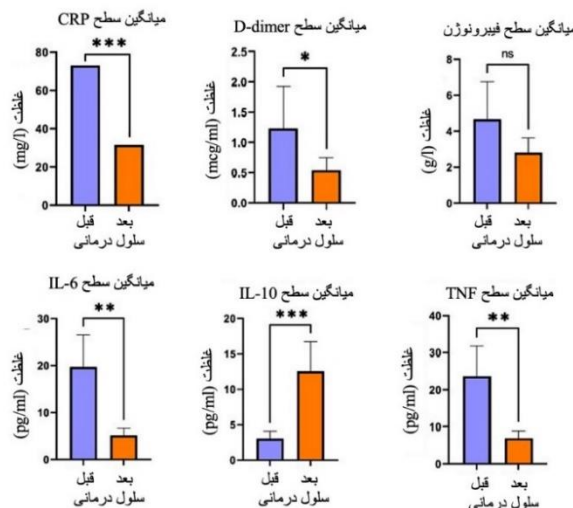
ارزیابی سطح پارامترهای التهابی و ضدالتهابی بیماران به منظور بررسی اثرات سلول‌درمانی بر سطح پارامترها و سنجش امکان بهبود CRS انجام شد. نتایج اندازه‌گیری

روز ۱*	روز ۲	روز ۳*	روز ۴	روز ۵*	روز ۶
۰۹/۷۳	۰۳/۶۲	۰۸/۴۷	۴۱/۹	۰۴/۳۶	۵۳/۳۱
۲۴/۱	۰۸/۱	۸۷/۰	۰/۸۸	۸۲/۰	۰/۵۴
۶۷/۴	۹/۳	۲۱/۴	۳/۱	۷۹/۲	۸۱/۲
۷/۱۹	۷۵/۱۸	۳/۱۸	۶۵/۹	۳۹/۵	۱۲/۵
۰۴/۳	۵۸/۳	۴۹	۶۳/۶	۴۵/۹	۵۴/۱۲
۵۶/۲۳	۹۴/۱۹	۰۱/۱۴	۱۱/۹۱	۵/۵۴	۶/۹۳

میانگین CRP، D-dimer، سایتوکاین‌های التهابی و ضدالتهابی سرم بیماران از روز یک تا شش نشان داده شده است. روز ۱، قبل از تزریق P-MSCs و روز ۶، ۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق سلول می‌باشد. روزهای تزریق با علامت \* نشان داده شده است.

شد. سطح سرمی IL-۶ و TNF- $\alpha$  پس از سلول‌درمانی به‌طور قابل توجهی به مقدار ۱۴/۵۹ پیکوگرم در میلی‌لیتر و ۱۶/۶۳ پیکوگرم در میلی‌لیتر کاهش و سطح IL-۱۰ ۹/۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر افزایش یافت ( $P < ۰/۰۵$ ). میانگین سطح فیبرینوژن کاهش یافت اما مقدار P عدم معنی‌داری را نشان داد.

در شکل ۴ نتایج آنالیز سطح سرمی پارامترهای التهابی و ضدالتهابی بیماران، قبل و بعد از سلول‌درمانی با P-MSCs نشان داده شده است. پس از آنالیز پارامترهای IL-۱۰، IL-۶، CRP، D-dimer، TNF- $\alpha$ ، مقدار P معنی‌داری را نشان داد ( $p < ۰/۰۵$ ) و سلول‌درمانی با P-MSCs به‌طور معنی‌داری باعث کاهش سطح CRP و D-dimer به مقدار ۴۱/۵۶ پیکوگرم در میلی‌لیتر و ۱/۶۹ میکروگرم در میلی‌لیتر



شکل ۴) نتایج آنالیز پارامترهای التهابی و ضدالتهابی قبل و بعد از سلول‌درمانی P-MSCs (Fig 4) Analysis results of inflammatory and anti-inflammatory parameters before and after P-MSCs cell therapy

## پیگیری بیماران

عوارض احتمالی اولیه از جمله تب، فشارخون، بثورات پوستی، کهیر، عوارض تنفسی یا قلبی عروقی، تنگی نفس ۲۴-۴۸ ساعت پس از تزریق مشاهده نشد. همه بیماران زنده ماندند و تزریق P-MSCs را تحمل کردند و عارضه جانبی حاد مرتبط با تزریق مشاهده نشد. بیماران پس از طی ۹-۲۷ روز (به‌طور میانگین ۱۶ روز) و گذراندن دوره درمان ترخیص شدند. بیماران در روز ۳۰ پیگیری پس از بستری در وضعیت مطلوب قرار داشتند و شکایتی از تب، سردرد یا تنگی نفس نداشتند.

## بحث

COVID-19 بیماری همه گیر جهانی است که به سرعت گسترش می‌یابد و توسط سویه جدید ویروس کرونا به نام SARS COV-2 ایجاد می‌شود (۱). درمان خاصی برای کنترل کامل وضعیت التهابی شدید در بیماران وجود ندارد؛ رویکرد درمانی بر مبنای کاهش و تعدیل وضعیت التهابی است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارای ویژگی خودنوسازی و تمایز چندرده هستند و در منابع مختلف یافت می‌شوند. ظرفیت بازسازی بالایی داشته و ترمیم بافت را تقویت می‌کنند. این سلول‌ها توانایی تعدیل پاسخ ایمنی التهابی، افزایش پاکسازی پاتوژن و کاهش شدت صدمات را در برخی از مطالعات پیش‌بالینی و بالینی دارند (۲۲ و ۲۳).

P-MSCs در مطالعات *in-vivo* و *in vitro* به دلیل عدم بیان MHC کلاس II بر روی سطح آن‌ها خواص ایمنی‌زایی پایینی را نشان می‌دهند و معمولاً در محیط کشت می‌توانند ظرفیت تکثیر بالایی را حداقل برای ۲۰ پاساژ حفظ کنند. فعالیت تلومراز پایینی (خاصیت تمایز کم) دارند و از این رو در سلول‌درمانی مورد نظر بسیار ایمن هستند (۴).

در پژوهش حاضر، جداسازی کشت و پاساژ P-MSCs در اتاق تمیز بیمارستان و شرایط استریل و کاملاً کنترل شده طبق اصول GMP، همانطور که قبلاً گزارش شده (۲۱)، انجام شد. تعیین هویت سلول‌های جدا شده از طریق بررسی مارکرهای سطحی توسط فلوسایتومتری و بررسی توان تمایز به رده استخوان و چربی تأیید شد. نتایج نشان داد که این سلول‌ها، مارکرهای CD ۴۴، CD ۱، CD ۷۳، CD ۱۰۵ بیان می‌کنند و از نظر بیان CD ۴۵ و CD ۳۴ منفی هستند و علاوه بر این، بررسی قابلیت تمایزی سلول P-MSCs به رده استخوان و چربی به ترتیب با تشکیل رسوب کلسیم و واکنول‌های چربی (لیپوزوم‌ها) تأیید شد. نتایج این بخش از مطالعه ما، با نتایج مطالعه سلطانی و همکاران، که ایمنی و کارایی سلول بنیادی مزانشیمی جفت آلورژن برای درمان استئوآرتریت زانو بررسی کردند، همخوانی دارد (۲۱).

ارزیابی کنترل کیفی P-MSCs قبل از سلول‌درمانی شامل بررسی از نظر سترون بودن، سنجش مایکوپلازما و سطح اندوتوکسین و ارزیابی زنده‌مانی مشابه مطالعه هاشمیان و همکاران (۱۵) انجام شد. زنده‌مانی بیش از ۹۰ درصد با روش حذف تریپان بلو، استریل بودن کشت‌های میکروبی در بررسی ۱۴ روزه، منفی شدن نتایج سطح مایکوپلازما با روش RT-PCR و سطح اندوتوکسین کمتر از ۰/۵ یونیت اندوتوکسین در میلی‌لیتر با روش لخته ژل به دست آمد. این داده‌ها با نتایج مطالعه ژانگ و همکاران، که از hWJCs برای درمان بیماران کرونایی استفاده نمودند (۱۶) مطابقت دارد. نتایج ارزیابی کنترل کیفی و تعیین هویت P-MSCs در پژوهش ما حاکی از این بود که سلول‌ها ویژگی و ماهیت مورد انتظار برای تزریق را داشتند؛ که این مشاهده، با نتایج مطالعه آقایان و همکاران، که

پروتکل تولید P-MSCs منطبق با اصول GMP برای کاربرد بالینی را شرح دادند، همخوانی دارد (۲۰). در پژوهش حاضر طبق بررسی متون گذشته در زمینه سلول درمانی COVID-19، به منظور سلول درمانی بیماران، سه دوز تزریق داخل وریدی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جفت تازه (P-MSCs) صورت گرفته و دوز تجویز مشابه مطالعه ژانگ و همکاران (۱۶)،  $1 \times 10^6$  سلولی در هر کیلوگرم در هر تزریق تعیین شده است. آن‌ها نشان دادند که تزریق یک دوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از وارتون ژلی بندناف انسانی  $1 \times 10^6$  سلول در هر کیلوگرم به بیمار مبتلا به COVID-19 شدید، منجر به کاهش CRP و عوامل التهابی می‌شود (۱۶). مزایای تزریق داخل وریدی شامل ایمنی و تحمل‌پذیری، تحویل مؤثر غلظت بالای سلول‌ها به ریه‌ها، آزادسازی سیستمیک عوامل ضدالتهابی و ضدفیروتیک، امکان تجویز دوزهای سلولی مکرر در طی یک دوره کوتاه سلول‌درمانی است (۱۵).

در مجموع ۹ بیمار بزرگسال مبتلا به COVID-19 حاد و شدید که در فاز التهابی بودند، وارد مطالعه شدند. تزریق داخل وریدی P-MSCs بهبود قابل توجهی در سطح  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  پس از سلول درمانی نشان داد. و سلول درمانی به‌طور معنی‌داری باعث افزایش سطح  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  به مقدار  $143/4$  میلی‌متر جیوه شد که نشانه توانایی P-MSCs در بهبود تبادل اکسیژن در ریه است. درصد  $\text{sat}2\text{O}$  در یک از بیمار  $59/1$  درصد بود و پس از سلول درمانی  $98/8$  درصد تسکین یافت. نتایج بیانگر این است که سلول درمانی تأثیر قابل توجهی در سطح  $\text{HCO}_3^-$ ،  $\text{Po}_2$ ،  $\text{PCO}_2$ ، PH و  $\text{O}_2 \text{ sat}$  (درصد) ندارد.

ناهنجاری آزمایشگاهی مشاهده شده در بیماران لنفوپنی، افزایش شمارش لکوسیت (۳ بیمار) و کاهش شمارش پلاکت و RBC، PT طولانی، افزایش LDH بود. بر پایه

مطالعات گذشته، کاهش میزان لنفوسیت در  $75-30$  درصد موارد رخ می‌دهد و با پیش آگهی بد بیماری مرتبط است. همه بیماران درجاتی از لنفوپنی را تحمل کردند. به‌طوری که سطح لنفوسیت در ۶ بیمار کمتر از  $10$  درصد بود که پس از سلول درمانی بهبود یافت اما همچنان کمتر از حد نرمال بود. این مشاهدات مشابه مطالعه‌ای گذشته‌نگر از ۱۳۸ بیمار مبتلا به COVID-19 بود. شایع‌ترین ناهنجاری‌های آزمایشگاهی مشاهده شده در مطالعه آن‌ها کاهش کل لنفوسیت‌ها، PT طولانی مدت و افزایش LDH بود.  $70$  درصد بیماران لنفوپنی (تعداد لنفوسیت در هر لیتر  $0.8 \times 10^9$ )،  $58$  درصد بیماران PT طولانی (۱۳ ثانیه) و  $40$  درصد بیماران افزایش (LDH  $261 \text{ U/L}$ ) را نشان دادند (۶). سطح پلاکت بیماران قبل و بعد از سلول درمانی، مشابه نتایج شیانگ (Shiyang) و همکاران، در محدوده نرمال بود (۱۰). کاهش شمارش پلاکت در یک بیمار مشاهده شد که پس از سلول درمانی افزایش یافت اما همچنان در محدوده بحرانی بود.

اگرچه به‌طور میانگین کاهش سطح WBC و نوتروفیل، افزایش لنفوسیت و مونوسیت پس از سلول درمانی مشاهده شد اما نتایج آنالیز سطح WBC، لنفوسیت، نوتروفیل، مونوسیت و HB بیماران قبل و پس از سلول درمانی با P-MSCs، عدم معنی‌داری را نشان داد و در نتیجه تجویز P-MSCs در بیماران COVID-19 حاد و شدید بر سطح این پارامترها تأثیر قابل توجهی ندارد.

نتایج تجزیه تحلیل RBC و پلاکت بیماران معنی‌داری را نشان داد و در نتیجه سلول درمانی بیماران COVID-19 حاد و شدید با P-MSCs، باعث کاهش قابل توجهی در سطح RBC و افزایش سطح پلاکت بیماران می‌شود. این نتایج حاکی از تأثیرات متفاوت سلول درمانی بر پارامتر خونی (سطح RBC) است و بنابراین احتمالاً سلول درمانی می‌تواند باعث کاهش

ناخواسته سطح RBC شود و به نظر می‌رسد پایش تغییرات سطح پارامترهای خونی طی سلول‌درمانی مهم است بنابراین پیشنهاد می‌شود اثرات سلول‌درمانی در گروه بزرگ‌تر بررسی شود.

به استناد مقالات افزایش میزان LDH در ۹۰-۲۰ درصد موارد رخ می‌دهد و با پیش‌آگهی بد بیماری مرتبط است. در پژوهش ما سطح LDH بیماران بیشتر از محدوده نرمال (۱۹۰-۱۰۰ واحد در هر لیتر) بود. سلول‌درمانی با P-MSCs بر سطح پارامترهای بیوشیمیایی بیماران از جمله پتاسیم، سدیم، کراتینین، LDH، ALK، AST، ALT، BUN و آلبومین تأثیر قابل توجه ندارد. نتایج مطالعه بینگ لیانگ (Bing Liang) و همکاران، نشان داد تزریق سه دوز UC-MSC به یک بیمار مبتلا به COVID-19، اکثر شاخص‌های آزمایشگاهی را بهبود بخشیده و علائم التهاب را تسکین می‌دهد. ۲۴ ساعت پس از تزریق دوم، غلظت بیلیروبین سرم، ALT و AST به تدریج کاهش یافت. تعداد WBC، نوتروفیل، لنفوسیت به سطح نرمال بازگشت و لنفوپنی درمان شد. لازم به ذکر است در این مطالعه تأثیرات سلول‌درمانی بر پارامترهای خونی ارزیابی نشده است (۲۴). در پژوهش ما نیز مشابه مطالعه بینگ لیانگ سطح لنفوسیت بیماران پس از سلول‌درمانی افزایش یافت اما نتایج حاکی از عدم تأثیر سلول‌درمانی بر سطح پارامتر خونی بود. در این پژوهش اندازه‌گیری و ارزیابی سطح پارامترهای التهابی و ضدالتهابی به منظور بررسی وضعیت التهابی ناشی از طوفان سایتوکاینی بیماران طی سلول‌درمانی و اثرات سلول‌درمانی بر آن انجام شد. همانطور که در مطالعه‌ای اثرات سلول‌درمانی با سلول‌بنیادی مزانشیمی در درمان ARDS ناشی از COVID-19 مورد بررسی قرار گرفت و بر این موضوع که ترمیم و بازسازی سلول‌های اندوتلیال و

سلول‌های آلوئولار و تعدیل پاسخ‌های التهابی شدید می‌تواند گام کلیدی برای بهبود بیماری باشد، اشاره داشت (۲۵). در پژوهش ما سطح فیبرینوژن، که احتمالاً با پیش‌آگهی ضعیف بیماری مرتبط است، ارزیابی شد که در اکثر مطالعات در زمینه سلول‌درمانی COVID-19 مورد توجه قرار نگرفته بود. اگرچه به‌طور میانگین سطح فیبرینوژن طی سلول‌درمانی کاهش یافت اما تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود در نتیجه سلول‌درمانی با P-MSCs تأثیر قابل توجهی بر سطح فیبرینوژن بیماران ندارد. سطح پارامترهای IL-6، D-dimer، CRP و TNF بیماران پس از سلول‌درمانی با P-MSCs به‌طور قابل توجهی کاهش و سطح IL-10 (پارامتر ضدالتهابی) افزایش یافت و نتایج حاکی از بهبود وضعیت التهابی بود. در یک کارآزمایی بالینی بهبود برخی از سایتوکاین‌های التهابی پس از سه دوز تزریق داخل وریدی (سلول در هر کیلوگرم  $10^6 \times 200$ ) سلول‌بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت پری‌ناتال در ۶ بیمار مبتلا COVID-19 مشاهده شد (۱۵). در مطالعه آن‌ها مشابه نتایج ما سطح TNF، CRP و IL-8 به‌طور معنی‌دار کاهش یافت ( $P < 0.05$ ). علی‌رغم کاهش IL-6 و IFN- $\gamma$  بیماران، تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود. همچنین سطح IL-4 و IL-10 در چهار بیمار از ۶ بیمار افزایش یافت اما نتایج عدم معنی‌داری را نشان داد ( $P = ns$ ) که این مشاهده متفاوت با پژوهش ما در زمینه ارزیابی سطح IL-10 و IL-6 بود. همچنین سطح D-dimer در مطالعه آن‌ها ارزیابی نشد (۱۵). کاهش قابل توجه سطح D-dimer نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث حذف سریع انعقاد خون داخل عروقی می‌شوند، که به‌طور مؤثر از میکروترومبوز عروق ریه جلوگیری می‌کند. در مطالعه‌ای دیگر تجویز سلول‌بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارتون با هدف کنترل

بافت ریه شوند (۲۷). همچنین از MSCs و مشتقات آن‌ها به عنوان یک تنظیم کننده ایمنی در طوفان سایتوکاینی ناشی از پانکراتیت حاد و بیماری حاد و مزمن ریوی و همچنین یک رویکرد درمانی برای رگ زایی و استفاده میتوان استفاده کرد (۳۰-۲۸).

در پژوهش حاضر همه بیماران تحت درمان زنده ماندند و تزریق P-MSCs را تحمل کردند و عارضه جانبی حاد مرتبط با تزریق از جمله بثورات پوستی، کپیر، عوارض تنفسی یا قلبی عروقی، مشاهده نشد. بیماران ۴-۵ روز پس از اولین تجویز P-MSCs پاسخ چشمگیر سریع داشتند. بیماران طی پیگیری در وضعیت مطلوب بوده و شکایتی از تب، تنگی نفس نداشتند. این نتایج با نتایج مطالعه هاشمیان مبنی بر عدم مشاهده عارضه جانبی در پیگیری بیماران پس از سلول درمانی با MSC مشتق از بافت پری ناتال، همخوانی دارد (۲۵). همچنین یکی از مهم‌ترین یافته‌های منتشر شده توسط سانچز (Sánchez) و همکاران، عدم وجود عوارض جانبی مرتبط با تجویز AT-MSCs در بیماران بسیار بحرانی COVID-19 با نارسایی تنفسی، التهاب گسترده و خطر پروترومبوتیک بود. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد درمان با AT-MSCs با کاهش پارامترهای التهابی (IL-۶، CRP، فریت، LDH و D-dimer) و همچنین افزایش لنفوسیت، همراه بود (۱۸). نتایج بهبودی در هر پژوهش ما با مطالعه لنج و همکاران، که بهبودی در هر هفت بیمار پس از تزریق  $1 \times 10^6$  سلول در هر کیلوگرم سلول بنیادی مزانشیمی را گزارش کردند، مشابه بود (۱۷). اما به دلیل تعداد کم بیماران و نداشتن گروه کنترل به‌طور قطعی قادر به مقایسه این نتایج با بیماران مشابه تحت درمان نیستیم. نتایج مطالعه ژانگ و همکاران، نشان داد که تزریق وریدی hWJC به‌طور قابل توجهی باعث بهبود التهاب و وضعیت ایمنی در بیماران

طوفان سیتوکین در بیماران مبتلا به کووید-۱۹ شدید انجام شد. نتایج این مطالعه مشابه پژوهش ما حاکی از افزایش معنی‌دار سطح سایتوکین‌های ضدالتهابی، IL-۱۳، IL-۱۰، IL-Ira و IL بود که نقش مهمی در تنظیم و کنترل پاسخ التهابی داشتند. اما از نظر آماری کاهش معنی‌دار در سطح پارامتر التهابی IL- $\beta$  و TNF- $\alpha$  مشاهده نشد که متفاوت با نتایج ما بود (۲۶). مکانیسم دقیق درمانی MSCs مشخص نیست اما بر اساس مطالعات، اثرات تعدیل وضعیت التهابی خود را با کاهش ترشح سایتوکاین‌های پیش‌التهابی از جمله IL-۱، IL-۸، TNF- $\alpha$ ، IFN- $\gamma$ ، IL-۶ از سلول‌های ایمنی اعمال می‌کنند؛ همچنین با ترشح TGF- $\beta$ ، IL-۴، IL-۱۰، پروستاگلندین E $_2$ ، اثرات ضدالتهابی بر بافت میزبان دارند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط ریه توسط سایتوکاین‌های اطراف تحریک می‌شوند و با ترشح مولکول‌هایی که التهاب را سرکوب می‌کنند، اثر ضد میکروبی دارند، باعث کموتاکسی لنفوسیتی می‌شوند، ماکروفاژها را تحریک می‌کنند تا فنوتیپ خود را از فنوتیپ M۱ پیش‌التهابی به فنوتیپ M۲ ضدالتهابی تغییر دهند. آن‌ها همچنین از تکثیر سلول‌های T جلوگیری کرده و آپتوز را در سلول‌های T و همچنین تمایز به سلول‌های تنظیم کننده T را القا می‌کنند. اثرات MSCs در ترمیم بافت از طریق ترشح فاکتور رشد، و محافظت از سلول اندوتلیال در برابر التهاب و استرس اکسیداتیو گزارش شده است. همچنین در مطالعه‌ای بیان شد که تجویز داخل برونش MSCs باعث کاهش ادم ریوی شده و نفوذپذیری اندوتلیال و اپیتلیال ریه را به حالت طبیعی برمی‌گرداند (۲۷).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌تواند با ترشح KGF، HGF، VEGF، تکثیر سلولی و ترمیم آسیب بافتی را تقویت کند. VEGF و FGF نیز می‌تواند باعث ترمیم

ناخواسته و بهینه‌سازی درمان بررسی شود. در مطالعه حاضر اثرات سلول درمانی با P-MSCs بر بهبود سندرم انتشار سایتوکاین و پارامترهای خونی مورد هدف قرار گرفت. طبق نتایج و بحث‌های انجام شده، می‌توان انتظار داشت که تجویز سه دوز P-MSCs در بیماران مبتلا به COVID-19 حاد و شدید، سبب تعدیل وضعیت التهابی و بهبود علائم بالینی شود. با توجه به نتایج پژوهش ما به نظر می‌رسد پایش تغییرات سطح پارامترهای خونی طی سلول درمانی به منظور بهینه‌سازی رویکرد درمانی مهم است.

مقاله حاضر تحت حمایت مالی هیچ سازمان یا مؤسسه‌ای نمی‌باشد.

#### تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

COVID-19 شدید شد و پس از انتقال آدپتو hWJC هیچ عارضه جانبی واضحی مشاهده نشد که این مشاهده با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد (۱۶). نتایج مطالعات بیان داشت که ICU عامل مهم در نتیجه و بهبود بیماران است که در پژوهش ما همه بیماران تحت مراقبت در ICU قرار گرفتند که احتمالاً یکی از دلایل کاهش نرخ مرگ و میر است (۲۵).

#### نتیجه‌گیری

بر پایه نتایج به دست آمده از این پژوهش سلول درمانی بیماران COVID-19 حاد و شدید با P-MSCs باعث کاهش قابل توجهی در سطح RBC بیماران می‌شود که نشانه تأثیرات متفاوت سلول درمانی بر پارامتر خونی در مقایسه با گزارش‌های مطالعات گذشته است؛ بنابراین پیشنهاد می‌شود اثرات سلول درمانی در پارامترهای خونی در گروه بزرگ‌تر به منظور بررسی عوارض

#### References:

1. Wu Y, Ho W, Huang Y, et al. SARS-CoV-2 is an appropriate name for the new coronavirus. *Lancet* 2020; 395(10228): 949-50. doi: [10.1016/S0140-6736\(20\)30557-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30557-2).
2. Guan W jie, Ni Z y, Hu Y, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med* 2020; 382(18): 1708-20. doi: [10.1056/NEJMoa2002032](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2002032).
3. Durand N, Mallea J, Zubair AC. Insights into the use of mesenchymal stem cells in COVID-19 mediated acute respiratory failure. *NPJ Regen Med* 2020; 5(1): 17. doi: [10.1038/s41536-020-00105-z](https://doi.org/10.1038/s41536-020-00105-z).
4. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* 2020; 5(4): 536-544. doi: <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>.
5. Słomka A, Kowalewski M, Żekanowska E. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Short Review on Hematological Manifestations. *Pathogens* 2020; 9(6): 493. doi: [10.3390/pathogens9060493](https://doi.org/10.3390/pathogens9060493).
6. Wang D, Hu B, Hu C, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA* 2020; 323(11): 1061-9. doi: [10.1001/jama.2020.1585](https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585).
7. D'Amico F, Baumgart DC, Danese S, et al. Diarrhea During COVID-19 Infection: Pathogenesis, Epidemiology, Prevention, and Management. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2020; 18(8): 1663-72. doi: [10.1016/j.cgh.2020.04.001](https://doi.org/10.1016/j.cgh.2020.04.001).

8. Debuc B, Smadja DM. Is COVID-19 a new hematologic disease? *Stem Cell Rev Rep* 2021; 17(1): 4-8.  
doi: [10.1007/s12015-020-09987-4](https://doi.org/10.1007/s12015-020-09987-4).
9. Lamers MM, Haagmans BL. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 2022; 20(5): 270-84.  
doi: [10.1038/s41579-022-00713-0](https://doi.org/10.1038/s41579-022-00713-0).
10. Yuan X, Huang W, Ye B, et al. Changes of hematological and immunological parameters in COVID-19 patients. *Int J Hematol* 2020; 112(4): 553-9.  
doi: [10.1007/s12185-020-02930-w](https://doi.org/10.1007/s12185-020-02930-w).
11. Jose RJ, Manuel A. COVID-19 cytokine storm: the interplay between inflammation and coagulation. *Lancet Respir Med* 2020; 8(6): e46-e47.  
doi: [10.1016/S2213-2600\(20\)30216-2](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30216-2).
12. Golchin A, Seyedjafari E, Ardeshiryajimi A. Mesenchymal Stem Cell Therapy for COVID-19: Present or Future. *Stem Cell Rev Rep* 2020; 16(3): 427-33.  
doi: [10.1007/s12015-020-09973-w](https://doi.org/10.1007/s12015-020-09973-w).
13. Shu L, Niu C, Li R, et al. Treatment of severe COVID-19 with human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2020; 11(1): 361.  
doi: [10.1186/s13287-020-01875-5](https://doi.org/10.1186/s13287-020-01875-5).
14. Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 2020; 395(10224): 565-74.  
doi: [10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8).
15. Hashemian SMR, Aliannejad R, Zarrabi M, et al. Mesenchymal stem cells derived from perinatal tissues for treatment of critically ill COVID-19-induced ARDS patients: a case series. *Stem Cell Res Ther* 2021; 12(1): 91.  
doi: [10.1186/s13287-021-02165-4](https://doi.org/10.1186/s13287-021-02165-4).
16. Zhang Y, Ding J, Ren S, et al. Intravenous infusion of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells as a potential treatment for patients with COVID-19 pneumonia. *Stem Cell Res Ther* 2020; 11(1): 207.  
doi: [10.1186/s13287-020-01725-4](https://doi.org/10.1186/s13287-020-01725-4).
17. Leng Z, Zhu R, Hou W, et al. Transplantation of ACE2- Mesenchymal Stem Cells Improves the Outcome of Patients with COVID-19 Pneumonia. *Aging Dis* 2020; 11(2): 216-228.  
doi: [10.14336/AD.2020.0228](https://doi.org/10.14336/AD.2020.0228).
18. Sánchez-Guijo F, García-Arranz M, López-Parra M, et al. Adipose-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of patients with severe SARS-CoV-2 pneumonia requiring mechanical ventilation. A proof of concept study. *EclinicalMedicine* 2020; 25: 100454.  
doi: [10.1016/j.eclinm.2020.100454](https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100454).
19. Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, et al. Pulmonary Passage is a Major Obstacle for Intravenous Stem Cell Delivery: The Pulmonary First-Pass Effect. *Stem Cells Dev* 2009; 18(5): 683-92.  
doi: [10.1089/scd.2008.0253](https://doi.org/10.1089/scd.2008.0253).
20. Aghayan HR, Payab M, Mohamadi-Jahani F, et al. GMP-Compliant Production of Human Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells. In: Turksen K, editor. *Stem Cells and Good Manufacturing Practices*. New York, NY: Springer US, 2020, 213-25.  
[https://doi.org/10.1007/7651\\_2020\\_282](https://doi.org/10.1007/7651_2020_282).
21. Khalifeh Soltani S, Forogh B, Ahmadbeigi N, et al. Safety and efficacy of allogenic placental mesenchymal stem cells for treating knee osteoarthritis: a pilot study. *Cytotherapy* 2019; 21(1): 54-63.  
doi: [10.1016/j.jcyt.2018.11.003](https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2018.11.003).
22. Kousha A, Haji Ghasem Kashani M, Vaezi GH, et al. Expression of Neurotrophins in Adipose-derived Stem Cells during in vitro Culture and Posttransplantation in Parkinsonian Rat Model. *Iran South Med J* 2022; 25(3): 227-239. (Persian)  
doi: [10.52547/ismj.25.3.227](https://doi.org/10.52547/ismj.25.3.227).
23. Zhu H, Xiong Y, Xia Y, et al. Therapeutic Effects of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells in Acute Lung Injury Mice. *Sci Rep* 2017; 7(1): 39889.  
doi: [10.1038/srep39889](https://doi.org/10.1038/srep39889).

24. Liang B, Chen J, Li T, et al. Clinical remission of a critically ill COVID-19 patient treated by human umbilical cord mesenchymal stem cells: A case report. *Medicine (Baltimore)* 2020; 99(31): e21429.  
doi: [10.1097/MD.00000000000021429](https://doi.org/10.1097/MD.00000000000021429).
25. Ramezankhani R, Solhi R, Memarnejadian A, et al. Therapeutic modalities and novel approaches in regenerative medicine for COVID-19. *Int J Antimicrob Agents* 2020; 56(6): 106208.  
doi: [10.1016/j.ijantimicag.2020.106208](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106208).
26. Adas G, Cukurova Z, Yasar KK, et al. The Systematic Effect of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Critical COVID-19 Patients: A Prospective Double Controlled Trial. *Cell Transplant* 2021; 30: 9636897211024942.  
doi: [10.1177/09636897211024942](https://doi.org/10.1177/09636897211024942).
27. Ahangar P, Mills SJ, Cowin AJ. Mesenchymal Stem Cell Secretome as an Emerging Cell-Free Alternative for Improving Wound Repair. *Int J Mol Sci* 2020; 21(19): 7038.  
doi: [10.3390/ijms21197038](https://doi.org/10.3390/ijms21197038).
28. Lu D, Xu Y, Liu Q, et al. Mesenchymal Stem Cell-Macrophage Crosstalk and Maintenance of Inflammatory Microenvironment Homeostasis. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9: 681171.  
doi: [10.3389/fcell.2021.681171](https://doi.org/10.3389/fcell.2021.681171).
29. Divband S, Tasharrofi N, Abroun S, et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells-Derived Small Extracellular Vesicles Can Be Considered as Cell-Free Therapeutics for Angiogenesis Promotion. *Cell J* 2022; 24(11): 689-696.  
doi: [10.22074/cellj.2022.8275](https://doi.org/10.22074/cellj.2022.8275).
30. Omidvar F, Haji Ghasem Kashani M, Tabatabai TS. *Expression of Apoptotic Genes in MCF-7 Cancer Cells after Induction with Human Adipose Stem Cells Conditioned Medium and Rosemary Extract*. *Iran South Med J* 2023; 25(5): 422-441. (Persian)  
URL: <http://ismj.bpums.ac.ir/article-1-1658-en.html>.

*Original Article*

# Blood Parameters in Coronavirus Patients After Cell Therapy with Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells

*H. Bakhshi (MSc)<sup>I\*</sup>, M. Soufizomorrod (PhD)<sup>I\*\*</sup>, M. Soleimani (PhD)<sup>I</sup>,*

<sup>I</sup> Department of Hematology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received 11 Nov, 2023

Accepted 14 Jan, 2024)

## Abstract

**Background:** With the emergence of SARS CoV-2, we have witnessed numerous deaths and injuries. Due to the possibility of emergence of new strains, there is a need to improve treatment approaches. There are reports on the application of placenta-derived mesenchymal stem cells (p-MSCs) as a therapeutic approach. In this study, we investigated the therapeutic effects of these cells in patients with COVID-19.

**Materials and Methods:** Nine patients with severe and critical COVID-19 and severe inflammatory condition admitted to the ICU were candidates for cell therapy. For each subject, three 1 x 10<sup>6</sup> injections of p-MSC (cell/kg) were administered intravenously. The clinical manifestations of the patients and the occurrence of potential early complications as well as the levels of blood and inflammatory and anti-inflammatory parameters before and after cell therapy were investigated.

**Results:** All treated patients tolerated the p-MSC injection and no acute side-effect was reported for the treatment. The PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> level increased significantly in the patients after cell therapy. The analysis of the blood, inflammatory and anti-inflammatory parameters of the patients before and after cell therapy showed a significant decrease in the level of RBC and CRP, D-dimer, IL-6 and TNF- $\alpha$  and an increase in platelets and IL-10. The changes in WBC, lymphocytes, neutrophils, monocytes, Hb and PT and biochemical parameters in the serum, fibrinogen coagulation, PH, PCO<sub>2</sub>, Po<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub> and O<sub>2</sub> sat (%) were not statistically significant.

**Conclusion:** Based on the results, three intravenous injections of p-MSCs in severe and acute patients improved their inflammatory condition and clinical symptoms and had a significant effect on their inflammation and blood parameters including RBC and platelet.

**Keywords:** COVID-19, SARS-CoV-2, cell therapy, mesenchymal stem cells, P-MSCs, placental mesenchymal stem cells

©Iran South Med J. All rights reserved

Cite this article as: Bakhshi H, Soufizomorrod M, Soleimani M. Blood Parameters in Coronavirus Patients After Cell Therapy with Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells. Iran South Med J 2023; 26(3): 134-154

\*\*Address for correspondence: Department of Hematology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

E. mail: m.soufi@modares.ac.ir

\*ORCID: 0000-0002-0882-7833

\*\*ORCID: 0000-0002-7046-1684

Website: <http://bpums.ac.ir>

Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>