

*На правах рукописи*

**Ремезова Анна Николаевна**

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК  
В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ТУБЕРКУЛЕЗА ПОЧЕК  
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

3.1.26. Фтизиатрия

3.1.13. Урология и андрология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2024

Работа выполнена на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научные руководители:**

Доктор медицинских наук, профессор **Виноградова Татьяна Ивановна**  
Кандидат медицинских наук, доцент **Муравьев Александр Николаевич**

**Официальные оппоненты:**

**Каюкова Светлана Ивановна**, доктор медицинских наук, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, отдел иммунологии, ведущий научный сотрудник

**Кирпатовский Владимир Игоревич**, доктор медицинских наук, профессор, Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии имени Н.А. Лопаткина – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел лабораторно-клинической диагностики, главный научный сотрудник

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «15» октября 2024 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 21.1.065.01 созданного на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2-4, тел. (812)775-75-55).

С диссертацией можно ознакомиться на официальном сайте федерального государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации [www.spbniif.ru](http://www.spbniif.ru) и в научной библиотеке (191036, г. Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2-4, тел. (812) 775-75-55).

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук, профессор

**Виноградова Татьяна Ивановна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Почечная патология является одной из глобальных проблем общественного здравоохранения, затрагивающей свыше 750 миллионов человек повсеместно (Акименко М.А., 2023). К одной из угроз здоровью почек относят нефротуберкулез (НТ). Во всем мире ежегодно диагностируется 10,6 миллионов случаев туберкулеза; среди них внелегочные локализации составляют от 15 до 45%, из которых 14-41% приходится на урогенитальный туберкулез (Кульчавеня Е.В., 2023). НТ диагностируется поздно (77,6%), когда у больных уже развиваются те или иные осложнения (Кульчавеня Е.В., 2023; Merchant S., 2013). Фиброзные процессы, характерные для длительного течения специфического воспаления приводят к хронической болезни почек у 5,7% пациентов (Park M., 2021), а также требуют выполнения реконструктивных операций на верхних мочевых путях или нефрэктомии (Mittal A., 2020). В связи с этим, актуальность изучения поражения почек при НТ не оставляет сомнений.

Увеличение числа случаев НТ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) возбудителя создает дополнительные социально-экономические и терапевтические проблемы (Зеллвегер Ж.П., 2017; Чотчаев Р.М., 2019). МЛУ нефротуберкулез отличается длительным, дорогостоящим лечением с развитием поражений почек в результате прямого токсического действия противотуберкулезных препаратов (Lee H.Y., 2015; Desai U., 2019; Park M., 2021).

Для восстановления структуры и функции поврежденных органов и тканей все чаще используется клеточная терапия, основанная на трансплантации мезенхимных стволовых клеток в пораженный орган. Мезенхимные стволовые клетки (МСК) обладают антимикробными свойствами (Chow L., 2020), выдающимся регенеративным потенциалом и оказывают иммуномодулирующее действие (Trohatou O., 2017; Chow L., 2020). Секретом МСК включает факторы, ответственные за ангио- и нейрогенез, пролиферацию клеток и хемотаксис (Prieto C.P., 2017; Liu Y., 2018; Xu J., 2019; Sagaradze G.D., 2020). Паракринная передача сигналов не ограничивается определенными факторами роста и цитокинами, однако играют здесь наиболее важную роль внеклеточные везикулы (МСК-ВВ), секретируемые МСК (Sagaradze G.D., 2020; Foo, J.V., 2021).

При НТ трансплантация МСК потенциально может оказывать существенное влияние на воспалительную реакцию и скорость репарации (Yudintceva N., 2021). В этой связи особую актуальность представляет экспериментальная разработка подходов к использованию МСК и МСК-ВВ, направленная на сохранение функционирующей почечной паренхимы. Однако отсутствие адекватной модели локального НТ препятствует разработке новых способов лечения специфического заболевания. В связи с этим необходимо разработать новую ограниченную почкой модель туберкулезной инфекции, позволяющую оценить в экспериментальных условиях терапевтическую эффективность МСК и МСК-ВВ с возможностью их дальнейшей клинической апробации и внедрения в практику.

### Степень разработанности темы исследования

В литературе имеются сведения об осуществлении моделирования НТ у кроликов (Беллендир Э.Н., 1973; Минаков Н.К., 1987). Однако представленные в этих работах способы имеют ряд существенных недостатков: отсутствие четких данных

в отношении заражающей дозы микобактерий, травматичность оперативного доступа, генерализация процесса и высокая летальность лабораторных животных.

Применение МСК и МСК-ВВ признано перспективным методом лечения в различных областях медицины. Положительные результаты получены в доклинических исследованиях почечной недостаточности, диабетической нефропатии, реконструкции мочевого пузыря и уретры (Горелова А.А., 2020; Perico L., 2017; Orlova N.V., 2019; Xiang E., 2020; Zhang C., 2020), а также при туберкулезе органов дыхания (Skrahin A., 2014; Parida S.K., 2015; Kim J.S., 2016), однако работ, демонстрирующих эффективность МСК и МСК-ВВ, при НТ нет.

### **Цель работы**

Обосновать возможность применения мезенхимных стволовых клеток и внеклеточных везикул в лечении экспериментального туберкулеза почки.

### **Задачи исследования**

1. Создать экспериментальную модель локального туберкулеза почки при помощи малоинвазивного доступа.
2. Изучить распределение МСК в организме экспериментальных животных с нефротуберкулезом в условиях системного введения.
3. Оценить влияние мезенхимных стволовых клеток в сочетании с противотуберкулезными препаратами на клинико-биохимические показатели и структурно-функциональную характеристику почек в динамике развития экспериментального нефротуберкулеза, вызванного микобактериями с различной лекарственной чувствительностью.
4. Изучить эффективность применения внеклеточных везикул, выделенных из мезенхимных стволовых клеток, на фоне этиотропной терапии экспериментального туберкулеза почек.

### **Научная новизна исследования**

Создана модель НТ (патент на изобретение RU № 2776130 от 13.07.2022), которая отличается от ранее предложенных малой травматичностью, постоянством воспроизведения, пригодна при решении вопросов фтизиатрии и фтизиоурологии. В экспериментальной модели изучена динамика развития НТ в почке кроликов на основе персонифицированного прижизненного мониторинга патофизиологических изменений.

Впервые показано, что после однократного внутривенного введения кроликам МСК сохраняют жизнеспособность и накапливаются в зоне специфического поражения почки.

В модели НТ, вызванного штаммами микобактерий туберкулеза (МТБ) с различной лекарственной чувствительностью, показана возможность применения МСК и МСК-ВВ на фоне лечения противотуберкулезными препаратами.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученная экспериментальная модель туберкулеза почки позволяет развивать новое научное направление – экспериментальную фтизиоурологию, открывает возможности для проведения разнообразных доклинических исследований в этой области.

В модели туберкулеза почки, вызванного микобактериями с различной лекарственной чувствительностью, показано нарушение баланса в системе протеиназы/ингибиторы в сторону протеолиза, степень которого связана с морфологическими характеристиками сосудистых нарушений и тубулоинтерстициальных изменений. Установленные экспериментальные факты, касающиеся патогенеза нефротуберкулеза, расширяют и уточняют представления о данном заболевании и закономерностях его развития.

Полученные данные, касающиеся биораспределения МСК, позволяют прогнозировать миграцию мезенхимных клеток в организме зараженных экспериментальных животных, что необходимо учитывать при выборе тактики лечения с использованием МСК на разных этапах развития заболевания.

Выявленные новые теоретические аспекты применения мезенхимных стволовых клеток и их внеклеточных везикул при нефротуберкулезе в сочетании с противотуберкулезными препаратами, в частности, впервые установленные факты снижения распространенности специфического воспаления в почках, уменьшения его активности и ускорения процессов репарации в почечной ткани, будут способствовать повышению эффективности лечения не только при данной патологии, но и при других хронических заболеваниях почек.

### **Методология и методы исследования**

Методы исследования выбраны исходя из поставленных задач и с учетом особенностей исследуемых объектов (здоровые и зараженные НТ кролики, *M. tuberculosis*, МСК, МСК-ВВ) и клинических материалов. Используются лабораторные, микробиологические, иммунологические, инструментальные (компьютерная томография, ультразвуковое исследование), гистологические и иммуногистохимические исследования образцов тканей почек, а также научные аналитические и статистические методы исследования. Исследование является экспериментальным, биомедицинским, базируется на изучении результатов моделирования НТ, биораспределения МСК и оценке эффективности комплексной терапии туберкулеза почки у 80 лабораторных животных.

Исследование одобрено решением Независимого этического комитета при федеральном государственном бюджетном учреждении «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России) (протокол № 80 от 23.06.2021 г., выписка № 80.1).

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Разработанная новая модель туберкулеза почки, воспроизводимая инокуляцией суспензии микобактерий в корковый слой нижнего полюса левой почки кроликов при помощи малотравматичного хирургического доступа, характеризуется общей воспалительной реакцией, дисбалансом протеиназно/ингибиторной системы, морфологическими сосудистыми нарушениями, тубулоинтерстициальными изменениями и почечной недостаточностью.

2. В экспериментальной модели туберкулеза почки с использованием иммунофлуоресцентной микроскопии установлены основные пути распределения мезенхимных стволовых клеток, меченых суперпарамагнитными наночастицами оксида железа (SPIONs), в почках и других органах.

3. Участие МСК в этиотропной терапии экспериментального нефротуберкулеза привело к снижению распространенности специфического

воспаления в почках, уменьшению его активности и к ускорению репаративной реакции с формированием зрелой соединительной ткани.

4. Применение внеклеточных везикул, выделенных из МСК, в комплексе с противотуберкулезными препаратами способствует повышению эффективности лечения экспериментального нефротуберкулеза за счет структурных белков, обладающих антимикробными, противовоспалительными и иммунорегуляторными свойствами.

### **Степень достоверности и апробация результатов работы**

Достоверность проведенного исследования определяется достаточным числом наблюдений (80 лабораторных животных), применением современных лабораторных и инструментальных методов, сертифицированного оборудования, адекватных методов статистического анализа.

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на: X и XI Конгрессе Национальной Ассоциации Фтизиатров с международным участием (Санкт-Петербург, 2021, 2022); V Национальном Конгрессе по Регенеративной Медицине (Москва, 2022); II научно-практической конференции «Роль фундаментальных исследований во фтизиатрии» (Москва, 2023); XXVI Международной медико-биологической научной конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2023); 12-м Международном конгрессе «Актуальные направления современной кардиоторакальной хирургии» (Санкт-Петербург, 2023).

Результаты диссертационной работы отмечены дипломами победителя конкурсов: за лучшую научную работу среди молодых ученых на Юбилейной научно-практической конференции, посвященной 80-летию кафедры и клиники урологии Военно-медицинской академии С.М. Кирова (Санкт-Петербург, 2022); а также грантов для кандидатов наук на Санкт-Петербургской ассамблее молодых ученых и специалистов (Санкт-Петербург, 2022, 2023).

По теме диссертационного исследования опубликовано 19 печатных работ, в том числе 5 в журналах, включенных в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 2 в зарубежных журналах, индексируемых в международных системах WoS и Scopus, получены 1 патент на изобретение РФ № 2776130 и одно свидетельство о регистрации базы данных RU 2023622275. 10 работ опубликовано в материалах научно-практических мероприятий различного уровня.

### **Личный вклад автора**

Автором совместно с руководителями сформулирована концепция диссертационного исследования, определены его дизайн, цели и задачи. Автором лично проведен поиск и анализ литературы по теме диссертации, выполнены все этапы диссертационной работы: обследование и ведение лабораторных животных, включая хирургические вмешательства, процесс моделирования туберкулеза почки, участие в клинических, иммунологических, лучевых, биохимических, фармакокинетических исследованиях, гистологических. Автором лично выполнены набор и обработка данных, их анализ и интерпретация, подготовка основных публикаций и апробация результатов диссертационного исследования.

### Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, двух глав собственных исследований, заключения, выводов, перспектив дальнейшей разработки темы исследования и списка литературы (223 источника), включающих 50 отечественных и 173 зарубежных публикаций. Работа иллюстрирована 7 таблицами и 33 рисунками.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материал и методы исследования

**Во введении** обоснована актуальность темы диссертационной работы, определены цель и задачи исследования, оценено текущее состояние научной проблемы, изложена научная новизна, практическая и теоретическая значимость работы, описаны методы исследования, сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

**В первой главе** представлен анализ современной научной литературы по теме диссертационного исследования, рассмотрены вопросы туберкулеза почек, как одной из форм внелегочного туберкулеза, а также возможности применения клеточной терапии различных нозологий.

**Во второй главе** представлены материалы и методы исследования. Модельные животные были получены из федерального государственного унитарного предприятия «Питомник лабораторных животных «Рапполово» федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»», содержались в стандартных условиях сертифицированного вивария ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России согласно СанПиН 3.3686-21, ГОСТ 33215-2014 и ГОСТ 33216-2014.

Критерии включения животных в эксперимент: положительная динамика массы тела в период карантина, отсутствие видимых симптомов заболевания. Все исследования на животных были одобрены Независимым Этическим комитетом ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России (протокол № 80 от 23.06.2021 г., выписка № 80.1). Объем выполненных исследований был распределен на три этапа.

На первом этапе разработан способ моделирования туберкулезного поражения почки кроликов (n=11). На втором – изучено биораспределение МСК при системном введении их зараженным нефротуберкулезом кроликам (n=9). На третьем этапе на 60 кроликах выполнялось лечение смоделированного туберкулезного поражения почки с применением МСК, МСК-ВВ и без.

Для заражения модельных животных использовали: международный стандартизованный вирулентный тест-штамм *M. tuberculosis* H37Rv, чувствительный к противотуберкулезным препаратам (из коллекции Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации) и клинический штамм № 5582 (из коллекции Федерального государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации), верифицированного по принадлежности к виду *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью (изониазид, рифампицин, пиперазид, стрептомицин).

**На первом этапе** разработан способ моделирования туберкулезного поражения почки кроликов. Протокол моделирования включал несколько стадий: 1-ая – обеспечение анестезиологического пособия: использовался тилетамина гидрохлорид/золазепам гидрохлорид (Zoletil, Virbac SA, Франция) в дозе 25 мг/кг внутривенно; миорелаксант ксилазина гидрохлорид (Ксила, Bioveta, Чехия) в виде 2% раствора внутримышечно в объеме 1,0-1,5 мл; 2-я – фиксация лабораторного животного на специальном станке; 3-я – удаление шерсти в области локализации левой почки; 4-я – осуществление хирургического доступа: кожные покровы обрабатывали дважды 5% раствором йода; с применением ультразвукового контроля (на аппарате Samsung Medison RS80A-RUS с использованием линейного датчика) выполняли тонкоигольную пункцию коркового слоя паренхимы нижнего полюса левой почки и инокулировали суспензию микобактерий *M. tuberculosis* H37Rv (или *M. tuberculosis* № 5582 генотипа Beijing) в дозе  $10^6$  микробных клеток /0,2 мл; место инъекции обрабатывали 5% раствором йода. Профилактика инфекционных осложнений проводилась в течение 5 дней с использованием цефазолина курсом (в дозе 50 тыс. ЕД/кг, 1,5 мл внутримышечно, АО «Фармасинтез», Россия).

Выделение и культивирование мезенхимных стволовых клеток костного мозга кролика выполнялось совместно с сотрудниками Центра клеточных технологий федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук по стандартной методике (Gudleviciene Z., 2015). Иммунофенотипирование клеток выполняли с помощью моноклональных антител Abcam (США) на проточном цитофлуориметре EpicsXL (BeckmanCoulter). Относительное количество позитивных клеток по иммунофенотипическим маркерам CD90+ и CD105+, характерным для МСК, составило 81% и 92% (соответственно), гемопоэтический маркер CD45+ отсутствовал.

Для идентификации клеток в эксперименте МСК были мечены суперпарамагнитными наночастицами оксида железа ( $Fe_3O_4$ , SPION). Размер ядра оксида железа и форму частиц анализировали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) (микроскоп JEOL-2000 г., Чжол, Япония) и рентгеновской дифракции. Клетки, достигшие состояния монослоя, инкубировали со SPION в концентрации 150 мкг/мл в течение 24 часов в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора. Оценку жизнеспособности клеток выполняли с помощью окраски красителем Трипановый синий (0,4%, Биолот, Россия). Дополнительно с помощью колориметрического теста для оценки метаболической активности клеток (метилтетразолиевый тест, набор Vybrant® в соответствии с протоколом производителя (Life Technologies, США)) была проанализирована цитотоксичность наночастиц.

МСК-ВВ выделяли из кондиционированной среды путем дифференцированного центрифугирования при +4 °С. Для освобождения от загрязняющих белков промывали фосфатно-солевым буфером и ультрацентрифугировали в течение 1,5 часов (ультрацентрифуга Optima XPN-100, Beckman Coulter, Калифорния, США; ротор Type 70 Ti, Beckman Coulter Optima L-XP). Полученный осадок ВВ ресуспендировали в стерильном фосфатно-солевом буфере (PBS) и замораживали при -80 °С до дальнейшего использования.

Визуализацию МСК-ВВ осуществляли с помощью ТЭМ Libra 120 (Carl Zeiss, Оберкохен, Германия). Для получения электронных микрофотографий использовали метод окрашивания 1%-ным водным раствором уранилацетата (АО ВЕКТОН, Россия). Гидродинамический размер МСК-ВВ оценивали методом динамического рассеяния

света с использованием ZetasizerNano (Malvern Instruments, Малверн, Великобритания); общий белок МСК-ВВ – на спектрофотометре NanoDropOne (Fisher Scientific, Массачусетс, США). Для определения общего количества белка в ВВ был применен анализ Брэдфорда. Измерение оптической плотности проводили при 595 нм.

Для обнаружения некоторых характерных белков МСК-ВВ использовался вестерн-блоттинг. Использовали первичные антитела против Hsp70, антитела против CD63, антитела против CD9. На следующий день мембраны инкубировали с вторичными антителами (Cell Signaling Technology, 7074P2, 1:10000). В дальнейшем хемилюминесцентные сигналы вестерн-блота усиливали с использованием набора Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (34095, Thermo Scientific, США) и записывали в режиме накопления сигнала с помощью системы ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad, США).

Протеомный профиль МСК-ВВ исследовали с помощью жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (МС). Использовали систему Ultimate 3000 Nano LC (Thermo Fisher Scientific, США), соединенную с масс-спектрометром Q Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, США) через источник наноэлектроспрея (Thermo Fisher Scientific, США). Для последующего анализа данных необработанные файлы МС анализировали с помощью Peaksstudio 10.0 (Bioinformatics Solutions Inc.). Идентификацию белков осуществляли путем поиска по базе данных *Oryctolagus cuniculus* Uniprot FASTA версии от 09.07.2021. Список белков, выявленных с помощью МС, загружали в онлайн-инструмент поиска STRING88 с целью получения сети белковых взаимодействий (protein-protein interaction, PPI). В результате мы получили сеть с количеством узлов, равным 302. Белковые комплексы идентифицировали с помощью марковского алгоритма кластеризации (Wang J., 2010). Каждому кластеру с более чем двумя белками было присвоено название (биологический процесс, белковый комплекс или функциональная группа). Для графического отображения сеть PPI была загружена в программу Gephi.

**На втором этапе** изучено биораспределение МСК на кроликах с НТ, вызванном международным стандартизированным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv. Суспензию МСК ( $5 \times 10^7$  клеток в 2 мл PBS), меченных SPION, вводили внутривенно с помощью 2-мл шприца (23 G) через вену левого уха. На 2, 3, 7 день от введения МСК животных подвергали эвтаназии путем введения тиопентал натрия 250 мг (ОАО «Синтез», Курган, Россия) и пипекурония бромид 1 мг (ОАО «Верофарм», Москва, Россия), а органы (почки, легкие, печень, селезенку) извлекали и фиксировали в 10% формалине. Выявление в ткани клеток выполняли с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции (Olympus IX83 microscope (Olympus Corporation, Япония)). Приготовленные по стандартизированной методике криосрезы выдерживали в течение 5 мин в 1% растворе красителя DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид). Для возбуждения флуоресценции использовали аргоновый лазер с длиной волны 405 нм. SPION визуализируются как красные точки, присутствующие в цитозоле, но не в ядре. Миграцию МСК, содержащих SPION, в ткани почек дополнительно подтверждали с помощью окраски по Перлсу.

**На третьем этапе** разработанная модель нефротуберкулеза была использована для оценки эффективности МСК и МСК-ВВ в составе противотуберкулезной терапии (ПТТ). Выполнено 3 серии экспериментов:

1 серия – заражение *M. tuberculosis* H37Rv, противотуберкулезная терапия с использованием МСК;

2-серия – заражение *M.tuberculosis* 5582 генотипа Beijing, химиотерапия с использованием МСК;

3-серия – заражение *M.tuberculosis* H37 Rv и лечение с использованием МСК-ВВ.

При положительных результатах кожной пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (Диаскин-тест®, АТР) кролики во всех сериях экспериментов были разделены на несколько групп с помощью онлайн-генератора случайных чисел: первая группа – кролики, зараженные без последующего лечения (контроль заражения,  $n_1=6$ ,  $n_2=6$ ,  $n_3=6$ ); вторая группа – кролики, получающие лечение только противотуберкулезными препаратами в средних терапевтических дозах (контроль лечения,  $n_1=7$ ,  $n_2=7$ ,  $n_3=7$ ); третья группа – животные, получавшие ПТТ в комплексе с МСК или МСК-ВВ (экспериментальная,  $n_1=7$ ,  $n_2=7$ ,  $n_3=7$ ).

Противотуберкулезная терапия во второй и третьей группах всех серий была начата через 21 день после заражения. Препараты назначали в соответствии с чувствительностью используемых для инфицирования штаммов МБТ:

- 1 и 3 серия опытов: изониазид (перорально в дозе 10 мг/кг, ОАО «Мосхимфармпрепараты им. Н.А. Семашко», Россия); этамбутол (перорально в дозе 20 мг/кг, Shreya Life Sciences, Индия); пиразинамид (перорально в дозе 20 мг/кг, АО «Фармасинтез», Россия);
- 2 серия опытов: этамбутол (перорально в дозе 20 мг/кг, ОАО «Акрихин», Россия), бедаквилин (перорально в дозе 14 мг/кг 10 дней, с 11 дня через день в дозе 7 мг/кг, ОАО «Фармстандарт», Россия), тиоуреидоиминометилпиридиния перхлорат (перорально в дозе 12 мг/кг АО «Фармасинтез», Россия), линезолид (перорально в дозе 10 мг/кг, «Тева», Венгрия).

Длительность ПТТ составила 3 месяца.

Через 2 месяца после начала стандартной ПТТ кроликам третьей группы первой и второй серий вводили суспензию МСК в дозировке  $5 \times 10^7$  в 2 мл в латеральную вену уха. На аналогичном сроке кроликам третьей группы 3-ей серии в вену уха вводили суспензию МСК-ВВ (концентрация белка 0,2 мг/мл) в объеме 0,2 мл.

Через 4 месяца от начала эксперимента животных подвергали эвтаназии путем введения в краевую ушную вену анестезирующих средств в дозировках, превышающих среднюю терапевтическую: натрия тиопентал (250 мг) и пипекурония бромид (1 мг).

Оценка эффективности применения МСК/МСК-ВВ проводилась по следующим критериям: динамике клинических показателей (массы тела, состояния шерстяного покрова, потребления кормов, двигательной активности кролика); мониторинга биохимических показателей периферической крови; лучевым методам исследования; гистологического и морфометрического исследований ткани почки.

Забор периферической крови для биохимической оценки белковых маркеров проводили трижды: исходно, через 18 дней после заражения и по завершении курса терапии (3, 5 месяца). Определяли концентрации показателей системы ММП/ингибиторы (ММП-1, -9) и их тканевого ингибитора-1 (ТИМП-1), цистатина С, оценка воспалительного ответа также включала анализ концентрации альбумина (АЛ) и креатинина (КР), концентрацию церулоплазмينا (ЦП), активность ферментов пуринергической системы – общей аденозиндезаминазы (АДА) и ее изоферментов (АДА-1 и АДА-2) и активность нейтрофильной эластазы (ЭЛ). Для оценки концентрации IL-4, IL-10, INF- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  в плазме образцы крови были взяты через 24 часа, 1, 2 и 4 недели после введения МСК-ВВ.

Бактериологическое исследование мочи выполняли через 30 дней (посев на плотную питательную среду Финн-П). Результаты учитывали через 60 дней. Величину колониеобразующих единиц (КОЕ) высчитывали как среднее по результатам подсчета выросших колоний на всех пробирках

Компьютерная томография (КТ) почек и легких выполнялась на томографе Toshiba One Aquilion через 30 дней после инфицирования с применением болюсного введения контрастного вещества Ультравист-370 (4 мл со скоростью 1 мл/мин) в краевую ушную вену.

Микроскопическое и морфометрическое исследование проводили на срезах почек, окрашенных гематоксилином и эозином, по Ван Гизону/по Массону, по Цилю-Нельсену и по Перлсу. Микропрепараты сканировали (LeicaAperioAT2 (LEICAMICROSYSTEMS, Германия; объектив: 20×/0.75 PlanApo) и анализировали с использованием программного обеспечения Aperio Image Scope. Морфометрическое исследование проводили с использованием программы NIH Image J версии 1.52a (National Institutes of Health, США). Определяли ширину коркового и мозгового вещества, площадь специфического воспаления, некротических очагов, воспалительной инфильтрации и площадь участков фиброза, толщину стенки лоханки и толщину эпителия лоханки, параметры клубочков, диаметр проксимальных и дистальных канальцев, междольковой артерии и вены.

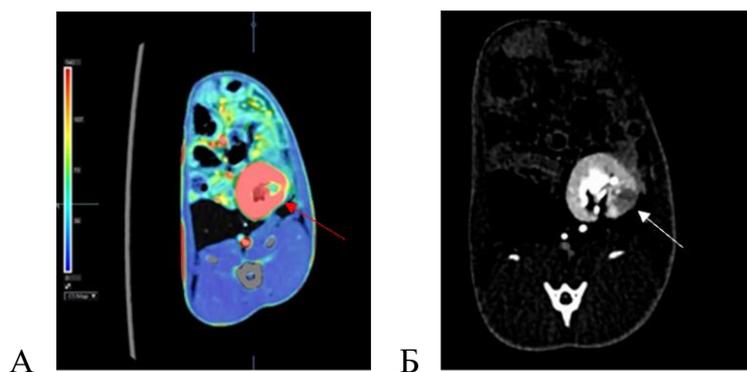
Результаты морфометрического и биохимического исследования оценивали с помощью специализированных программ: R-4.0.4 (The R Foundation, Вена, Австрия) и RStudio Desktop (версия 1.3.1093, RStudio Inc., США). Использовали пакет программ Statistica 7.0 (Stat Soft Inc., США). Определяли характер распределения выборочных данных и в случае отклонения от нормального распределения (по критерию Шапиро-Уилка) вычисляли медиану (Me) и первый и третий квартили (Q1-Q3). Достоверность различий оценивали с помощью критерия Вилкоксона, непараметрического U-критерия Манна-Уитни и критерия Крускала-Уоллеса. Корреляции определяли путем расчета и оценки коэффициента Спирмена.

**В третьей главе** описаны основные результаты исследования.

### **Результаты моделирования экспериментального нефротуберкулеза**

Результаты первого этапа исследования показали, что при введении взвеси *M.tuberculosis* H37Rv в корковый слой нижнего полюса левой почки у кроликов закономерно развивается НТ, что подтверждается следующими данными:

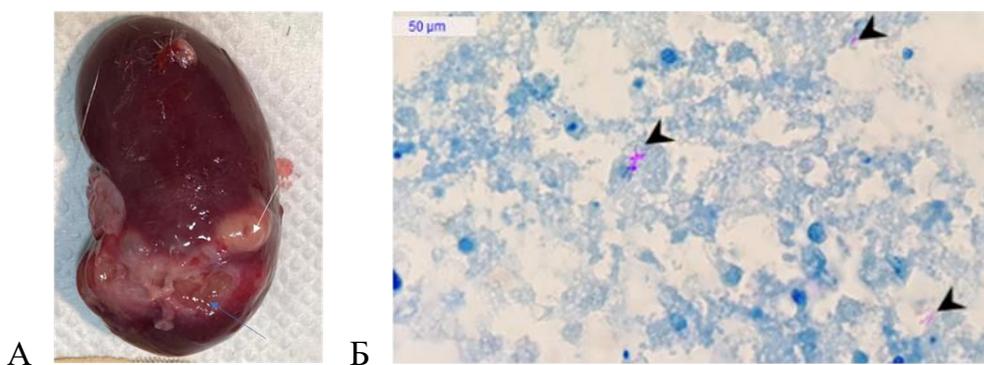
- клиническими – на сроке 3,5 месяца от начала эксперимента отмечался статистически значимый дефицит массы тела у модельных животных в сравнении с интактными ( $p < 0,05$ );
- иммунологическими – через 18 дней после инокуляции МБТ в левую почку в ответ на введение АТР у инфицированных кроликов регистрировали появление эритемы размером  $15,3 \pm 2,8$  мм;
- лучевыми – по результатам КТ брюшной полости в левой (инфицированной) почке была выявлена четко выраженная зона снижения перфузии (рисунок 1, А) совпадающая в этой области с очагом деструкции (рисунок 1, Б). Очагов деструкции в правых почках и легких обнаружено не было;
- микробиологическими – в посевах мочи выявляли умеренный рост культуры МТБ ( $76,6 \pm 8,3$  КОЕ);



А – в левой почке определяется участок сниженной перфузии (зеленый цвет отражает низкий кровоток по сравнению с оставшейся паренхимой (красный)); Б – очаг деструкции в левой почке (гиповаскулярная зона) при стандартной компьютерной томографии (белая стрелка).

Рисунок 1 – КТ почек кролика с нефротуберкулезом

- биохимическими – развитие НТ сопровождалась повышением показателей воспалительного ответа. Через 3,5 месяца от начала эксперимента у кроликов 2 группы наблюдалось достоверное повышение уровня КР по сравнению с исходным уровнем ( $p=0,019$ ), тогда как АЛ, ЦП и ЭЛ оставались прежними. Выявлено увеличение активности АДА, АДА-1. Уровень ТИМП-1 значительно изменился по сравнению с исходным, однако значения ММП-1 и ММП-3 были стабильными, что на фоне с увеличением активности ЭЛ свидетельствует о дисбалансе в системе протеиназа/ингибитор и характеризует преобладание процессов протеолиза в организме зараженных животных;
- гистологическими – при макроскопической оценке вблизи капсулы левой почки (инфицированной) визуализировались: полость размером  $11 \times 18$  мм, заполненная рыхлыми казеозными массами, в окружающей ткани - отдельные казеозные фокусы  $2 \times 3$  мм (рисунок 2, А); в левой почке подтверждено наличие специфического воспаления с образованием полостей с некротическими массами, окруженных псевдоэозинофильными лейкоцитами, макрофагами и формирующимися гигантскими многоядерными клетками Лангханса. Кроме того, выявлены участки тубулярной атрофии. При окраске по Цилю-Нельсену обнаружены кислотоустойчивые микобактерии (КУМ, рисунок 2, Б).



А – очаг деструкции в области нижнего полюса левой почки (синяя стрелка) и отдельный казеозный фокус (белая стрелка); Б – КУМ (обозначены стрелками) в очагах специфического воспаления. Окраска по Цилю-Нельсену. Масштабный отрезок 50 мкм.

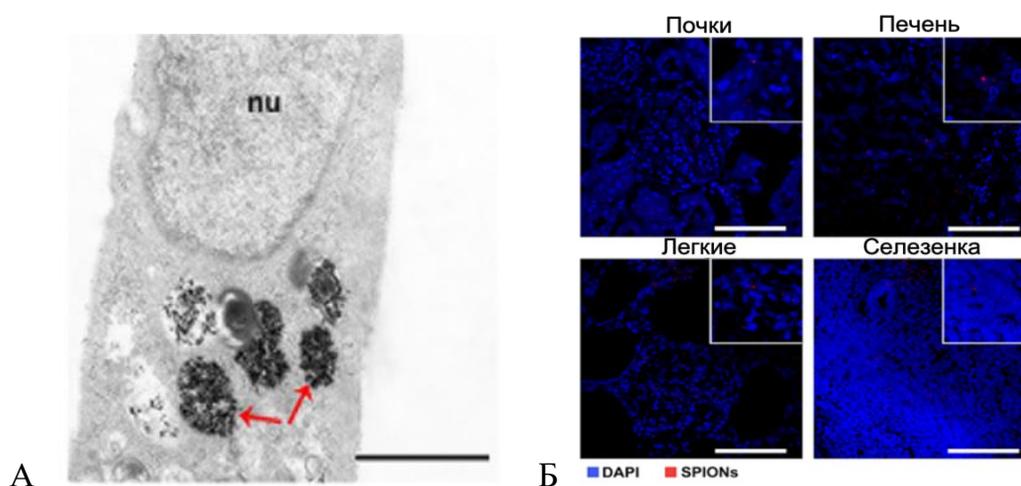
Рисунок 2 – Препараты почек кролика с нефротуберкулезом

Таким образом, при введении взвеси *M.tuberculosis* H37Rv в корковый слой нижнего полюса левой почки у кроликов закономерно развивается нефротуберкулез, что подтверждается данными клинических, иммунологических, лучевых, микробиологических и гистологических методов исследования.

### Оценка распределения МСК в организме в условиях системного введения их зараженным животным

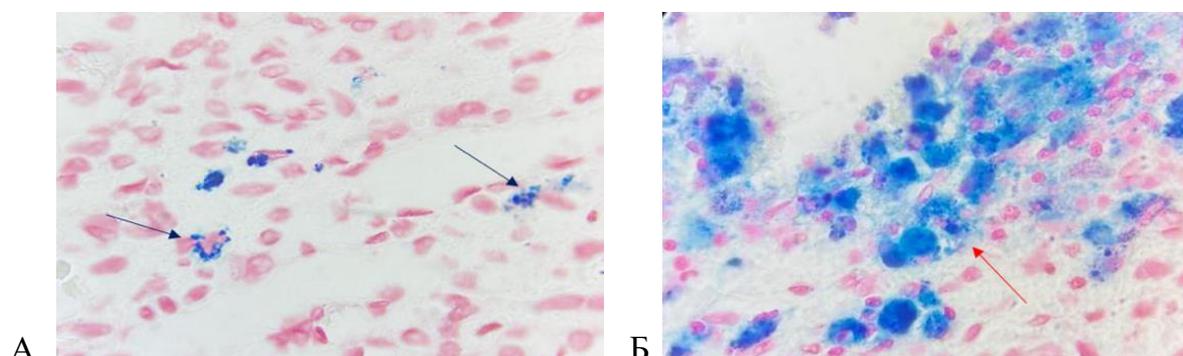
*Характеристика SPION.* Результаты рентгеновской дифракции показали, что SPIONs имеют структуру нанокристаллического магнетита Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. По данным ТЭМ наночастицы локализованы в цитоплазме МСК (рисунок 3, А).

*Анализ биораспределения меченых SPIONs МСК* методом конфокальной микроскопии подтвердил наличие МСК в тканях почек, легких, печени и селезенки животных с НТ на всех сроках исследования (рисунок 3, Б). Окрашивание образцов по методу Перлса подтвердило миграцию МСК в зону специфического воспаления (левые почки) и в контрлатеральный орган (правые почки) (рисунок 4).



А – ТЭМ-изображение SPION в МСК: заполненные вторичные эндосомы с электронно-плотными наночастицами; Б – накопление МСК в органах кроликов с нефротуберкулезом. Ядра – DAPI (синий), SPION (красный). Масштабные отрезки: 400 нм (А), 100 мкм (Б).

Рисунок 3 – Изображения МСК



А – мелкие клетки в строме с Перлс-положительными включениями (черная стрелка); Б – скопление гемосидерофагов (красная стрелка). Окраска по Перлсу; увеличение  $\times 1000$ .

Рисунок 4 – Гистологическая картина тканей почек

Таким образом использование SPION в качестве метки для МСК оказалось эффективным методом. Высокая интернализация магнитных наночастиц позволила использовать специальные методы окрашивания для выявления железа в качестве оценки биораспределения МСК в организме зараженных МБТ животных. Согласно полученным данным после внутривенного введения МСК накапливались преимущественно в тканях почки пораженной *M.tuberculosis* H37Rv.

**Эффективность мезенхимных стволовых клеток  
в комплексном лечении туберкулеза почки,  
вызванного лекарственно чувствительным штаммом *M.tuberculosis* H37Rv**

*Биохимическое исследование крови.* Ни в одной из исследуемых групп к 18 дню от начала эксперимента не обнаружено значимых изменений уровня КР, ЦП и АЛ в сравнении с исходными данными, при этом отмечался значимый рост активности общей АДА, за счет АДА-1 ( $p=0,005$ ), а также рост ЭЛ ( $p=0,049$ ) и снижение ТИМП-1 ( $p=0,03$ ), на фоне неизменного уровня ММП-1 и ММП-3. Изменения ЭЛ были положительно связаны с уровнем общей АДА и АДА-1 ( $r=0,61$ ;  $p=0,002$ ;  $r=0,62$ ;  $p=0,0015$ ). На фоне снижения АЛ отмечался рост ТИМП-1 ( $r=-0,47$ ;  $p=0,03$ ). Изменения ММП и ЭЛ носили однонаправленный характер. Также выявлены зависимости изменений между уровнями ММП-1 и ММП-3 ( $r=0,47$ ,  $p=0,04$ ), а также между ММП-1 и ЭЛ ( $r=0,51$ ,  $p=0,01$ ).

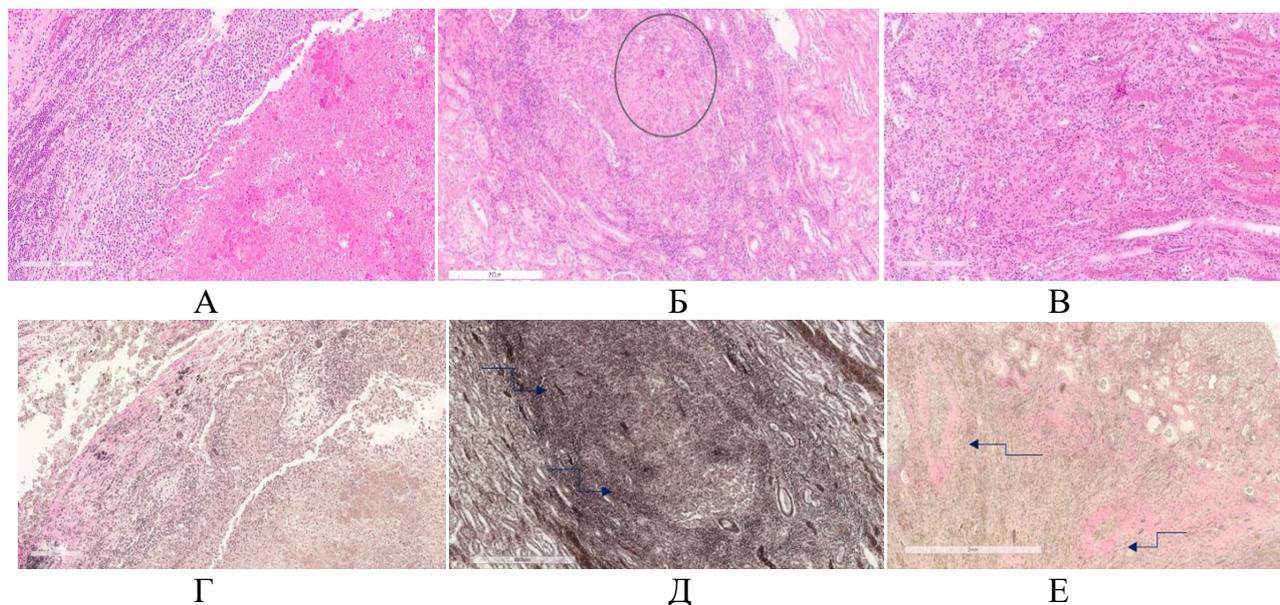
Через 3,5 месяца у кроликов первой группы все еще наблюдались повышенные уровни КР ( $p=0,006$ ), общей АДА и АДА-1 ( $p=0,027$ ), к этому времени также наблюдалось достоверное снижение ММП-1 ( $p=0,03$ ). Повышение уровня КР коррелировало с повышением активности общей АДА и АДА-1 ( $r=0,85$ ;  $p=0,035$ ;  $r=0,9$ ;  $p=0,04$ ), что свидетельствует о развитии воспалительного процесса в сочетании со снижением функции почек. Остальные показатели остались неизменными относительно предыдущих периодов наблюдения.

У кроликов второй группы после трехмесячного курса противотуберкулезного лечения уровень КР оставался повышенным, а уровень ЦП снижался и достоверно отличался от такового в первой группе ( $p=0,008$ ). Отмечается высокая активность общей АДА, преимущественно за счет АДА-1. Изменения активности общей АДА сочетались с увеличением КР ( $r=0,45$ ;  $p=0,04$ ). Значимых изменений ТИМП-1, ЭЛ, АЛ и ММП не наблюдалось, что можно расценивать как отсутствие выраженных процессов протеолиза.

Для 3-й группы животных прирост уровня КР был наименьшим и достоверно отличался от такового в первой группе ( $p=0,003$ ). ЦП также был ниже, чем в первой группе ( $p=0,02$ ). При пересчете концентраций показателей системы ММП/ингибиторы в этой группе выявлен самый высокий уровень ТИМП-1 ( $p=0,03$ ) и самый низкий уровень ММП-1 ( $p=0,03$ ). Такие же корреляционные связи сохранились между ЦП и ТИМП-1 ( $r=-0,45$ ;  $p=0,04$ ), с одной стороны, и между ММП-1 и ММП-3 ( $r=0,54$ ;  $p=0,01$ ) с другой, при этом отмечается статистически значимый рост АЛ ( $p=0,03$ ). Полученные результаты позволяют предположить, что МСК в сочетании с противотуберкулезными препаратами приводили к менее интенсивному воспалительному ответу и ускорению репаративной реакции.

*Гистологическое исследование.* При сочетанном введении МСК с противотуберкулезными препаратами морфологическая картина отличалась выраженным ангиоматозом и продуктивным характером инфильтрации. При окраске

методом Ван-Гизона зарегистрировано формирование зрелой, волокнистой соединительной ткани на месте очагов некроза (рисунок 5, В, Е). При окраске по Цилю-Нельсену КУМ не определяются. При использовании окраски по Перлсу выявляются очаги скопления макрофагов с обилием гемосидерина и мелкие клетки с чуть вытянутым ядром и Перлс-позитивными включениями, расположенные как в строме, между коллагеновыми волокнами, так и в стенках мелких сосудов. Конфокальная микроскопия показала наличие в ткани почки жизнеспособных МСК, меченных SPIONs.



А и Г – почка кролика первой группы; крупный очаг деструкции с формирующейся трехслойной стенкой и очагом некроза в центре; Б, Д – почка кролика второй группы; очаг специфического воспаления с некрозом в центре (круг) и умеренно выраженной лимфоидной инфильтрацией по периферии (Б); начальные признаки образования соединительной ткани (указаны стрелками) (Д); В, Е – почка кролика третьей группы; грануляционная ткань с признаками созревания (В), очаги зрелой соединительной ткани (указаны стрелками) со скоплениями макрофагов в центре очагов (Е). Окраска: гематоксилином и эозином (А, Б, В), по Ван-Гизону (Г, Д, Е). Масштабные отрезки: 200 мкм (А, Б, В, Г, Е), 400 мкм (Д).

Рисунок 5 – морфологическая картина микропрепаратов почек

*Морфометрическое исследование* таких показателей, как площадь внутренней поверхности капсулы Шумлянско-Боумана, площадь капсулярного пространства и площадь, занимаемая клубочковыми капиллярами, выявило, что у всех подопытных кроликов численные значения клубочковых параметров в 1,4-2,4 раза выше, чем в контроле (у здоровых животных).

При морфометрическом исследовании высоты эпителиальных клеток проксимальных и дистальных извитых канальцев, а также собирательных трубочек выявлено, что почти у всех подопытных кроликов за исключением одного численные значения высот эпителиоцитов извитых канальцев и собирательных трубочек в 1,1-1,4 раза выше, чем в контроле (у здоровых животных).

При оценке площадей некрозов в исследуемых группах статистически достоверных различий выявлено не было, однако в группе с МСК площадь некроза меньше в сравнении с группой, получавшей лечение только противотуберкулезными препаратами (рисунок 6).

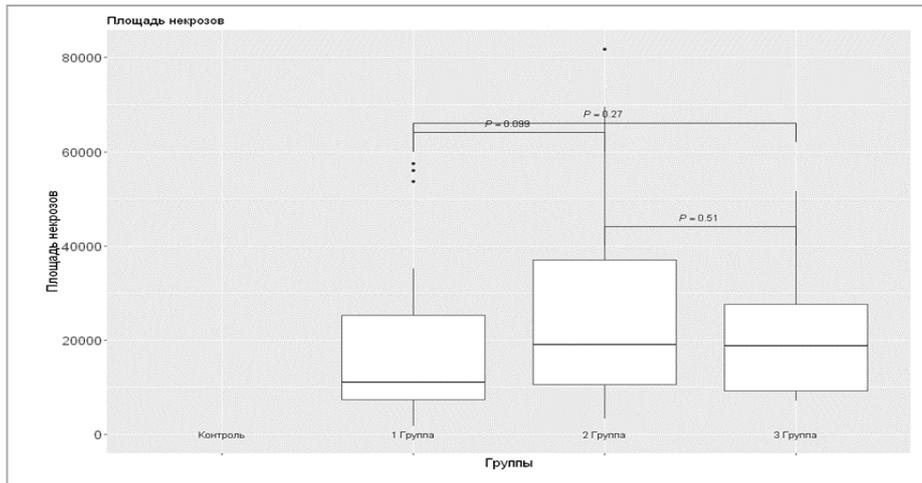


Рисунок 6 – Сравнение площади некрозов между группами

Таким образом у кроликов группы контроля заражения на протяжении всего эксперимента сохранялась высокая активность воспалительной реакции. Она была минимальной в третьей группе кроликов, которые получали в составе противотуберкулезной терапии МСК. Именно у животных этой группы по данным гистологического исследования отмечены начальные проявления репаративной реакции.

#### **Эффективность мезенхимных стволовых клеток в схеме химиотерапии туберкулеза почки кроликов, зараженных лекарственно устойчивым клиническим штаммом *M. tuberculosis* генотипа Beijing**

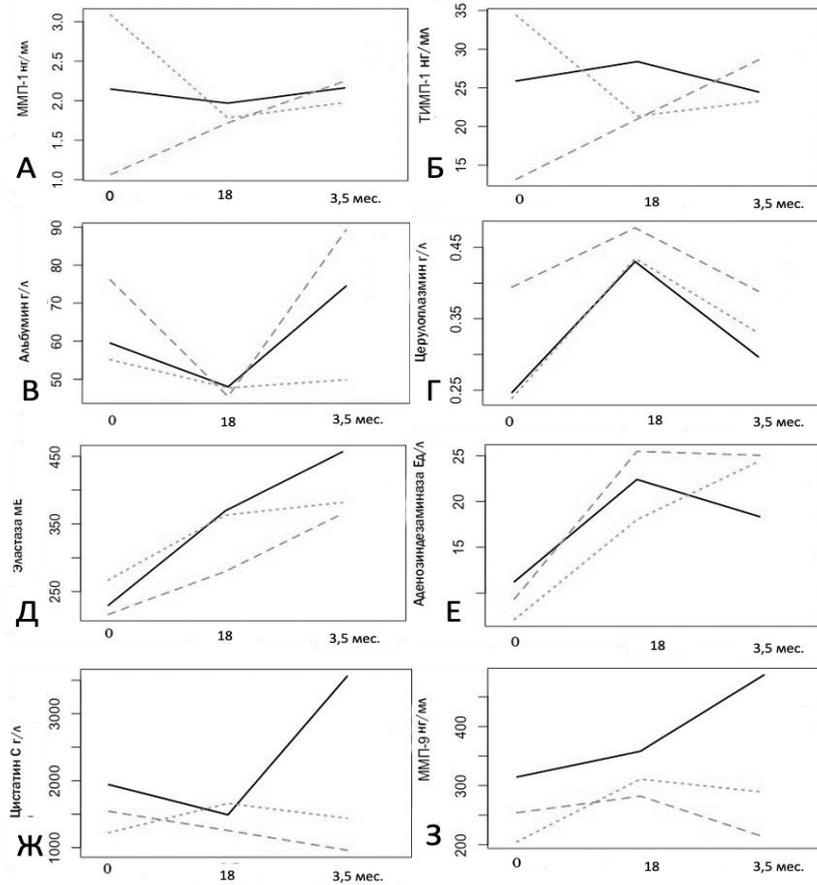
*Биохимическое исследование крови.* К 18 дню от начала эксперимента во всех группах наблюдалось значимое снижение концентрации АЛ, повышение ЦП, активности ЭЛ и АДА на фоне снижения массы тела животных (рисунок 7). В то же время, изменений концентрации маркеров функции почек – ЦС и КР, а также показателей системы ММП/ингибиторы (ММП-1, -9 и ТИМП-1) к этому сроку еще не было.

Через 3,5 месяца от начала эксперимента во всех трех группах воспалительный процесс характеризовался сохранением высокой активности АДА и ЭЛ, тогда как ЦП и АЛ вернулись к исходным значениям. Одномерный статистический анализ выявил значимые различия между группой контроля заражения (без лечения) и группами с лечением. Однако значимых различий между 2-й и 3-й группой ни по биохимическим маркерам воспалительного ответа, ни по показателям системы ММП/ингибиторы установлено не было, что послужило в дальнейшем, необходимостью поиска интегральной переменной (ДФ). В состав ДФ вошли показатели системы ММП/ингибиторы и маркеры функции почек и воспалительного ответа.

$$\text{ДФ} = \text{ЭЛ} \times 183285,57 + \text{ММП-1} \times 22848,45 - \text{ММП-9} \times 44989,18 + \text{ТИМП-1} \times 197091,42 - \text{КР} \times 527454,12 + \text{ЦС} \times 20227,34.$$

ДФ позволила отделить группу 1 от групп 2 ( $p=0,012$ ) и 3 ( $p=0,0005$ ), а также вторую группу от третьей ( $p=0,04$ ).

Животные с НТ без лечения имели самые высокие показатели ДФ, что соответствует росту концентрации ЦС на фоне сохранения деструктивных изменений, судя по уровням ЭЛ, ММП-1, -9 и ингибиторной защиты в виде ТИМП-1 (рисунок 7).



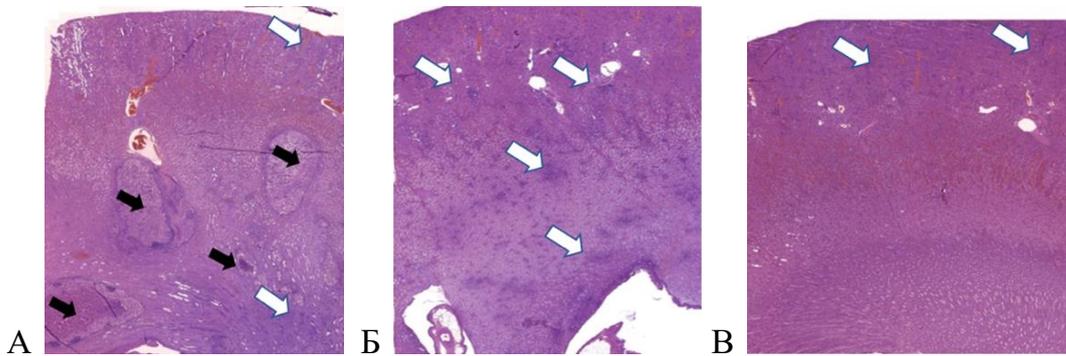
Примечание: группы 1 – сплошная жирная линия; 2 – пунктирная линия; 3 – штрих-линия.

Рисунок 7 – Уровни показателей воспалительной реакции: исходно (0), через 18 дней и 3,5 месяца от начала эксперимента

*Гистологическое и морфометрическое исследование.* При микроскопическом исследовании во всех образцах левых почек у кроликов 1 группы выявлено ярко-выраженное активное специфическое воспаление ( $30,6 (19,6;39,7) \text{ мм}^2$ ): макрофагально-лимфоцитарная инфильтрация по периферии казеозных масс (рисунок 8, А) с атрофией и некрозом канальцев на границе воспаления. В корковом веществе обнаружены участки ремоделирования стромы с отеком и лимфоцитарной инфильтрацией, в мозговом веществе – участки интерстициального фиброза, локализованного преимущественно периваскулярно, с тубулярной атрофией, лимфоцитарной и макрофагальной инфильтрацией и клетками Лангханса. При окрашивании по Цилю-Нельсену найдены кислотоустойчивые микобактерии в участках специфического воспаления. В остальных группах (2 и 3) явных морфологических признаков специфического воспаления и КУМ выявлено не было (рисунок 8, Б, В), в корковом и мозговом веществе преимущественно периваскулярно выявлены участки лимфоцитарной и макрофагальной инфильтрации с ремоделированием стромы, дистрофическими изменениями и атрофией канальцев, белковыми цилиндрами. Перлс-положительные включения были выявлены только у кроликов 3-й группы, получавшей МСК. Конфокальная микроскопия криосрезов показала инкорпорацию в ткани почки жизнеспособных МСК, меченных SPION.

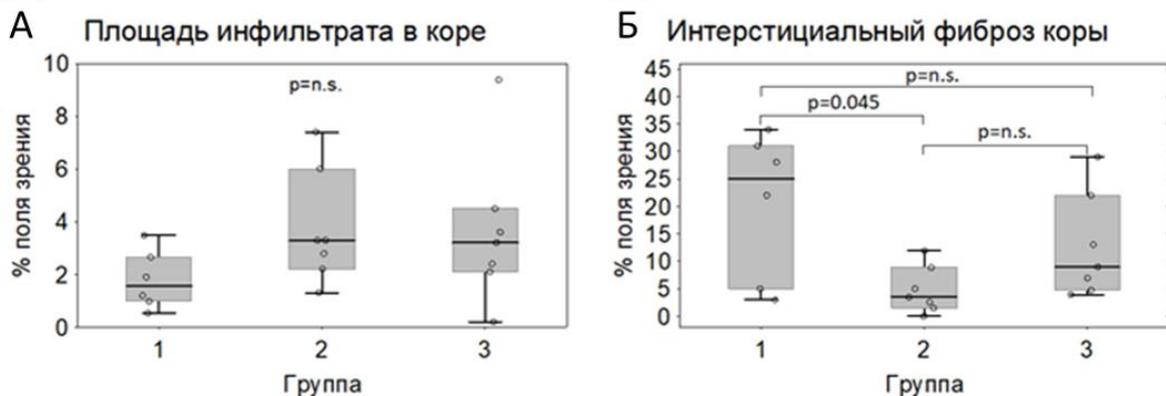
При сравнительном анализе площади инфильтрации в группах исследования было определено статистически значимое увеличение площади инфильтрации в группе

2 (рисунок 9, А), в то время как максимальный уровень фиброзных изменений отмечен в группе контроля заражения (рисунок 9, Б), что закономерно вследствие сохранения активности специфического процесса.



А – 1-я группа; Б – 2-я группа; В – 3-я группа. Участки специфического воспаления обозначены черными стрелками, лимфоцитарная инфильтрация – белыми. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 400$ .

Рисунок 8 – Микрофотографии морфологических изменений почки, в исследуемых группах



Примечание: n.s. – not significant,  $p > 0,05$ .

Рисунок 9 – Площадь инфильтрата (А) и площадь интерстициального фиброза (Б) левых почек (процент площади поля зрения) в экспериментальных группах

Большинство количественных показателей морфологии клубочков левых (зараженных) почек животных в изучаемых группах не различались. Значимые различия были выявлены по величине диаметра капилляров клубочков и толщине париетального листка капсулы Шумлянско-Боумана между 1 и 2-ой группами ( $p=0,035$ ) и тенденцией к снижению в 3-ей ( $p=0,06$ ). Толщина капсулы в 1 группе составила 4,08 мкм, во 2-ей – 2,89 мкм, а в 3-ей – 3,90 мкм. Отмечалось уменьшение диаметра перитубулярных капилляров во 2-й (8,68 мкм) и 3-й группах (5,8 мкм,  $p=0,05$ ) по сравнению с 1-й группой (10,7 мкм). Различия между 2-й (59,9 мкм) и 3-й группами были связаны с более высокими значениями в 3-й группе (68,4 мкм,  $p=0,002$ ) клеточности клубочков, что определялось наличием лимфоцитарной инфильтрации и увеличением площади коллагена в коре. Полученные результаты свидетельствуют о более выраженных гломерулярных изменениях в контрольной группе по сравнению с группами лечения.

Различий между 3-й и 2-й группами при сравнении количественных показателей изменений эпителиоцитов канальцев, лоханок левых почек и показателей сосудистых изменений левых почек установлено не было. В этих группах отмечалось снижение диаметра междольковой артерии за счет уменьшения толщины меди (p=0,05) и снижение толщины стенки лоханки (p=0,01) по сравнению с 1 группой (1-ая – 743,7 мкм, 2-ая – 289 мкм, 3-я – 377 мкм).

Микроструктура проксимальных извитых канальцев у кроликов 2-й группы сохранялась лучше, чем у кроликов 1-й группы, в частности, у них сохранялась и щеточная каемка эпителиоцитов, в связи с чем диаметр просвета проксимального канальца у кроликов 2-й группы (6,7 мкм) был меньше, чем у кроликов 1-й группы (10,4 мкм, p=0,05).

Сопоставление биохимических данных с морфологическими характеристиками структурного строения паренхимы почек показало их согласованность. По окончании эксперимента только в 1-й группе сохранялись очаги специфического воспаления с КУМ, локализованные преимущественно в мозговом веществе, также отмечались отчетливо выраженные изменения клубочков, что сопровождалось увеличением в крови концентраций АДА, ЭЛ и КР, ММП-9 и цистатина С, но не ММП-1 и ТИМП-1. В группах лечения были выявлены только косвенные признаки хронического воспалительного процесса в виде неспецифической интерстициальной лимфоцитарной инфильтрации. У кроликов 3-й группы выявлены более низкие значения площади интерстициального фиброза, площади коллагена в коре (p=0,04) по сравнению с данными 2-й группы, что, по-видимому, связано с наличием фибропластических или склеротических интерстициальных изменений.

**Применение внеклеточных везикул,  
выделенных из мезенхимных стволовых клеток, в терапии нефротуберкулеза,  
вызванного клиническим штаммом *M. Tuberculosis H37Rv***

*Биохимическое исследование крови.* К 18-му дню после заражения во всех группах наблюдались признаки снижения активности ЩФ при неизменном уровне КР, повышение активности АДА и снижение уровня АЛ. Уровень активности ЦП и ЭЛ статистически значимо не изменился (таблица 1). Полученные данные свидетельствуют о воспалительном процессе со статистически значимым снижением уровня АЛ как одного из реактантов острой фазы и со снижением активности ЩФ, отражающим поражение почек.

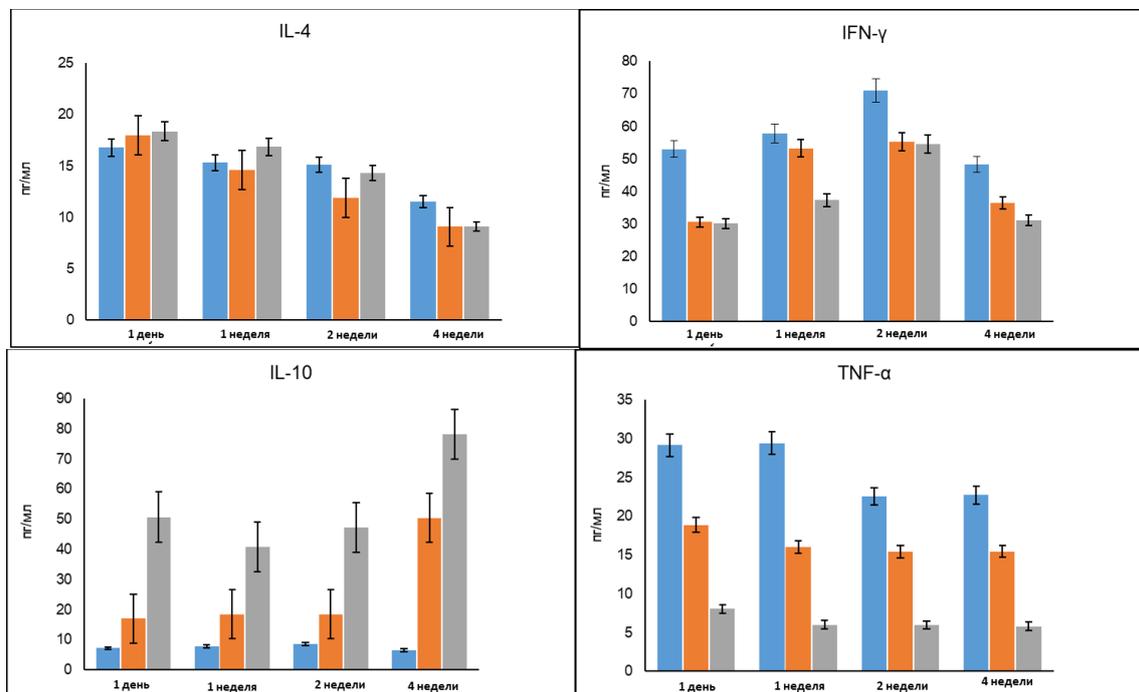
Через 3,5 месяца зафиксировано дальнейшее статистически значимое снижение активности ЩФ по сравнению с исходными данными при неизменном уровне КР в первой группе. Выявлено статистически значимое повышение активности ЭЛ и, наоборот, снижение уровня АЛ. Во второй группе наблюдалось снижение активности ЩФ, уровня ЦП и АЛ, повышение активности ЭЛ. Повышение активности ЭЛ - регулятора воспалительной реакции, может быть связано как с его провоспалительной, так и противовоспалительной активностью. В третьей группе снижение активности ЩФ и уровней КР и АЛ было в меньшей степени. Концентрация ЦП статистически значимо не изменилась, что показывает по-прежнему высокий уровень воспалительного ответа (таблица 1). Кроме того, наблюдался прирост массы тела экспериментальных животных.

Таблица 1 – Биохимические показатели крови кроликов с НТ

Показатели	Исходные данные	Исследуемые группы, 18 день	Исследуемые группы, 3,5 месяца		
			1 группа	2 группа	3 группа
КР, мкмоль/л	0,025	0,021	0,023	0,016*	0,02**
ЩФ, ед/л	178,0	123,0**	41,0*	41,0**	51,0**
АЛ, г/л per g. weight	0,015	0,013*	0,013*	0,01**	0,01**
ЦП, г/л per g. weight	0,0001	0,0001	0,0001	0,00006*	0,00008**
Общ. АДА, Ед/л	11,8	21,2**	11,1*	14,3*	17,6**
ЭЛ, мЕ	221,0	304,3	412,9**	376,7*	449,2*
Масса, г	3148,0	3454,0**	3628,0*	3956,0**	4240,0*

Примечание – звездочки – статистически значимая разница, показанная для групп по сравнению с исходным уровнем, значения р выражаются следующим образом: 0,05 > р > 0,01 \*; 0,01 > р > 0,001 \*\*; сроки указаны от начала эксперимента.

*Оценка иммунологических показателей.* Минимальный уровень противовоспалительных цитокинов (IL-4 и IL-10) на протяжении всего периода наблюдения выявлен в первой группе. На 1-е сутки после введения МСК-ВВ уровень IL-4 был самым высоким в третьей группе по сравнению с первой и второй группами. Однако через 4 недели различий между уровнем IL-4 во второй и третьей группах не было (рисунок 10). Значение уровня IL-10 в первой группе было самым низким и в дальнейшем медленно снижалось (с 7,15 до 6,41 пг/мл). В то же время во второй и третьей группах уровень IL-10 был в разы выше, чем в первой группе. Через 4 недели он еще более значительно увеличился (50,36 и 78,23 пг/мл).



Примечание: ■ – группа 1, ■ – группа 2, ■ – группа 3;

\* – статистически значимая разница, показанная для групп по сравнению с первой группой, значения р выражаются следующим образом: 0,05 > р > 0,01 \*; 0,01 > р > 0,001 \*\*; сроки указаны от введения МСК-ВВ.

Рисунок 10 – Концентрация иммунологических показателей в плазме крови через 1 день, 1 неделю, 2 недели, 4 недели от введения МСК-ВВ

Во всех группах максимальный уровень провоспалительного цитокина TNF- $\alpha$  выявлен в течение первой недели. Однако его значение было самым высоким в первой группе (71,1 пг/мл) по сравнению со второй и третьей группами (55,27 и 54,51 пг/мл). В первые сутки уровень INF- $\gamma$  для второй и третьей групп не имел различий и был ниже по сравнению с первой группой. Через 4 недели во второй и третьей группах наблюдалось статистически значимое снижение INF- $\gamma$  по сравнению с первой группой, что может свидетельствовать об эффективности лечения туберкулёза (рисунок 10).

*Оценка гистологических и морфометрических показателей.* У животных первой группы размер левой почки был больше, чем правой. Кортикальный и мозговой слой дифференцированы, лоханка расширена. Участок казеозного некроза (около 40,6 мм<sup>2</sup>) с соединительнотканной капсулой выявлялся преимущественно в мозговом веществе. Активное специфическое воспаление с макрофагально-лимфоцитарной инфильтрацией наблюдалось во всех исследуемых группах только в левой, но не в правой почке. КУМ были выявлены только в группе 1. У животных 2 и 3 групп не было выявлено различия в размерах левой и правой почки. Кортикальный и мозговой слой дифференцированы без макроскопических признаков структурных нарушений, лоханка не расширена.

Данные морфометрического исследования левых почек показали меньшие значения площади специфического и интерстициального воспаления коркового слоя и коллагеновой зоны мозгового вещества у животных второй и третьей групп по сравнению с первой группой. Площадь специфического воспаления в третьей группе (0,34 $\pm$ 0,04 мм<sup>2</sup>) была в сто двадцать раз меньше по сравнению с первой (40,6 $\pm$ 3,5 мм<sup>2</sup>) и второй (6,5 $\pm$ 9,5 мм<sup>2</sup>) группами (таблица 2).

Таблица 2 – Количественные показатели структурных изменений почек

Исследуемые показатели	Исследуемые группы			p
	1	2	3	
Ширина коркового вещества мм	4,1 $\pm$ 0,42	3,5 $\pm$ 0,37	3,3 $\pm$ 0,31	0,30
Ширина мозгового вещества, мм	9,3 $\pm$ 0,8	12,1 $\pm$ 2,1	11,8 $\pm$ 1,3	0,48
Площадь специфического воспаления, мм <sup>2</sup>	40,6 $\pm$ 3,5	6,5 $\pm$ 9,5	0,34 $\pm$ 0,04	0,048
Интерстициальное воспаление в корковом веществе, %	7,1 $\pm$ 0,51	1,7 $\pm$ 1,6	2,0 $\pm$ 2,5	0,78
Интерстициальное воспаление в мозговом веществе, %	5,5 $\pm$ 1,5	5,7 $\pm$ 2,4	5,1 $\pm$ 2,8	0,73
Коллаген в корковом веществе, %	6,7 $\pm$ 0,76	5,0 $\pm$ 4,1	6,4 $\pm$ 3,6	0,51
Коллаген в мозговом веществе, %	27,8 $\pm$ 2,5	10,1 $\pm$ 11,8	19,9 $\pm$ 7,6	0,15
Примечание – p – значение значимости при сравнении второй и третьей групп с первой.				

Большинство количественных показателей клубочков почек между второй и третьей группами достоверно не различались. Однако некоторые показатели, такие как диаметр капилляров клубочков у животных второй и третьей групп (5,4 $\pm$ 1,1 и 5,5 $\pm$ 1,3 мкм) по сравнению с первой группой (9,8 $\pm$ 0,9 мкм), могут быть признаком застоя в инфицированной почке. Во второй и третьей группах высота эпителия (54,5 и 66,5 мкм) и толщина почечной лоханки (289 и 377 мкм) также были меньше, чем в первой группе (74,5 и 743,7 мкм). Эти показатели свидетельствуют о меньшей степени ремоделирования и инфильтрации стенки почечной лоханки, особенно в 3-й группе. Количественные параметры почечных сосудов в исследуемых группах существенно не

изменились за исключением толщины стенки междольковой вены и ее диаметра, который был меньше для первой группы по сравнению с другими группами.

По данным *КТ почек* в первой группе наблюдалась инфильтрация (рисунок 11) с массивной гиповаскулярной зоной в корковом и мозговом слоях и вовлечением прилежащей жировой клетчатки. Также наблюдалось сморщивание стенки за счет рубцевания, истончение коркового слоя и фиброзные изменения. Во второй и третьей группах зон деструкции и инфильтрации в паренхиме, а также зон пониженной перфузии не выявлено (рисунок 11).

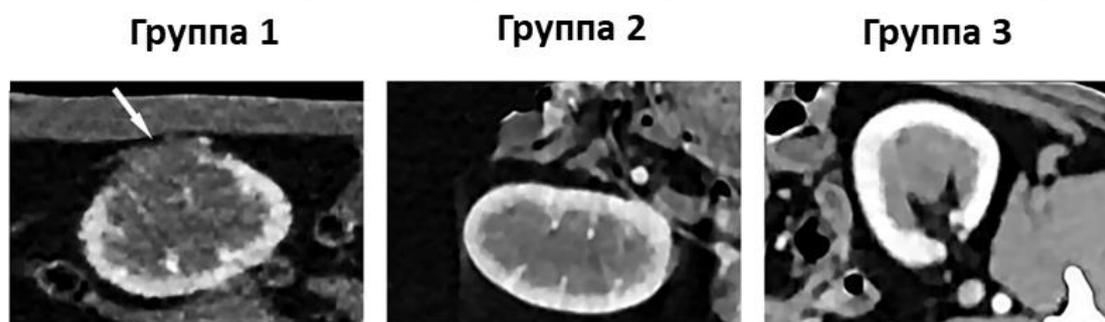


Рисунок 11 – КТ почек, кортико-медуллярная фаза: в первой группе имеется массивная гиповаскулярная зона, во второй и третьей группах изменений нет. Стрелка указывает на патологические изменения в почке

*Оценка МСК-ВВ.* С помощью ТЭМ выявлено, что МСК-ВВ имеют сферическую морфологию. По данным динамического светорассеяния раствора МСК-ВВ, три группы ВВ имели диапазон диаметров 10–300 нм ( $10 \pm 0,5$  нм;  $70 \pm 5,1$  нм,  $300 \pm 3,3$  нм). Вестерн-блот-анализ показал, что МСК-ВВ специфичные маркеры (Hsp70, CD63, CD9). Концентрация общего белка в МСК-ВВ составляла 200 мкг/мл.

*Характеристика протеома МСК-ВВ.* Всего было идентифицировано 473 белка, включая биомаркеры ВВ, такие как белки теплового шока, аннексины и CD63. Кластеризация выявила 32 группы, среди которых тремя крупнейшими были белки внеклеточного матрикса, протеасомный комплекс и группа белков энергетического метаболизма. Среди протеома МСК-ВВ были обнаружены белки, связанные с иммунным ответом, антимикробной и противовоспалительной активностью (таблица 3).

Таблица 3 – Список характерных белков ВВ, выявленных с помощью масс-спектрометрического анализа

Наименование белка	Кластер	Биологическое действие
Субъединица гемоглобина бета-2 Лактотрансферрин Лизоцим ЦистатинВ	Противомикробный	Иммунный ответ Антимикробная защита Регуляция воспаления Модуляция цитоскелета
АннексинА	Группа аннексинов	Противовоспалительный ответ
Аполипопротеин Е Аполипопротеин А-I	Липопротеины высокой плотности	Связывание липидов
Галектин Галектин-3	Галектины	Клеточная адгезия Воспалительная реакция

Таким образом, проведенные исследования демонстрируют преимущества применения ПТТ с МСК-ВВ, которые проявляются в уменьшении зон специфического воспаления и достоверным увеличением противовоспалительных цитокинов IL-4, IL-10, что дает возможность сокращать длительность курса противотуберкулезной терапии. С этим согласуется наличие в протеоме МСК-ВВ белков, которые могут модулировать иммунный ответ и уменьшать воспаление тканей. Таким образом, МСК-ВВ могут стать перспективным компонентом комплексного лечения различных инфекционных заболеваний, в частности НТ.

## **ВЫВОДЫ**

1. В экспериментальных условиях показано, что при введении кроликам суспензии микобактерий с различной лекарственной чувствительностью в корковый слой нижнего полюса левой почки закономерно развивается нефротуберкулез, что подтверждается данными лучевого, микробиологического, гистологического и биохимического исследований, а также результатами Диаскинтеста.

2. Полученная в результате исследования новая экспериментальная модель туберкулеза почки отличается от ранее предложенных малотравматичным хирургическим доступом, точной дозировкой микобактериальных клеток, используемых для заражения, доступностью для воспроизведения, возможностью персонифицированного прижизненного мониторинга патофизиологических изменений у экспериментальных животных, что позволяет использовать ее для разработки различных аспектов профилактики, диагностики и лечения данного заболевания в соответствии с задачами практической фтизиатрии и урологии.

3. При однократном системном введении зараженным животным мезенхимных стволовых клеток, меченых SPION, с использованием иммунофлуоресцентной микроскопии МСК и окраски по методу Персла обнаруживаются преимущественно в тканях почек.

4. Однократное системное применение мезенхимных стволовых клеток костного мозга через 1 месяц противотуберкулезной терапии у кроликов с туберкулезом почки, вызванного микобактериями с разной лекарственной чувствительностью, способствует повышению эффективности лечения. Отмечается снижение распространенности специфического воспаления в почках, уменьшение его активности и ускорение репаративной реакции с формированием зрелой соединительной ткани.

5. Однократное применение внеклеточных везикул, выделенных из мезенхимных стволовых клеток костного мозга, в составе химиотерапии моделированного нефротуберкулеза приводила к значимому повышению уровня противовоспалительных цитокинов IL-4, IL-10, сокращению распространенности туберкулезного процесса в тканях инфицированной почки и уменьшению его активности.

## **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Проведенное экспериментальное исследование посвящено актуальной проблеме современной медицины – разработке альтернативных методов терапии туберкулеза и ренопротекции в условиях лечения противотуберкулезными препаратами. Результаты эксперимента продемонстрировали, что даже однократное введение МСК или ВВ при комплексном лечении туберкулеза почек способствует элиминации возбудителя,

отграничению очага специфического воспаления и его ускоренному замещению рубцовой тканью. Важным этапом дальнейших исследований является накопление и оценка отдаленных результатов применения МСК в экспериментах, моделирующих всевозможные патологические процессы в тканях почки перед внедрением в клиническую практику.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Работы, опубликованные в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и образования РФ и входящих в международные реферативные базы данных:

1. **Ремезова, А.Н.** Мезенхимные стволовые клетки в терапии туберкулеза / А.Н. Ремезова, А.А. Горелова, А.Н. Муравьев, Т.И. Виноградова, А.И. Горелов, А.И. Горбунов, Н.В. Орлова, Н.М. Юдинцева, Ю.А. Нащекина, М.Г. Шейхов, П.К. Яблонский // *Consilium Medicum*. – 2021. – Т. 23, № 9. – С. 462-465. – doi: 10.26442/20751753.2021.9.200953.
2. **Ремезова, А.Н.** Применение мезенхимных стволовых клеток при заболеваниях почек и мочевыводящих путей: обзор литературы и собственный опыт / А.Н. Ремезова, А.А. Горелова, А.Н. Муравьев, А.И. Горелов, А.И. Горбунов, Т.И. Виноградова, Н.В. Заболотных, Н.В. Орлова, М.Г. Шейхов, Н.М. Юдинцева, Ю.А. Нащекина, П.К. Яблонский. // *Медицинский Альянс*. – 2021. – № 2. – С. 34-43.
3. **Ремезова, А.Н.** Использование мезенхимных стволовых клеток в терапии туберкулеза / А.Н. Ремезова, А.А. Горелова, Т.И. Виноградова, А.И. Горелов, А.И. Горбунов, Н.М. Юдинцева // *Туберкулёз и болезни лёгких*. – 2022. – Т. 100, № 4. – С. 62-66. – doi: 10.21292/2075-1230-2022-100-4-62-66.
4. Юдинцева, Н.М. Применение мезенхимных стволовых клеток и внеклеточных везикул в терапии инфекционных заболеваний / Н.М. Юдинцева, М.А. Шевцов, М.Г. Хотин, Т.И. Виноградова, А.Н. Муравьев, **А.Н. Ремезова**, Н.А. Михайлова // *Молекулярная медицина*. – 2022. – Т. 20, № 6. – С. 16-24. – doi: 10.29296/24999490-2022-06-03.
5. Виноградова, Т.И. Применение мезенхимных стволовых клеток в комплексном лечении лекарственно-устойчивого туберкулеза почки (экспериментальное исследование при морфологическом контроле) / Т.И. Виноградова, Д.С. Эсмедляева, М.Е. Дьякова, А.Н. Муравьев, **А.Н. Ремезова**, Б.М. Ариэль, Е.О. Богданова, М.З. Догонадзе, Н.В. Заболотных, Н.Ю. Юдинцева, В.О. Полякова, П.К. Яблонский // *Молекулярная медицина*. – 2023. – Т. 21, № 5. – С. 27-35. – doi: 10.29296/24999490-2023-05-04.
6. Muraviov, A.N. The Use of Mesenchymal Stem Cells in the Complex Treatment of Kidney Tuberculosis (Experimental Study) / A.N. Muraviov, T.I. Vinogradova, **A.N. Remezova**, B.M. Ariel, A.A. Gorelova, N.V. Orlova, N.M. Yuditceva, D.S. Esmedliaeva, M.E. Dyakova, M.Z. Dogonadze, N.V. Zabolotnykh, I.A. Garapach, O.S. Maslak, Y.A. Kirillov, S.E. Timofeev, Y.S. Krylova, P.K. Yablonskiy // *Biomedicines*. – 2022. – Vol. 10, Iss. 12. – A. 3062. – doi: 10.3390/biomedicines10123062.
7. Yuditceva, N. Mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles for therapeutics of renal tuberculosis / N. Yuditceva, D. Bobkov, M. Sulatsky, N. Mikhailova, E. Oganessian, T. Vinogradova, A. Muraviov, **A. Remezova**, E. Bogdanova, I. Garapach, O. Maslak, D. Esmedlyaeva, M. Dyakova, P. Yablonsky, R. Ziganshin, S. Kovalchuk, N. Blum, S.H. Sonawane, A. Sonawane, A. Behl, S. Singh, M. Shevtsov // *Scientific Reports*. – 2024. – Vol. 14, № 1. – A. 4495.

### Результаты интеллектуальной деятельности

8. Патент на изобретение 2776130 С1. Способ моделирования туберкулеза почки: заявл. 13.07.2022; опубл. 13.07.2022 / А.Н. Муравьев, Т.И. Виноградова, М.З. Догонадзе,

Д.С. Эсмедляева, М.Е. Дьякова, Н.В. Орлова, А.А. Горелова, **А.Н. Ремезова**, Н.В. Заболотных, Н.М. Юдинцева, Е.Г. Соколович, П.К. Яблонский // Изобретения. Полезные модели: офиц. бюл. – Москва: ФИПС, 2022. – № 20.

9. Свидетельство о регистрации базы данных RU2023622275. Эффективность мезенхимных стволовых клеток в комплексной терапии экспериментального туберкулеза почек с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя: заявл. 29.05.2023; опублик. 07.07.2023 / Т.И. Виноградова, А.Н. Муравьев, Д.С. Эсмедляева, М.Е. Дьякова, А.Н. Ремезова, Е.О. Богданова, Н.М. Блюм, И.А. Гарапач, О.С. Маслак, Н.В. Заболотных, М.З. Догондзе, М.Л. Витовская, Ю.А. Кириллов, В.О. Полякова, П.К. Яблонский; заявитель и правообладатель федеральное государственное бюджетное учреждение «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

#### Публикации в иных научных изданиях:

10. Горелова, А.А. Мезенхимные стволовые клетки и их распределение в организме при внутривенном введении лабораторному животному / А.А. Горелова, **А.Н. Ремезова**, Н.М. Юдинцева, М.З. Догондзе, А.Н. Муравьев, Т.И. Виноградова, П.К. Яблонский // Медицинский альянс. X конгресс Национальной ассоциации фтизиатров с международным участием (25-26 ноября 2021 года, Санкт-Петербург): тезисы докладов / под ред. П.К. Яблонского (президент конгресса). – 2021. – Т. 9, № S4. – С. 34-35.

11. **Ремезова, А.Н.** Использование малоинвазивного доступа при создании экспериментальной модели туберкулеза почки кролика / А.Н. Ремезова, А.А. Горелова, Н.В. Заболотных, А.Н. Муравьев, Т.И. Виноградова, Е.Г. Соколович // Медицинский альянс. X конгресс Национальной ассоциации фтизиатров с международным участием (25-26 ноября 2021 года, Санкт-Петербург): тезисы докладов / под ред. П.К. Яблонского (президент конгресса). – 2021. – Т. 9, № S4. – С. 92-94.

12. Горелова, А.А. Оценка распределения мезенхимных стволовых клеток в организме лабораторного животного / А.А. Горелова, **А.Н. Ремезова** // Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье: материалы XXV Международной медико-биологической конференции молодых исследователей. 2022. – Санкт-Петербург, Издательство: Общество с ограниченной ответственностью, Издательский дом «Сциентиа», 2022. – С. 264-265.

13. **Ремезова, А.Н.** Преимущества малоинвазивного доступа при создании экспериментальной модели туберкулеза почки кролика / А.Н. Ремезова, А.А. Горелова // Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье: материалы XXV Международной медико-биологической конференции молодых исследователей. 2022. – Санкт-Петербург, Издательство: Общество с ограниченной ответственностью, Издательский дом «Сциентиа», 2022. – С. 578-579.

14. **Ремезова, А.Н.** Применение мезенхимных стволовых клеток в комплексном лечении туберкулеза почек: предварительные результаты / А.Н. Ремезова, А.А. Горелова // Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза. – 2022. – № S1. – С. 17-18.

15. **Ремезова, А.Н.** Применение мезенхимных стволовых клеток в комплексном лечении туберкулеза почек (экспериментальное исследование) / А.Н. Ремезова // XXV Санкт-Петербургская Ассамблея молодых ученых и специалистов: сборник тезисов. – Санкт-Петербург: Правительство Санкт-Петербурга Комитет по науке и высшей школе, 2022. – С. 231.

16. Юдинцева, Н.М. Применение внеклеточных везикул, выделенных из мезенхимных стволовых клеток, в терапии нефротуберкулеза / Н.М. Юдинцева, М.Г. Хотин, М.А. Шевцов, М.И. Сулацкий, Д.Ф. Гончарова, Т.И. Виноградова, А.Н. Муравьев, **А.Н. Ремезова**, М.З. Догондзе, Н.В. Заболотных, М.Е. Дьякова, Д.С. Эсмедляева, И.А. Гарапач, О.С. Маслак, Н.А. Михайлова // Гены и клетки. – 2022. – Т. 17, № 3. – С. 267.

17. Горелова, А.А. Лечение экспериментального нефротуберкулёза с применением внеклеточных везикул / А.А. Горелова, **А.Н. Ремезова**, В.В. Шумко // Материалы XXVI Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» / под ред. А.М. Сараны [и др.]. – Санкт-Петербург, 2023. – С. 788-789.

18. **Ремезова, А.Н.** Оценка активности репаративных процессов в рамках изучения эффективности применения мезенхимных стволовых клеток в комплексной терапии экспериментального туберкулеза почек / А.Н. Ремезова, А.А. Горелова // Материалы XXVI Международной медико-биологической конференции молодых исследователей Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье / под ред. А.М. Сараны [и др.]. – Санкт-Петербург, 2023. – С. 792-793.

19. Юдинцева, Н.М. Бесклеточная терапия в комплексном лечении туберкулеза / Н.М. Юдинцева, Д.Е. Бобков, М.И. Сулацкий, Т.И. Виноградова, А.Н. Муравьев, **А.Н. Ремезова**, Р.Х. Зиганшин, С.И. Ковальчук, А.А. Тен, М.А. Шевцов, Н.А. Михайлова // StemCellBio-2023. Трансляционная медицина – спектр возможностей: сборник материалов конференции и Школы-конференции «Коллекции культур клеток человека и животных: современные вызовы и сетевые решения». – Санкт-Петербург, ПОЛИТЕХ-ПРЕСС, 2023. – С. 68.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДА	– аденозиндезаминаза
АЛ	– альбумин
АТР	– аллерген туберкулезный рекомбинантный
КОЕ	– колониеобразующая единица
КР	– креатинин
КТ	– компьютерная томография
КУМ	– кислотоустойчивые микобактерии
МЛУ	– множественная лекарственная устойчивость
ММП	– металлопротеиназа
МС	– масс-спектрометрия
МСК	– мезенхимные стволовые клетки
МСК-BB	– внеклеточные везикулы, выделенные из МСК
МТБ	– микобактерии туберкулеза
НТ	– нефротуберкулез
ПТТ	– противотуберкулезная терапия
ТИМП	– тканевой ингибитор металлопротеиназ
ТЭМ	– трансмиссионная электронная микроскопия
ЦП	– церрулоплазмин
ЭЛ	– эластаза
DAPI	– 4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид
IFN	– интерферон
IL	– интерлейкин
PBS	– фосфатно-буферный солевой раствор
PPI	– белок-белковые взаимодействия
SPION	– суперпарамагнитная наночастица
TNF	– фактора некроза опухоли