

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ИНСТИТУТ ФТИЗИОПУЛЬМОНОЛОГИИ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*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

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

Виноградова Татьяна Ивановна,  
доктор медицинских наук, профессор

Муравьев Александр Николаевич  
кандидат медицинских наук

Санкт-Петербург – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	15
1.1 Современные представления о туберкулезе почек: эпидемиология, этиология, патогенез, диагностика, лечение .....	15
1.2 Возможности экспериментального моделирования туберкулезной инфекции почек .....	19
1.3 Мезенхимные стволовые клетки внеклеточные везикулы .....	21
1.3.1 Основные характеристики и механизмы действия мезенхимных стволовых клеток и внеклеточных везикул .....	21
1.3.2 Роль мезенхимных стволовых клеток и внеклеточных везикул в улучшении репаративных процессов в органах и тканях .....	30
Глава 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	36
2.1 Модельные животные и их содержание .....	36
2.2 Методы исследования .....	37
2.2.1 Методика подготовки штаммов микобактерий туберкулеза, используемых для заражения .....	37
2.2.2 Протокол моделирования экспериментального нефротуберкулеза .....	39
2.2.3 Постановка внутрикожной пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным .....	41
2.2.4 Методика выделения и культивирования мезенхимных стволовых клеток костного мозга .....	41
2.2.5 Методики оценки внеклеточных везикул, выделенных из мезенхимных стволовых клеток .....	45
2.2.6 Методика изучения биораспределения мезенхимных стволовых клеток в организме кроликов с нефротуберкулезом .....	48

2.2.7	Протокол проведения противотуберкулезной терапии и введения мезенхимных стволовых клеток и внеклеточные везикулы, выделенные из мезенхимных стволовых клеток.....	50
2.2.8	Клинические методы исследования.....	52
2.2.9	Биохимические и иммунологические методы исследования....	52
2.2.10	Бактериологический метод исследования мочи .....	53
2.2.11	Лучевые методы исследования.....	54
2.2.12	Гистологические и морфометрические методы исследования .....	56
2.2.13	Методы статистической обработки результатов.....	58
Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....		
3.1	Результаты моделирования экспериментального нефротуберкулеза.....	59
3.2	Оценка распределения мезенхимных стволовых клеток в организме в условиях системного введения зараженным животным.....	66
3.3	Влияние мезенхимных стволовых клеток костного мозга на эффективность лечения туберкулеза почки, вызванного микобактериями с различной лекарственной чувствительностью....	69
3.3.1	Эффективность мезенхимных стволовых клеток в комплексном лечении туберкулеза почки, вызванного лекарственно чувствительным штаммом <i>M.tuberculosis</i> H37Rv .....	69
3.3.2	Эффективность мезенхимных стволовых клеток в схеме химиотерапии туберкулеза почки кроликов, зараженных лекарственно устойчивым клиническим штаммом <i>M. tuberculosis</i> генотипа Beijing .....	79
3.4	Применение внеклеточных везикул, выделенных из мезенхимных стволовых клеток, в терапии нефротуберкулеза, вызванного лекарственно чувствительным штаммом <i>M.tuberculosis</i> H37Rv .....	93

ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	108
ВЫВОДЫ .....	118
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ....	120
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	121
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	123

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Почечная патология является одной из глобальных проблем общественного здравоохранения, затрагивающей свыше 750 миллионов человек во всем мире (Акименко М.А., 2023). В течение последнего десятилетия заболевания почек занимают одно из лидирующих мест среди патологий с социально значимыми последствиями, такие как утрата трудоспособности, инвалидизация, высокая стоимость лечения и низкое качество жизни, связанное в первую очередь с почечной недостаточностью (Свиридова М.С., 2013; Акименко М.А., 2023; Bello A.K., 2017; Yang C.W., 2020). Хроническая болезнь почек (ХБП) занимает одно из ведущих мест как по распространенности, так и по затратам на лечение (Швецов М.Ю., 2014; Котенко О.Н., 2018; Акименко М.А., 2023), а также является одной из главных причин смертности во всем мире (Siddiqui M.M., 2011; Neuen B.L., 2017).

К одной из угроз здоровью почек относят нефротуберкулез (НТ). По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), 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; Muneer A., 2019; Global TB report, 2023). НТ вторичен по отношению к легочному туберкулезу (ТБ) и представляет гораздо меньшую эпидемиологическую опасность, чем ТБ органов дыхания, однако диагностируется сравнительно поздно, когда более чем в половине случаев (77,6%) у больных уже развиваются осложнения и необратимые изменения (Кульчавеня Е.В., 2023; Figueiredo A., 2008; Merchant S., 2013) неизбежные как из-за поздней диагностики НТ, так и вследствие нефротоксического действия противотуберкулезных препаратов (Danjuma L., 2018). Фиброзные процессы, характерные для длительного течения

специфического воспаления и его хронизации, способствуют в 54,5-84,7% случаев уретерогидронефротической трансформации почки (Lima N., 2012; Merchant S., 2013; Kim E., 2018), наряду с образованием гранулем и их кальцификацией, что с одной стороны приводит к терминальной стадии ХБП у 5,7% пациентов (Desai U., 2019; Gopaldaswamy R., 2021; Park M., 2021), а с другой – требует выполнения реконструктивно-пластических операций на верхних мочевых путях или нефрэктомии (Муравьев А.Н., 2012; Смирнов А.В., 2012; Швецов М.Ю., 2014; Шутов А.М., 2014; Комяков Б.К., 2015; Котенко О.Н., 2018; Чотчаев Р.М., 2019; Mittal A., 2020). В связи с этим, актуальность изучения поражения почек при НТ не оставляет сомнений, особенно с учетом того, что почечная дисфункция является одним из факторов риска неблагоприятного течения и исхода для пациентов с сопутствующей патологией – сердечно-сосудистыми заболеваниями, сахарным диабетом и др. (Мухин Н.А., 2007; Tonelli M., 2006).

Регистрируемое в последнее десятилетие повсеместное увеличение числа случаев туберкулеза почек с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) возбудителя создает дополнительные серьезные социально-экономические и терапевтические проблемы (Зеллвегер Ж.П., 2017; Чотчаев Р.М., 2019). МЛУ нефротуберкулез отличается длительным, дорогостоящим лечением, нередко с развитием поражений почек в результате прямого токсического действия противотуберкулезных препаратов (Lee H.Y., 2015; Danjuma L., 2018; Desai U., 2019; Gopaldaswamy R., 2021; Park M., 2021).

В последние годы для восстановления структуры и функции поврежденных органов и тканей все чаще используются новейшие биомедицинские технологии, в частности клеточная терапия, основанная на трансплантации мезенхимных стволовых клеток в пораженный орган. Мезенхимные стволовые клетки (МСК) представляют собой один из основных инструментов репарации при различных патологических процессах. Эти плюрипотентные клетки обладают антимикробными свойствами (Ярыгин К.Н., 2016; Nicolay N.H., 2015; Harman R.M., 2017; Trohatou O., 2017; Chow L., 2020), выдающимся регенеративным потенциалом благодаря уникальной способности мигрировать

к месту повреждения, персистировать там и секретировать широкий спектр биоактивных макромолекул, регулирующих восстановление поврежденных тканей (Caplan A.I., 2007; Jones G.N., 2012; Trohatou O., 2017), способностью дифференцироваться в разные типы клеток (Meirelles L.D.S., 2006; Guillot P.V., 2007; Della Bella E., 2021) и оказывать иммуномодулирующее действие (Islam M., 2012; Favaro E., 2014; Parida S., 2015; Yáñez-Mó M., 2015; Chow L., 2020; Della Bella E., 2021). Исследователи полагают, что МСК участвуют в регуляции регенерации тканей путем распределения клеток в поврежденный участок путем хемотаксиса и паракринной регуляции (Gattazzo F., 2014; Chermnykh E., 2018; Degirmenci B., 2018). Секретом МСК включает факторы, ответственные за ангио- и нейрогенез, пролиферацию клеток, жизнеспособность и хемотаксис (Prieto C.P., 2017; Liu Y., 2018; Xu J., 2019; Sagaradze G.D., 2020). Однако паракринная передача сигналов не ограничивается определенными факторами роста и цитокинами; внеклеточные везикулы (МСК-ВВ), секретируемые МСК, играют здесь наиболее важную роль (Sagaradze G.D., 2020; Foo J.V., 2021).

При НТ, приводящем к тяжелым фибротическим изменениям мочевыводящих путей, вплоть до гидронефротической трансформации почек, трансплантация МСК потенциально может оказывать существенное влияние на воспалительную реакцию и скорость репарации (Yudintseva N., 2021). Иными словами, теоретически стимуляция регенерации тканей МСК при различных патологиях, как один из методов клеточной терапии, открывает широкие терапевтические перспективы. Само собой разумеется, что, прежде чем внедрять в клинический процесс клеточную терапию, необходимо создать стандарты, позволяющие существенно снизить риск ее применения в клинике.

В этой связи особую актуальность представляет экспериментальная разработка подходов к использованию МСК и внеклеточных везикул, выделенных из МСК, направленная на сохранение функционирующей почечной паренхимы. Однако отсутствие адекватной модели локального нефротуберкулеза 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 их внеклеточных везикул с возможностью их дальнейшей клинической апробации и внедрения в практику.

### **Степень разработанности темы исследования**

В литературе имеются сведения об осуществлении моделирования туберкулеза почек у кроликов (Беллендир Э.Н. и соавт., 1973; Минаков Н.К., 1987). Однако представленные в этих работах способы моделирования имеют ряд существенных недостатков, такие как отсутствие четких данных в отношении используемой заражающей дозы микобактерий, травматичность оперативного доступа, генерализация процесса и высокая летальность лабораторных животных.

С развитием клеточных технологий и изучением свойств мезенхимных стволовых клеток было высказано предположение, что клеточная терапия МСК может оказывать положительный терапевтический эффект благодаря их способности увеличивать регенеративный потенциал бронхоальвеолярных стволовых клеток (Islam M., 2012; Parida S., 2015; Chow L., 2020; Della Bella E., 2021), что в дальнейшем послужило поводом для доклинических и клинических исследований возможностей применения МСК при туберкулезе органов дыхания (Skrahin A., 2014; Parida S.K., 2015; Kim J.S., 2016). В урологии использование МСК и МСК-ВВ также признано перспективным методом лечения (Grange C., 2019). Положительные результаты получены в доклинических исследованиях острой и хронической почечной недостаточности, ранней диабетической нефропатии, реконструкции мочевого пузыря и уретры (Горелова А.А., 2020; Zhe Z., 2016; Perico L., 2017; Orlova N.V., 2019; Xiang E., 2020; Zhang C., 2020), однако работ, демонстрирующих эффективность МСК и МСК-ВВ, при нефротуберкулезе нет.

## **Цель исследования**

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

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

В модели нефротуберкулеза, вызванного штаммами микобактерий туберкулеза (МБТ) с различной лекарственной чувствительностью, впервые показана возможность применения мезенхимных стромальных клеток костного мозга на фоне лечения противотуберкулезными препаратами.

Впервые изучен терапевтический эффект МСК-ВВ в сочетании с противотуберкулезными препаратами на течение нефротуберкулеза, включающий оценку клинических, биохимических, иммунологических и лучевых параметров, а также структурно-функциональную характеристику почек у модельных животных.

### **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**

Для подготовки и реализации диссертационной работы методы исследования были выбраны исходя из поставленных задач, а также с учетом особенностей исследуемых объектов (здоровые и зараженные нефротуберкулезом кролики, *M.tuberculosis*, МСК, МСК-ВВ) и клинических материалов. В исследовании использованы лабораторные, микробиологические, иммунологические, инструментальные (компьютерная томография, ультразвуковое исследование), гистологические и иммуногистохимические исследования образцов тканей почек, а также научные аналитические и статистические методы исследования. По дизайну исследование является экспериментальным, биомедицинским, базируется на изучении результатов моделирования нефротуберкулеза, биораспределения МСК и оценке эффективности комплексной терапии туберкулеза почек 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 протеиназного/ингибиторной системы, морфологическими сосудистыми нарушениями, тубулоинтерстициальными изменениями и почечной недостаточностью.

2. В экспериментальной модели туберкулеза почки с использованием иммунофлуоресцентной микроскопии установлены основные пути распределения МСК, 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 проведённого исследования определяется достаточным числом наблюдений (80 лабораторных животных), применением современных лабораторных и инструментальных методов, сертифицированного оборудования, адекватных методов статистического анализа.

Основные положения диссертационной работы используются в учебной деятельности ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России (в программах подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре по дисциплине 3.1.26. Фтизиатрия и ординатуре по специальности 3.1.13. Урология и андрология); Частного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский медико-социальный институт» (по учебной дисциплине «Урология» направления подготовки 31.05.01 – «Лечебное дело», повышения квалификации и профессиональной переподготовки врачей-урологов и фтизиатров); ФГБУН «Институт цитологии» Российской академии наук (в лекционных курсах для аспирантов по направлению подготовки 06.06.01 «Биологические науки» и программам дисциплин «Введение в биологию стволовых клеток» и «Клеточная биология, цитология, гистология»).

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 кардио-торакальной 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 студентов, аспирантов, молодых ученых, кандидатов наук на Санкт-Петербургской ассамблее молодых учёных и специалистов (Санкт-Петербург, 2022, 2023).

По теме диссертационного исследования опубликована 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.

## Глава 1

### ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

#### 1.1 Современные представления о туберкулезе почек: эпидемиология, этиология, патогенез, диагностика, лечение

Современная обстановка по туберкулезу в Российской Федерации по сей день остается напряженной (Яблонский П.К., 2013; Нечаева О.Б., 2018; Мочакова К.А., 2021; Кульчавеня Е.В., 2022). Внелегочные формы туберкулеза, в силу особенностей патогенеза и клинических проявлений, остаются одной из самых сложных эпидемиологических, диагностических и лечебных проблем фтизиатрии, а урогенитальный туберкулез в его структуре занимает одну из лидирующих позиций в странах с высоким уровнем заболеваемости, достигая 33,7-45,5%, и находится на третьем месте в странах, благополучных по туберкулезу (WHO, 2023). У 20% больных туберкулезом легких со временем развивается внелегочная локализация, наиболее часто – в мочеполовой системе, при этом отсутствие системы детального учёта всех случаев мочеполового ТБ затрудняет анализ эпидемической ситуации (Кульчавеня Е.В., 2010; 2013).

Несмотря на успехи в борьбе с туберкулезом в России, как и во всем мире, в структуре туберкулезного процесса произошли определенные сдвиги, существенно влияющие на эпидемическую ситуацию. Этому способствовало принятие в 2014 году ВОЗ масштабного плана ликвидации туберкулеза как массового инфекционного заболевания к 2035 году, где было сформулировано несколько основных принципов, необходимых для реализации плана, прежде всего, ежегодное снижение заболеваемости ТБ на 10% и смертности – на 6%. Однако, как отмечено в документах ВОЗ серьезным препятствием на пути ликвидации туберкулеза являются две проблемы – туберкулез с множественной устойчивостью микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам (МЛУ ТБ) и туберкулез, сочетанный с ВИЧ-инфекцией (WHO, 2015; WHO, 2022).

В среднем по России прирост числа случаев туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью за пять лет (с 2007 по 2012 гг.) составлял 39,7% для впервые выявленных больных и 42,5% – для состоящих на учете на конец года (Яблонский П.К., 2013). В первую очередь это объясняется ежегодным ростом доли пациентов с МЛУ: с 13,0% в 2009 году до 29,0% в 2018. За 2018 год у 55% бактериовыделителей, находящихся под контролем противотуберкулезной службы, выявлены штаммы с МЛУ. По данным ВОЗ, в 2020 году во всем мире 71% пациентов с диагнозом бактериологически подтвержденным туберкулезом легких прошли тестирование на устойчивость к противотуберкулезным препаратам. Устойчивость обнаружена у 157 903 пациентов, что на 22% превысило данные 2019 года при одновременном сокращении за тот же период общего числа людей с впервые диагностированным ТБ на 18% (WHO, 2022.). Следует учесть, что на этот показатель оказывает существенное влияние повышение объемов и улучшение качества микробиологической и молекулярно-генетической диагностики. Рост числа пациентов с туберкулезом с МЛУ возбудителя сопровождается появлением новых серьезных проблем, таких как удлинение сроков лечения, и, как следствие, сложностями формирования приверженности лечению (Goossens S.N., 2020; Jain N., 2020). Кроме того, значительно увеличивается стоимость лечебного процесса, связанного как с необходимостью формирования новых алгоритмов диагностики и с использованием для лечения дорогостоящих медикаментов второго ряда. Кроме того, МЛУ создает трудности, связанные с проведением превентивного лечения.

*Этиология и патогенез.* Туберкулез почек – это инфекционно-воспалительное заболевание почек, возбудителем которого является *M. tuberculosis*. При НТ сначала поражаются почки, затем процесс может распространиться на верхние и нижние мочевыводящие пути. По данным К.А. Мочаковой и соавт. (2021) нефротуберкулез в 45,24% представлен кавернозной формой, 38,1% – паренхиматозной и 16,67% туберкулезным папиллитом. Необходимо отметить, что в виду особенностей распространения специфического процесса в организме человека, большинство случаев

туберкулеза мочевыделительной и половой систем являются сочетанной патологией (Новиков Б.И., 2013; Vaveja S.P., 2007; Dias N., 2022).

При нефротуберкулезе вовлечение нижележащих отделов мочеполового тракта с формированием его рубцовых сужений и деформаций имеет место в 25,4-84,7% случаев. Частота множественных и протяженных сужений мочеточника вследствие туберкулезного поражения достигает 9-12,3% (Зубань О.Н., 2014; McAllen S.J., 2007; Jagodziński J., 2018; Kulchavenya E., 2020). Впоследствии необратимо развиваются уретерогидронефроз и нефросклероз, что приводит к снижению объема функционирующей паренхимы. Только своевременное дренирование почки и замещение пораженной части мочеточника участками мочевого пузыря, кишечника или лоскутом из слизистой щеки позволяет сохранить ее функцию (Гулиев Б.Г., 2021).

*Лечение.* Выбор режима химиотерапии основывается на результатах определения лекарственной устойчивости возбудителя молекулярно-генетическими и культуральными методами. Назначают не менее 4 противотуберкулезных препаратов одновременно на срок не менее 6-и месяцев (при множественной лекарственной устойчивости возбудителя – до двух лет) с последующим 2-месячным реабилитационным курсом во фтизиоурологическом санатории (Ткачук В.Н., 2004; Кульчавеня Е.В., 2013; Туберкулез у взрослых: клинические рекомендации. Москва, 2022).

Хирургические методы играют важнейшую роль в лечении туберкулеза почек и мочевыводящих путей. Несмотря на наличие высокоэффективных антибактериальных противотуберкулезных препаратов, излечение больных нефротуберкулезом более чем в 58-80% случаев связано с оперативным вмешательством (Gopaldaswamy R., 2021). Самой востребованной операцией является нефрэктомия, которая выполняется у каждого четвертого больного ТБ почек (Ткачук В.Н., 2004; Нерсесян А.А., 2007; Зубань О.Н., 2008; Mittal A., 2020). Известно, что проведение любого хирургического вмешательства при туберкулезе и, в частности, на органах мочеполовой системы предполагает предварительный курс химиотерапии с целью профилактики обострения и генерализации

туберкулезного процесса (Mittal A., 2020). Быстро возникающие фиброзные изменения в мочевых путях на фоне этиопатогенетической терапии приводят к развитию уретерогидронефротической трансформации, что препятствует элиминации возбудителя из почки, а в ряде случаев ведет к утрате функции органа (Нерсесян А.А., 2007; Левашев Ю.Н., 2008). Это объясняется не только поздним выявлением заболевания, но и длительностью противотуберкулезной терапии (ПТТ).

Возможности современной специфической химиотерапии обеспечивают своевременное выполнение органосохраняющих операций, в частности различных видов резекций почки, кавернотомии и кавернэктомии почек (Волков А.А., 2021; Mittal A., 2020), а также позволяет избежать таких осложнений нефротуберкулеза, как хроническая почечная недостаточность, формирование свища поясничной области вследствие прорыва каверны почки в паранефральное пространство и артериальная гипертензия. В зависимости от степени вовлеченности почки в специфический процесс выбирается объем оперативного вмешательства. Показаниями для нефрэктомии являются наличие солитарных и множественных каверн, а также выделение микобактерий, пиурия и интоксикация несмотря на длительную противотуберкулезную терапию (Нерсесян А.А., 2007). Операции, направленные на сохранение органа, показаны у практически излеченных от туберкулеза больных с целью ликвидации остаточных изменений (посттуберкулезный пионефроз, сегментарный гидронефроз, «кистоподобные» полости, кальцифицированные очаги, или «казеомы»). Использование современных эхографических и рентгенологических методик в урологии позволяет эвакуировать содержимое каверны малоинвазивным доступом (Зубань О.Н., 2008; Парпиева Н.Н., 2019).

Согласно некоторым исследованиям, предварительное стентирование или чрескожная пункционная нефростомия (ЧПНС) приводят к снижению нефрэктомий с 73% до 34% при проведении только медикаментозной терапии. Возможность выполнения дальнейших реконструктивных вмешательств на верхних мочевыводящих путях без предварительного отведения мочи составила

всего 8%, у пациентов со стентированием мочеточника или ЧПНС – 49% (Муравьев А.Н., 2012; Shin K.Y., 2002; Gopalaswamy R., 2021). Своевременное отведение мочи в зависимости от его способа позволяет сохранять функциональную способность почек в 70,8-94,4% случаев. Таким образом, раннее отведение мочи у больных с туберкулезными стриктурами является профилактикой нефрэктомии. Комбинация раннего дренирования почек с противотуберкулезной полихимиотерапией существенно превосходит результаты только консервативного лечения, приводит к быстрой редукции ХБП (Нерсеян А.А., 2007).

Таким образом, поскольку симптомы туберкулеза почек неспецифичны, а врачи амбулаторного звена не обладают должным уровнем настороженности в отношении данного специфического процесса. Все это в совокупности приводит к развитию осложнений, которые связаны не только с поздней диагностикой нефротуберкулеза, но и с объемом терапевтического (зачастую нефротоксичного) и хирургического лечения. Поэтому существует необходимость поиска принципиально новых подходов к лечению, направленных на сохранение числа функционирующей паренхимы и предотвращение развития ХБП.

## **1.2 Возможности экспериментального моделирования туберкулезной инфекции почек**

Экспериментальные животные модели являются наиболее эффективными для воспроизведения различных форм туберкулеза, изучения патоморфологических изменений органов и тканей в условиях туберкулезного воспаления, тестирования кандидатных вакцин и потенциальных противотуберкулезных препаратов, а также выяснения причин неудач клинической терапии и других целей. При этом для решения конкретных задач целесообразно использовать не только разные виды и линии животных,

но и различные способы их заражения. Тем не менее, по мнению ряда исследователей, никакая универсальная модель не способна представить все аспекты патогенеза болезни из-за существенных различий в сопротивлении болезни/восприимчивости между этими моделями. Первым, кто использовал животные модели туберкулезной инфекции еще в 19 веке, был Роберт Кох. Одно из требований знаменитого тезиса Коха, относящееся к животным моделям, гласило «введение *M. tuberculosis*, индуцировало у них (*животных*) развитие поражений, так называемых «туберкулов», наподобие наблюдавшихся у больного человека».

В исследовании, целью которого являлось моделирование туберкулезного поражения почки у кроликов при внутривенном введении культуры микобактерий бычьего типа, непременным условием воспроизводимости модели являлось дополнительное формирование нарушения оттока мочи из почек путем наложения лигатуры на мочеточник (Минаков Н.К., 1987). К основному недостатку этого метода следует отнести высокую летальность лабораторных животных, обусловленную развитием острого генерализованного специфического процесса.

Другой способ моделирования деструктивного туберкулеза почки позволяет добиться приближения модели к клиническому течению путем создания туберкулезной каверны у экспериментального животного (собаки), предварительно сенсибилизированной с помощью лошадиной сыворотки (Козин Ю.И., 1988). Под наркозом проводят компрессию верхнего полюса почки, охлаждают ее до -2 -6 °С и заражают культурой *M. tuberculosis* H37Rv (в дозе 50 мг в 0,5 мл лошадиной сыворотки). Однако, предложенная модель не воспроизводит реально существующий механизм развития туберкулезного поражения почки, поскольку формирование в ней деструктивных форм (каверн) происходит путем искусственно создания участка ишемии в результате экспериментального воздействия. К недостаткам данного способа следует также отнести и выбор в качестве модельных животных собак, что существенно ограничивает широту использования способа в связи высокими затратами на приобретение и содержание животных, а также на выполнение операционных и лечебных процедур.

Э.Н. Беллендиром и соавторами (1973) исследовано создание модели ограниченного деструктивного туберкулеза почек у кроликов путем выполнения люмботомии для инокуляции культуры микобактерий. Однако, такой метод травматичен и сложен в осуществлении: сама манипуляция формирования канала в корковом слое почки (около 1 мм диаметром и 8-10 мм длиной) сопровождается кровопотерей, механической травмой с последующим развитием неспецифической воспалительной реакции. К недостаткам способа следует также отнести неизвестность качественной (фенотипической и генотипической) характеристики клинического штамма, используемого для инфицирования, а также отсутствие четких данных в отношении заражающей дозы (количество микобактериальных клеток в 1 мг сухой культуры). Кроме того, метод не позволяет осуществлять прижизненный контроль за ходом развития туберкулезного процесса, что не дает возможности получения сопоставимых результатов по клиническому течению заболевания.

Поскольку представленные способы моделирования туберкулеза имеют ряд существенных недостатков, которые не позволяют использовать их в нашем эксперименте, все вышеописанное диктует необходимость разработки нового способа моделирования туберкулеза почки с применением современных миниинвазивных технологий.

### **1.3 Мезенхимные стволовые клетки и внеклеточные везикулы**

#### ***1.3.1 Основные характеристики и механизмы действия мезенхимных стволовых клеток и внеклеточных везикул***

Первоначально МСК были обнаружены Фриденштейном и коллегами в костном мозге мышей и описаны как фибробластоподобные клетки, обладающие свойством прилипать к пластику при культивировании (Friedenstein A.J., 1968).

Эти клетки получили название колониобразующих предшественников фибробластов (КОЕ-ф). Стволовая природа КОЕ-ф была подтверждена в многочисленных исследованиях, а их свойства глубоко изучены (Friedenstein A.J., 1976; Owen M., 1988; Minguell J.J., 2001; Pittenger, M.F., 2019). Позже было обнаружено, что КОЕ-ф обладают потенциалом для дифференцировки в различные клеточные линии мезенхимы (остеоидную, хондрогенную, адипогенную, миогенную) и А. Caplan (1991) назвал их мезенхимными стволовыми клетками. Независимо от используемой терминологии, во всех исследованиях речь идет об образующих колонии при культивировании *in vitro* веретенообразно вытянутых клетках по морфологии напоминающих фибробласты.

Мезенхимные стволовые клетки первоначально были обнаружены в строме костного мозга, но затем идентифицированы и в других органах и тканях (Лызиков А.Н., 2015; Campagnoli C., 2001; Götherström C., 2003; Guillot P.V., 2007) и их высокая распространенность может быть объяснена периваскулярной локализацией (Psaltis P.J., 2015). МСК функционально являются репарационным клеточным депо для поддержания клеточного гомеостаза и обеспечивают формирование, рост и обновление тканей. На практике наиболее часто используются МСК, выделенные из костного мозга и жировой ткани, в связи с доступностью исходного материала и возможностью его быстрого получения в большом количестве.

Мезенхимные стволовые клетки являются мультипотентными и могут дифференцироваться в различные типы клеток. Имеются данные, что МСК в культуре могут пролиферировать до 19 удвоений, не теряя способности к пролиферации и дифференцировке (Шаманская Т.В., 2009).

Способность МСК дифференцироваться в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях при соответствующей индукции подтверждена рядом исследователей (Campagnoli C., 2001; Götherström C., 2003; Guillot P.V., 2007). *In vitro* доказана способность МСК дифференцироваться в клетки, обладающие свойствами уротелиальных клеток, гладких миоцитов

и эндотелиальных клеток (Da Silva Meirelles L., 2006), хотя другие исследователи ставят под сомнение наличие таких множественных потенций (Fromigué O., 2008).

Мезенхимные стволовые клетки, секретируя обширный спектр биоактивных макромолекул, способны оказывать регуляторное воздействие на иммунную систему, обеспечивать антипролиферативные и противовоспалительные эффекты (Caplan A.I., 2007; Gould S.J., 2013; Crivelli B., 2017; Zhou Y., 2019; Lobov A.A., 2020; Rahmati S., 2020; Wang L.T., 2021). Они способны ингибировать пролиферацию и функцию основных иммунных клеток, включая Т-, В- и NK-клетки (естественные киллеры), а также способствуют активации дендритных клеток и индуцируют регуляторные Т-клетки как *in vitro*, так и *in vivo* (Joshi L., 2015; Jiang D., 2016; Cagliani J., 2017). МСК вырабатывают множественные цитокины, факторы роста и сигнальные молекулы, обладающие способностью подавлять воспалительную реакцию, стимулировать регенерацию тканей и неоангиогенез.

Влиянию МСК на пролиферацию и функцию Т-клеток посвящен целый ряд исследований (Кузьмичева Л.В., 2010; Krampera M., 2003; Augello A., 2005; Jiang X.X., 2005; Corcione A., 2006; Sotiropoulou P.A., 2006; Ryan J.M., 2007; Ren G., 2008; Rubtsov Y., 2017; Wu J., 2017; Guan Q., 2018; Liang C., 2018; Wang L.T., 2021). Известно, что МСК способны подавлять пролиферацию Т-лимфоцитов, индуцированную аллоантигенами, митогенами, анти-CD3, анти-CD28 антителами, а также оказывают антипролиферативное действие на Т-клетки памяти и наивные Т-клетки (Krampera M., 2003), CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки (Guan Q., 2018) за счет межклеточных взаимодействий (Jiang X.X., 2005; Sotiropoulou P.A., 2006) и посредством высвобождения растворимых факторов, таких как интерферон- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) и интерлейкин-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Rubtsov Y., 2017; Liang C., 2018), которые продуцируются после перекрестного взаимодействия с клетками-мишенями.

Иммуносупрессивная функция МСК опосредована IFN- $\gamma$  совместно с одним из трех провоспалительных цитокинов: фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\alpha$  или IL-1 $\beta$  (Ren G., 2008). Комбинации цитокинов вызывают экспрессию

некоторых хемокинов (CXCL9, CXCL10 и CXCL11), являющихся лигандами для Т-клеточного хемокинового рецептора CXCR3, и синтазы оксида азота в МСК. Миграция Т-клеток вблизи МСК опосредована влиянием хемокинов, в результате чего запускается каскад апоптоза Т-лимфоцитов под действием оксида азота (Кузьмичева Л.В., 2010; Ren G., 2008). Однако, согласно данным Q. Guan et al. (2018) МСК в присутствии IFN- $\gamma$  продуцируют индоламин-пиррол 2,3-диоксигеназу, которая приводит к катаболизму незаменимой аминокислоты триптофана, что, в свою очередь, подавляет пролиферацию эффекторных клеток, в том числе Т-лимфоцитов (Guan Q., 2018).

Ингибирующее воздействие МСК на В-клетки иммунной системы связано с нарушением выработки антител и секреции хемокиновых рецепторов CXCR4, CXCR5 и CCR7, отвечающих за хемотаксис к CXCL12 и CXCL13. Однако, на экспрессию костимулирующих молекул В-клеток и продукцию цитокинов МСК не влияют (Augello A., 2005). Основным механизмом подавления В-клеток объясняется физическим контактом между В-клетками и МСК, а также растворимыми факторами, высвобождаемыми последними. Это приводит к блокированию пролиферации В-клеток в фазе G0/G1 клеточного цикла без апоптоза (Augello A., 2005; Corcione A., 2006), в отличие от взаимодействия с Т-клетками.

По данным исследований J.M. Ryan et al. (2007), МСК способны подавлять пролиферацию NK-клеток и продукцию IFN- $\gamma$ , за счет IL-2 или IL-15, а также частично ингибировать пролиферацию активированных NK-клеток. Одну из ключевых ролей в опосредованном МСК подавлении пролиферации NK-клеток играют такие факторы, как трансформирующий фактор роста (TGF- $\beta$ 1) и простагландин E-2 (PGE-2) (Sotiropoulou P.A., 2006). Однако, результаты исследования G.M. Spaggiari et al. (2006) свидетельствуют в пользу того, что IL-2-активируемые NK-клетки подвергали лизису аутологичные и аллогенные МСК. Опосредованная NK-клетками цитотоксичность в отношении МСК обусловлена экспрессией на поверхности мезенхимных клеток лигандов для рецепторов ULBPs, PVR и Nectin-2.

Мезенхимные стволовые клетки нарушают дифференцировку моноцитов и CD34+ гемопоэтических стволовых клеток в дендритные клетки (ДК), тормозя ответ моноцитов на сигналы созревания и уменьшая экспрессию молекул, таких как CD40, CD83 и CD86, необходимых для стимуляции пролиферации наивных Т-клеток и продукции IL-12 (Jiang X.X., 2005; Nauta A.J., 2006; Ramasamy R., 2007; Ivanova-Todorova E., 2009; Wu J., 2017; Wang L.T., 2021).

После взаимодействия МСК с ДК происходит выработка небольшого количества TNF- $\alpha$ , в то время как плазматические ДК продуцируют повышенное количество IL-10 и TNF- $\alpha$ , которые играют важную роль в миграции, созревании и представлении антигенов ДК. Процесс ингибирования созревания, дифференцировки и функции ДК также возможен в результате, как прямого контакта с МСК, так и опосредованного через PGE-2 (Aggarwal S., 2005).

Исследования, посвященные изучению биораспределения МСК к участкам повреждения или воспаления, показали, что данное явление осуществляется благодаря иммунным клеткам и продуцируемым ими хемотаксическим факторам. Ряд молекул, включая фактор роста тромбоцитов (PDGF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1), IL-8, костный морфогенетический белок BMP-4 и BMP-7, а также TNF- $\alpha$ , который является ключевым регулятором пути NF- $\kappa$ B, способны привлекать МСК в зону воспаления (Mishima Y., 2008). Путь NF- $\kappa$ B играет важную роль в регуляции генов, влияющих на миграцию, пролиферацию, дифференцировку и апоптоз клеток, а также на процессы воспаления (Böcker W., 2008).

Полагают, что МСК из костного мозга или ближайшего окружения мигрируют в участки поврежденной ткани и высвобождают ряд биоактивных молекул, таких как фактор-1, полученный из стромальных клеток, эпидермальный фактор роста, фактор роста фибробластов, VEGF, PDGF, TGF- $\beta$ , IGF-1, ангиопоэтин-1, каждый из которых может оказывать влияние на развитие фибробластов и эндотелиальных клеток (da Silva Meirelles L., 2009). В результате миграция МСК в зону повреждения способствует ускоренному восстановлению всех видов повреждений в организме.

Все вышеупомянутые механизмы воздействия МСК на окружающие клетки и ткани лежат в основе их терапевтических эффектов при лечении разного рода патологий, путем влияния на различные звенья иммунной системы и регулируя высвобождение сигнальных молекул. Однако, необходимо четкое понимание взаимосвязи сигнальных молекул и МСК в микросреде для использования последних при лечении конкретных патологических состояний.

В последние годы появляются данные, свидетельствующие о том, что большинство положительных эффектов МСК связано с их паракринной активностью, которая по большей части состоит из секреции биоактивных молекул, заключенных во внеклеточные везикулы, а не с хемотаксисом клеток в очаги повреждения (Crivelli B., 2017). В связи с этим МСК-ВВ были предложены в качестве возможной альтернативы терапии МСК. Результаты доклинических исследований, проведенных в условиях *in vitro* и *in vivo*, показывают, что ВВ, выделенные из МСК, также обладают иммуномодулирующим и регенеративным потенциалом, и в отличие от МСК не увеличивают частоту осложнений, таких как повышенная иммуногенность (Kooijmans S.A.A., 2016; Börger V., 2017; Crivelli B., 2017; Lou G., 2017; Murphy D.E., 2019; Rahmati S., 2020).

МСК-ВВ представляют собой биоактивные молекулы (нуклеиновые кислоты, цитокины, м-РНК, микро-РНК, белки), окруженные липидным бислоем, выступающие посредниками между различными типами клеток в микросреде, и участвующие во многих физиологических и патофизиологических процессах, включающих поддержание гомеостаза, модулирование иммунных реакций, воспаление, ангиогенез и т.д. (Gould S.J, 2013; Lobov A.A., 2020; Rahmati S., 2020). Большинство живых клеток выделяют ряд внеклеточных везикул, содержимое которых варьирует в зависимости от происхождения. Широкий функционал МСК-ВВ обусловлен содержащимися в них активными молекулами: поддерживающими иммунный ответ – IL-6, IL-10, индоламин-2,3-диоксигеназа, PGE-2; обладающими противовоспалительным действием – IL-4, IL-13, TNF- $\alpha$ ; противовирусным и антибактериальным действием – лизоцими тд. (Sutton M.T., 2016; Harman R.M., 2017; Chow L., 2020); способствуют восстановлению эпителия

и регенерации тканей (TGF), фактор роста кератиноцитов, VEGF, фактор роста гепатоцитов и т.д. (Zhang X., 2021). МСК-ВВ оказывают иммуномодулирующее действие на различные клетки иммунной системы путем регуляции баланса Т – хелперов (Th1/Th2) (Li P., 2016), стимуляции регуляторных Т-клеток (Colombo M., 2014; Favaro E., 2014) ингибирования активности В-клеток (Zhang X., 2018; Ren W., 2019). Кроме того, показано, что МСК-ВВ обладают противовоспалительной активностью за счет снижения TNF- $\alpha$  и увеличения TGF- $\beta$  и IL-10 (Mokarizadeh A., 2012; Nassar W., 2016).

В ряде доклинических исследованиях показано, что ВВ способствуют восстановлению тканей, уменьшают воспаление в различных моделях острого повреждения почек (Cantaluppi V., 2013) и эффективны в реверсии фиброза почек в модели диабетической нефропатии (Grange C., 2019). МСК-ВВ ускоряют восстановление поврежденных клеток канальцев, способствуя пролиферации клеток и защищая клетки от апоптоза (Bruno S., 2019). Продемонстрировано, что перенос микро-РНК из МСК-ВВ в клетки-мишени является основным механизмом уменьшения повреждения почек (Collino F., 2015).

Так, K. Yan et al. (2022) *in vitro* проведена оценка влияния выделенных из МСК ВВ на альвеолоциты II типа при инфицировании МБТ. Внедрение в среду МСК-ВВ значительно предотвратило увеличение синтеза провоспалительных цитокинов в альвеолоцитах. Исследователи предполагают, что данный эффект ВВ опосредован влиянием микро-РНК-20b на ядерный фактор активированных Т-клеток, что приводит к инактивации Toll-подобного рецептора и связанного с ним сигнального пути, таким образом защищая альвеолоциты от повреждения, опосредованного МБТ.

Помимо терапевтических свойств ВВ, полученных из МСК, активно исследуются свойства ВВ микобактерий туберкулёза. Результаты ряда работ показали возможность идентификации пептидов *M. tuberculosis* во ВВ сыворотки крови у лиц с латентной (Mehaffy C., 2020) и активной (Lu G., 2021) ТБ инфекцией. Представленные данные могут указывать на возможность использования ВВ, выделенных из МБТ, не только в качестве маркера наличия

специфического процесса, но и в качестве способа более эффективной доставки компонентов вакцины (белков, пептидов и т.д.) для здоровых лиц (Mehaffy C., 2020, 2022; Lu G., 2021; Mohammadzadeh R., 2021; Sun Y.F., 2021).

Таким образом МСК-ВВ могут решить ряд проблем, связанных с диагностикой, лечением и профилактикой ТБ инфекции, однако существуют определенные сложности, связанные с синтезом МСК-ВВ предсказуемого состава и терапевтического потенциала (Crivelli B., 2017; Gonda A., 2019; Lobov A.A., 2020). Доставка лекарств наночастицами является быстро развивающейся областью исследований, поскольку полученные результаты имеют не только научную, но и прикладную ценность, что открывает дополнительные возможности в борьбе с ТБ инфекцией.

Одним из важнейших механизмов уничтожения *M. tuberculosis* в организме человека является фагоцитоз, обеспечиваемый нейтрофилами и альвеолярными макрофагами. *M. tuberculosis* реплицируются и выживают в макрофагах за счет использования различных механизмов уклонения от иммунной системы хозяина, включающих ингибирование слияния фаголизосом (Levitte S., 2016; Sachdeva K., 2020), снижение кислотности лизосомальных компартментов (Sturgill-Koszycki S., 1994) и выход микобактерий в цитозоль (vander Wel N., 2007; Levitte S. 2016). В макрофагах хозяина *M. tuberculosis* нарушает путь созревания фагосом (слияние фагосомы и лизосомы), вследствие нарушения доставки субъединиц АТФ-азы и лизосомальных гидролаз по пути, зависящему от фосфатидилинозитол-3-киназы (Gutierrez M.G., 2004). Также *M. tuberculosis* продуцирует липиды, которые имитируют фосфатидилинозитолы млекопитающих и ингибируют фосфатидилинозитол-3-фосфатзависимые пути транспортировки в инфицированных макрофагах.

Что касается взаимодействия микобактерий с МСК, то точные механизмы, с помощью которых *M. tuberculosis* адаптируются и персистируют в мезенхимных клетках, остаются окончательно неизученными. Считается, что основным аспектом взаимодействия между МСК и *M. tuberculosis* является внутриклеточное пребывание микобактерий в неактивной форме (Raghuvanshi S., 2010; Das B.,

2013; Khan A., 2017). В МСК почти все бактерии присутствуют в цитозоле, в то время как в макрофагах большинство микобактерий находится в компартментах ранних фагосом. *M. tuberculosis* способствует быстрому синтезу липидов в МСК, в результате чего образуются липидные капли, которые защищают находящиеся в них бактерии. Ингибирование синтеза липидов резко снижает экспрессию генов, связанных с состоянием покоя, одновременно повышая регуляцию генов, связанных с репликацией, что повышает чувствительность микобактерий к действию противотуберкулезных препаратов (Fatima S., 2020; Zhang X., 2021). Ряд исследователей считают, что подавление липидного синтеза позволит резко снизить экспрессию генов, связанных с покоем, одновременно повышая регуляцию генов, связанных с репликацией, что может повысить чувствительность микобактерий к изониазиду (Вишневский Б.И., 2022; Fatima S., 2020; Zhang X., 2021). Также обнаружено, что *M. tuberculosis* в МСК экспрессируют гены, связанные с фазой покоя клетки, тогда как микобактерии, которые находятся в макрофагах, экспрессируют гены, связанные с репликацией. Кроме того, известно, что МСК имеют на своей поверхности АТФ связывающий домен – белки-транспортеры семейства ABC, которые способны выводить из клетки различные лекарственные препараты, в том числе используемые для лечения ТБ (Espinal M.A., 2001; Fatima S., 2020).

Ингибирование аутофагии является одним из наиболее широко изученных механизмов уклонения от иммунной системы хозяина, используемых штаммами *M. tuberculosis* (Gutierrez M.G., 2004; Tardif S., 2015). Ряд наблюдений показал, что аутофагия может устранить как активные, так и покоящиеся *M. tuberculosis*, находящиеся в макрофагах и МСК соответственно. Так, на мышинной модели ТБ поражения легких активация аутофагии приводила к элиминации *M. tuberculosis* из МСК, в то же время сочетание рапамицина с изониазидом в схеме лечения туберкулеза легких позволило предотвратить реактивацию заболевания и добиться абациллирования (Fatima S., 2020).

Таким образом, изучение способов взаимодействия *M. tuberculosis* с макрофагами и МСК показало, что клетки хозяина по-разному

запрограммированы для поддержания активной и латентной инфекции, поэтому сочетание стандартной противотуберкулезной терапии и индукторов аутофагии может способствовать успешному лечению специфического процесса. Но поскольку функции МСК разнообразны и определяются местными цитокинами, это затрудняет прогнозирование их терапевтических эффектов в организме человека, инфицированном *M. tuberculosis* (Parida S.K., 2015, Fatima S., 2020).

### ***1.3.2 Роль мезенхимных стволовых клеток и внеклеточных везикул в улучшении репаративных процессов в органах и тканях***

С открытием и углубленным изучением иммуномодулирующих свойств МСК все больше исследований показывают, что их применение в составе комплексной терапии подает новые надежды на клиническое излечение от туберкулеза. Длительность лечения является одной из главных причин низкой приверженности пациентов лечению, что обуславливает важность разработки принципиально новых подходов к терапии ТБ (Shah N.S., 2007; Jain N., 2020). Некоторые авторы утверждают, что применение МСК у таких пациентов может способствовать сокращению сроков лечения, как за счет активации репаративного процесса (Skrahin A., 2014; Parida S.K., 2015), так и благодаря уменьшению площади повреждения органов, связанного с деструктивным действием иммунных комплексов (Matthay M.A., 2010).

Еще в 2008 г. В.В. Ерохин и соавт. (2008) провели исследование по оценке эффективности трансплантации аутологичных МСК в комплексной терапии ТБ легких у 15 пациентов с МЛУ и 12 больных с МБТ с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ). Все исследуемые являлись бактериовыделителями, имели диссеминированный деструктивный процесс в легких, а также анамнез длительной и малоэффективной противотуберкулезной химиотерапии. После проведения комплексного лечения пациенты наблюдались в течение 24 месяцев,

и у всех отмечалась положительная динамика, в том числе в 20 случаях – прекращение бактериовыделения через 3-4 месяца и закрытие длительно существовавших полостей в легочной ткани у 11 больных (Ерохин В.В. и соавт. 2008).

В ряде исследований, посвященных репарации легочной ткани, подробно рассмотрена роль мезенхимных клеток. Показано, что МСК способствуют регенерации легочной ткани, за счет увеличения пролиферативного потенциала бронхоальвеолярных стволовых клеток, восстанавливают энергетический потенциал эпителия легких за счет донорства митохондрий, а также предотвращают увеличение синтеза провоспалительных цитокинов в альвеолоцитах после заражения, тем самым защищая альвеолоциты от повреждения, опосредованного МБТ (Spees J.L., 2006; Tropea K.A., 2012; Islam M.N., 2012; Sinclair K., 2013; Parida S.K., 2015; Yan K., 2022).

A. Skrahin в 2014 г. оценил безопасность применения аутологичных МСК у больных ТБ легких с подтвержденной МЛУ/ШЛУ в качестве дополнения к противотуберкулезной химиотерапии. В исследовании приняли участие 30 пациентов, срок наблюдения составил 6 месяцев. Наиболее частыми нежелательными явлениями оказались тошнота, диарея, а также изменения в лабораторных анализах (повышение холестерина, лимфопения). Серьезных нежелательных явлений зафиксировано не было. Результаты позволили авторам сделать вывод о безопасности применения МСК в клинической практике, однако, данные по долгосрочной безопасности применения МСК пока отсутствуют.

Разработка клеточной терапии заболеваний почек является трудной задачей, поскольку почка, благодаря своей сложной архитектуре и гетерогенности клеток, является наиболее сложным для восстановления органом мочеполовой системы.

Возможностям применения МСК с целью ренопротекции и регенерации тканей почки и мочевыводящих путей посвящены многочисленные исследования (Рогачева Н.В., 2011; Орлова Н.В., 2016; Горелова А.А., 2018; Morigi M., 2004, 2010; Ikarashi K., 2005, Lin F., 2005, 2008; Togel F., 2005; Humphreys B.D., 2008; Ren G., 2008; Newman R.E., 2009; Ghannam S., 2010; Tan J., 2012;

Yudintceva N.M., 2016, 2018, 2020; Danjuma L., 2018). Защитные свойства МСК часто изучаются в условиях острого повреждения почек или ХБП, когда количество функционирующей почечной паренхимы снижено и недостаточно для полноценного функционирования органа. По данным K. Ikarashi et al. (2005) МСК, извлеченные из костного мозга, способствуя ангиогенезу в областях деструкции почечной паренхимы, способны дифференцироваться и в конечном итоге регенерировать несколько клеточных линий, включая эндотелиальные клетки клубочков. Эксперименты F. Lin et al. (2005) на мышинной модели ишемии-реперфузии почек продемонстрировали, что большинство регенерированных клеток возникло из клеток реципиента.

МСК способны регулировать процесс репарации следующими механизмами: путем дифференцировки в несколько видов стромальных и /или поврежденных типов клеток, а также путем создания микроокружения за счет взаимодействия со многими типами тканевых и иммунных клеток, таких как эндотелиальные и эпителиальные клетки, фибробласты, макрофаги, лимфоциты и нейтрофилы. Считается, что такого рода взаимодействие имеет решающее значение для создания микросреды благоприятной для регенерации тканей и заживления ран (Ren G., 2008).

Имеется положительный экспериментальный опыт применения МСК в составе тканеинженерных конструкций при замещении дефектов мочевого пузыря и уретры (Орлова Н.В. и соавт., 2016; Горелова А.А. и соавт., 2018; Yudintceva N.M. et al., 2016, 2018). Применение МСК-содержащих тканеинженерных конструкций не приводит к ее отторжению в 83% случаев, и не способствует фиброзу тканей в зоне имплантации (Орлова Н.В. и соавт., 2016; Горелова А.А. и соавт., 2018).

Для определения ренопротекторных способностей системно вводимых МСК костного мозга при повреждении почек использовалось множество моделей на животных (Morigi M., 2004; Lin F., 2005, 2008; Humphreys B.D., 2008; Danjuma L., 2018). Так, на мышинной модели цисплатин-индуцированного повреждения почек, после системного введения МСК, полученных из пуповинной крови, наблюдалось

увеличение скорости пролиферации почечных канальцев, за счет дифференцировки МСК в эпителиальные клетки канальцев и значительно снижался уровень мочевины в сыворотке, что обусловлено выработкой факторов роста и ингибированием медиаторов воспаления (Morigi M., 2004, 2010).

Ренопротективные возможности МСК также изучаются с целью их использования для предотвращения повреждения почек при проведении нефротоксичной терапии. В экспериментальном исследовании L. Danjuma et al. (2018) на здоровых крысах сравнивались биохимические и гистологические показатели в трех группах: контрольные животные; крысы, получавшие только рифампицин в качестве нефротоксичного препарата, и крысы, получавшие комплексное лечение рифампицином и МСК. Результаты показали достоверные изменения биохимических показателей и признаки гистопатологического повреждения (вакуолизация клеток канальцев, некроз клубочков) у крыс, получавших лечение только рифампицином, в то время как в остальных группах таких отклонений выявлено не было.

Ряд авторов утверждает, что МСК, выделенные из костного мозга, способны оказывать положительный терапевтический эффект при хронических воспалительных процессах в почечной ткани (Newman R.E., 2009; Ghannam S., 2010). У крыс с индуцированным кишечной палочкой хроническим пиелонефритом введение МСК привело у 20% животных к кратковременному снижению воспалительного процесса в почках – уменьшение протеинурии, лейкоцитурии и бактериурии. При оценке функционального состояния почек отмечалось стойкое улучшение основных показателей (снижение уровня креатинина, мочевины), в то время как у не получавших МСК животных параметры, характеризующие развитие общевоспалительного процесса и функциональное состояние почек, сохранялись. Оценка гуморального иммунитета выявила уменьшение уровня С3 компонента комплемента и иммуноглобулина G в крови крыс с хроническим пиелонефритом, что связано с уменьшением выраженности воспалительной реакции и нивелированием последствий длительно

текущего воспаления, что в свою очередь способствует лучшей морфологической сохранности нефронов в поврежденных участках органа (Рогачева Н.В., 2011).

В рандомизированном открытом клиническом исследовании у пациентов, перенесших трансплантацию почки, применение в качестве индукционной терапии аутологичных МСК привело к снижению частоты острого отторжения и риска оппортунистической инфекции, а также к более высокой скорости восстановления функции почек в течение первого месяца после операции по сравнению со стандартной индукционной терапией антителами против рецептора IL-2 (Tan J., 2012).

F. Tögel et al. (2005) на крысиной модели ишемии-реперфузии изучали тропность и терапевтические эффекты вводимых системно МСК к поврежденным тканям почки. Оценивали биораспределение МСК, меченых железом-51, при помощи магнитно-резонансной томографии (МРТ) сразу после инфузии, через 24 часа и на 3 день от начала эксперимента. По данным МРТ было обнаружено, что МСК на всех сроках после инъекции локализуются преимущественно в корковом веществе почек. После эвтаназии гистологическое исследование показало, что МСК расположены в большей степени в капиллярах клубочков и зонах базальных мембран, в то время как канальцы оставались интактными. В результате исследования были подтверждены ренопротекторные свойства МСК, включая восстановление функции почек, высокую скорость пролиферации и низкую частоту апоптоза. Однако, в течение 3 дней после введения МСК не дифференцировались в фенотип канальцевых или эндотелиальных клеток. Авторы пришли к выводу, что положительные свойства МСК связаны не с их дифференцировкой в клетки-мишени, а опосредуются сложными паракринными механизмами взаимодействия с клетками почечной паренхимы.

Таким образом, большинство авторов склоняется в пользу того, что в основе регенеративных и ренопротективных процессов, запускаемых системным введением МСК, лежат механизмы, связанные с их паракринной активностью, что в свою очередь опосредовано способностью мезенхимных клеток мигрировать к месту повреждения и секретировать пул факторов роста и цитокинов

с противовоспалительным, митогенным и иммуномодулирующим действием (Рогачева Н.В., 2011; Morigi M., 2004, 2010; Ikarashi K., 2005; Lin F., 2005, 2008; Togel F., 2005; Humphreys B.D., 2008; Lin F., 2008; Ren G., 2008; Newman R.E., 2009; Ghannam S., 2010; Tan J., 2012; Danjuma L., 2018). Результаты описанных исследований показали, что комплексная терапия ТБ с применением МСК может способствовать сокращению сроков лечения за счет снижения площади очагов деструкции и активации репаративных процессов в очагах, а также за счет доставки лекарственного препарата в зоны интереса. На данный момент клеточная терапия еще не получила широкого применения ввиду ее высокой стоимости неизученного профиля безопасности. Существует необходимость в более длительных исследованиях, которые помогут определить безопасность применения МСК у пациентов с различной патологией.

## Глава 2

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 2.1 Модельные животные и их содержание

Экспериментальные исследования проведены на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации на 89 кроликах-самцах породы «Советская шиншилла». Кролики поступили из сертифицированного учреждения – федеральное государственное унитарное предприятие «Питомник лабораторных животных «Рапполово» федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»».

Животные содержались в стандартных условиях сертифицированного вивария ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России по одной особи в клетках из нержавеющей стали тип NYA K (S =4200 см<sup>2</sup>), оборудованными кормушками и стандартными поилками. Световой режим: 12 часов – свет, 12 часов – темнота. Температура поддерживалась в пределах +15 – +21 °С, относительная влажность – не ниже 45%. Воздухообмен поддерживался с помощью приточно-вытяжной вентиляции, стерилизация воздуха осуществлялась ежедневно путем кварцевания.

Все процедуры с модельными животными в исследованиях были рассмотрены и утверждены Независимым этическим комитетом ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России (протокол № 80 от 23.06.2021 г., выписка № 80.1) на предмет соответствия этическим принципам обращения с лабораторными животными «Council of Europe. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes. CETSNo. 123, 1991, а также:

- разделу IV «Санитарно-эпидемиологические требования к обеспечению безопасности при работе с ПБА» Постановления Государственного санитарного врача Российской Федерации № 4 от 28 января 2021 года «Об утверждении санитарных правил и норм СанПин 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» (СанПин 3.3686-21, 2021);
- ГОСТ 33215-2014 «Правила оборудования помещений и организации процедур при работе с лабораторными животными» (ГОСТ 33215-2014, 2016);
- ГОСТ 33216-2014 «Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами» (33216-2014, 2016).

Животных включали в исследование после двухнедельного карантина (акклиматизационный период), во время которого осуществляли ежедневный клинический мониторинг животных, включавший визуальный осмотр, оценку поведения и общего состояния, потребление ими кормов и воды. Еженедельно осуществляли мониторинг динамики массы тела животных. Критерии включения кроликов в эксперимент: положительная динамика массы тела в период карантина, отсутствие видимых симптомов заболевания.

## **2.2 Методы исследования**

### ***2.2.1 Методика подготовки штаммов микобактерий туберкулеза, используемых для заражения***

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;
- 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, пиразинамид, стрептомицин) и различными сочетаниями мутаций в генах *rpoB* (резистентность к рифампицину), *katG*, *inhA*, *ahpC* (устойчивость к изониазиду). Фенотипическую оценку резистентности изолята к противотуберкулезным препаратам осуществляли с помощью автоматизированной системы ВАСТЕСМGIT 960. Молекулярно-генетическая характеристика резистентности исследуемого штамма дана по детекции мутаций, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду в генах: *katG*, *inhA*, межрегуляторной области генов *ahpC*-*oxyR* с помощью биологических микрочипов «ТБ-БИОЧИП» (Регистрационное удостоверение № ФС 03262004/0889-04) ИМБ РАН.

За 3 недели до заражения модельных животных исследуемые штаммы инокулировали на плотную яичную среду Левенштейна-Йенсена, что позволяет получить минимальное количество клампсов (clumps), при этом достигая определенной точности в концентрации суспензии микобактерий.

В запланированный день заражения модельных животных собранную с плотной среды бактериальную массу помещали в сухую стерильную стеклянную пробирку с 8-10 стеклянными шариками диаметром 3 мм, растирали на шейкере «Вортекс» 15-20 сек. Затем вносили 3 капли физиологического раствора и вновь растирали. Далее добавляли 5-6 мл физиологического раствора и процедуру суспендирования на шейкере повторяли. Суспензию переносили в центрифужную пробирку и осаждали клампсы при 1000 об/мин в течение 10 мин. Верхнюю часть супернатанта (осторожно, чтобы не захватить клампсы в нижних слоях) отбирали и переносили в полистероловую пробирку для измерения мутности. Доводили

суспензию до 1,5 ед. по McFarland ( $5 \times 10^8$ ) клеток/мл с помощью денситометра DEN-SILAMETR. Затем полученную суспензию разводили физиологическим раствором до нужной для заражения концентрации –  $10^6$  микобактериальных клеток/0,2 мл.

### **2.2.2 Протокол моделирования экспериментального нефротуберкулеза**

Протокол моделирования включал несколько этапов:

1-этап – обеспечение анестезиологического пособия: использовался комбинированный препарат для анестезии тилетамина гидрохлорид/золазепам гидрохлорид (Zoletil, Virbac SA, Франция) в дозе 25 мг/кг внутривенно в краевую ушную вену; миорелаксант ксилазина гидрохлорид (ксила Bioveta, Чехия) в виде 2% раствора внутримышечно в объеме 1,0-1,5 мл.

2-этап – фиксация лабораторного животного на специальном станке в положении на спине, конечности – в максимально вытянутом положении.

3-этап – удаление шерсти с боковой поверхности туловища лабораторного животного в зоне проекции левой почки.

4-этап – ход оперативного вмешательства: кожные покровы обрабатывали дважды 5% раствором йода; под общей анестезией с применением ультразвукового (УЗИ) контроля (на аппарате Samsung Medison RS80A-RUS с использованием линейного датчика) выполняли тонкоигольную пункцию коркового слоя паренхимы нижнего полюса левой почки; через пункционную иглу в корковый слой почечной паренхимы 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 (рисунок 1).

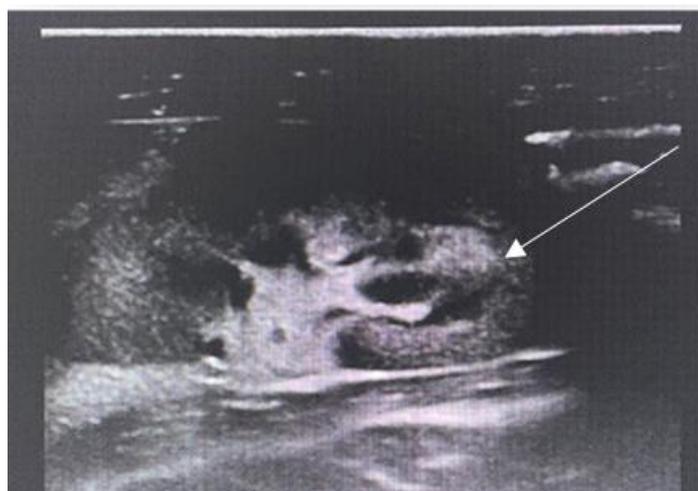


Рисунок 1 – Тонкоигольная пункция коркового слоя паренхимы нижнего полюса левой почки. Направление хода иглы обозначено белой стрелкой

В течение 5 дней после инфицирования проводилась антибиотикопрофилактика с использованием цефазолина (в дозе 50 тыс. ЕД/кг, 1,5 мл внутримышечно, АО «Фармасинтез», Россия).

Дизайн исследования представлен на рисунке 2.



Рисунок 2 – Дизайн исследования

### ***2.2.3 Постановка внутрикожной пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным***

Через 18 дней от момента заражения выполнялась проба с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (АТР) «Диаскинтест»® (Генериум, Москва, Россия), который вводили в концентрации 2 мкг/мл в 0,1 мл физиологического раствора кроликам внутрикожно в область проекции инфицированной почки. Оценка результатов выполнялась через 48-72 ч от постановки пробы. Учитывали реакцию по общепризнанным критериям, указанным в инструкции к препарату: отрицательная – при полном отсутствии инфильтрата и гиперемии или при наличии «уколочной реакции» до 2 мм; сомнительная – при наличии гиперемии без инфильтрата; положительная – при наличии инфильтрата (папулы) любого размера. Наличие эритемы свидетельствовало об активном туберкулезном процессе.

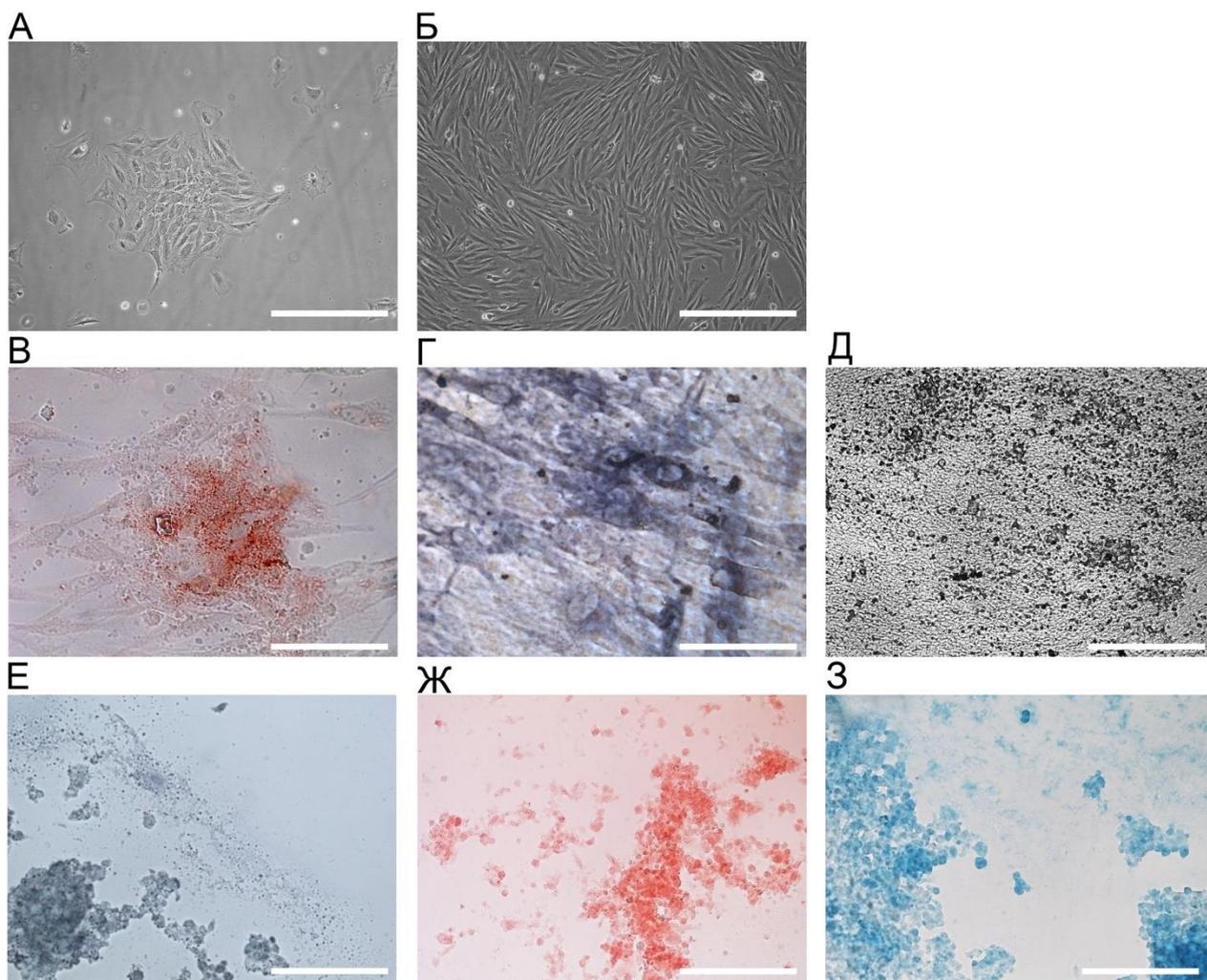
### ***2.2.4 Методика выделения и культивирования мезенхимных стволовых клеток костного мозга***

Выделение и культивирование клеток выполнено в Центре клеточных технологий ФГБУН «Институт цитологии» РАН совместно с к.б.н., старшим научным сотрудником лаборатории клеточных биотехнологий Н.М. Юдинцевой. Для получения МСК использовали метод аспирации. Костный мозг забирали у здоровых кроликов породы (n=4). Под общей анестезией с использованием тилетамина гидрохлорид/золазепам гидрохлорида (Zoletil, Virbac SA, Франция) в дозе 25 мг/кг внутримышечно и ксилазина гидрохлорида (Bioveta, Чехия) в виде 2% раствора в объеме 1,0-1,5 мл внутримышечно) выполняли прокол кожи в области гребня подвздошной кости шприцом с иглой диаметром 18 G. От каждого животного брали по 4 вакутейнера (объемом 2 мл) с литий-гепарином (BD Biosciences, Франция).

Из аспирата выделяли моноклеарные клетки методом градиента Фиккола. Костный мозг разводили (1:1) фосфатно-солевым буфером (PBS) и переносили в конические центрифужные пробирки объемом 50 мл (TPP, Швейцария). Для выделения клеток использовали пробирки Set Mate (Stemcell Technologies, США) и Ficoll (Merck, США). Костный мозг осторожно вносили на поверхность фиколла в пропорции 2:1, центрифугировали в течение 10 мин при  $1200 \times g$ . Далее плазму с моноклеарами осторожно переносили в новую центрифужную пробирку на 50 мл и дважды промывали 10 мл PBS. Полученные МСК, подсчитывали и высевали на чашку (Nunc, США) плотностью  $5 \times 10^3 / \text{см}^2$ . Клетки культивировали в стандартных условиях в среде, содержащей 10% фетальную бычью сыворотку и раствор гентамицина (Gibco, Великобритания) 50 мкг/мл при  $+37 \text{ }^\circ\text{C}$  в 5%  $\text{CO}_2$ . Неадгезированные клетки удаляли через 2 суток при последующей замене среды. После достижения культурой конfluence до 80% выполняли пассирование клеток с помощью раствора смеси ферментов трипсина-ЭДТА (0,25-0,02%) (Gibco, США). В эксперименте использовали клетки 4-5-го пассажей (рисунок 3).

Иммунофенотипирование клеток выполняли с помощью моноклональных антител Abcam (США) на проточном цитофлуориметре Epics XL (Beckman Coulter). Относительное количество позитивных клеток по иммунофенотипическим маркерам CD90+ и CD105+, характерным для МСК, составило 81% и 92% (соответственно), гемопоэтический маркер CD45+ отсутствовал.

Выявление в ткани клеток выполняли с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции. Ткань заключали в раствор «Tissuetec» (криогель) и замораживали в жидком азоте путем многократного погружения. Криосрезы толщиной 15-20 мкм готовили на криотоме, помещали на предметные стекла «super frost» и фиксировали 10%-ным раствором формалина, затем срезы выдерживали в течение 5 мин в 1%-ном растворе красителя DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндола дигидрохлорид), трижды отмывали физиологическим солевым раствором.



А – через 1 сутки; Б – через 3 суток; В – адипогенная дифференцировка, окраска масляным красным; Г – остеогенная дифференцировка, окраска щелочной фосфатазой; Д – остеогенная дифференцировка, реакция фон Косса; Е – хондрогенная дифференцировка, окраска толуидиновым синим; Ж – хондрогенная дифференцировка, окрашивание сафранином; З – хондрогенная дифференцировка, окрашивание альциановым синим (электронная микроскопия, 100 мкм).

Рисунок 3 – Культура МСК кролика (А, Б) и различные направления дифференцировки (В, Г, Д, Е, Ж, З)

В качестве заключающей среды использовали Mounting medium (Pharmacia Biotech., Швеция). Идентификацию окрашенных клеток проводили с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SL (Zeiss, Германия). Для возбуждения флуоресценции использовали аргоновый лазер с длиной волны 488 нм.

Для последующей идентификации клеток в эксперименте *in vivo* МСК были мечены суперпарамагнитными наночастицами оксида железа ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , SPION). Суперпарамагнитные наночастицы готовили на основе солевого раствора, содержащего  $\text{FeCl}_3$  и  $\text{FeSO}_4$ , путем осаждения (Шевцов и соавт., 2015). SPION размерами менее 50 нм покрывали декстраном (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США) под воздействием ультразвука с целью повышения биосовместимости и снижения агрегации. Для удаления крупных наночастиц и получения мелкодисперсной фракции с высокой коллоидной стабильностью использовался неодимовый магнит (Nd-Fe-B). Непосредственно перед применением коллоидный раствор наночастиц встряхивали для ресуспендирования образовавшихся агрегатов. Гидродинамический размер и поверхностный заряд наночастиц оценивали с помощью Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Великобритания). 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  $\text{CO}_2$ -инкубатора. После инкубации среду меняли на свежую, а клетки, находящиеся на стеклах, трижды отмывали раствором PBS. Оценку жизнеспособности клеток выполняли с помощью окраски красителем Трипановый (рисунок 4) синий (0,4%, Биолот, Россия). Дополнительно с помощью колориметрического теста для оценки метаболической активности клеток (метилтетразолиевый тест – МТТ) была проанализирована цитотоксичность наночастиц. С этой целью использован набор Vybrant® МТТ в соответствии с протоколом производителя (Life Technologies, США).

### ***2.2.5 Методики оценки внеклеточных везикул, выделенных из мезенхимных стволовых клеток***

МСК-ВВ выделяли из кондиционированной среды путем дифференцированного центрифугирования при +4 °С: 1) для удаления погибших клеток – при 300×g в течение 10 минут; 2) для удаления клеточного «мусора» – при 2000×g в течение 15 минут; 3) для удаления мелкого «мусора» и крупных везикул – при 10000×g в течение 30 минут. После каждого этапа центрифугирования клеточную суспензию переносили в новую пробирку. Затем промывали фосфатно-солевым буфером для освобождения от загрязняющих белков и ультрацентрифугировали при 100000×g в течение 1,5 часов (ультрацентрифуга Optima XPN-100, Beckman Coulter, Калифорния, США) (ротор Type 70 Ti, Beckman Coulter Optima L-XP) при +4 °С. Полученный осадок ВВ ресуспендировали в стерильном буфере PBS и быстро 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 негативного окрашивания 1%-ным водным раствором уранилацетата (АО ВЕКТОН, Россия). Образец с МСК-ВВ (10 мкл) помещали на медные сетки, покрытые формварно-углеродными пленками (Electron Microscope Sciences, Хэтфилд, Пенсильвания, США) на 1,5 мин, сушили и окрашивали 1%-ным водным раствором уранилацетата.

Гидродинамический размер МСК-ВВ оценивали методом динамического рассеяния света с использованием Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Малверн, Великобритания). Поправочный коэффициент диаметра определяли путем анализа одноразмерных стандартов (монодисперсные полистироловые шарики размером 60 нм). Общий белок МСК-ВВ оценивали с помощью спектрофотометра Nano Drop One (Fisher Scientific, Массачусетс, США). Для определения общего количества белка в ВВ был применен белковый анализ Брэдфорда. Стандартную

кривую поглощения выстраивали в зависимости от концентрации бычьего сывороточного альбумина (от 1000 до 10 мкг). Равный объем образца МСК-ВВ и реагента Брэдфорда смешивали и инкубировали 10 минут в темноте. Измерение оптической плотности (n=5) проводили при 595 нм.

Для обнаружения некоторых характерных белков МСК-ВВ использовался вестерн-блоттинг. Белки разделяли электрофорезом с использованием 12% полиакриламидных гелей в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия. Затем белки переносили из геля на нитроцеллюлозную мембрану (BIO-RAD, 1620112) в трис-глициновом буфере (pH 8,3), содержащем 10% этанола и 0,1%. После переноса мембраны промывали в течение 20 минут PBS, содержащим 0,1% Tween 20, и блокировали 5% обезжиренным сухим молоком (Biotium, Калифорния, США), разведенным в PBS, в течение 1 часа для предотвращения неспецифического связывания. Мембраны инкубировали с первичными антителами при +4 °C в течение ночи. Первичными антителами, использованными для вестерн-блоттинга, были антитела против Hsp70 (кат. № ab181606, Abcam, 1:1000), антитела против CD63 (кат. № ab134045, Abcam, 1:1000), антитела против CD9 (кат. № ab134045, Abcam, 1:1000), (№ ab263019, Abcam, 1:1000). На следующий день мембраны инкубировали с вторичными антителами конъюгированными с пероксидазой хрена (Cell Signaling Technology, 7074P2, 1:10000) в течение 1 ч при комнатной температуре, трижды промывали на шейкере PBS, содержащим 0,1% полисорбата 20, по 5 мин каждая промывка. 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). Колонку-ловушку (50×0,1 мм) заполняли сорбентом Prontosil 120-C18AQ 5 мкм (Dr. Maisch, Аммербух, Германия) и загружали образцы в загрузочный буфер (2% ACN, 98% H<sub>2</sub>O, 0,1% TFA) при потоке 4 мкл/мин. Образцы разделяли при комнатной температуре

в самоупакованной колонке из плавленого кварца (300×0,1 мм), заполненной Reprosil PUR C18AQ 1.9 (Dr. Maisch, Аммербух, Германия) в эмиттер, подготовленный с помощью P2000 Laser Puller (Sutter, США). Для обращенно-фазовой хроматографии 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 элюирования пептидов готовили следующие растворы: Буфер А – 5% ацетонитрил и 0,1% муравьиная кислота; буфер Б – 80% ацетонитрил и 0,1% муравьиная кислота. Затем пептиды загружали в загрузочный раствор (98% 0,1% (об./об.) муравьиной кислоты, 2% (об./об.) ацетонитрила) и элюировали линейными градиентами: 3-35% раствор Б в течение 105 мин; 35-50% Б в течение 18 мин, 50% Б в течение 1 мин, 50-99% Б в течение 0,1 мин, 99% Б в течение 3 мин, 99-2% Б в течение 0,1 мин при скорости потока 500 нл/мин. Параметры MS1 были следующими: разрешение 70К, диапазон сканирования 350-1600, максимальное время инъекции – 35 мс, заданное значение автоматической регулировки управления –  $3 \times 10^6$ . Ионы выделяли с использованием окна 1,4 m/z, предпочтительного сопоставления пептидов и исключения изотопов. Время динамического исключения было установлено равным 30 с. Фрагментация MS2 проводилась с разрешением 17,5К, энергия столкновения 30%, максимальное время инъекции – 80 мс, цель автоматической регулировки управления –  $1 \times 10^5$ . Другие настройки: исключение начислений – не назначено, 1, >7. Для последующего анализа данных необработанные файлы MS 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 с карбамидометилом Cys в качестве фиксированной модификации и дезамидированием Asn /Gln и окислением Met. как переменные модификации. Частота ложного обнаружения совпадений пептидного спектра определялась путем поиска в обратной базе данных и была установлена на уровне 0,01. Специфичность фермента была установлена как С-концевая по отношению к аргинину и лизину, и при поиске в базе данных допускалось максимум два пропущенных расщепления.

Идентификацию пептидов проводили с допустимым отклонением массы исходного предшественника до 10 мд и допустимым отклонением массы фрагмента 0,05 Да.

Список белков, выявленных с помощью МС, с целью получения сети белок-белковых взаимодействий (protein-protein interaction, PPI) был загружен в онлайн-инструмент поиска множественных белков STRING88 со следующими настройками: организм – *Oryctolagus cuniculus*; тип сети – полная сеть STRING; значение ребер сети – evidence; минимально необходимый балл взаимодействия – средняя достоверность (0,4). В результате мы получили сеть с количеством узлов, равным 302. Далее для идентификации белковых комплексов полученную сеть кластеризовали с помощью с помощью марковского алгоритма кластеризации (Markov Cluster Algorithm, MCL) (Wang J., 2010) с параметром инфляции, равным 3. Для каждого кластера 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.

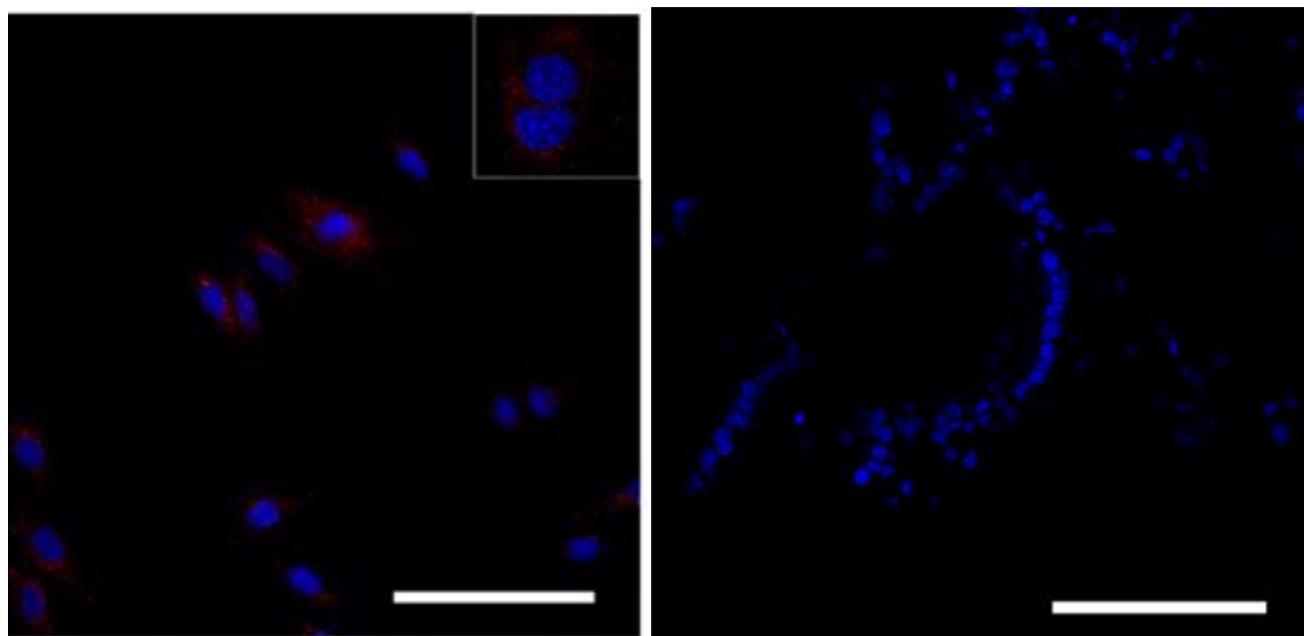
### **2.2.6 Методика изучения биораспределения мезенхимных стволовых клеток в организме кроликов с нефротуберкулезом**

Оценка биораспределения МСК проведена на 9 кроликах с нефротуберкулезом, вызванном международным стандартизованным вирулентным тест-штаммом *M. tuberculosis* H37Rv. Суспензию МСК ( $5 \times 10^7$  клеток в 2 мл PBS), меченных SPION, вводили кроликам в краевую ушную вену. Оценку биораспределения выполняли на 2-е, 3-и и 7-е сутки после введения МСК на фоне противотуберкулезной терапии.

Органы (почки, легкие, печень, селезенку) извлекали и фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина.

1. Для выявления в тканях МСК, содержащих SPION, использовали *непрямой иммунофлуоресцентный анализ*. Для этого ткань заливали раствором

Tissue-Tek (Sakura Finetek Europe BV, Alphenanden Rijn, Нидерланды) и замораживали в жидком азоте методом многократного погружения. Кротомиические срезы толщиной 10-15 мкм помещали на Super Frost. Предметные стекла и фиксировали 10% раствором нейтрального формалина. Для окрашивания ядер срезы погружали на 5 мин в 1% краситель DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндола дигидрохлорид, Thermo Fisher Scientific), трижды промывали физиологическим раствором PBS и заключали в среду Mountingmedium (Pharmacia Biotech., Швеция) и детектировали с помощью диодного лазера (405 нм) (рисунок 4). SPIONs были обнаружены отраженным лазерным сканированием (561 нм). Краситель визуализируется в виде красных точек, присутствующих в цитозоле, но не в ядре. МСК без метки SPION использовали в качестве контроля (рисунок 4, Б). Исследования выполняли на конфокальном микроскопе (Olympus 3000) с применением конфокальной системы Olympus IX83 microscope (Olympus Corporation, Япония).



А

Б

А – МСК, совместно инкубированные со SPION; Б – контроль (необработанные клетки).

Ядра окрашивали DAPI (синий) и детектировали с помощью диодного лазера (405 нм).

Наночастицы (красный) были обнаружены отраженным лазерным сканированием (561 нм).

Масштабный отрезок: 100 мкм.

Рисунок 4 – Оценка интернализации наночастиц. Конфокальная микроскопия

2. Реакция Перлса – с целью регистрации миграции в ткани почек МСК, содержащих SPION. Для этого почки после фиксации в 10% растворе нейтрального формалина (рН 7,4) обезвоживали и пропитывали парафином по стандартизированной методике в автоматическом гистологическом процессоре Excelsior AS (Thermo, США) в готовом растворе IsoPREP (Биовитрум, Россия) и парафиновой среде HISTOMIX (Биовитрум, Россия). Срезы толщиной 1,5-2 мкм изготавливали с использованием ротационного микротомы HM 325 (Thermo, США). Затем срезы депарафинировали, дегидратировали и выполняли окрашивание по методу Перлса для выявления железосодержащих частиц.

**2.2.7 Протокол проведения противотуберкулезной терапии  
и введения мезенхимных стволовых клеток и внеклеточные везикулы,  
выделенные из мезенхимных стволовых клеток**

Исследования выполнены на 60 кроликах-самцах породы «Советская шиншилла» массой  $3457 \pm 262$  г (3315-3930) в трех сериях 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* H37RV и лечение с использованием МСК-ВВ.

После верификации туберкулезного процесса в почках 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. Противотуберкулезные 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); пипразинамид (перорально в дозе 20 мг/кг, АО «Фармасинтез», Россия). Рифампицин – препарат, входящий в противотуберкулезную терапию первой линии, не был включен в схему противотуберкулезной терапии кроликов в виду развития тяжелого колита;
- 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), тиюреидоиминометилпиридиния 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 PBS в латеральную вену уха. На аналогичном сроке кроликам третьей группы 3-ей серии в латеральную 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:

1. Динамике клинических показателей (массы тела, состояния шерстяного покрова, потребления кормов, двигательной активности).
2. Мониторирования биохимических показателей периферической крови.
3. Лучевым методам исследования.
4. Гистологического и морфометрического исследований ткани почки.

### ***2.2.8 Клинические методы исследования***

Клинические методы исследования включали: ежедневную оценку общего состояния животных (удовлетворительное/неудовлетворительное), осмотр области инокуляции инфекта (абсцессы, гематомы – есть /нет); измерение массы тела животных (кг) еженедельно с использованием электронных весов модели Adventurer™, точность взвешивания  $\pm 0,1$  г.

### ***2.2.9 Биохимические и иммунологические методы исследования***

Забор периферической крови для биохимической оценки белковых маркеров проводили трижды: исходно, через 18 дней после заражения и по завершении курса терапии (3, 5 месяца). В сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа определяли концентрации показателей системы ММП/ингибиторы (ММП-1, -9) и их тканевого ингибитора-1 (ТИМП-1), цистатина С – используя наборы реагентов «Cloud-Clone Corp.» согласно протоколу производителя (Cusabio, China). Оценка воспалительного ответа также включала анализ концентрации альбумина (АЛ) и креатинина (КР) на анализаторе фирмы Beckman Coulter, концентрацию церулоплазмينا (ЦП) – методом Раввина, активность ферментов пуринергической системы – общей аденозиндезаминазы

(АДА) и ее изоферментов (АДА-1 и АДА-2) методом G. Giusti и активность нейтрофильной эластазы (ЭЛ) – по гидролизу синтетического субстрата паранитрофенил-N-трет-бутилоксикарбонил-L-аланина.

Оценку концентрации интерлейкина (IL)-4, IL-10, INF- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  в плазме периферической крови определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) по протоколу производителя (Cloud-Clone Corp., Техас, США). Для этого образцы крови были взяты через 24 часа, 1, 2 и 4 недели после введения МСК-ВВ.

### ***2.2.10 Бактериологический метод исследования мочи***

Бактериологическое исследование мочи выполняли через 30 дней после инфицирования экспериментальных животных. Забор мочи осуществляли стерильным катетером и переносили в стерильные пробирки на 50 мл. Центрифугировали в течение 20 минут при скорости 4000 оборотов /мин. Супернатант удаляли, в пробирку вносили реагент MycoPrep™Kit (Becton, Dickinson and Company) в соотношении 1,5 мл на 1,0 мл мочи. Экспозиция – 20 минут при комнатной температуре, далее добавляли буфер до 50 мл, центрифугировали, супернатант удаляли. Осадок высевали на плотную питательную среду Финн-II (на две пробирки). Посевы инкубировали в условиях термостата при +37 °С. Результаты учитывали через 60 дней. Интенсивность роста обозначали по трехбалльной системе:

- 1+ 1-20 КОЕ – «скудное бактериовыделение»;
- 2+ 21-100 КОЕ – «умеренное бактериовыделение»;
- 3+ >100 КОЕ – «обильное бактериовыделение».

Величину КОЕ (колониеобразующие единицы) высчитывали как среднее по результатам подсчета выросших колоний на всех пробирках.

### *2.2.11 Лучевые методы исследования*

#### **Компьютерная томография**

Компьютерную томографию (КТ) почек и легких проводили на томографе Toshiba One Aquilion через 30 дней после инокуляции инфекта с целью оценки состояния ткани почек, в 3-й серии дополнительно выполняли КТ через 3 месяца от момента заражения для оценки эффективности терапии.

КТ выполняли путем болюсного введения контрастного вещества Ультравист-370 (4 мл со скоростью 1 мл/мин) в краевую ушную вену. Затем в течение 30 секунд получали последовательные изображения брюшной полости, которые служили основой для карты перфузии.

Техническая характеристика аппарата: Гентри:

- апертура 720 мм;
- поля сканирования 180, 240, 320, 400, 500 мм;
- углы наклона  $\pm 30$  градусов;
- толщина срезов 0,5 мм, 1 мм, 2 мм, 3 мм, 4 мм, 6 мм, 8 мм;
- время сканирования: для 229 градусов – 0,32 с, для 360 – 0,5 с, 0,75 с, 1 с, 1,5 с, 2 с, 3 с (0,4 с – опция);
- время сканирования для сканограммы: произвольно от 2 до 14 с;
- система детекции: высокоэффективный твердотельный детектор с 896 каналов  $\times 64$  элемента; сбор данных  $896 \times 32$  ряда;
- напряжение на рентгеновской трубке: 80, 100, 120 и 135 кВ;
- ток рентгеновской трубки от 10 до 500 мА с приращением 10 мА (от 10 мА до 50 мА – шаг 0,5 мА);
- мощность излучения рентгеновской трубки: 7500 кНУ;
- скорость охлаждения анода трубки: 1386 кНУ/мин;
- угол расхождения пучка рентгеновской трубки 49,2 градуса.

Стол пациента: вертикальное перемещение, минимальная высота примерно 300 мм (высота стола), рабочий ход 644 мм. Рентгеновская трубка: Megacool. Скорость охлаждения: 1368 kHU/мин.

Сканирование проводилось в программе Pediatric 1,0 при заранее установленных настройках: напряжение на рентгеновской трубке: 80,0 кВ, сила тока на рентгеновской трубке 150 мА, толщина томографического слоя 1,0 мм/0.0:1, размер матрицы изображения 512x512 пикселей. Время ротации трубки 0,5 с.

### **Ультразвуковое исследование**

УЗ – исследование почек выполняли непосредственно в процессе моделирования нефротуберкулеза, для визуализации направления хода иглы при проведении тонкоигольной пункции коркового вещества нижнего полюса левой почки. Для повышения точности позиционирования пункционной иглы использовали пункционный адаптер для ультразвукового сканера.

Техническая характеристика аппарата Samsung Medison RS80A-RUS:

- режимы визуализации: 2D, 3D, 4D, анатомический, M-режим, цветового доплера, S-Flow, ElastoScan;
- шкала серого: 256 градаций (8 бит);
- фокусировка передачи: максимум по восьми точкам, цифровой динамический фокус получения (непрерывный);
- датчики (тип BF/IPX7): L3-12A, PA3-8B, E3-12A, CA1-7A протестированы и соответствуют требованиям к излучению для группы 1 класса А по международному стандарту CISPR 11;
- основной монитор: 23-дюймовый ЖК-монитор со светодиодной подсветкой;
- измерение: режим 2D – линейные измерения и измерения площади с использованием эпилептической аппроксимации или обведения контуров;
- точность акустических измерений и их суммарная погрешность: интеграл ослабленной интенсивности импульса (PI.3) точность 3,2%, суммарная погрешность от +21% до -24%; акустическая мощность (WO) точность 6,2%,

суммарная погрешность  $\pm 19\%$ ; ослабленное давление волны разрежения (Pr.3) точность 5,4%, суммарная погрешность  $\pm 15\%$ ; центральная частота (Fc) точность  $< 1\%$ , суммарная погрешность  $\pm 4,5\%$ ;

- динамический диапазон от 25 до 75;
- усреднение кадров от 0 до 15;
- скорость 1410 до 1600 m/s;
- серая карта от 1 до 13;
- область сканирования от 20 до 100%;
- мощность ультразвукового сигнала от 10 до 100.

Использовали пакет измерений: педиатрия в режиме 2D, с линейным датчиком L3-12A при заранее установленных настройках с применением функции улучшения визуализации иглы.

### ***2.2.12 Гистологические и морфометрические методы исследования***

Почки (левую и правую) целиком фиксировали в 10% нейтральном формалине (рН 7,4). Производили макроскопическую оценку препаратов, после чего вырезали фрагменты нижнего полюса левой почки, включающие все исследуемые структуры для проведения гистологического исследования. Обезвоживание и пропитывание парафином проводили по стандартизированной методике в автоматическом гистологическом процессоре Excelsior AS (Thermo, США) в готовом растворе IsoPREP (Биовитрум, Россия) и парафиновой среде HISTOMIX (Биовитрум, Россия). Срезы изготавливали при помощи ротационного микротомы HM 325 (Thermo, США). Толщина срезов 1,5-2 мкм. После чего их депарафинировали, дегидратировали и выполнили окрашивание несколькими способами: гематоксилином и эозином; с целью оценки распространенности соединительной ткани и ее зрелости использовали окрашивание по Ван Гизону или трихром по Массону. Для выявления кислотоустойчивых микроорганизмов

(КУМ), применяли метод Циля-Нельсена; окрашивание по Перлсу использовали для выявления железа (в том числе SPION). Микропрепараты сканировали (LeicaAperioAT2 (LEICAMICROSYSTEMS, Германия; объектив: 20×/0,75 PlanApo) и анализировали с использованием программного обеспечения Aperio Image Scope.

Предварительный просмотр и выбор областей для анализа выполняли на цифровых изображениях гистологических препаратов с помощью программного обеспечения QuPath v0.2.3 (Эдинбургский университет, Великобритания). Области для измерения полностью захватывали корковую и мозговую паренхиму от капсулы до лоханки; их периметр составлял 22-31 тыс. кв. мкм.

При гистологическом исследовании оценивались особенности структурного строения паренхимы, стромы, лоханки, капсулы почки, кровообращения и наличие признаков его нарушения, очаги некроза, характер воспалительного экссудата при его наличии.

Для морфофункциональной характеристики почек проводили морфометрическое исследование с использованием программы NIH Image J версии 1.52a (National Institutes of Health, США) с дополнительными плагинами. Определяли ширину коркового и мозгового вещества, площадь специфического воспаления, некротических очагов, воспалительной инфильтрации и площадь участков фиброза, толщину стенки лоханки и толщину эпителия лоханки. Оценка функциональной способности почек включала исследование клубочков (определение толщины париетального листка капсулы Шумлянско-Боумана, диаметр капилляра клубочка, площади капсулярного пространства и площади, занимаемой капиллярами, площадь почечного тельца и мочевого пространства в почечном тельце, клеточность клубочка), диаметров проксимальных и дистальных извитых канальцев, междольковой артерии и вены.

### *2.2.13 Методы статистической обработки результатов*

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 (StatSoft 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.

### ГЛАВА 3

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Результаты моделирования экспериментального нефротуберкулеза

Моделирование нефротуберкулеза выполнено на 11 кроликах, разделенных на две группы случайным образом: 1 группа – интактные (n=5) и 2 группа – модели (n=6). Для инфицирования использовали международный стандартизованный вирулентный тест-штамм *M.tuberculosis* H37Rv.

За период наблюдения у всех животных определялись удовлетворительные клинические показатели. При осмотре области инокуляции инфекта абсцессы и/или гематомы обнаружены не были. Динамика массы тела в группе 1 оставалась положительной, в то время как в группе 2 на сроке 3,5 месяца от начала эксперимента отмечался статистически значимый дефицит массы тела у кроликов в сравнении с группой 1 (таблица 2).

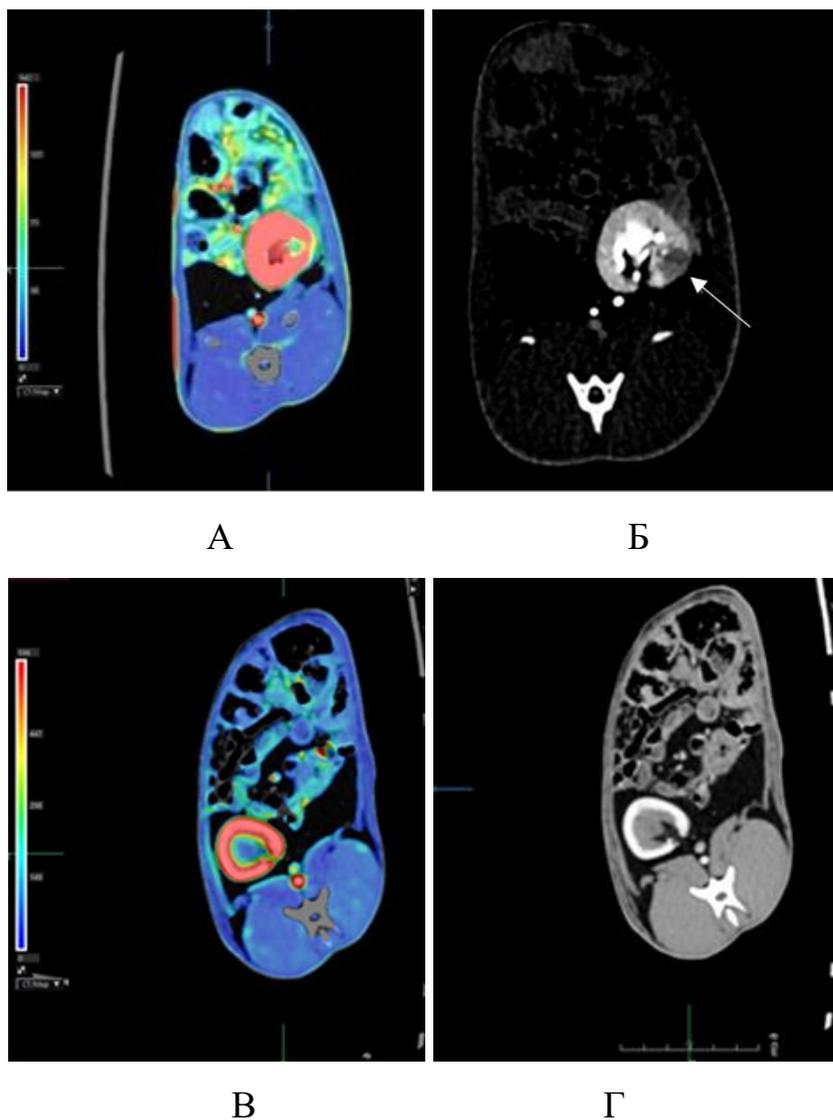
Через 18 дней после инокуляции МБТ в левую почку в ответ на введение Диаскинтеста у инфицированных кроликов регистрировали появление эритемы размером  $15,3 \pm 2,8$  мм, что свидетельствовало о наличии сенсibilизации и подтверждало развитие туберкулезного процесса (рисунок 5).



А – интактный; Б – зараженный кролик.

Рисунок 5 – Гиперергическая реакция (эритема)  
в ответ на внутрикожное введение АТР

По результатам КТ брюшной полости с применением контрастного препарата Ультравист-370, через 30 дней после заражения в левой (инфицированной) почке выявлена четко выраженная зона снижения перфузии (рисунок 6, А), совпадающая в этой области с очагом деструкции (рисунок 6, Б), что подтверждает эффективность модели нефротуберкулеза. По данным КТ легких очагов деструкции обнаружено не было.



А– в левой почке определяется четко очерченный 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); В, Г – в правой почке участков сниженной перфузии очагов деструкции не определяется.

Рисунок 6 – КТ брюшной полости

В посевах мочи на этом сроке (таблица 1) выявляли умеренный рост культуры МБТ ( $76,6 \pm 8,3$  КОЕ).

Таблица 1 – Результаты бактериологического исследования мочи у инфицированных кроликов (2-я группа)

Номера кроликов	Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в посевах мочи
1	60
2	75
3	100
4	100
5	75
6	50
Среднее значение КОЕ	$76,7 \pm 8,3$

По данным биохимического анализа крови, в группе модели к 18-му дню после заражения по сравнению с исходным уровнем не обнаружено существенных изменений уровней КР, АЛ и ЦП, но при этом наблюдалось увеличение общей активности АДА за счет АДА-1, тогда как уровень АДА-2 значимо не изменялся. Кроме того, наблюдалось повышение активности ЭЛ ( $p=0,049$ ) и снижение уровня ТИМП-1 ( $p=0,03$ ), при этом значения ММП оставались неизменными. Изменения ЭЛ были однонаправленно связаны с активностью общей АДА ( $r=0,61$ ;  $p=0,002$ ) и противоположно с АЛ ( $r=-0,44$ ;  $p=0,03$ ). Снижение уровня АЛ наблюдалось при увеличении ТИМП-1, насколько можно судить по коэффициентам корреляции ( $r=-0,47$ ;  $p=0,03$ ). Изменения ММП и ЭЛ были однонаправленными. Также выявлены зависимости изменений между уровнями металлопротеиназ 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 от начала эксперимента у кроликов второй группы наблюдалось достоверное повышение уровня КР по сравнению с исходным уровнем ( $p=0,019$ ), тогда как АЛ и ЭЛ оставались прежними. Выявлено увеличение общей активности АДА, АДА-1. Уровень ТИМП-1 значительно изменился по сравнению с исходным уровнем, однако значения ММП-1 и ММП-3 оставались достаточно стабильными, что на фоне увеличения активности ЭЛ свидетельствует о дисбалансе в системе протеиназа/ингибитор и характеризует преобладание процессов протеолиза в организме зараженных животных. Повышение уровня КР ассоциировалось с повышением активности общей АДА и АДА-1 ( $r=0,85$ ;  $p=0,035$ ;  $r=0,9$ ;  $p=0,04$  соответственно), что указывает на развитие воспалительного процесса в сочетании со снижением функции почек на данном сроке наблюдения (таблица 2).

Таблица 2 – Биохимические показатели в исследуемых группах

Показатели	Исходные значения	1 группа (здоровые, незараженные)		2 группа (кролики с нефротуберкулезом)	
		18 день	3,5 месяца	18 день	3,5 месяца
КР, мкмоль/л	66,3 (61,5; 73,5)	68,5 (60,9; 74,3)	65,7 (60,1; 70,3)	69,0 (65,0; 80,0)	84,5* (75,5; 92,0)
ЦП, г/л	0,24 (0,17; 0,34)	0,26 (0,17; 0,34)	0,25 (0,16; 0,34)	0,32 (0,27; 0,38)	0,39 (0,3; 0,55)
АЛ, г/л	44,0 (43,0; 46,0)	46,0 (43,0; 48,0)	46,0 (43,0; 47,0)	48,0 (45,0; 49,0)	47,0 (43,0; 48,0)
Общая АДА, ед/л	3,7 (2,2; 5,6)	4,0 (2,5; 5,5)	3,9 (2,5; 5,7)	8,5* (5,7; 12,6)	9,9* (6,6; 12,1)
АДА-1, ед/л	3,2 (1,8; 4,8)	3,4 (2,0; 5,3)	3,5 (1,9; 5,4)	8,3* (4,3; 12,6)	9,9* (5,9; 11,3)
АДА-2, ед/л	0,46 (0; 1,2)	0,46 (0; 0,99)	0,47 (0; 1,1)	0,02 (0; 0,95)	0,2 (0; 0,4)

## Продолжение таблицы 2

Показатели	Исходные значения	1 группа (здоровые, незараженные)		2 группа (кролики с нефротуберкулезом)	
		18 день	3,5 месяца	18 день	3,5 месяца
ЭЛ, МЕ	325,7 (211,9; 383,0)	330,4 (250,8; 350,2)	327,9 (270,1; 341,4)	445,5* (302,9; 505,3)	390,1 (265,8; 433,3)
ТИМП-1, нг/мл	102,0 (80,1; 128,7)	105,2 (80,3; 111,6)	104,8 (88,9; 115,2)	83,1* (69,3; 101,1)	99,9 (80,2; 105,4)
ММП-1, нг/мл	0,40 (0,37; 0,42)	0,40 (0,34; 0,41)	0,39 (0,35; 0,41)	0,37 (0,34; 0,43)	0,33 (0,32; 0,47)
ММП-3, нг/мл	21,7 (9,3; 26,3)	20,9 (8,7; 24,9)	19,5 (10,8; 20,1)	21,5 (9,6; 23,8)	20,2 (10,6; 24,7)
Масса, г	3056,0 (2887,0; 3144,0)	3500,2 (3405,8; 3710,9)	3777,0 (3543,3; 3955,8)	3400,6 (3210,0; 3540,2)	3005,0* (2960,0; 3100,3)
Примечание – данные приведены в виде медианы и межквартильного размаха. * – статистически значимое отличие от исходного уровня и от 1 группы на всех сроках контроля. Сроки указаны от начала эксперимента.					

Через 4 месяца после инфицирования выполнена эвтаназия животных путем введения тиопентал натрия 250 мг (ОАО «Синтез», Курган, Россия) и пипекурония бромид 1 мг (ОАО «Верофарм», Москва, Россия).

При макроскопическом оценке вблизи капсулы левой почки (инфицированной) визуализировались: полость размером 11×18 мм, заполненная рыхлыми казеозными массами, в окружающей ткани – отдельные казеозные фокусы 2×3 мм (рисунок 7, Б) с переходом патологического процесса на мочеточник и его облитерацией. При макроскопической оценке правых почек патологических изменений не визуализировано.



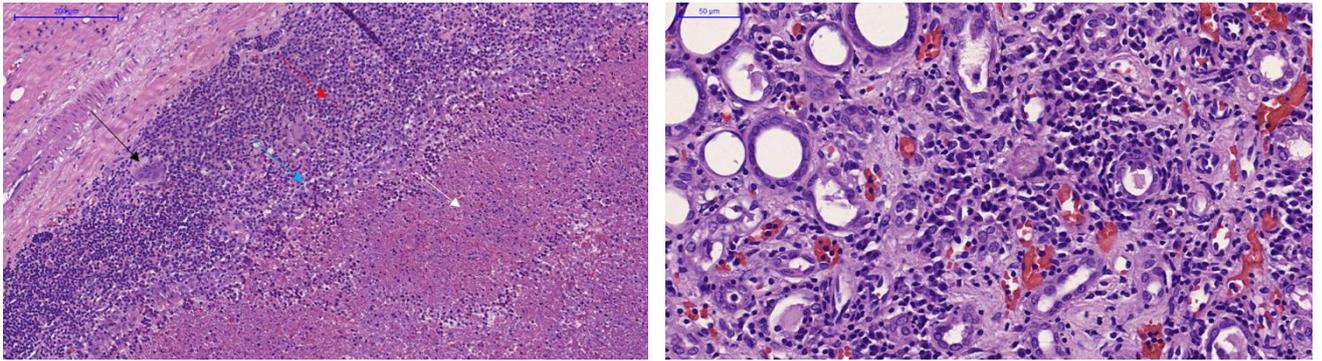
А

Б

А – почка интактного кролика; Б – почка зараженного кролика: в области нижнего полюса левой почки – очаг деструкции (синяя стрелка) и отдельный казеозный фокус (белая стрелка).

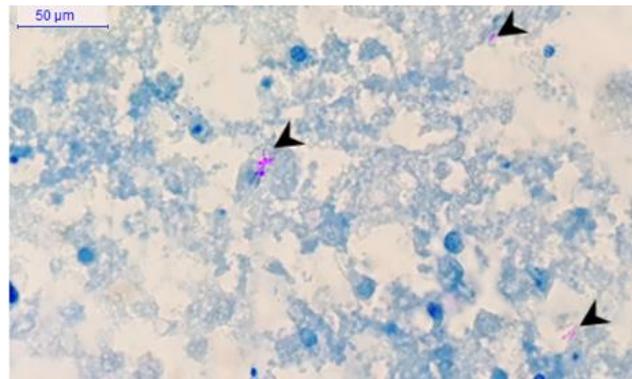
Рисунок 7 – Макропрепараты почек кролика

При гистологическом исследовании микропрепаратов тканей левой почки подтверждено наличие специфического воспаления с образованием полостей с некротическими массами, окруженных псевдоэозинофильными лейкоцитами, макрофагами и формирующимися гигантскими многоядерными клетками Лангханса (рисунок 8, А). Кроме того, выявлены участки тубулярной атрофии (рисунок 8, Б). При окраске по Цилю-Нельсену обнаружены КУМ (рисунок 8, В). При гистологической оценке правых почек, органов грудной клетки и брюшной полости очагов специфического или интерстициального воспаления, а также КУМ не обнаружено.



А

Б



В

А – очаг некроза: казеозно-некротические массы, детрит (белая стрелка); макрофагальный эпителиоидно-клеточный слой (синяя стрелка); лимфоцитрано-плазмоцитарный слой (красная стрелка); многоядерные гигантские типа Лангханса (черная стрелка);  
 Б – интерстициальная лимфоцитарно-плазмоцитарная инфильтрация с единичными макрофагами и многоядерной клеткой типа Лангханса, фокусами ремоделирования и тубулярной атрофией; В – КУМ (обозначены стрелками) в очагах специфического воспаления.

Окраска: гематоксилином и эозином (А, Б), по Цилю – Нельсену (В).

Масштабные отрезки: 500 мкм (А), 50 мкм (Б, В).

### Рисунок 8 – Микропрепараты левой почки

Таким образом, при введении взвеси *M.tuberculosis* H37Rv в корковый слой нижнего полюса левой почки у кроликов закономерно развивается нефротуберкулез, что подтверждается данными иммунологических, лучевых, микробиологических и гистологических методов исследования. Разработанный нами способ позволяет воспроизвести в экспериментальных условиях на кроликах локальное туберкулезное поражение почки с использованием малоинвазивного

хирургического доступа, а также осуществлять прижизненный мониторинг развития и оценку тяжести течения специфического воспалительного процесса от момента заражения до эвтаназии у каждого животного, включенного в исследование.

### **3.2 Оценка распределения мезенхимных стволовых клеток в организме в условиях системного введения зараженным животным**

Изучение биораспределения МСК, меченных SPIONs, при системном введении (в краевую вену уха) проводили на 9 кроликах, инфицированных *M.tuberculosis* H37Rv

*Характеристика SPION.* По данным ТЭМ установлено, что ядро из оксида железа SPION имеет диаметр 9,46 (5) нм, что свидетельствует об отсутствии агрегации наночастиц. Результаты рентгеновской дифракции показали, что SPIONs имеют структуру нанокристаллического магнетита Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

Кроме того, с помощью ТЭМ проанализировано включение наночастиц клетками на ультраструктурном уровне. Цитоплазма содержала заметные гетероморфные эндосомы диаметром 0,5 мкм, заполненные агрегатами многочисленных мелких электронно-плотных частиц (рисунок 9).

*Анализ биораспределения меченых SPIONs МСК методом конфокальной микроскопии* подтвердил наличие МСК, меченных наночастицами, в тканях легких, печени, селезенке и почках у животных с нефротуберкулезом на всех сроках исследования (рисунок 10).

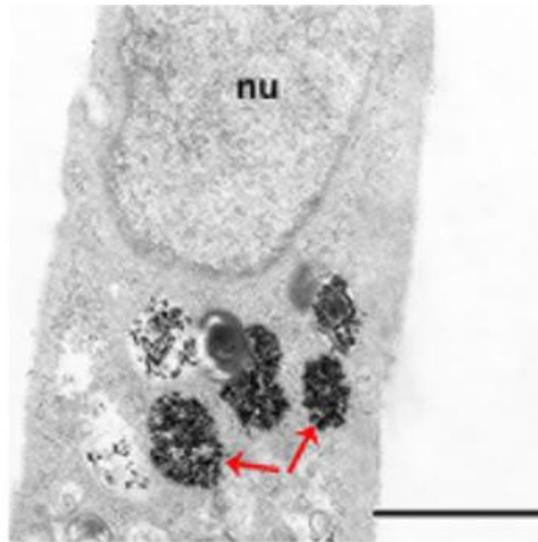


Рисунок 9 – ТЭМ-изображение SPION. Красные стрелки указывают на заполненные вторичные эндосомы с гетерогенным материалом, включая электронно-плотные наночастицы. Масштабный отрезок 400 нм

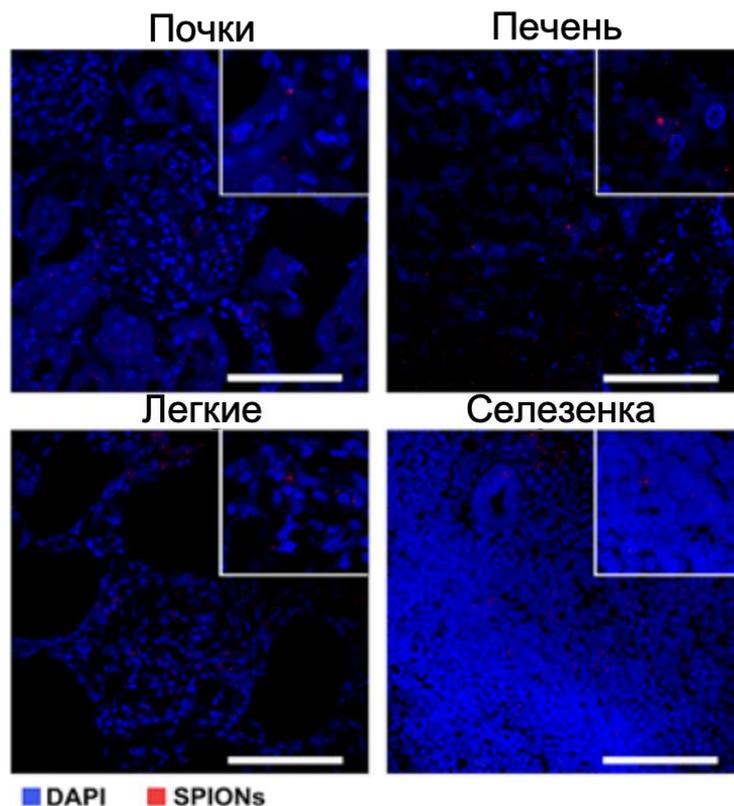
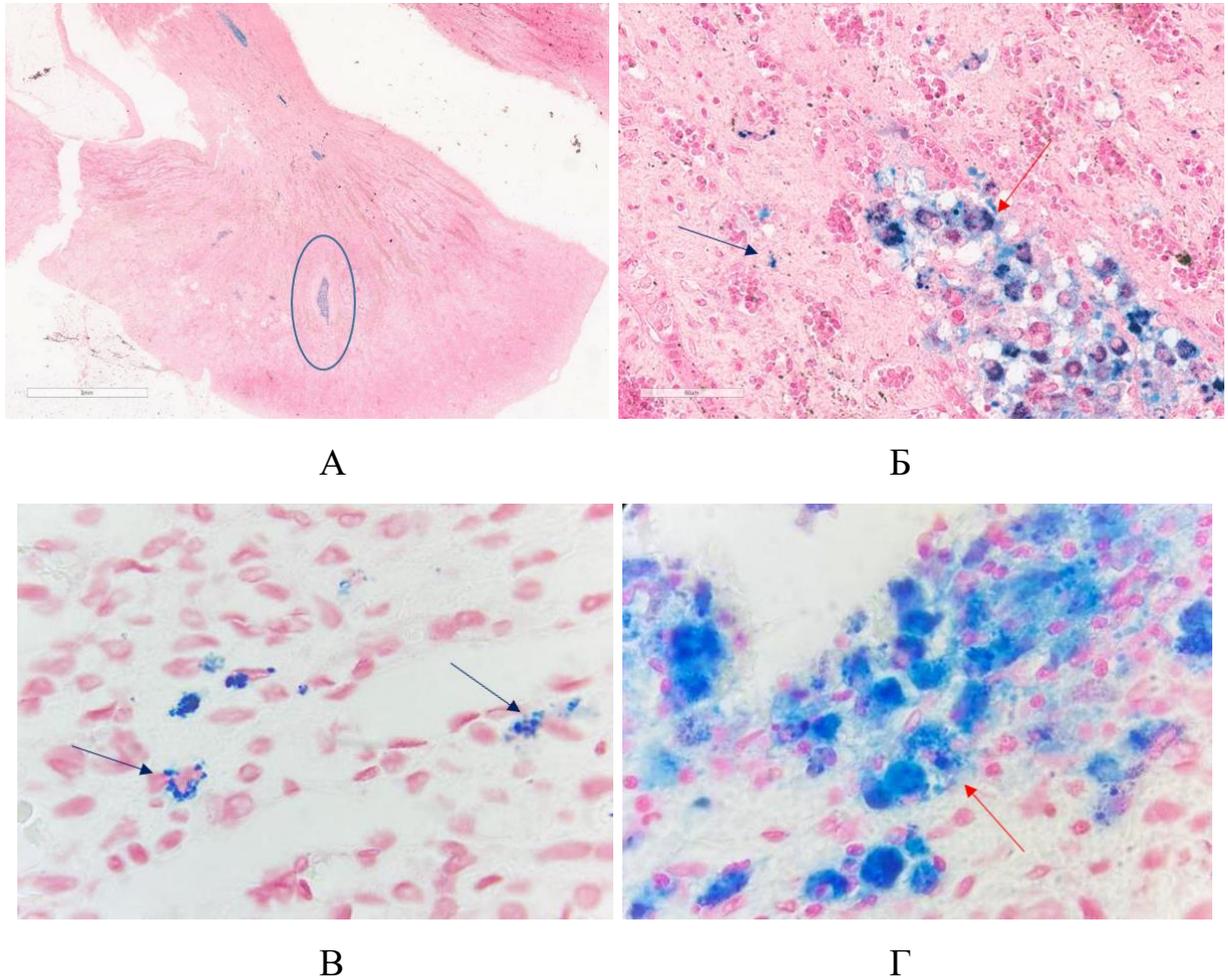


Рисунок 10 – Оценка накопления МКС, меченных SPION, в различных органах (почках, печени, легких и селезенке) кроликов с нефротуберкулезом. Ядра окрашивали DAPI (синий). SPION обнаружены методом отраженного лазерного сканирования (красный). Масштабные отрезки, 100 мкм

При окраске по Перлсу образцов органов животных с нефротуберкулезом, МСК обнаружены в тканях как в зараженной, так и в интактной почках (рисунок 11).



А – общий вид почки, линией обозначена зона накопления гемосидерофагов;  
 Б – гемосидерофаги (красная стрелка) и рядом расположенные в строме мелкие клетки с Перлс-положительными включениями (черная стрелка); В – мелкие клетки в строме с Перлс-положительными включениями (черная стрелка); Г – скопление гемосидерофагов (красная стрелка). Окраска по Перлсу. Масштабные отрезки: 3 мм (А), 50 мкм (Б); увеличение  $\times 1000$  (В, Г).

Рисунок 11 – Гистологическая картина тканей почек кроликов с нефротуберкулезом

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 пораженной почки *M.tuberculosis* H37Rv.

### **3.3 Влияние мезенхимных стволовых клеток костного мозга на эффективность лечения туберкулеза почки, вызванного микобактериями с различной лекарственной чувствительностью**

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

Для заражения использовался международный стандартизованный вирулентный тест-штамм *M. tuberculosis* H37Rv, чувствительный к противотуберкулезным препаратам. После верификации туберкулезного процесса в почках кролики были разделены на несколько групп: первая группа – зараженные кролики без последующего лечения (контроль заражения,  $n_1=6$ ); вторая группа – кролики, получающие лечение только противотуберкулезными препаратами в средних терапевтических дозах (контроль лечения,  $n_1=7$ ); третья группа – животные, получавшие ПТТ в комплексе с МСК (экспериментальная,  $n_1=7$ ).

*Результаты биохимического исследования.* Биохимическая оценка воспалительного ответа базировалась на сопоставлении данных о маркерах пуринового метаболизма, маркерах протеолиза и ремоделирования с показателями реактантов острой фазы и маркером острого повреждения почек креатинином (таблица 3).

Таблица 3 – Биохимические показатели в исследуемых группах

Показатели	Исходные значения	1 группа		2 группа		3 группа	
		18 день	3,5 месяца	18 день	3,5 месяца	18 день	3,5 месяца
КР, мкмоль/л	67,0 (60,5; 73,5)	66,0 (59,0; 80,0)	84,0* (75,0; 91,0) (p=0,006)	66,0 (59,0; 80,0)	77,0* (73,0; 93,0) (p=0,01)	66,0 (59,0; 80,0)	74,0* (71,0; 79,0) (p=0,049)
ЦП, г/л	0,25 (0,16; 0,34)	0,32 (0,24; 0,38)	0,38 (0,29; 0,58)	0,32 (0,24; 0,38)	0,23 <sup>#,&amp;</sup> (0,2; 0,25) (p=0,008)	0,32 (0,24; 0,38)	0,21 <sup>#,&amp;</sup> (0,18; 0,29) (p=0,02)
АЛ, г/л	45,0 (43,5; 46,0)	47,0 (45,0; 49,0)	46,0 (43,0; 49,0)	47,0 (45,0; 49,0)	46,0 (45,0; 47,0)	47,0 (45,0; 49,0)	48,0* (45,0; 51,0) (p=0,03)
Общая АДА, ед/л	3,8 (2,3; 5,8)	8,4* (5,2; 12,6) (p=0,0015)	9,9 (5,8; 11,1)	8,4* (5,2; 12,6) (p=0,001)	13,7* (10,9; 15,1) (p=0,01)	8,4* (5,2; 12,6) (p=0,0015)	15,0* (4,6; 17,8) (p=0,016)
АДА-1, ед/л	3,3 (1,9; 5,2)	8,4* (4,4; 12,5) (p=0,005)	9,9* (5,8; 10,6) (p=0,027)	8,4* (4,4; 12,5) (p=0,005)	11,7* (11,5; 14,9) (p=0,002)	8,4* (4,4; 12,5) (p=0,005)	13,3* (4,5; 14,8) (p=0,01)
АДА-2, ед/л	0,47 (0;1,3)	0,02 (0;0,95)	0,2 (0;0,45)	0,02 (0;0,95)	0,1 (0;1,6)	0,02 (0;0,95)	1,3 (0;2,1)
ЭЛ, МЕ	326,0 (211,9; 393,0)	445,5* (282,5; 510,7) (p=0,049)	391,1 (260,8; 423,8)	445,5* (282,5; 510,7) (p=0,049)	385,6 (315,0; 434,7)	445,5* (282,5; 510,7) (p=0,049)	326,0 (315,0; 358,6)

## Продолжение таблицы 3

Показатели	Исходные значения	1 группа		2 группа		3 группа	
		18 день	3,5 месяца	18 день	3,5 месяца	18 день	3,5 месяца
ТИМП-1, нг/мл	103,0 (79,1; 128,9)	84,5* (70,3; 113,9) (p=0,03)	98,9 (76,4; 106,4)	84,5* (70,3; 113,9) (p=0,04)	90,4* (73,7; 104,0) (p=0,04)	84,5* (70,3; 113,9) (p=0,04)	94,4 (87,8; 109,5)
ММП-1, нг/мл	0,39 (0,35; 0,42)	0,36 (0,33; 0,43)	0,39* (0,29; 0,47) (p=0,03)	0,36 (0,33; 0,43)	0,41 (0,34; ;0,56)	0,36 (0,33; ;0,43)	0,38 (0,35; 0,42)
ММП-3, нг/мл	20,7 (6,3; 27,3)	21,6 (11,6; 23,8)	7,1 (3,6; 10,7)	21,6 (11,6; 23,8)	5,0 (0,1; 23,1)	21,6 (11,6; 23,8)	10,6 (6,7; 15,8)
Примечание – * – статистически значимое отличие от исходного уровня; # – статистически значимая разница по сравнению с 18 днями; & – достоверное отличие от первой группы. Сроки указаны от начала эксперимента.							

По данным биохимического анализа крови, ни в одной из исследуемых групп к 18-ому 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, преимущественно за счет АДА-1 ( $p=0,005$ ), а также рост ЭЛ ( $p=0,049$ ) и снижение активности 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 ( $r=0,61$ ;  $p=0,002$ ;  $r=0,62$ ;  $p=0,0015$  соответственно). На фоне снижения АЛ отмечался рост ТИМП-1 ( $r=-0,47$ ;  $p=0,03$ ). Изменения ММП и ЭЛ носили однонаправленный характер. Также были выявлены зависимости изменений между уровнями металлопротеиназ 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 ( $r=0,85$ ;  $p=0,035$ ;  $r=0,9$ ;  $p=0,04$  соответственно), что свидетельствует о развитии воспалительного процесса в сочетании со снижением функции почек на данном сроке исследования. 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, в то время как уровень АДА-2 значимо не изменился. 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.

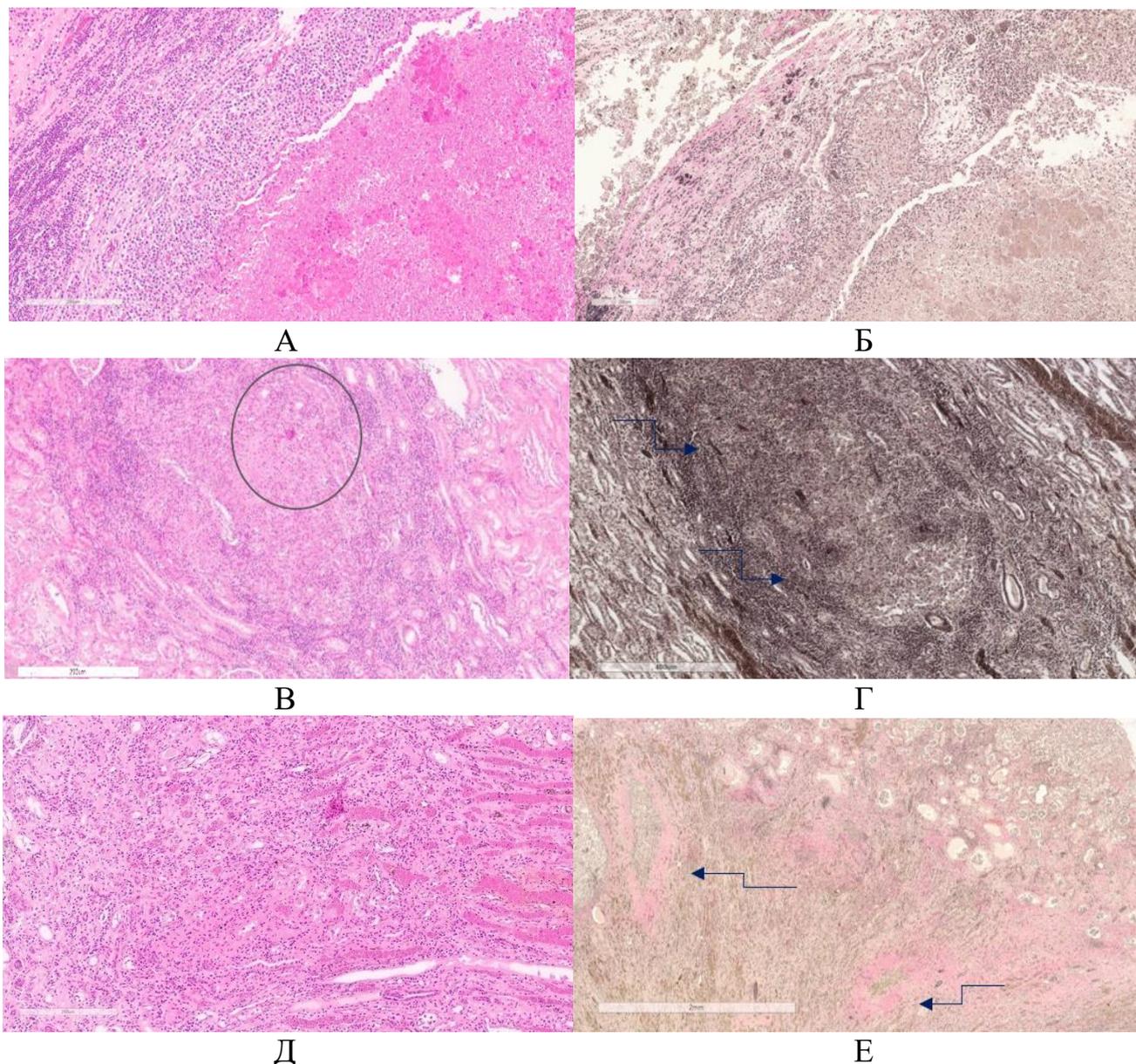
В третьей группе кроликов, которым наряду с химиотерапией вводили МСК, изменения биохимических показателей были такими же, как у животных второй группы, и отражали наличие почечной недостаточности на фоне специфического воспалительного процесса, но менее выраженное, чем в других группах.

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 достигший (1,31 против 1,12 в 1-ой группе ( $p=0,03$ )) и самый низкий уровень ММП-1, составивший 0,005 против 0,003 в 1-ой группе ( $p=0,03$ ). 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 интенсивной активности воспалительного ответа и ускорению репаративной реакции.

При *гистологическом исследовании* микропрепаратов левой почки у зараженных нелеченых кроликов выявлены выраженные нарушения кровообращения с обилием кровоизлияний и эритроцитарных тромбов в мелких сосудах. В почечной паренхиме обнаружены обширные очаги с некротическими массами, окруженными псевдоэозинофильными лейкоцитами, макрофагами, плазмоцитами, лимфоцитами, эпителиодными клетками и формирующимися гигантскими многоядерными клетками Лангханса. Кроме того, в некоторых очагах некроза определяется тенденция к формированию полости с трехслойной стенкой, характерной для каверны (рисунок 12, А, Б). При окраске срезов по методу Циля-Нельсена выявлены кислотоустойчивые микобактерии.

У кроликов, получивших 3-х месячных курс противотуберкулезной терапии, специфическое воспаление в ткани почки было представлено очагами массивной макрофагальной инфильтрации, единичными гигантскими клетками, выраженной лимфоцитарной инфильтрацией и мелкими очагами некроза. При окраске по Цилю-Нельсену в зонах некроза определялись единичные кислотоустойчивые палочки. Окраска методом Ван-Гизона обнаружила начальные признаки формирования соединительной ткани, при этом зрелой соединительной ткани не выявлено (рисунок 12, В, Г).

При сочетанном введении МСК с противотуберкулезными препаратами морфологическая картина отличалась выраженным ангиоматозом и продуктивным характером инфильтрации с сохранением в центральной части участков скопления макрофагов. При окраске методом Ван-Гизона зарегистрировано формирование зрелой, волокнистой соединительной ткани на месте очагов некроза (рисунок 12 Д, Е). При окраске по Цилю-Нельсену кислотоустойчивые палочки 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. Данные клетки могут являться МСК (рисунок 13).

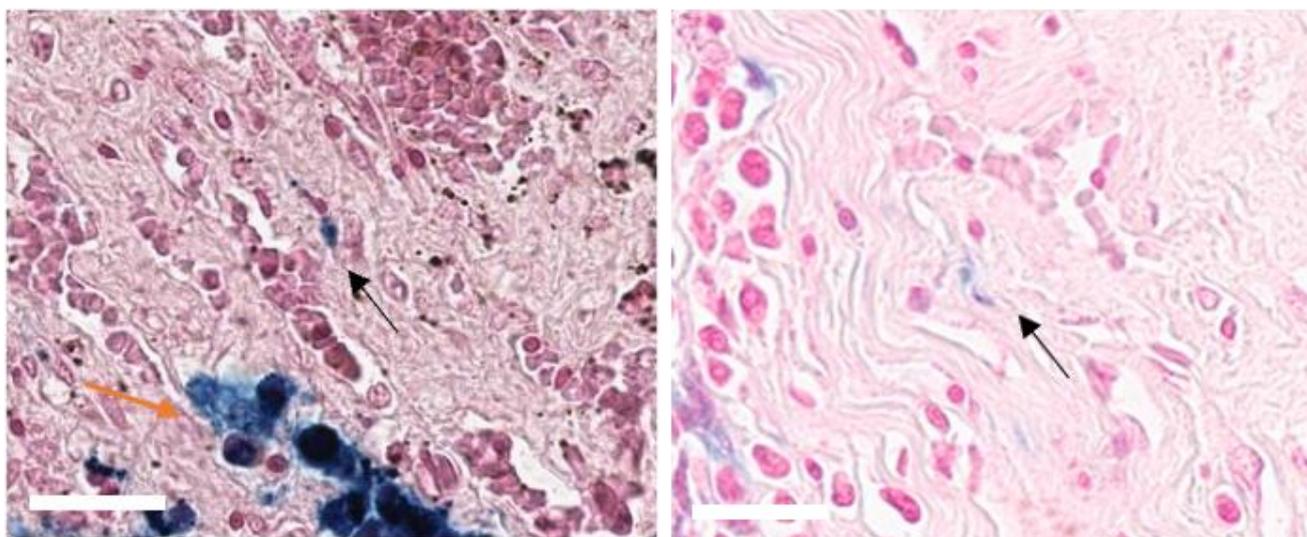


А и Б – почка кролика первой группы; крупный очаг деструкции с формирующейся трехслойной стенкой и очагом специфической инфильтрации с некрозом в центре; В, Г – почка кролика второй группы, получившего противотуберкулезную химиотерапию в течение 3 месяцев после заражения; очаг специфического воспаления с легким некрозом в центре (выделенный кружок) и умеренно выраженной лимфоидной инфильтрацией по периферии (В); зрелая соединительная ткань отсутствует, начальные признаки образования соединительной ткани (указаны стрелками) (Г); Д, Е – почка кролика третьей группы, получившего ПТТ+МСК; грануляционная ткань с признаками созревания (Д), очаги зрелой соединительной ткани (указаны стрелками) со скоплениями макрофагов в центре очагов (Е).

Окраска: гематоксилином и эозином (А, В, Д), по Ван-Гизону (Б, Г, Е).

Масштабные отрезки: 200 мкм (А, Б, В, Д, Е), 400 мкм (Г).

Рисунок 12 – морфологическая картина микропрепаратов почек через 3,5 месяца после заражения



А

Б

А – скопление гемосидерофагов (указано желтой стрелкой) в паренхиме почек;  
 А, Б – клеток с Перлс-позитивными включениями (указано черной стрелкой) в стенках мелких сосудов. Окраска по Перлсу. Масштабный отрезок, 200 мкм.

### Рисунок 13 – Почка кролика, получившего ПТТ совместно с МСК

Таким образом, применение МСК в комплексной терапии туберкулеза почки привело к снижению распространенности специфического воспаления, уменьшению его активности и к ускорению репаративных процессов по формированию зрелой соединительной ткани.

*Морфометрическое исследование* таких показателей, как площадь внутренней поверхности капсулы Шумлянско-Боумена, 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), что приобретает особенную наглядность, если представить это как отношения к соответствующим значениям у здоровых животных, принятым за единицу (рисунок 14).

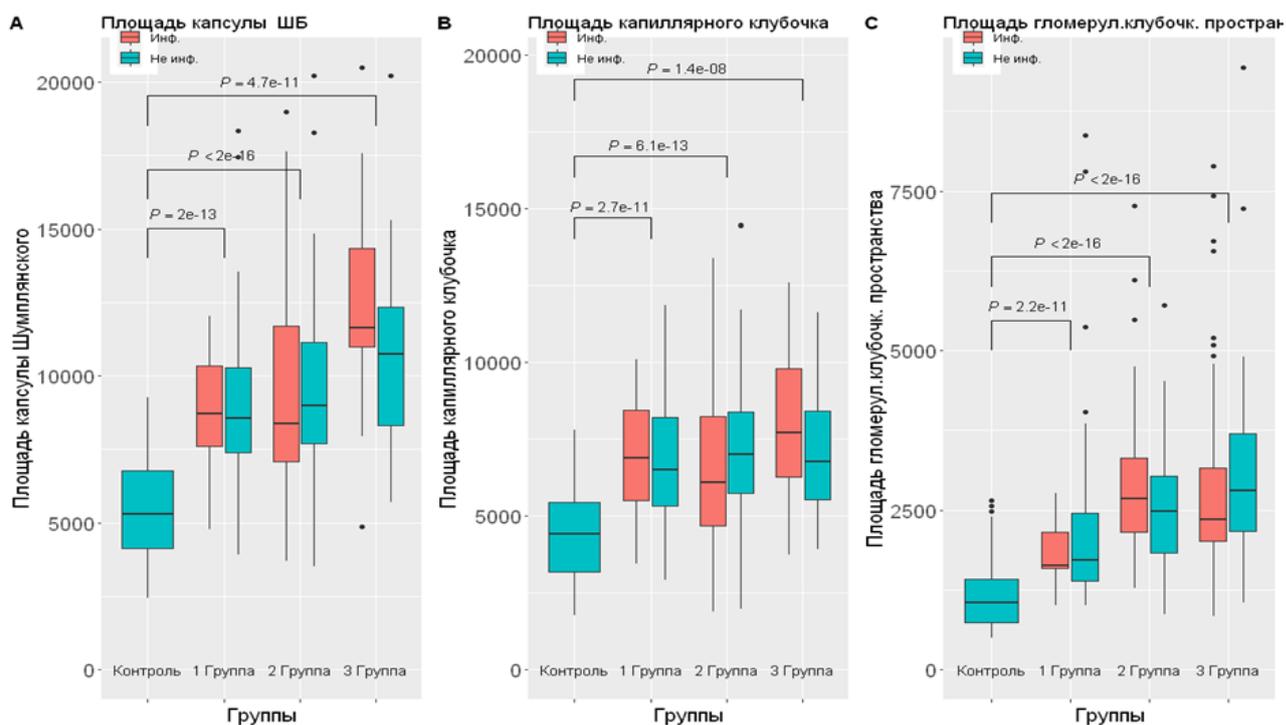


Рисунок 14 – Площади капсулы Шумлянского-Бумена, капилляров клубочка и капсулярного пространства у кроликов 1-3 групп в сравнении с контролем

При морфометрическом исследовании таких показателей, как высота эпителиальных клеток проксимальных и дистальных извитых канальцев, а также собирательных трубочек обнаружены статистически достоверные различия ( $p < 0,05$ ) между левой инфицированной почкой и правой контрольной. Надо полагать, что в отличие от клубочковой фильтрации процессы реабсорбции в левой и правой почках, как и выведение мочи через собирательные трубочки, отличались друг от друга. В связи с этим выборки, относящиеся к левой и правой почкам, рассматривались по отдельности. Эти измерения показывают, 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), что приобретает особенную наглядность, если представить это как отношения к соответствующим значениям у здоровых животных, принятым за единицу (рисунок 15).

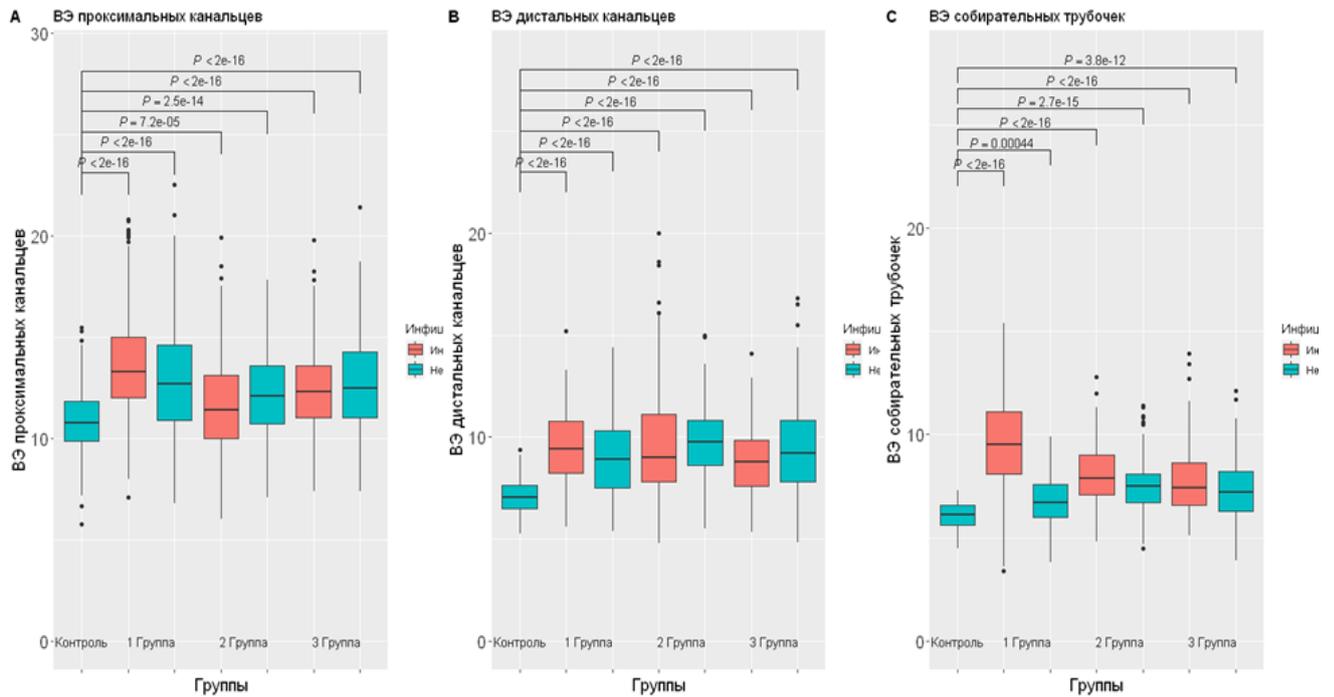


Рисунок 15 – Высота эпителиоцитов и извитых канальцев и собирательных трубочек у кроликов 1-3 группы в сравнении с контролем (Б)

При оценке результатов измерений площадей некрозов в исследуемых группах статистически достоверных различий между группами выявлено не было, однако в группе, получавшей комплексную терапию с МСК, площадь некроза меньше в сравнении с группой, получавшей лечение только противотуберкулезными препаратами (рисунок 16).

Конфокальная микроскопия криосрезов через 30 дней после внутривенного введения МСК кроликам третьей группы показала наличие в ткани почки жизнеспособных МСК, меченных SPIONs (рисунок 17). Об их жизнеспособности свидетельствуют флуоресцентные очаги свечения: синего (ядра, меченые DAPI) и красного (отраженные лазерным сканированием SPIONs).

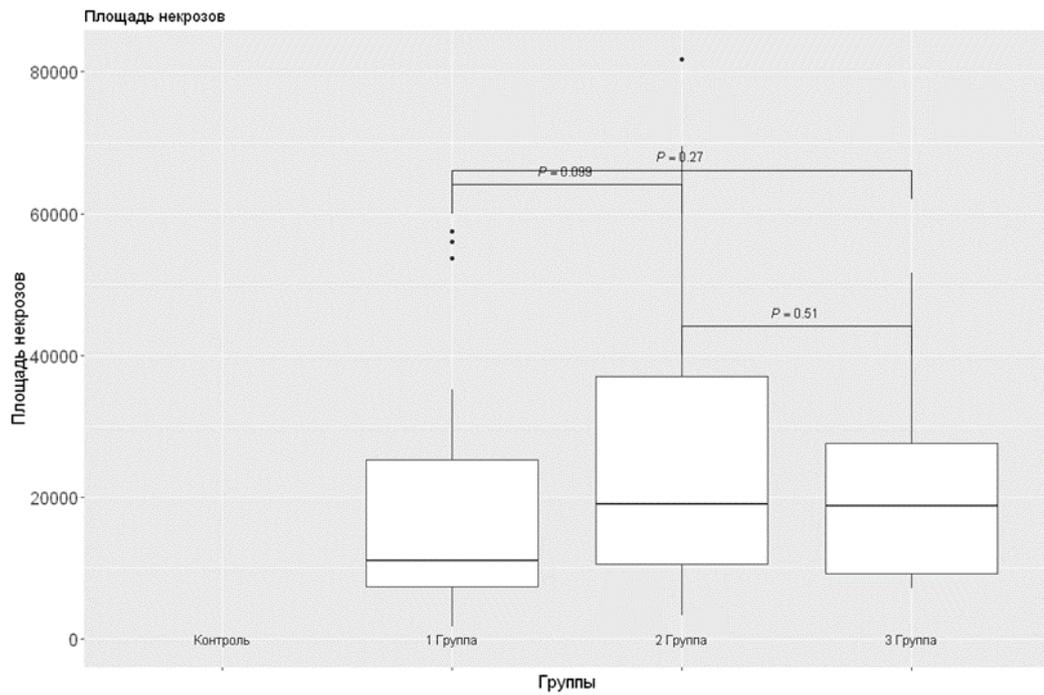


Рисунок 16 – Сравнение площади некрозов между группами

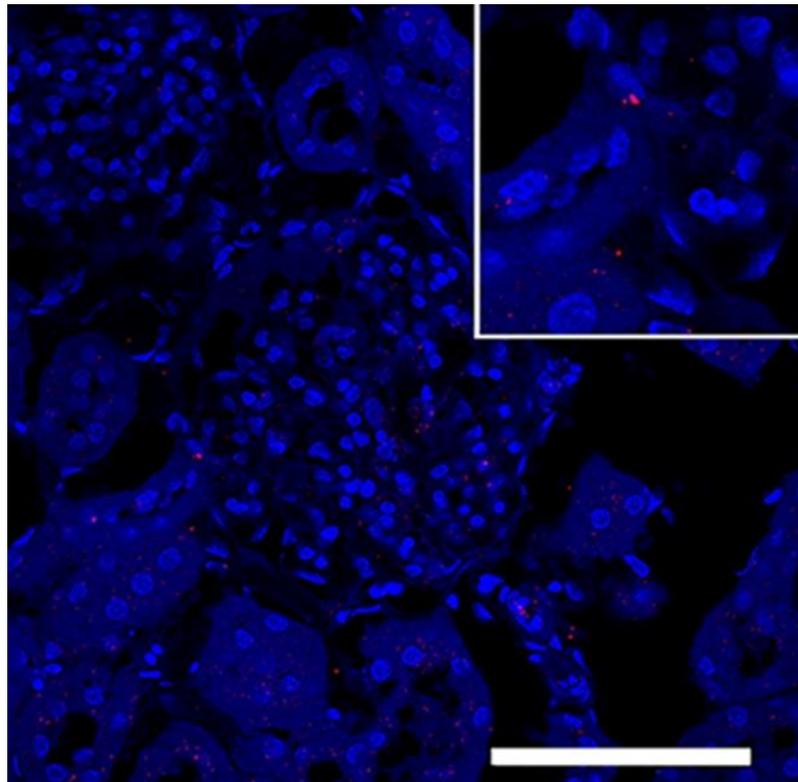


Рисунок 17 – Конфокальная микроскопия почек кролика 3-й группы. Ядра окрашены DAPI (синим). МСК меченые SPION обнаружены с помощью отраженного лазерного сканирования (красный). Масштабный отрезок, 100 мкм

Таким образом, наши наблюдения показали, что 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.

Все это позволяет сделать вывод, что комплексная терапия нефротуберкулеза кроликов, включающая МСК в сочетании со стандартной противотуберкулезной схемой, может считаться достаточно эффективной.

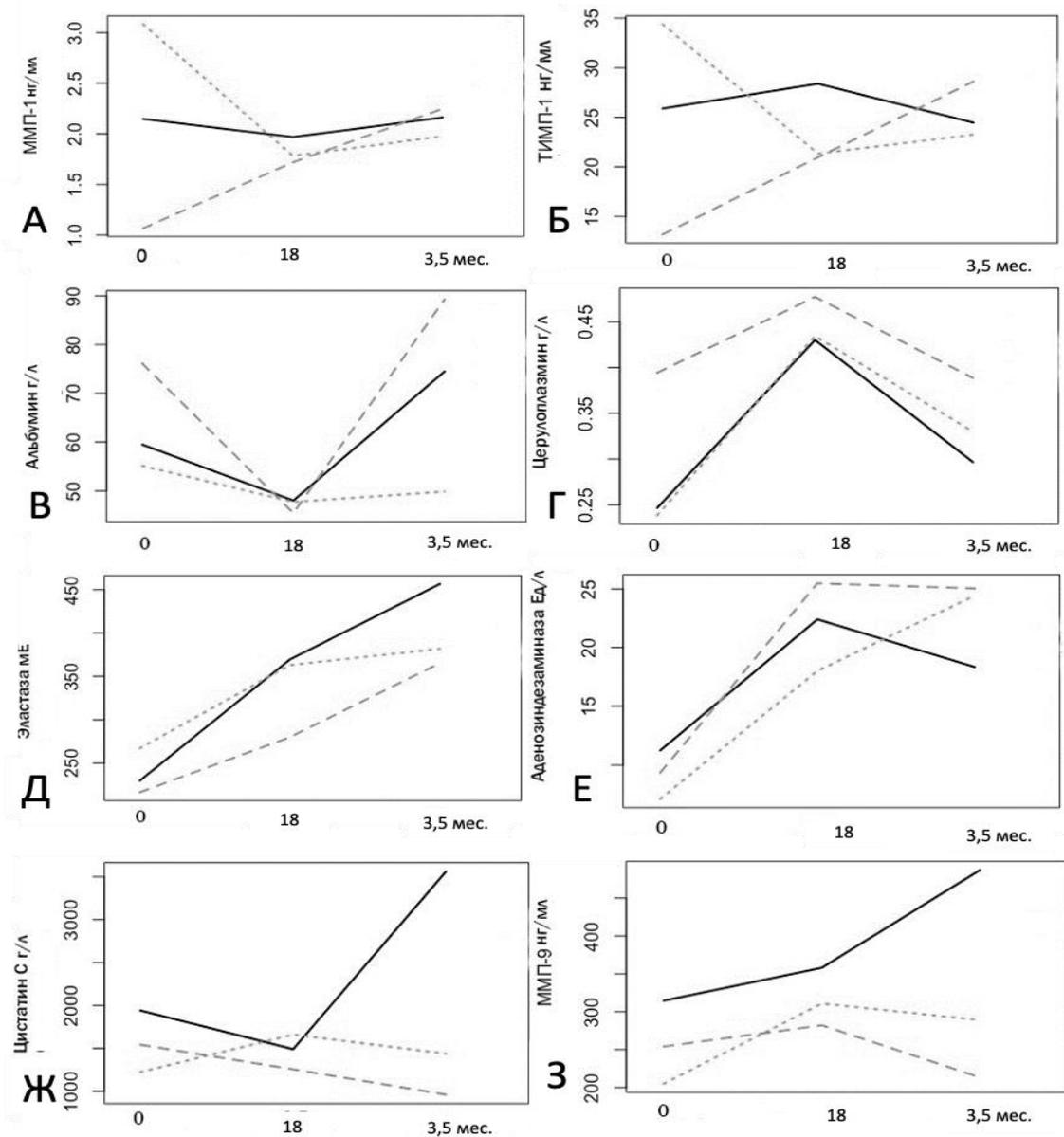
### ***3.3.2 Эффективность мезенхимных стволовых клеток в схеме химиотерапии туберкулеза почки кроликов, зараженных лекарственно устойчивым клиническим штаммом *M. tuberculosis* генотипа Beijing***

Для заражения использовался клинический штамм лекарственно устойчивый клинический штамм *M. tuberculosis* 5582 генотипа *Beijing*. После верификации туберкулезного процесса в почках на кролики были разделены на группы: первая группа (контроль заражения,  $n_2=6$ ) – кролики, зараженные без последующего лечения; вторая группа (контроль лечения,  $n_2=7$ ) – кролики, получающие в течение 18,5 недель лечение только противотуберкулезными препаратами в средних терапевтических дозах в учетом чувствительности штамма МБТ (этамбутол перорально в дозе 20 мг/кг, бедаквилин перорально в дозе 14 мг/кг 10 дней, с 11 дня через день в дозе 7 мг/кг; тиоуреидоиминометилпиридиния перхлорат перорально в дозе 12 мг/кг; линезолид перорально в дозе 10 мг/кг); третья группа (экспериментальная,  $n_2=7$ ) – животным, которой через 14,5 недель на фоне ПТТ однократно вводили в краевую ушную вену суспензию аутологичных мезенхимных стволовых клеток (МСК,  $5 \times 10^7$  в 2 мл). Общий период наблюдения составил 22 недели.

*Результаты биохимического исследования.* Согласно результатам дисперсионного анализа повторных наблюдений, можно выделить несколько вариантов изменений показателей системы ММП/ингибиторы и маркеров воспалительного ответа в ходе развития НТ.

Первый вариант изменений установлен для таких показателей как ММП-1 и ТИМП (рисунок 18 А, Б). Концентрации этих белковых маркеров значимо не различались между группами ( $p=0,46$ ;  $p=0,52$ ) и не менялись в ходе развития процесса ( $p=0,76$ ;  $p=0,89$ ) соответственно. Эффекта взаимодействия фактора группы и фактора времени не наблюдалось ( $0,32$ ;  $0,13$ ).

Второй вариант изменений был установлен для таких маркеров воспалительного ответа как АЛ, АДА, ЦП и ЭЛ. Их уровни значимо не различались между группами ( $p=0,33$ ;  $0,33$ ;  $0,29$ ;  $0,13$  соответственно), но менялись в ходе развития процесса (рисунок 18 В, Г, Д, Е). Уровень АЛ на 18 день исследования значимо понизился во всех трех группах (значимость различий по фактору времени составила  $p=0,003$ ), тогда как различий по фактору группы ( $p=0,26$ ) и эффекту их взаимодействия ( $p=0,12$ ) установлено не было. По окончании эксперимента в 1-й группе его уровень вернулся к исходным значениям, в группе 2 он даже превысил исходный уровень, тогда как в группе с МСК он остался сниженным. В целом группу МСК отличали минимальные колебания концентрации показателя. Уровни АДА ( $p=0,003$ ), ЦП ( $p=0,003$ ) и ЭЛ ( $p=0,003$ ) значимо повышались к 18 дню от начала эксперимента и не снижались во всех группах до его окончания. Эффекта взаимодействия факторов группы и времени для всех трех показателей не наблюдалось ( $p=0,52$ ;  $0,62$ ;  $0,84$ ). Учитывая способность АДА – ключевого фермента пуринового метаболизма – вносить свой вклад в развитие и поддержание иммунной системы, ЭЛ – играть роль в дегенеративных и воспалительных заболеваниях и ЦП – участвовать в острофазовых реакциях, полученные нами результаты можно рассматривать как сохранение неспецифического компонента воспаления к окончанию эксперимента во всех группах. Изменения КР были однонаправленны. Отмечался его рост во всех группах ( $p=0,003$ ).



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

Рисунок 18 – Уровни показателей воспалительной реакции за время с момента инокуляции инфекции в левую почку кролика: исходно (0), через 18 дней и 3,5 месяца

Третий вариант изменений был выявлен при исследовании MMP-9 и ЦС. Концентрации этих белковых маркеров значительно различались между группами и сроками исследования. К 18 дню отмечалась лишь тенденция к повышению концентраций MMP-9 и ЦС во всех группах (рисунок 18 Ж, З). Но к окончанию эксперимента величины показателей повысились ( $p < 0,05$ ) у зараженных

нелеченых кроликов, тогда как в группах с лечением они снизились почти до исходного уровня. Наиболее высокие концентрации протеиназы и ингибитора катепсина отмечались у зараженных нелеченых животных ( $p=0,04$ ). Различий обоих маркеров по фактору времени ( $p=0,19$ ) и эффекта взаимодействия фактора группы и времени установлено не было ( $p=0,18$ ). Во всех трех группах животных отмечался прирост массы тела в ходе эксперимента ( $p=0,003$ ), но его величина в группе 1 была минимальной ( $p=0,02$ ) (таблица 4).

Таблица 4 – Динамика массы тела в исследуемых группах

Показатели	Исходные значения, n=20	Группы					
		1		2		3	
		18 дней, n=6	3,5 месяца, n=6	18 дней, n=7	3,5 месяца, n=7	18 дней, n=7	3,5 месяца, n=7
Масса, г	3585,0 (3315,0; 3755,0)	3920,0* (3641,5; 4151,0)	3771,5* (3736,0; 3807,0)	3920,0* (3641,5; 4151,0)	4585,0*#.& (4108,0; 4806,0)	3920,0* (3641,5; 4151,0)	4310,0*# (4122,0; 4804,0)

Примечание – \* – статистически значимое отличие от исходного уровня;

# – статистически значимая разница по сравнению с 18 днями; & достоверное отличие от первой группы. Сроки указаны от начала эксперимента.

Суммируя результаты биохимической оценки показателей системы ММП/ингибиторы, маркеров функции почек и воспалительной реакции через 18 дней после инокуляции МБТ, можно отметить следующее:

- наблюдалось значимое снижение концентрации АЛ, повышение ЦП, активности ЭЛ и АДА на фоне снижения массы тела животных ( $p=0,03$ ). К этому сроку были получены данные о положительной реакции у всех исследуемых животных на внутрикожное введение Диаскинтеста® (эритема размером  $27,73 \pm 0,54$  мм), что в сочетании с биохимическими показателями свидетельствует о развитии специфического воспалительного процесса

и адекватности данной модели НТ. 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 таких маркеров, как АДА и ЭЛ, тогда как концентрации ЦП и АЛ вернулись к исходным значениям. Одномерный статистический анализ выявил значимые различия между группой контроля заражения (без лечения) и группами с лечением. Они были связаны с уровнями ММП-9 и ЦС, но не КР. Величины ММП-1 и ТИМП-1 не отличались между группами и от референтных значений.

Таким образом, значимых различий между 2 и 3 группой ни по биохимическим маркерам воспалительного ответа, ни по показателям системы ММП/ингибиторы установлено не было, что обосновывает в дальнейшем необходимость поиска интегральной переменной (ДФ), по которой можно было бы охарактеризовать значимые различия между всеми тремя группами. Следует обратить внимание, что в состав ДФ вошли не только показатели системы ММП/ингибиторы, но 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.

*Результаты гистологического исследования.* При макроскопической оценке аутопсийного материала по окончании эксперимента, во всех образцах левых почек 1 группы были выявлены казеозные некротические очаги преимущественно в глубоких слоях мозгового вещества и зоне лоханок, в правых почках казеозные некротические очаги не обнаружены. Во всех образцах правых

и левых почек в группах, получавших лечение, макроскопически казеозно-некротические очаги не выявлены.

При микроскопическом исследовании во всех образцах левых почек у кроликов 1 группы выявлено ярко-выраженное активное специфическое воспаление (30,6 (19,6; 39,7) мм<sup>2</sup>). Специфические изменения в этой группе характеризовались макрофагально-лимфоцитарной инфильтрацией по периферии казеозных масс (рисунок 19, 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 (рисунок 20). В остальных группах (2 и 3) явных морфологических признаков специфического воспаления не выявлено (рисунок 19, Б, В).



А

Б

В

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 19 –Репрезентативные микрофотографии морфологических изменений почки, инфицированной *M. tuberculosis* генотипа Beijing в исследуемых группах

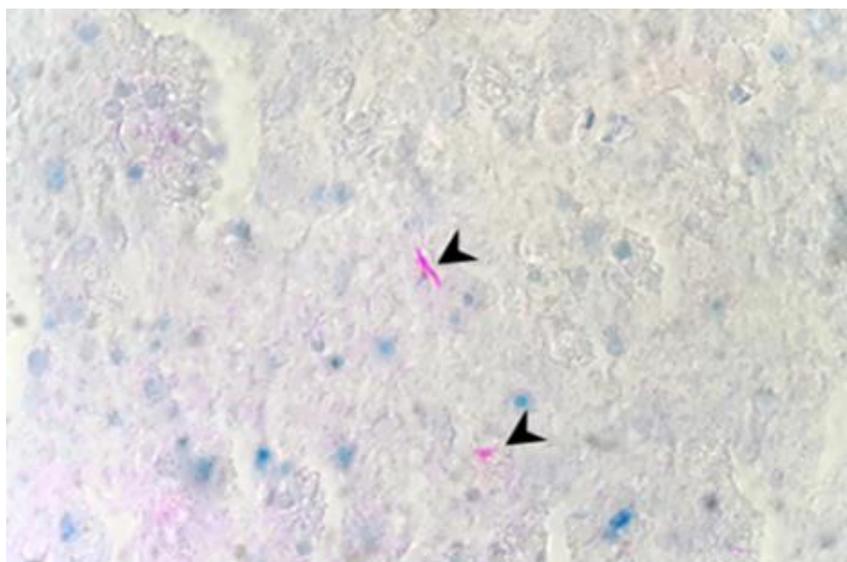
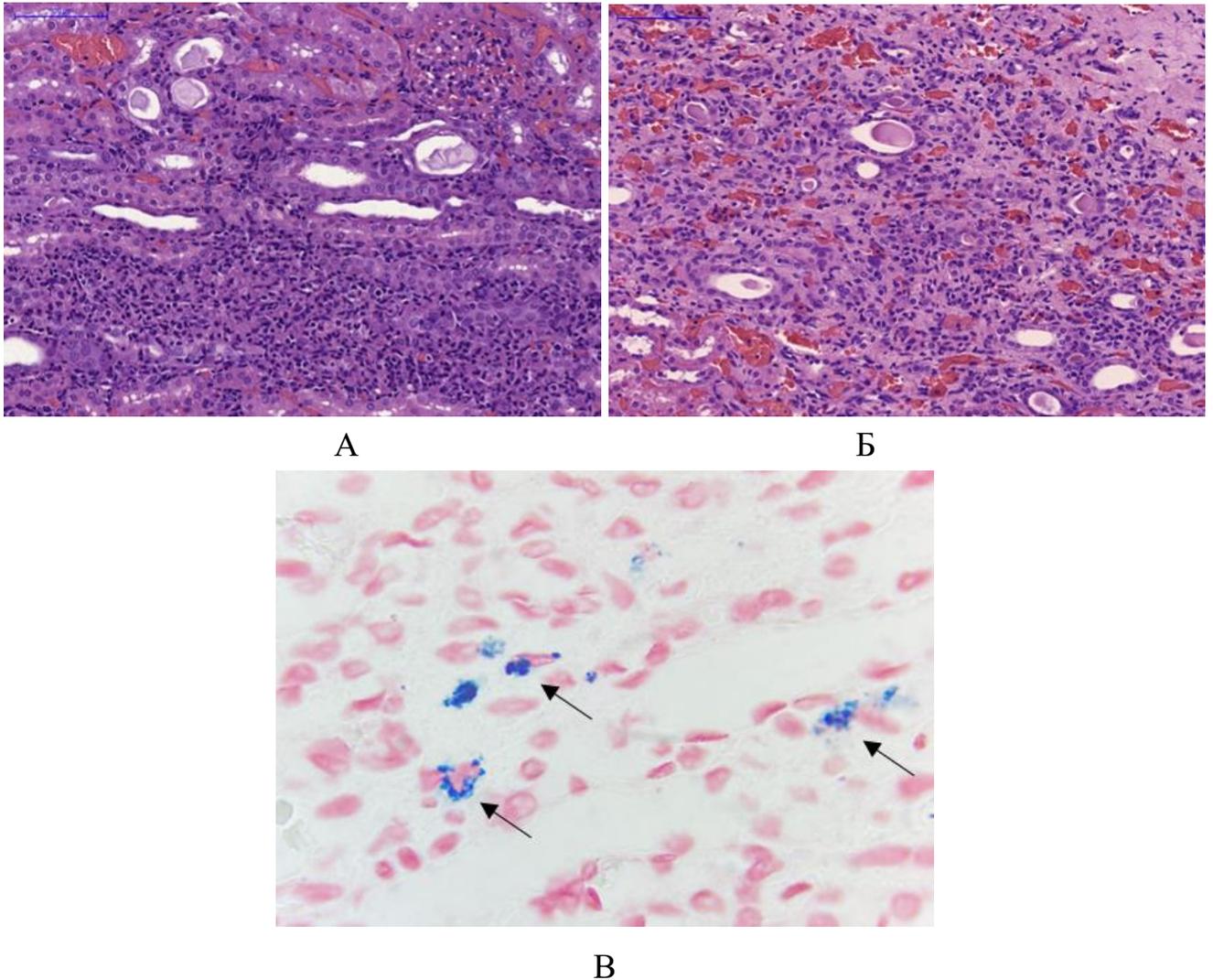


Рисунок 20 – КУМ в очагах некроза в левой почке, инфицированной *M. tuberculosis* генотипа Beijing в группе 1 (обозначены стрелками). Окраска по Цилю-Нельсену. Увеличение  $\times 1000$

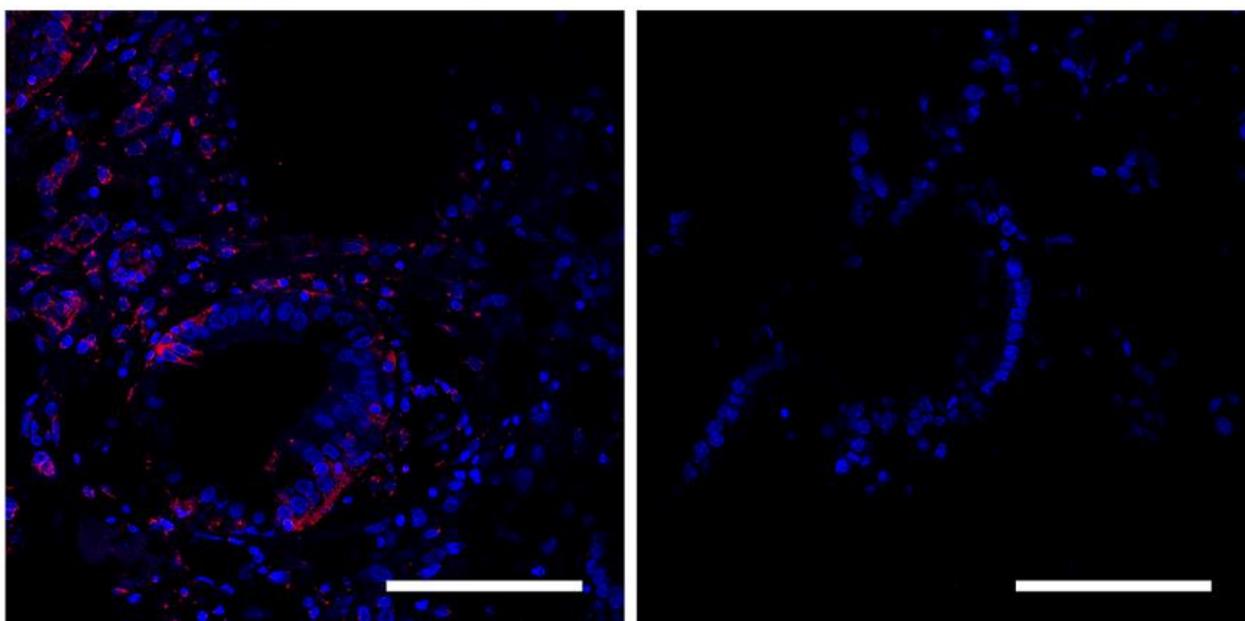
Во второй и третьей группах кроликов в корковом и мозговом веществе преимущественно периваскулярно выявлены участки лимфоцитарной и макрофагальной инфильтрации с ремоделированием стромы, дистрофическими изменениями и атрофией канальцев, белковыми цилиндрами (рисунок 21). При окрашивании по Цилю-Нельсену ни в одной левой почке не обнаружены КУМ и участки специфического воспаления. Перлс-положительные включения были выявлены только у кроликов 3-й группы, получавшей МСК (рисунок 21, В). На основании данных литературы, а также наших собственных, можно предположить, что это МСК, локализованные в ткани пораженной почки.



А – группа 2 – лимфоцитарная и макрофагальная инфильтрация, с атрофией канальцев, белковыми цилиндрами; Б – группа 3 – лимфоцитарная и макрофагальная инфильтрация с атрофией канальцев и ремоделированием стромы; окраска гематоксилином и эозином; В – группа 3 – Перлс-положительные включения (стрелки). А, Б – окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 200$ . В – окраска по Перлсу. Увеличение  $\times 1000$ .

Рисунок 21 – Гистологическое исследование ткани левой почки кроликов, инфицированной *M. tuberculosis* генотипа Beijing

Конфокальная микроскопия криосрезов через 30 дней после внутривенного введения МСК кроликам третьей группы показала инкорпорацию в ткани почки жизнеспособных МСК, меченных SPION (рисунок 22). Об их жизнеспособности свидетельствуют флуоресцентные очаги свечения: синего (ядра, меченые DAPI) и красного (отраженные лазерным сканированием SPIONs).



А

Б

Ядра окрашивали DAPI (синий): А – SPIONs были обнаружены отраженным лазерным сканированием (красный); Б – Контроль (здоровый кролик без введения SPIONs).

Световая микроскопия. Масштабные отрезки, 100 мкм.

Рисунок 22 – Оценка накопления МСК, меченных SPION, в почках кроликов с нефротуберкулезом (третья группа).

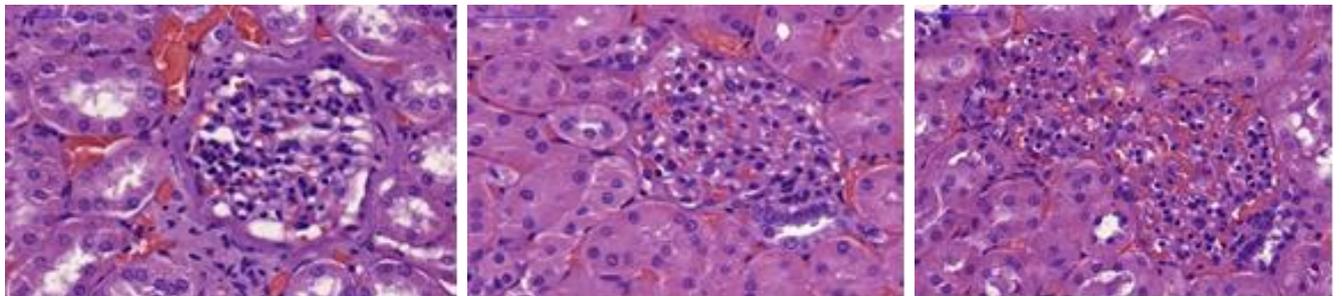
Конфокальная микроскопия криосрезов ткани почки

Таким образом, гистологическое исследование показало наличие специфического воспаления в группе контроля заражения, тогда как лечение в группах 2 и 3 приводило к сохранению только косвенных признаков хронического воспалительного процесса в виде неспецифической интерстициальной лимфоцитарной инфильтрации различной выраженности.

*Морфометрическое исследование.* Сравнение количественных показателей функциональных структур левых почек в исследуемых группах показало более высокие значения ширины коркового вещества ( $p=0,05$ ) и снижение площади коллагена в коре ( $p=0,05$ ) во 2-й группе по сравнению с 1-й группой. Различия между 3 и 2 группами были связаны с меньшей шириной мозгового вещества в группе с применением МСК и сопровождалось более выраженным склерозом стромы ( $p=0,038$ ). Таким образом, максимальный уровень фиброзных изменений

отмечается в группе контроля заражения, что закономерно вследствие сохранения активности специфического процесса.

Большинство количественных показателей морфологии клубочков левых (зараженных) почек животных в изучаемых группах не различались. Значимые различия выявлены по величине диаметра капилляров клубочков и толщине париетального листка капсулы Шумлянско-Боумена между группами 1 и 2 ( $p=0,035$ ) и тенденцией к снижению в группе 3 ( $p=0,06$ ). Толщина капсулы в 1 группе составила 4,08 мкм (3,56; 4,48), во 2 – 2,89 мкм (2,62; 3,76), а в 3 – 3,90 мкм (3,49; 4,84). Отмечалось уменьшение диаметра перитубулярных капилляров в группах 2 и 3 ( $p=0,05$ ) по сравнению с группой 1. Различия между группами 2 и 3 были связаны с более высокими значениями в группе 3 ( $p=0,002$ ) клеточности клубочков (рисунок 23), что определялось наличием лимфоцитарной инфильтрации и увеличением площади коллагена в коре (фибропластические/склеротические интерстициальные изменения). Полученные результаты свидетельствуют о более выраженных гломерулярных изменениях в контрольной группе по сравнению с группами лечения.



А

Б

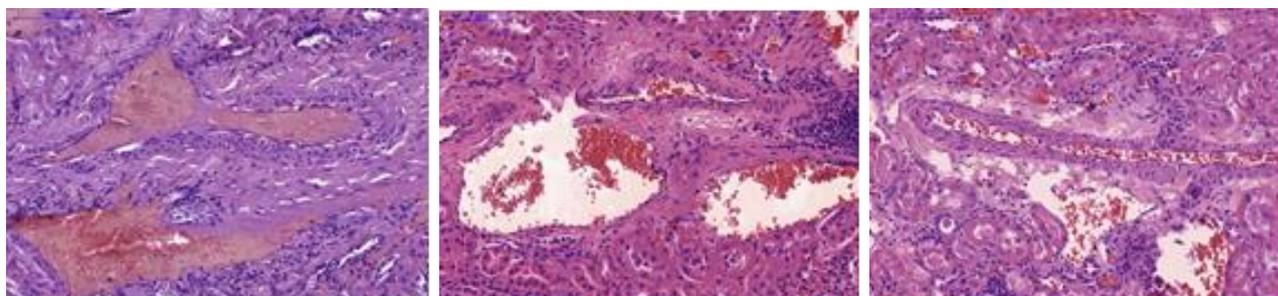
В

А – группа 1; Б– группа 2; В – группа 3. Окраска гематоксилином и эозином; увеличение  $\times 400$ .

Рисунок 23 – Микрофотографии морфологии клубочков

Различий между 3-й и 2-й группами при сравнении количественных показателей изменений эпителиоцитов канальцев, лоханок левых почек и показателей сосудистых изменений левых почек не установлено. 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 (рисунок 24).



А

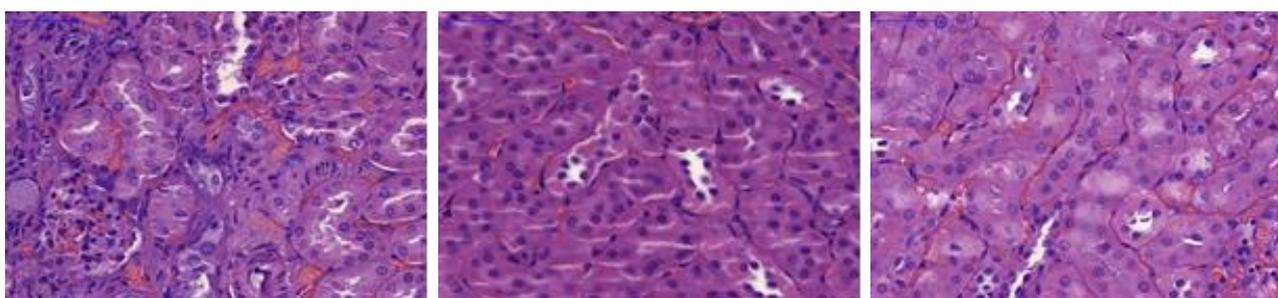
Б

В

А – группа 1; Б– группа 2; В – группа 3. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 200$ .

Рисунок 24 – Микрофотографии толщины срединной оболочки  
междольковых артерий в исследуемых группах

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 был меньше, чем у кроликов 1-й группы (p=0,05) (рисунок 25).



А

Б

В

А – группа 1; Б– группа 2; В – группа 3. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 400$ .

Рисунок 25 – Микрофотографии перитубулярных капилляров  
в почках кроликов исследуемых групп

При сравнительном анализе площади инфильтрации в группах исследования было определено статистически значимое увеличение площади инфильтрации в группе 2 (рисунок 26, А). Однако, при сравнительном анализе площади интерстициального фиброза максимальный уровень отмечается в группе контроля заражения (группа 1), что закономерно вследствие специфического процесса (рисунок 26, Б, рисунок 27). Интерстициальный фиброз выявляется и в группе с МСК, что, возможно, связано с дифференцировкой мезенхимных клеток в фибробласты.

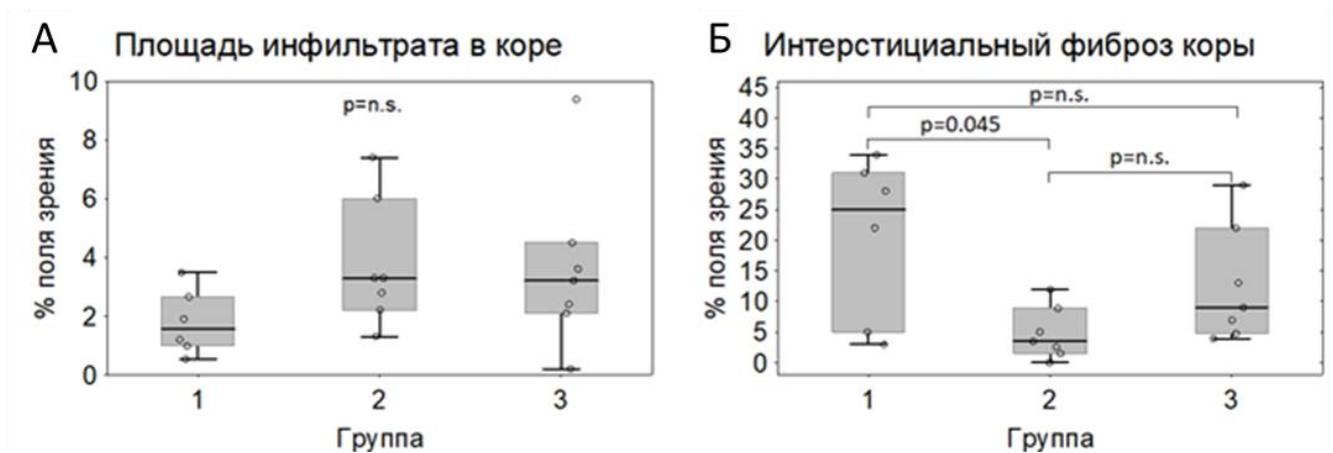
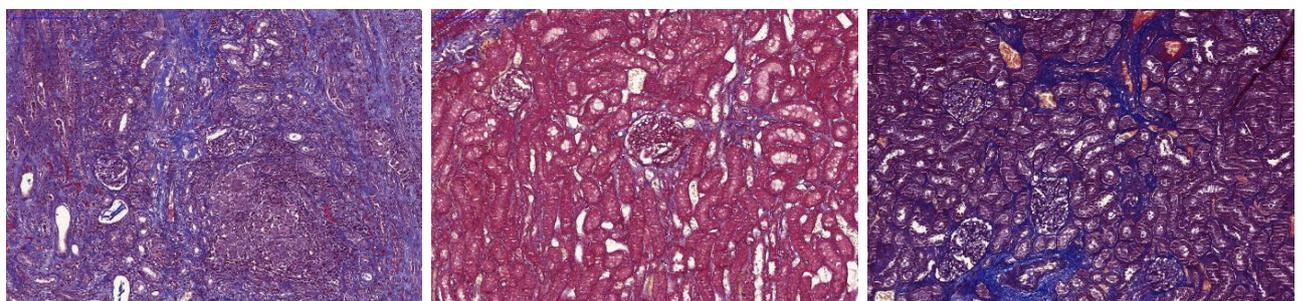


Рисунок 26 – Площадь инфильтрата (А) и количественная морфометрия площади интерстициального фиброза (Б) коркового вещества левых почек (процент площади поля зрения) в экспериментальных группах. n.s. – not significant,  $p > 0,05$



А

Б

В

А – группа 1; Б – группа 2; В – группа 3. Окраска трихром по Массону. Увеличение  $\times 100$ .

Рисунок 27 – Репрезентативные микрофотографии выраженности интерстициального фиброза в корковом веществе почки

При морфологическом исследовании правых почек гистологическая картина во всех трех группах была схожа: специфическое туберкулезное воспаление не выявлено, в коре и мозговом веществе обнаружено интерстициальное воспаление с участками выраженной лимфоцитарной и макрофагальной инфильтрации, встречаются дистрофические изменения канальцев. Необходимо отметить, что в образцах правых почек группы 3, получавшей МСК, при окрашивании по Перлсу обнаружены Перлс-положительные внутриклеточные включения.

Таким образом, воспалительный ответ у кроликов, зараженных штаммом *Mycobacterium tuberculosis* 5582 генотипа Beijing с МЛУ, через 18 дней характеризовался повышением в крови аденозидеаминазы, нейтрофильной эластазы, церулоплазмينا и снижением альбумина, и отсутствием изменений концентраций показателей системы матриксные металлопротеиназы/ингибиторы (ММП-1, -9 и ТИМП-1) и маркеров функции почек (креатинина, цистатина С). Прогрессирование нефротуберкулеза сопровождалось увеличением в крови концентраций аденозидеаминазы, нейтрофильной эластазы и креатинина, ММП-9 и цистатина С, но не ММП-1 и ТИМП-1. Комплекс белковых маркеров крови, таких как ММП-1, -9, ТИМП-1, нейтрофильная эластаза, креатинина и цистатина С, позволяет дифференцировать группы с различной активностью нефротуберкулеза. Терапия ПТТ и с МСК нормализовала уровни ММП-9 и цистатина С, но не аденозидеаминазы и нейтрофильной эластазы.

Гистологическая оценка строения почек продемонстрировала, что однократное системное введение МСК через 1 месяца противотуберкулезной терапии кроликам с нефротуберкулезом привело к полной ликвидации явных признаков специфического поражения в виде гранулем, очагов некроза и инфильтратов, в том числе и КУМ, наблюдались только косвенные признаки хронического воспалительного процесса в виде неспецифической интерстициальной лимфоцитарной инфильтрации различной выраженности.

Следует отметить, что площадь мочевого пространства значительно ниже, а площадь клубочка с капсулой выше в группах лечения: за счет площади почечного тельца в группе контроля лечения и клеточности клубочка только при терапии с применением МСК.

Сопоставление биохимических данных с морфологическими характеристиками структурного строения паренхимы и стромы почек показало их согласованность. По окончании эксперимента только в 1-й группе сохранялись очаги специфического воспаления с КУМ, локализованные преимущественно в мозговом веществе. В некоторых случаях очаги выявлялись в почечных лоханках, полость которых была расширена, также отмечались отчетливо выраженные изменения клубочков. В группах лечения были выявлены только косвенные признаки хронического воспалительного процесса в виде неспецифической интерстициальной лимфоцитарной инфильтрации.

В группах лечения явных признаков специфического поражения в виде гранулем, очагов некроза и инфильтратов не обнаружено. Выявлены только косвенные признаки хронического воспалительного процесса в виде неспецифической интерстициальной лимфоцитарной инфильтрации различной выраженности.

В эти же сроки 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. Не совсем объяснимо наличие более высоких значений клеточности клубочков в 3-й группе по сравнению с 1 и 2 группами ( $p=0,02$ ). Возможно, это связано с лимфоцитарной инфильтрацией.

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

Терапевтическая эффективность МСК-ВВ изучена у 20 кроликов-самцов породы «Советская шиншилла» с моделированным туберкулезом почки, вызванным международным стандартизованным вирулентным тест-штаммом *M. tuberculosis* H37Rv, чувствительным к противотуберкулезным препаратам. После верификации туберкулезного процесса в почках кролики были разделены на несколько групп: первая группа (контроль заражения,  $n_3=6$ ) – кролики, зараженные без последующего лечения; вторая группа (контроль лечения,  $n_3=7$ ); – кролики, получающие лечение только противотуберкулезными препаратами в средних терапевтических дозах третья группа (экспериментальная,  $n_3=7$ ) – животные, получавшие ПТТ в комплексе с МСК-ВВ.

*Оценка биохимических показателей крови.* К 18-му дню после заражения по сравнению с исходными значениями 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 5). Оценка биохимических показателей свидетельствовала о воспалительном процессе со статистически значимым снижением уровня АЛ как одного из реактантов острой фазы. Эти изменения сопровождалось развитием почечной недостаточности со снижением активности ЩФ, отражающим поражение почек (Zhu X., 2022). Кроме того, выявлено повышение активности АДА – фермента пуринового обмена (с 11,8 до 21,2\*\* Ед/л). Эти изменения связаны со снижением внеклеточного уровня аденозина, что снижает скорость клубочковой фильтрации за счет сужения афферентных артериол, особенно в поверхностных нефронах, и тем самым снижает солевую нагрузку и транспортную работу почек в соответствии с концепцией метаболического контроля функции органа (Vallon V., 2006).

Через 3,5 месяца зафиксировано дальнейшее статистически значимое снижение активности ЩФ по сравнению с исходными данными при неизменном уровне КР в первой группе (от 178,0 до 41,0\* Ед/л). Выявлено статистически значимое повышение активности ЭЛ и, наоборот, снижение уровня АЛ (таблица 5). Во второй группе наблюдалось снижение активности ЩФ, уровня ЦП и АЛ, повышение активности ЭЛ. Наблюдаемое увеличение поражения почек (снижение активности ЩФ и уровня КР) сопровождалось уменьшением воспалительного процесса (Zhu X., 2022). Повышение активности ЭЛ – регулятора воспалительной реакции, может быть связано как с его провоспалительной, так и противовоспалительной активностью (Nocheried T., 2003). В третьей группе снижение активности ЩФ и уровней КР и АЛ было в меньшей степени. Концентрация ЦП статистически значимо не изменилась (таблица 5). Кроме того, наблюдался прирост массы тела экспериментальных животных.

Таблица 5 – Биохимические показатели крови кроликов в группах наблюдения

Показатели	Исходные данные	Исследуемые группы, 18 день	Исследуемые группы, 3,5 мес. от начала эксперимента		
			1 группа	2 группа	3 группа
КР, мкмоль/л за г. масса	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**

## Продолжение та блицы 5

Показатели	Исходные данные	Исследуемые группы, 18 день	Исследуемые группы, 3,5 мес. от начала эксперимента		
			1 группа	2 группа	3 группа
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:  $0,05 > p > 0,01^*$ ;  $0,01 > p > 0,001^{**}$ ; сроки указаны от начала эксперимента.

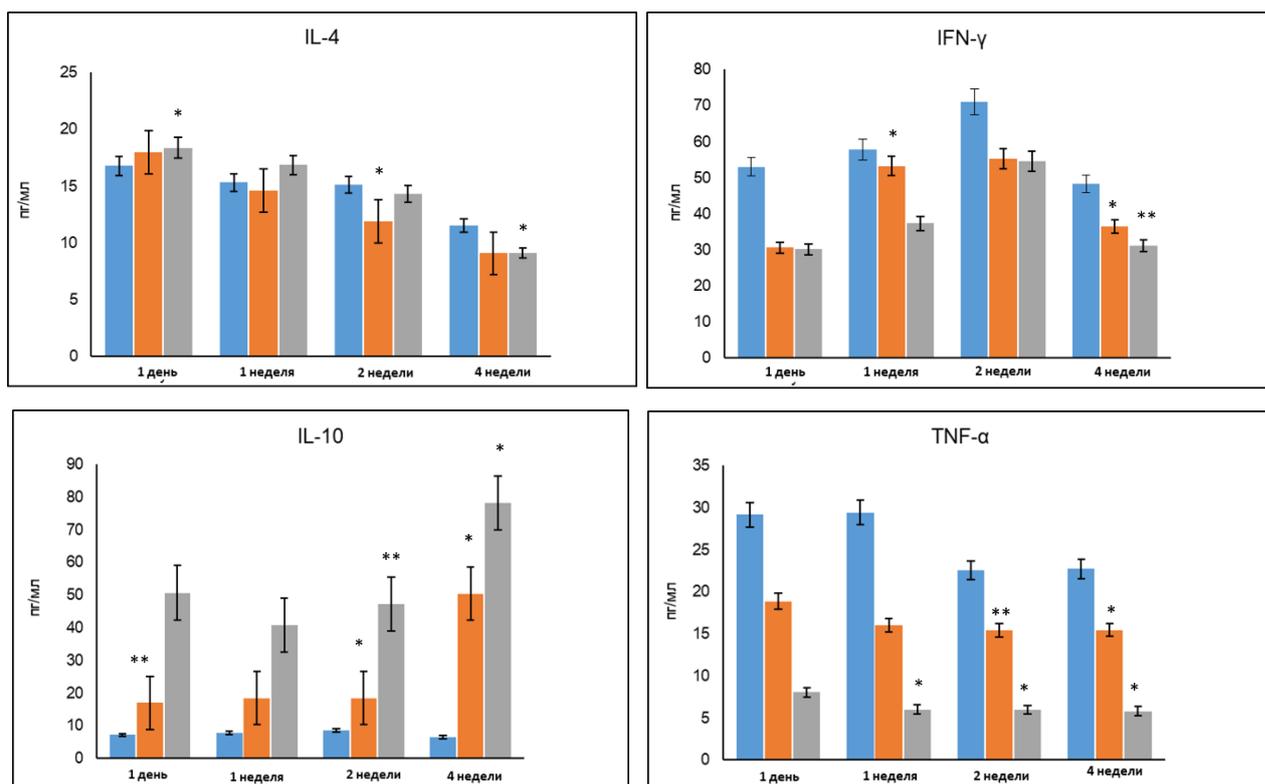
Оценка биохимических показателей после введения МСК-ВВ показывает по-прежнему высокий уровень воспалительного ответа. Снижение уровня АЛ и активности ЩФ по сравнению с исходными данными выявлено для всех групп (таблица 5). Эти изменения согласуются с данными ряда авторов. ЩФ может высвобождаться в растворимой форме и высока в кишечнике и почках, где считается специфическим маркером (Bin A., 2018). Значительное снижение уровня ЩФ было показано на моделях почечного ишемического инсульта (Khundmiri S.J., 1997; Bentala H., 2002) и указывает на повреждение почек (Zhu X., 2022).

*Оценка иммунологических показателей в плазме периферической крови кроликов.* Оценивали уровни противовоспалительных (IL-4 и IL-10) и провоспалительных (INF- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ ) цитокинов. Минимальный уровень противовоспалительных цитокинов (IL -4 и IL -10) на протяжении всего периода наблюдения выявлен для первой группы (от 16,77 до 10,4). На 1-е сутки после введения МСК-ВВ уровень IL-4 был самым высоким в третьей группе (18,36) по сравнению с первой и второй группами (16,77 и 17,86 соответственно). Вероятно, инъекция МСК-ВВ оказала влияние на клетки иммунитета и увеличила выработку IL-4 Т-хелперами 2 (Th2), базофилами и тучными клетками, которые выполняют критические функции в иммунном ответе (Huang F.J., 2016; Junttila I.S., 2018;

Labuz D., 2021). IL-4 в Т-клетках может индуцировать дифференцировку наивных CD4 Т-клеток в клетки Th2, в В-клетках он индуцирует переключение класса иммуноглобулина (Ig) на IgG1 и IgE, а в макрофагах он индуцирует их альтернативную активацию (Junttila I.S., 2018). Однако через 4 недели различий между уровнем IL-4 во второй и третьей группах не было и наблюдалось снижение уровня IL-4 до 14,07 и 14,09 пг/мл соответственно (рисунок 28).

Наши результаты показывают, что самое низкое значение уровня IL-10 в первой группе 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, составив 17,02 и 50,66 пг/мл соответственно. Через 4 недели он еще более значительно увеличился (50,36 и 78,23 пг/мл соответственно) (рисунок 28). Действие IL-10 может оказывать как стимулирующее, так и ингибирующее действие на различные типы иммунных реакций в зависимости от того, какие клетки (хелперные и/или регуляторные Т-клетки) секретируют этот цитокин (Geginat J., 2016).

Максимальный уровень провоспалительного цитокина INF- $\gamma$  выявлен в первой группе (71,1 пг/мл) по сравнению со второй и третьей группами (55,27 и 54,51 пг/мл соответственно) через 2 недели. В первые сутки уровень INF- $\gamma$  для второй и третьей групп (30,66 и 30,12 пг/мл) не имел различий и был ниже по сравнению с первой группой (53,06 пг/мл). Через 4 недели во второй и третьей группах наблюдалось статистически значимое снижение INF- $\gamma$  (36,53 и 31,2 пг/мл соответственно) по сравнению с первой группой (48,26 пг/мл), что может свидетельствовать об эффективности лечения туберкулеза. Во всех группах максимальный уровень провоспалительного цитокина TNF- $\alpha$  выявлен в течение первой недели. Однако его значение было самым высоким для первой группы (71,1 пг/мл) по сравнению со второй и третьей группами (55,27 и 54,51 пг/мл соответственно). Интересно, что через 4 недели наблюдения уровень TNF- $\alpha$  был более чем в 4 раза ниже в третьей группе по сравнению с остальными группами (рисунок 28).



Примечание: ■ – Группа 1; ■ – Группа 2; ■ – Группа 3;

Различия при сравнении опытных группы с контролем заражения:

\* –  $0,05 > p > 0,01$ ; \*\* –  $0,01 > p > 0,001$ .

Рисунок 28 – Содержание цитокинов в плазме крови, кроликов с нефротуберкулезом, через один день, 1, 2 и 4 недели от введения МСК-ВВ

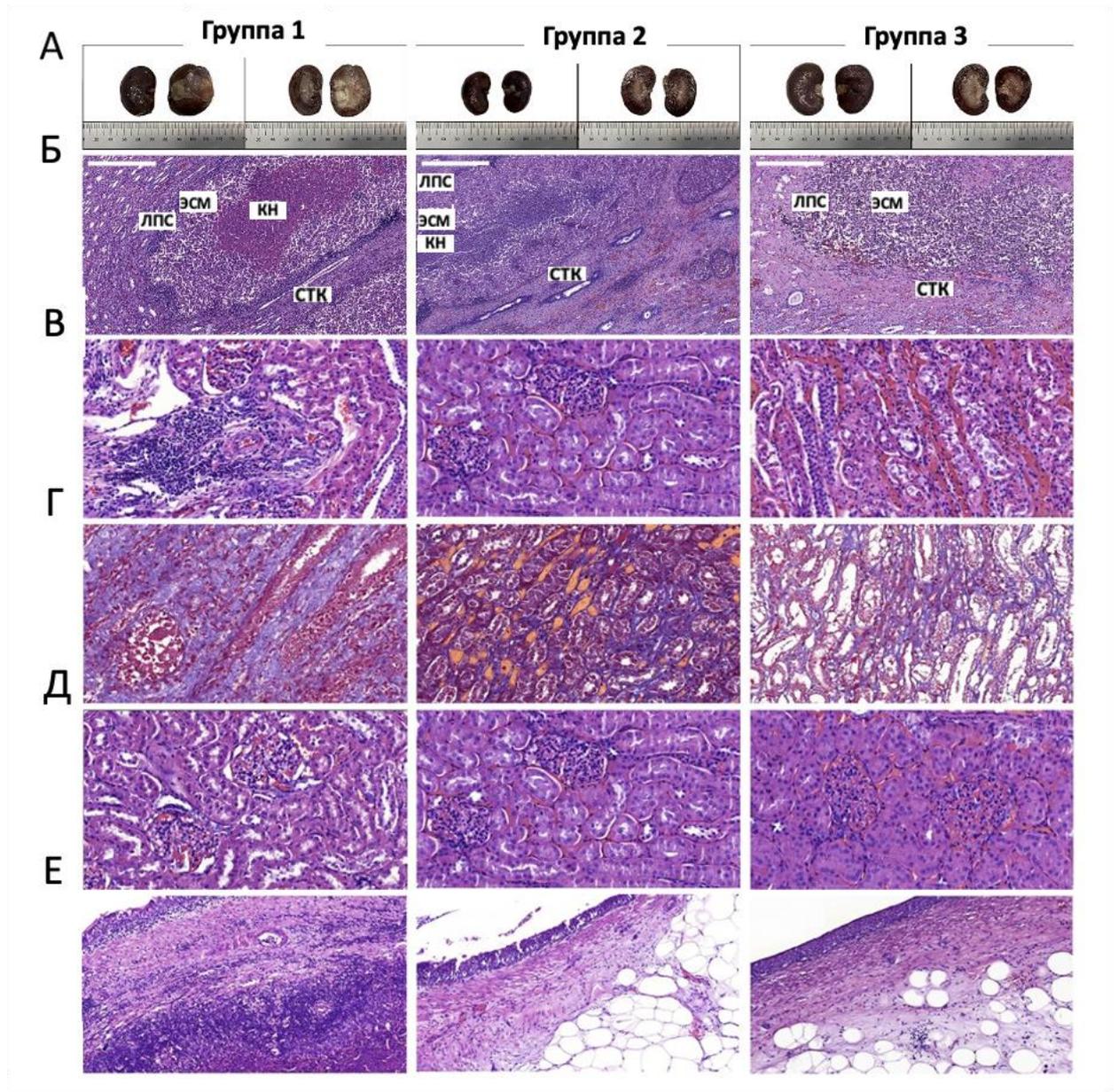
Т-клеточный иммунитет, опосредованный такими цитокинами, как IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , играет ключевую роль в контроле туберкулезной инфекции (Kaufmann S.H., 2001). Максимальный уровень провоспалительных цитокинов (IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ ), выявленный для первой группы, свидетельствует о наличии активной формы туберкулеза. Хотя иммунологические механизмы туберкулеза еще не до конца изучены, некоторые исследования показали, что Т-клетки, продуцирующие IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ , связаны с активным туберкулезом (Kim J.Y., 2018).

Противовоспалительный эффект МСК-ВВ основан на доставке иммуномодулирующих белков к воспалительным иммунным клеткам (дендритным клеткам (ДК), макрофагам M1, клеткам CD4+Th1 и Th17), что обеспечивает их фенотипическую конверсию в толерогенные ДК,

иммуносупрессивные M2 макрофаги, а также толерогенные ДК и T-регуляторные клетки. Кроме того, МСК-ВВ могут активировать аутофагию и/или ингибировать апоптоз, некроз и окислительный стресс в поврежденных клетках, особенно клетках почек, способствуя их выживанию и регенерации. Мы обнаружили, что введение МСК-ВВ, вероятно, может индуцировать продукцию противовоспалительных цитокинов (IL-4 и IL-10) и снижать уровень провоспалительных цитокинов (т.е. IFN- $\gamma$ , TNF - $\alpha$ ).

*Оценка гистологических показателей.* У животных первой контрольной группы (инфицированных и нелеченых) размер левой почки был больше, чем правой. Кортикальный и мозговой слой дифференцированы, лоханка расширена (рисунок 29, А). Участок казеозного некроза (около 40,6 мм<sup>2</sup>) выявлялся преимущественно в мозговом веществе. На границе казеозно-некротических масс сформировалась соединительнотканная капсула (рисунок 29, Б). Активное специфическое воспаление с макрофагально-лимфоцитарной инфильтрацией (рисунок 29, Б) наблюдалось во всех исследуемых группах только в левой, но не в правой почке. Однако КУМ были выявлены только в группе 1. У животных второй и третьей групп не выявлено разницы в размерах левой и правой почки (рисунок 29, А). 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. Следует отметить, что площадь специфического воспаления в третьей группе ( $0,34 \pm 0,04$  мм<sup>2</sup>) была более чем 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 соответственно (рисунок 29, Г, Д и таблица б).



А – макрофотографии почки: орган целиком (левый столбец); поперечное сечение (правый столбец); инфицированная почка (слева), контрольная почка (справа).  
 Б – активное специфическое воспаление почки: казеозный некроз (кн); эпителиоидный слой макрофагов (эсм); лимфоцитно-плазматический слой (лпс); соединительнотканная капсула (стк). В – специфическое и интерстициальное воспаление коры. Г – распределение коллагена в мозговом веществе. Д – клубочки почек. Е – почечная лоханка.  
 Окраска: гематоксилином и эозином (Б, В, Д и Е), по Массону (Г).  
 Масштабный отрезок: 100 мкм (Б), 300 мкм (В-Е).

Рисунок 29 – Гистологический срез почки

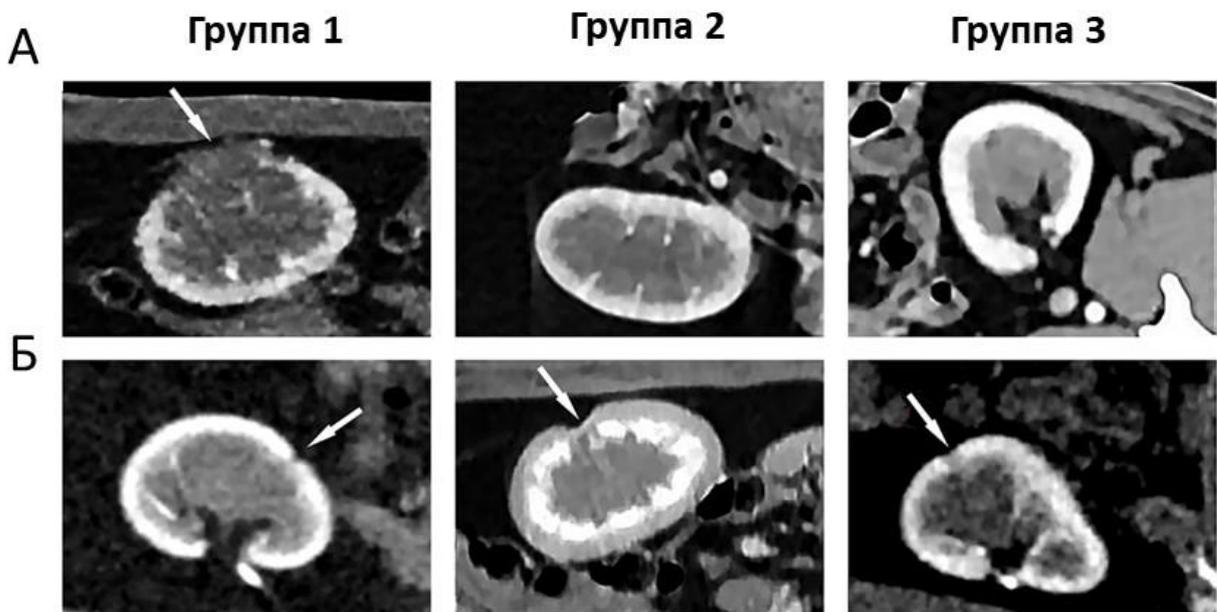
Таблица 6 – Количественные показатели функциональных и структурных изменений почек

Исследуемые показатели	Исследуемые группы			p
	1	2	3	
Площадь специфического воспаления, мм <sup>2</sup>	40,6±3,5	6,5±9,5	0,34±0,04	0,048
Интерстициальное воспаление в корковом веществе, %	7,1±0,51	1,7±1,6	2,0±2,5	0,78
Интерстициальное воспаление в мозговом веществе, %	5,5±1,5	5,7±2,4	5,1±2,8	0,73
Коллаген в корковом веществе, %	6,7±0,76	5,0±4,1	6,4±3,6	0,51
Коллаген в мозговом веществе, %	27,8±2,5	10,1±11,8	19,9±7,6	0,15
Примечание – p – значение значимости для сравнения второй и третьей групп с первой группой.				

По большинству количественных показателей клубочков почек между животными второй и третьей групп достоверных различий не выявлено. Однако некоторые показатели, такие как диаметр капилляров клубочков у животных второй и третьей групп (5,4±1,1 и 5,5±1,3 мкм) по сравнению с первой группой (9,8±0,9 мкм), могут быть признаком застоя в инфицированной почке (рисунок 29, Д). Во второй и третьей группах высота эпителия (54,5±26,8 и 66,5±20,1 мкм) и толщина почечной лоханки (289±198 и 377±168 мкм) также были меньше, чем в первой группе (74,5 и 743,7 мкм) (рисунок 29, Е). Эти показатели свидетельствуют о меньшей степени ремоделирования и инфильтрации стенки почечной лоханки, особенно для третьей группы. Количественные параметры почечной сосудистой сети существенно не изменились как в группе животных, получавших, так и не получавших лечение, за исключением толщины стенки междольковой вены и ее диаметра, который был меньше для первой группы по сравнению с другими группами.

Гистологический анализ не выявил достоверной разницы между второй и третьей группами по эффективности терапии ТБ. У животных этих групп были выявлены признаки специфического туберкулезного воспаления, но существенно меньшей площади по сравнению с первой группой.

КТ почек выполняли через 3 месяца от начала эксперимента с введением контрастного вещества для лучшей визуализации изменений паренхимы. В первой группе наблюдалась инфильтрация почки (рисунок 30, А) с массивной гиповаскулярной зоной в корковом и мозговом слоях и вовлечением прилежащей жировой клетчатки. Также наблюдались ретракция (сморщивание) стенки за счет рубцевания (рисунок 30, Б), истончение коркового слоя и фиброзные поствоспалительные изменения. Однако зон деструкции и инфильтрации в паренхиме, а также зон пониженной перфузии во второй и третьей группах не выявлено (рисунок 30, А). У одного животного из каждой группы наблюдалось незначительное сморщивание почки (рисунок 30, Б).



А – В первой группе имеется массивная гиповаскулярная инфильтрация почки, во второй и третьей группах изменений нет; Б – Сморщивание стенки за счет рубцевания у всех животных первой группы и у одного животного из второй и третьей групп.

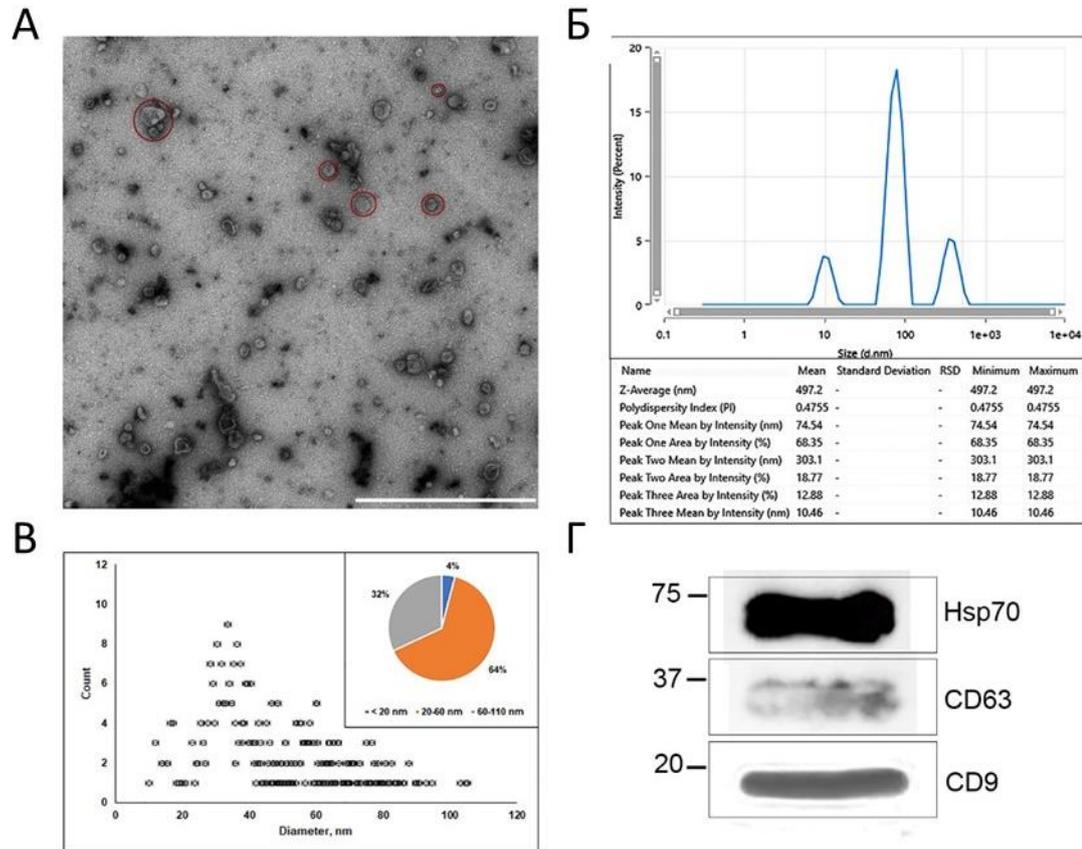
Белые стрелки показывают патологические изменения почек.

Рисунок 30 – Компьютерно-томографический анализ, кортико-медуллярная фаза

Таким образом, сопоставление результатов КТ, данных гистоморфометрических исследований и ИФА подтвердили положительный эффект терапии с применением МСК-ВВ. Преимущество применения ПТТ с МСК-ВВ проявляется прежде всего в уменьшении зон специфического воспаления, что дает возможность сокращать длительность курса противотуберкулезной терапии. Применения МСК-ВВ в сочетании со стандартной терапией сопровождалось достоверным увеличением противовоспалительных цитокинов IL-4, IL-10 ( $p < 0,05$ ). Методами ИФА подтверждено статистически значимое повышение уровня противовоспалительных цитокинов по сравнению с группой стандартной терапии. С этим согласуется наличие в протеоме МСК-ВВ белков (по данным масс-спектрометрического анализа), которые могут модулировать иммунный ответ и уменьшать воспаление тканей, такие как аннексины, аполипопротеины и галектины наряду с белками, проявляющими антимикробные свойства, такие как НВВ2, ЛТФ, лизоцим и цистатин В. Наличие белков МСК-ВВ, обладающих антимикробной, противовоспалительной и иммунорегуляторной функцией, снижало уровень воспалительного ответа и тяжесть поражения почек (подтверждено данными КТ). Таким образом, МСК-ВВ могут стать перспективным компонентом комплексного лечения различных инфекционных заболеваний, в частности нефротуберкулеза.

*Оценка МСК-ВВ.* Выделенные МСК-ВВ были охарактеризованы по морфологии, размеру, специфическим маркерам и составу белков. С помощью ТЭМ мы подтвердили, что МСК-ВВ имеют сферическую морфологию (рисунок 31, А). Анализ наших результатов показал, что диаметр МСК-ВВ достигал  $105 \pm 5$  нм (при этом 70% наблюдаемых везикул имели диаметр до  $60 \pm 3$  нм) (рисунок 31, Б). Полученные данные хорошо согласуются с данными, полученными с помощью Zetasizer Nano. 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) (рисунок 31, В). Вероятно, наличие определенного количества везикул крупных размеров можно объяснить наличием агрегации во время измерения. Вестерн-блот-анализ показал, что МСК-ВВ были положительными в отношении обычных ВВ-специфичных маркеров, включая

Hsp70, CD63, CD9 (рисунок 31, Г). Концентрация общего белка в зондах МСК-ВВ (n=3) составляла 200 мкг/мл.



А – ТЭМ МСК-ВВ. Красные круги обозначают отдельные ВВ и их группы.

Б – Распределение МСК-ВВ по размерам, измеренное с помощью ТЭМ, с обнаружением ВВ от 20 до 110 нм. Процент МСК-ВВ присутствует в диапазонах размеров  $\leq 20$ , 20-60 и 60-110 нм.

В – Гидродинамическое распределение МСК-ВВ по размерам, измеренное с помощью DLS. Процент МСК-ВВ, присутствующих в диапазоне размеров  $10 \pm 0,5$  нм;  $70 \pm 5,1$  нм и  $300 \pm 3,3$  нм.

Г – Вестерн-блот-анализ МСК-ВВ показал обогащение известными маркерами ВВ Hsp70, CD63 и CD9.

Рисунок 31 – Характеристика МСК-ВВ

*Характеристика протеома МСК-ВВ методом масс-спектрометрии.* Чтобы исследовать протеомный профиль изолированных МСК-ВВ, проведен количественный анализ их протеомики. Всего было идентифицировано 473 белка, включая биомаркеры ВВ, такие как белки теплового шока, аннексины и CD63 (рисунок 32).

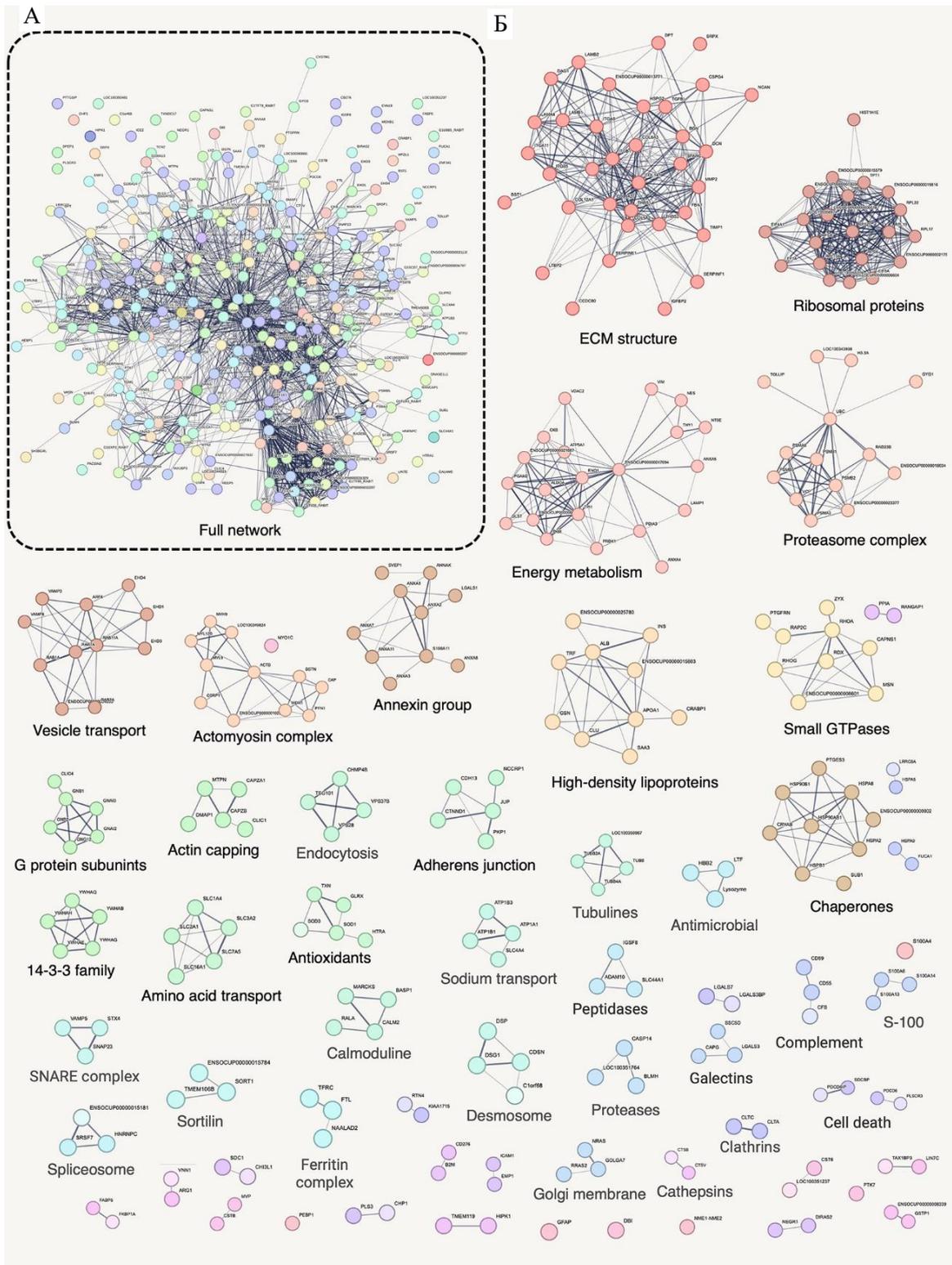


Рисунок 32 – PPI-анализ протеома МСК-ВВ, полная сеть STRING PPI (А) была разделена на кластеры с помощью MCL (Б). Для каждого кластера, содержащего более двух белков, присвоенное имя представляет одну из трех субонтологий (биологический процесс, белковый комплекс или функциональная группа).

Размеры кластеров представлены разными цветами

Кластеризация выявила 32 группы, содержащие более двух белков, среди которых тремя крупнейшими были белки внеклеточного матрикса (БВМ), протеасомный комплекс и группа белков энергетического метаболизма (рисунок 32). Среди протеома МСК-ВВ обнаружены белки, о которых известно, что они связаны с антимикробной и противовоспалительной активностью, а также белки, участвующие в иммунном ответе (рисунок 33). Некоторые из этих белков перечислены в таблице 8.

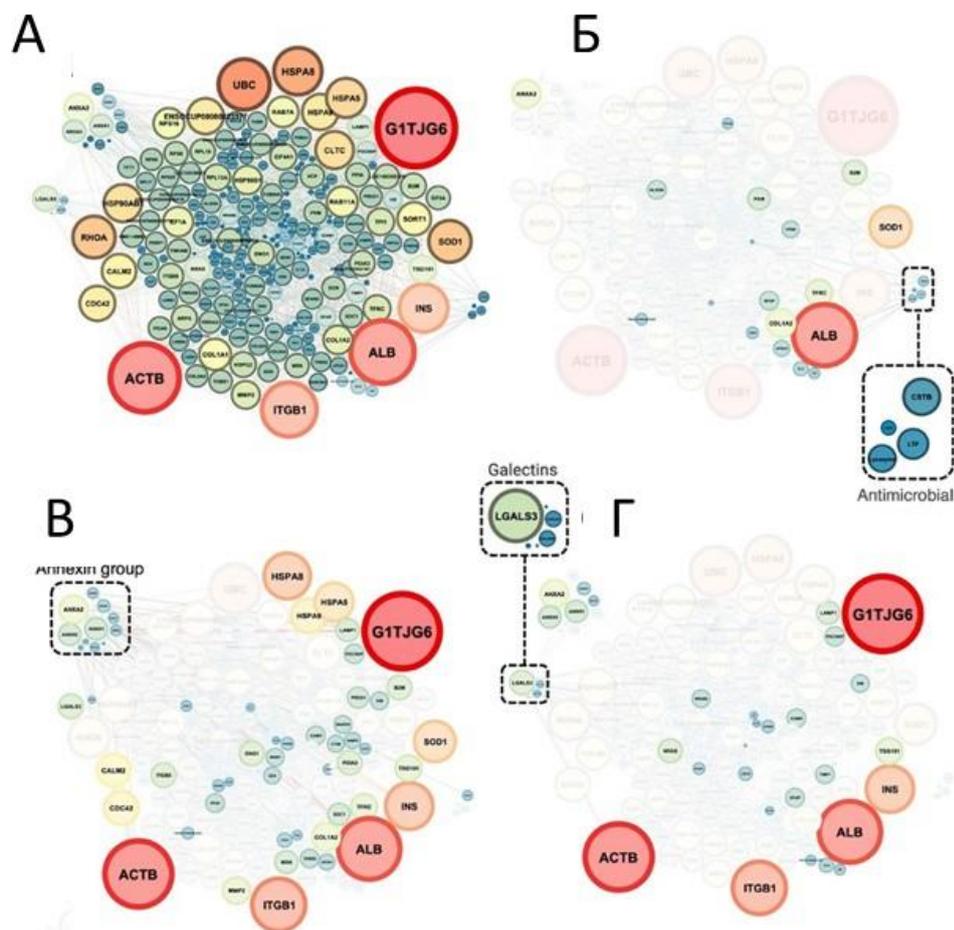


Рисунок 33 – Сеть PPI протеома МСК-ВВ, извлеченная из базы данных STRING, с размерами узлов, масштабированными в соответствии со степенью узла (А). Для идентификации интеракторов кластера из этой сети были выделены некоторые белковые кластеры, при этом отмечены только те белки, которые взаимодействуют с белками кластера согласно базе данных STRING: антимикробные (Б), группа аннексинов (В) и галектины (Г)

Таблица 7 – Список характерных белков ВВ, выявленных с помощью масс-спектрометрического анализа

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

В протеомном профиле МСК-ВВ обнаружены белки, которые связаны с антимикробной (субъединица гемоглобина бета-2 (НВВ2), лактотрансферрин (ЛТФ), лизоцим, цистатин В) и противовоспалительной (такие как галектины и аннексины, цистатин В) активностью (рисунок 33), а также белки, участвующие в иммунном ответе, такой как компонент комплемента C1s. Также идентифицированы факторы роста, в том числе инсулиновый фактор роста (IGF) и трансформирующий фактор роста (TGF), которые могут индуцировать восстановление тканей и уменьшение воспаления.

Другими белками протеома МСК-ВВ являются аполипопротеины (АРО): аполипопротеин Е (АРОЕ) и аполипопротеин А-I (АРОА-I). АРОЕ – это белок, транспортирующий липиды, который действует как ключевой медиатор транспорта липидов и метаболизма холестерина, а также обладает антибактериальным и противовоспалительным действием (Puthia M., 2022).

Следует также отметить, что среди протеома МСК-ВВ идентифицирован кластер малых гуаназинтрифосфатаз (ГТФаз), включающий такие белки, как RhoA и RhoG. Малые ГТФазы семейства Rho являются общими ключевыми регуляторами дифференцировки и функции иммунных клеток, таких как нейтрофилы, макрофаги и обычные дендритные клетки.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лечение больных внелегочными формами туберкулеза остается сложной задачей. Несмотря на то, что нефротуберкулез представляет значительно меньшую эпидемиологическую опасность, чем туберкулез органов дыхания, диагностируется относительно поздно, когда у пациентов уже развиваются необратимые изменения, одним из которых является почечная недостаточность. Патоморфологические процессы в почках при инфекции в 54,5-84,7% случаев свидетельствуют о необратимом повреждении паренхимы в сочетании с формированием стриктур мочеточников и последующим гидронефрозом, который лечится преимущественно реконструктивно-пластическими хирургическими методами (Merchant S., 2013; Kim E.J., 2018).

Фиброзные процессы, характерные для длительного течения специфического воспаления и его хронизации, частично способствуют уретерогидронефротической трансформации почки, образованию гранулем и их обызвествлению. Они неизбежны, с одной стороны, из-за поздней диагностики нефротуберкулеза, о чем говорилось выше, а с другой стороны, из-за нефротоксического действия противотуберкулезных препаратов (Danjuma L., 2018).

Активный рост фундаментальных исследований стволовых клеток дал толчок развитию трансляционной медицины, которая основана на современных результатах исследований и продвигает новые методы лечения различных заболеваний. Одним из таких направлений является клеточная терапия, которая основана на использовании клеток и клеточного секрета, способных стимулировать регенерацию тканей, оказывать противовоспалительное, иммуномодулирующее и другие терапевтические воздействия на организм (Zakrzewski W., 2019; Miceli V., 2021). Бесспорно оправдана осторожность, которую проявляют в связи с этим теоретики и клиницисты: само собой разумеется, что перед внедрением в процесс клеточной терапии необходимо

создать стандарты, позволяющие значительно снизить риск ее применения в клинике.

Использование МСК и их производных в форме внеклеточных везикул признано перспективным методом лечения в урологии (Grange C., 2019). Положительные результаты получены в доклинических исследованиях острой и хронической почечной недостаточности, ранней диабетической нефропатии и реконструкции мочевого пузыря (Zhe Z., 2016; Perico L., 2017; Orlova N.V., 2019; Xiang E., 2020; Zhang C., 2020).

При нефротуберкулезе, приводящем к выраженным фиброзным изменениям мочевыводящих путей, вплоть до гидронефротической трансформации почек, трансплантация МСК потенциально может оказывать существенное влияние на воспалительную реакцию и скорость репарации. Первые наши исследования по оценке эффективности МСК в активации репаративных процессов на модели туберкулеза мочевого пузыря и женских половых органов показали положительные результаты (Gusejnova F.M., 2017; Yudintceva N.M., 2016; 2018; 2020).

Целью настоящей работы явилось экспериментальное обоснование возможности применения мезенхимных стволовых клеток и внеклеточных везикул в комплексном лечении экспериментального туберкулеза почки. Для реализации поставленной цели использованы лабораторные, инструментальные, научные аналитические и статистические методы исследования. По дизайну исследование является экспериментальным, проспективным, биомедицинским и базируется на изучении результатов, в том числе хирургического вмешательства, на 80 лабораторных животных.

Исследование включило создание способа моделирования туберкулезного поражения почки кролика, изучение биораспределения МСК, оценку эффективности комплексного лечения смоделированного туберкулезного поражения почки с применением МСК и МСК-ВВ.

Моделирование туберкулезного поражения почки выполнено на 11 кроликах-самцах породы «Советская шиншилла». Инокуляция

международного стандартизованного вирулентного тест-штамма *M. tuberculosis* H37Rv, чувствительный к противотуберкулезным препаратам осуществлялась путем тонкоигольной пункции коркового слоя почечной паренхимы нижнего полюса левой почки под контролем УЗИ. Период наблюдения составил 4 месяца.

Оценка биораспределения МСК осуществлялась в организме 9 экспериментальных животных, зараженных международным стандартизованным штаммом *M.tuberculosis H37Rv*. Эвтаназия животных из эксперимента проводилась через 2, 3 и 7 дней от введения МСК в ушную вену.

Для оценки эффективности применения МСК и МСК-ВВ в комплексном лечении туберкулеза почек проведено три серии экспериментов:

- первая серия выполнена на 20 животных, которым моделирование нефротуберкулеза осуществлялось при инокуляции лекарственно чувствительного штамма *M.tuberculosis*H37Rv, а комплексное лечение включало применение ПТТ в соответствии с чувствительностью штамма МБТ в сочетании с однократным системным введением МСК;
- вторая серия – на 20 животных, моделирование нефротуберкулеза осуществлялось при помощи клинического лекарственно устойчивого штамма *M. tuberculosis* № 5582 генотипа Beijing, а комплексное лечение включало применение ПТТ в сочетании с однократным системным введением МСК;
- третья серия выполнена на 20 кроликах с нефротуберкулезом, вызванным *M.tuberculosis* H37Rv, получавших противотуберкулезную терапию, дополненную однократным системным введением внутриклеточных везикул, выделенных из МСК.

В каждой серии экспериментов зараженные животные разделены на три группы в зависимости от используемого схемы лечения:

- в группу № 1 каждой серии вошли по 6 инфицированных кроликов соответственно, которые не получали лечения (контроль заражения);
- группу № 2 составили 7 кроликов соответственно, которые получали лечение только противотуберкулезными препаратами;

– в группу № 3 вошли также по 7 кроликов соответственно, которые получали лечения противотуберкулезными препаратами в сочетании с МСК (1-ая и 2-ая серии) или МСК-ВВ (3-я серия)

Период наблюдения составил 4 месяца.

Мезенхимные стволовые клетки и их производные (внеклеточные везикулы) получали из пунктата костного мозга подвздошной кости методом аспирации и вводили кроликам 3-их групп однократно, через 1 месяц от начала противотуберкулезной терапии.

Результаты моделирования туберкулеза почек показали, что при введении суспензии *M.tuberculosis* H37Rv ( $10^6$  микробных клеток в 0,2 мл физиологического раствора, под УЗИ-контролем в корковый слой паренхимы нижнего полюса левой почки у кроликов развивается нефротуберкулез. Развитие специфического процесса подтверждено:

- иммунологическими методами – через 18 день после инокуляции МБТ в ответ на введение АТР у инфицированных кроликов регистрировали появление эритемы размером  $15,3 \pm 2,8$  мм;
- инструментальными методами – по результатам КТ брюшной полости и забрюшинного пространства с применением контрастного вещества, через 30 дней после заражения в левой (инфицированной) почке выявлена зона снижения перфузии и очаг деструкции;
- микробиологическими методами – в посевах мочи через 30 дней после заражения выявили умеренный рост культуры МБТ ( $76,6 \pm 0,06$  КОЕ);
- биохимическими методами: при инфицировании штаммом *M.tuberculosis* H37 Rv выраженные изменения биохимических показателей отмечались через 3,5 месяца от начала эксперимента – у зараженных кроликов наблюдалось достоверное увеличение уровня КР по сравнению с исходным уровнем ( $p=0,019$ ), а также общей АДА, за счет АДА-1, увеличение ТИМП-1 и ЭЛ, что свидетельствует в пользу преобладания процессов протеолиза на фоне

специфического воспаления и снижения функции почек на данном сроке наблюдения;

- гистологическими методами – при макроскопической оценке вблизи капсул левых почек визуализировались полости, заполненные казеозными массами; при исследовании микропрепаратов во всех образцах левых почек подтверждено наличие специфического воспаления с образованием полостей с некротическими массами, окруженных псевдоэозинофильными лейкоцитами, макрофагами и клетками Лангханса, при окраске по Цилю-Нельсену обнаружены КУМ; при гистологической оценке правых (интактных) почек очагов специфического воспаления и КУМ обнаружено не было.

Оценка биораспределения МСК, меченых SPION, осуществлялась путем использования конфокальной микроскопии и дополнительно подтверждалась гистологически (окрашивание по Перлсу). Выявлено, что в организме животных с моделированным нефротуберкулезом МСК накапливались преимущественно в тканях зараженных почек и в меньшей степени легких, печени и селезенке на всех сроках наблюдения. Дополнительное окрашивание микропрепаратов почек животных с экспериментальным нефротуберкулезом подтвердило наличие МСК как в зараженных (левых), так и в интактных (правых) почках.

Использование SPION в качестве метки для МСК оказалось высокоэффективными позволило доказать присутствие клеток в гистологических срезах с помощью специальных методов окрашивания для выявления солей оксида железа – конфокальной микроскопии и окрашивании по Перлсу.

В результате оценки эффективности комплексной терапии нефротуберкулеза с применением МСК и МСК-ВВ получены следующие результаты.

В первой серии эксперимента при однократном введении кроликам суспензии *M. tuberculosis* H37Rv в корковый слой нижнего полюса левой почки закономерно развивается нефротуберкулез, что подтверждается данными компьютерной томографии, гистологического исследования, а также результатами Диаскинтеста.

Биохимическое исследование дало основание убедиться в том, что острый воспалительный процесс с типичным снижением уровня альбумина и нарастанием уровня ЦП как одного из реактантов острой фазы воспаления сопровождался развитием почечной недостаточности с увеличением концентрации креатинина в плазме крови. Это сочеталось с характерными нарушениями пуринового обмена в виде увеличения общей активности АДА и экто-АДА-1, дисбалансом в системе протеиназ и их ингибиторов (соотв. снижением уровня ТИМП-1) и ростом активности ЭЛ. Снижение уровня альбумина в сочетании с ростом ТИМП-1 и активности ЭЛ наряду с наличием прямой корреляции между значениями активности ММП, а точнее говоря между уровнями ММП-1 и ММП-3, свидетельствуют об активизации процессов протеолиза.

Аденозин – это важная регуляторная молекула; концентрация которой быстро увеличивается при воспалении. Уровень аденозина зависит от активности изофермента АДА-1, в частности, высокоаффинного А1. Аденозин снижает скорость клубочковой фильтрации путем сужения афферентных артериол, особенно в поверхностных нефронах, что согласуется с концепцией метаболического контроля функции органа.

В таком аспекте раскрывается смысл и важнейших результатов морфометрии, в частности, увеличение площади, занимаемой капиллярами в клубочках. В самом деле, снижение скорости клубочковой фильтрации под влиянием аденозина как бы компенсируется за счет увеличения общей площади фильтрующей поверхности капилляров. В связи с этим в клубочках накапливается избыточное по сравнению с нормой количество фильтрата, что в свою очередь приводит к растяжению капсулярного пространства и расширению площади внутренней поверхности капсулы Шумлянско-Боумана.

Очевидно, избыточное накопление фильтрата в капсулярном пространстве также требует компенсации. Она осуществляется, по-видимому, за счет увеличения реабсорбции в извитых канальцах. Согласно нашим морфометрическим оценкам, вполне достоверным в статистическом плане,

у кроликов увеличивалась высота эпителиальных клеток извитых канальцев, и это можно рассматривать в качестве компенсаторной реакции на относительную задержку мочи в верхних отделах нефрона. Аналогичным образом мы рассматриваем морфометрические данные, касающиеся собирательных трубочек.

Таким образом, наши наблюдения показали, что у всех кроликов, независимо от их групповой принадлежности, на всем протяжении эксперимента сохранялась высокая активность воспалительного ответа. И вместе с тем у кроликов 3-й группы, которым наряду с противотуберкулезными препаратами вводили МСК, она была выражена в минимальной степени. Именно у животных этой группы, по данным гистологического исследования, отмечались начальные проявления репаративной реакции.

Во второй серии эксперимента наше исследование показало, что при введении взвеси клинического штамма *Mycobacterium tuberculosis* 5582 генотипа Beijing с МЛУ в корковый слой нижнего полюса левой почки у всех кроликов закономерно развивается туберкулез почек, что подтверждалось иммунологически и данными КТ. Дополнение МСК комплексной терапии нефротуберкулеза привело к полной инволюции специфического поражения в виде гранулем, очагов некроза и инфильтратов, в том числе и КУМ, наблюдались только косвенные признаки хронического воспалительного процесса в виде неспецифической интерстициальной лимфоцитарной инфильтрации различной выраженности, а также нормализовала уровни ММП-9 и цистатина С, но не аденозиндезаминазы и нейтрофильной эластазы.

Независимо от отсутствия или наличия лечения выявлялись фиброзные процессы, характерные для длительного течения специфического воспаления и его хронизации, которые частично способствуют уретерогидронефротической трансформации почки, образованию гранулем и их обызвествлению. Они неизбежны, с одной стороны, из-за поздней диагностики НФ, о чем говорилось выше, а с другой стороны, обусловлены нефротоксическим действием противотуберкулезных препаратов (Gopaldaswamy R., 2021). Обнаружение

большой площади фиброза в гистологических срезах тканей почки кроликов, получавших МСК, возможно связано с дифференцировкой клеток в фибробласты.

В 3-й серии экспериментов показано, что применение внеклеточных везикул, полученных из мезенхимных стволовых клеток, в сочетании с адекватной противотуберкулезной терапией на модели лекарственно чувствительного нефротуберкулеза, способствовало достоверному увеличению противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10 ( $p < 0,05$ ), снижению активности воспалительного ответа и тяжести поражения почек (подтверждено данными КТ).

Интерлейкин-10 (IL-10) – один из наиболее важных цитокинов с противовоспалительными свойствами, который играет центральную роль в патогенезе ТБ инфекции, ограничивая иммунный ответ на патогены и тем самым предотвращая повреждение организма хозяина (Shaw T.C., 2000; Saraiva M., 2010). IL-10 синтезируется Т-хелперами 2 типа и МФ и стимулирует пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов, подавляет синтез IL-2 и IFN- $\gamma$  Т-хелперными клетками типа I и ингибирует продукцию провоспалительных цитокинов.

Одним из важнейших биохимических показателей поражения почек является АДА. Сохранение высокой активности АДА, вероятно, связано с высвобождением АТФ. В нашем исследовании повышение активности АДА может быть связано с аденозин-ассоциированной активацией рецепторов A2A, A2B. Передача сигнала через рецепторы A2A, A2B снижает инфильтрацию Т-эффекторных клеток и макрофагов M1 и способствует образованию регуляторных Т-клеток и макрофагов M2, что связано со снижением воспаления и меньшим фиброзом почек (Roberts V.S., 2014). Вероятно, однократного применения МСК-ВВ недостаточно для существенного уменьшения воспалительного процесса. Однако имеется положительная тенденция повышения ЩФ в третьей группе по сравнению с другими группами (таблица 6), что может свидетельствовать об улучшении состояния почек.

Данные гистологических методов исследования не показали достоверной разницы между группой, получавшей лечение только ПТТ, и группой,

получавшей ПТТ в комплексе с МСК-ВВ, поскольку у животных этих групп были минимальные признаки специфического туберкулезного воспаления.

Морфометрический анализ выявил существенные различия между второй и третьей группами по таким количественным показателям, как площадь специфического и интерстициального воспаления в мозговом веществе, диаметр капилляров клубочка, высота эпителия и толщина почечной лоханки, что свидетельствует в пользу положительного терапевтического эффекта МСК-ВВ.

Анализ протеома МСК-ВВ выявил некоторые белки с антимикробными свойствами, такие как НВВ2, ЛТФ, лизоцим и цистатин В. Протеом МСК-ВВ содержит некоторые белки, которые могут модулировать иммунный ответ и уменьшать воспаление тканей, такие как аннексины, аполипопротеины и галектины.

Согласно различным экспериментальным моделям, аннексин А-I (ANXA1), является одним из аннексинов, наиболее активно участвующих в противовоспалительных реакциях, подавляет экстравазацию лейкоцитов (особенно нейтрофилов) и регулирует интенсивность воспалительной реакции. Кроме того, была показана связь между ANXA1 и туберкулезом. Мыши ANXA1-/- более восприимчивы к инфекции МБТ, о чем свидетельствует временное увеличение легочной бактериальной нагрузки, а также обострение и дезорганизация гранулематозного воспаления.

АРОЕ обладает антибактериальным и противовоспалительным действием (Puthia M., 2022). АРОА-I также выполняют ту же функцию и играют многофункциональную роль в иммунитете, воспалении, апоптозе, вирусной, бактериальной инфекции и т. д. (Mangaraj M., 2016; Gao P., 2022).

Галектины представляют собой семейство эндогенных гликан связывающих белков, которые выполняют множество функций, включая воспаление, фиброз и защиту хозяина. Галектин-3 обладает противомикробной активностью в отношении бактерий и грибов, а также обладает иммуногенными свойствами (Loimaranta V., 2018). Функции галектина-3 при фиброзе и иммунном ответе также ранее исследованы и указывают на его возможную терапевтическую

эффективность при определенных нозологиях, связанных с преобладанием процессов фиброза в патогенезе инфекционных процессов (Dong R., 2018).

Среди протеома МСК-ВВ был также идентифицирован кластер малых ГТФаз, включающий такие белки, как RhoA и RhoG. Rho-ГТФазы могут усиливать активацию иммунных клеток, миграцию к местам инфекции и воспаления, а также интернализацию патогенов (Bros M., 2019; Dipankar P., 2021). Кроме того, на модели беспозвоночных животных было показано, что RhoA подавляет бактериальную инфекцию посредством интегрино-опосредованного фагоцитоза (Xu J.D., 2018).

Таким образом в трех сериях экспериментов на кроликах изучена эффективность применения МСК и МСК-ВВ в комплексной терапии экспериментального туберкулеза, вызванного штаммами МБТ с различной чувствительностью. Установлено, что 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. Таким образом, МСК и МСК-ВВ могут стать перспективным компонентом комплексного лечения нефротуберкулеза у человека, после проведения необходимых клинических испытаний.

## 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 используемых для заражения микобактериальных клеток, доступностью для воспроизведения, возможностью персонифицированного прижизненного мониторинга патофизиологических изменений у экспериментальных животных, что позволяет использовать ее для разработки различных аспектов профилактики, диагностики и лечения 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 стромальных клеток костного мозга через 14,5 недель 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 стромальных клеток костного мозга, в составе химиотерапии моделированного нефротуберкулеза приводила к значимому повышению уровня противовоспалительных цитокинов IL-4, IL-10, сокращению распространенности туберкулезно-го 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 МСК-ВВ в схемы лечения туберкулеза почек способствует отграничению очага специфического воспаления и его ускоренному замещению рубцовой тканью. Важным этапом дальнейших исследований является накопление и оценка отдаленных результатов применения МСК и МСК-ВВ в экспериментах, моделирующих всевозможные патологические процессы в тканях почки перед внедрением в клиническую практику.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

АДА	– аденозиндезаминаза
АЛ	– альбумин
АРО	– аполипопротеин
АТР	– аллерген туберкулезный рекомбинантный
БВМ	– белки внеклеточного матрикса
ВОЗ	– Всемирная организация здравоохранения
ГТФ	– гуанозинтрифосфат
ДК	– дендритная клетка
ИФА	– иммуноферментный анализ
КОЕ	– колониобразующая единица
КР	– креатинин
КТ	– компьютерная томография
КУМ	– кислотоустойчивые микобактерии
ЛТФ	– лактотрансферрин
МБТ	– микобактерии туберкулеза
МЛУ	– множественная лекарственная устойчивость
ММП	– металлопротеиназа
МРТ	– магнитно-резонансная томография
МС	– масс-спектрометрия
МСК	– мезенхимные стволовые клетки
МСК-ВВ	– внеклеточные везикулы, выделенные из МСК
НВВ2	– бета 2 субъединица гемоглобина
НТ	– нефротуберкулез
ПТТ	– противотуберкулезная терапия
ТБ	– туберкулез
ТИМП	– тканевой ингибитор металлопротеиназ
ТЭМ	– трансмиссионная электронная микроскопия

УЗИ	– ультразвуковое исследование
ХБП	– хроническая болезнь почек
ЦП	– церрулоплазмин
ЧПНС	– чрескожная пункционная нефростомия
ШЛУ	– широкая лекарственная устойчивость
ЭЛ	– эластаза
ВМР	– костный морфогенетический белок
ДАРИ	– 4,6–диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид
IFN	– интерферон
IGF	– инсулиноподобный фактор роста
IL	– интерлейкин
MCL	– Markov Cluster Algorithm
NK	– естественный киллер
PBS	– фосфатно-буферный солевой раствор
PDGF	– фактор роста тромбоцитов
PGE	– простагландин
PPI	– белок-белковые взаимодействия
SPION	– суперпарамагнитная наночастица
TGF	– трансформирующий фактор роста
TNF	– фактора некроза опухоли
VEGF	– фактор роста эндотелия сосудов

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Акименко, М.А. Патогенетические механизмы изменения нефрона при односторонней обструкции верхних мочевыводящих путей в эксперименте: дис. ... канд. мед. наук: 3.3.3 / Акименко Марина Анатольевна. – Ростов-на-Дону, 2023. – 15-26 с.
2. Барканова, О.Н. Диагностика урогенитального туберкулеза в условиях общей лечебной сети / О.Н. Барканова, С.Г. Гагарина, А.А. Калуженина // *Medical sciences*. – 2020. – № 15-1. – С. 10-12.
3. Беллендир, Э.Н. Очагово-казеозные поражения и ангиографические исследования при туберкулезе почек в эксперименте / Э.Н. Беллендир, Г.Д. Наконечный, А.Г. Шапкин // *Проблемы туберкулеза*. – 1973. – № 9. – С. 70-75.
4. Вишневский, Б.И. Компенсаторные мутации как механизм сохранения вирулентности и жизнеспособности лекарственно-устойчивых форм *Mycobacterium tuberculosis* / Б.И. Вишневский // *Молекулярная медицина*. – 2022. – Т. 20, № 2. – С. 19-25. – doi: 10.29296/24999490-2022-02-03.
5. Волков, А.А. Хирургическое лечение обструкции верхних мочевых путей при туберкулезе мочевой системы / А.А. Волков, О.Н. Зубань, Н.В. Будник // *Экспериментальная и клиническая урология*. – 2021. – № 3. – С. 142-149. – doi: 10.29188/2222-8543-2021-14-3-142-149.
6. Горелова, А.А. Заместительная уретропластика тканеинженерными конструкциями в эксперименте / А.А. Горелова, А.Н. Муравьев, Т.И. Виноградова [и др.] // *Урологические ведомости*. – 2020. – Т. 10, № 3. – С. 201-208. – doi: 10.17816/uroved46031.
7. Горелова, А.А. Тканеинженерные технологии в реконструкции уретры / А.А. Горелова, А.Н. Муравьев, Т.И. Виноградова [и др.] // *Медицинский альянс*. – 2018. – № 3. – С. 75-82.

8. ГОСТ 33215-2014. Правила оборудования помещений и организации процедур при работе с лабораторными животными : межгосударственный стандарт : утвержден и введен в действие Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации от 22 декабря 2014 г. № 73-П : введен впервые : дата введения 01.07.2016. – Москва: Стандаринформ, 2016. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200127789> (дата обращения: 14.03.2024).
9. ГОСТ 33216-2014. Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами : межгосударственный стандарт : утвержден и введен в действие Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации от 22 декабря 2014 г. № 73-П : введен впервые : дата введения 01.07.2016. – Москва: Стандаринформ, 2016. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200127506> (дата обращения: 14.03.2024).
10. Гулиев, Б.Г. Лапароскопическая буккальная пластика проксимального отдела мочеочника / Б.Г. Гулиев, Б.К. Комяков, Ж.П. Авазханов // Урология. – 2021. – № 3. – С. 13-19. – doi: 10.18565/urology.2021.3.13-19.
11. Ерохин, В.В. Системная трансплантация аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в лечении больных множественным лекарственно-устойчивым туберкулёзом легких / В.В. Ерохин, И.А. Васильева, А.Г. Коноплянников [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2008. – Т. 85, № 10. – С. 3-6.
12. Зеллвегер, Ж.П. Современные возможности лечения туберкулеза со множественной лекарственной устойчивостью микобактерий / Ж.П. Зеллвегер // Bulletin of the International Scientific Surgical Association. – 2017. – Т. 6, № 4. – С. 5-12.
13. Зубань, О.Н. Оперативное лечение туберкулеза почки с тотальным поражением мочеочника / О.Н. Зубань, С.Н. Скорняков, Л.В. Арканов [и др.] // Урология. – 2014. – № 2. – С. 29-33.
14. Зубань, О.Н. Хирургическое лечение нефротуберкулеза в современных эпидемиологических условиях / О.Н. Зубань, А.Н. Муравьев, А.А. Волков // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 2008. – Т. 167, № 1. – С. 92-95.

15. Козин, Ю.И. Патент № 1443019 СССР. Способ моделирования деструктивного туберкулеза почки : № 4145923: заявл. 11.11.1986: опубл. 07.12.1988 / Козин Ю.И.
16. Комяков, Б.К. Лапароскопическая кишечная пластика мочеточника / Б.К. Комяков, Б.Г. Гулиев // Эндоскопическая хирургия. – 2015. – Т. 21, № 3. – С. 8-12.
17. Котенко, О.Н. Хроническая болезнь почек. Проблемы и решения / О.Н. Котенко // Московская медицина. – 2018. – Т. 1. – С. 21-23.
18. Кузьмичева, Л.В. Влияние оксида азота на апоптоз лимфоцитов / Л.В. Кузьмичева, К.М. Костычева // Современные наукоемкие технологии. – 2010. – № 2. – Р. 132.
19. Кульчавеня, Е.В. Динамика структуры туберкулеза почек за 20 лет / Е.В. Кульчавеня, Д.П. Холтобин // Терапевтический архив. – 2022. – Т. 94, № 11. – С. 1239-1245. – doi: 10.26442/00403660.2022.11.201930.
20. Кульчавеня, Е.В. Избранные вопросы фтизиоурологии : монография / Е.В. Кульчавеня. – Новосибирск: Наука, 2010. – 144 с.
21. Кульчавеня, Е.В. Классификация, клиническая картина и диагностика туберкулеза мочевой системы / Е.В. Кульчавеня, А.А. Баранчукова // Journal of Siberian Medical Sciences. – 2013. – № 5. – С. 24.
22. Кульчавеня, Е.В. Современные тенденции эпидемической ситуации по внеторакальному туберкулёзу / Е.В. Кульчавеня, В.А. Краснов, С.Н. Скорняков [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2013. – Т. 90, № 12. – С. 34-39.
23. Кульчавеня, Е.В. Туберкулез как заболевание, передающееся половым путем: руководство для врачей / Е.В. Кульчавеня. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2023. – 160 с. – URL: <https://doi.org/10.33029/9704-7559-1-KEV-2023-1-160>.
24. Левашев, Ю.Н. Руководство по легочному и внелегочному туберкулезу / Ю.Н. Левашев, Ю.М. Репин. – Санкт-Петербург: ЭЛБИ, 2008. – 90 с.

25. Лызиков, А.Н. Стволовые клетки в регенеративной медицине: достижения и перспективы / А.Н. Лызиков, Б.Б. Осипов, А.Г. Скуратов, А.А. Призенцов // Проблемы здоровья и экологии. – 2015. – № 3. – С. 4-8.
26. Минаков, Н.К. Сочетанное поражение почки туберкулезом и хроническим пиелонефритом и его особенности на Крайнем Севере : автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.40 / Минаков Николай Кондратьевич. – Москва, 1987. – 17 с.
27. Мочакова, К.А. Структура и особенности клинического течения урогенитального туберкулеза в Удмуртской республике за 2017-2020 годы / К.А. Мочакова, А.А. Сидорова, Е.В. Савинцева, Н.Н. Федотова // Инновации. Наука. Образование. – 2021. – № 31. – С. 1640-1648.
28. Муравьев, А.Н. Патент № 2776130 Российская Федерация, МПК G09B23/28. Способ моделирования туберкулеза почки : № 2021120918 : заявл. 14.07.2021 : опубл. 13.07.2022 / Муравьев А.Н., Виноградова Т.И., Догондзе М.З. [и др.].
29. Муравьев, А.Н. Роль суправезикального отведения мочи в комплексном лечении больных туберкулезом почек и мочеточников / А.Н. Муравьев, О.Н. Зубань // Урология. – 2012. – № 6. – С. 16-20.
30. Мухин, Н.А. Снижение скорости клубочковой фильтрации – общепопуляционный маркер неблагоприятного прогноза / Н.А. Мухин // Терапевтический архив. – 2007. – Т. 79, № 6. – С. 6-9.
31. Нерсесян, А.А. Особенности клинического течения, диагностики и лечения мочевого туберкулеза: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.26 / Нерсесян Аветис Агванович – Москва, 2007. – 38 с.
32. Нечаева, О.Б. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в России / О.Б. Нечаева // Туберкулез и болезни легких. – 2018. – Т. 96, № 8. – С. 15-24. – doi: 10.21292/2075-1230-2018-96-8-15-24.
33. Новиков, Б.И. Особенности клинического течения и тактика лечения при туберкулезе мочевых и мужских половых органов / Б.И. Новиков, С.Н. Скорняков, В.Н. Журавлев [и др.] // Уральский медицинский журнал. – 2013. – № 2. – С. 89-93.

34. Орлова, Н.В. Экспериментальная реконструкция мочевого пузыря кролика с использованием аллогенных клеток различного тканевого происхождения / Н.В. Орлова, А.Н. Муравьев, Н.М. Блюм [и др.] // Медицинский альянс. – 2016. – № 1. – Р. 49-51.
35. Парпиева, Н.Н. Значение лучевых методов диагностики характера и распространенности туберкулеза почек в выборе тактики хирургического лечения / Н.Н. Парпиева, М.А. Хакимов, Д.К. Абдурахманов, Ш.М. Халилов // Вестник экстренной медицины. – 2019. – Т. 12, № 5. – С. 47-50.
36. Рогачева, Н.В. Влияние мультипотентных стромальных клеток костного мозга на течение хронического пиелонефрита у крыс / Н.В. Рогачева, Е.Ю. Плотников, В.И. Кирпатовский [и др.] // Главный редактор. – 2011. – Т. 218. – С. 88-95.
37. Российская Федерация. Главный государственный санитарный врач Российской Федерации. Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» : постановление Главного государственного санитарного врача РФ № 4 от 28 января 2021 года (с изменениями на 25 мая 2022 года). – Москва, 2021. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/573660140> (дата обращения: 14.03.2024).
38. Свиридова, М.С. Распространённость ХБП I-III стадий в Белгородской области / М.С. Свиридова, О.А. Ефремова, Л.А. Камышникова // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия «Медицина. Фармация». – 2013. – Т. 21, № 4. – С. 182-186.
39. Смирнов, А.В. Национальные рекомендации. Хроническая болезнь почек: основные принципы скрининга, диагностики, профилактики и подходы к лечению / А.В. Смирнов, Е.М. Шилов, В.А. Добронравов [и др.] // Нефрология. – 2012. – Т. 16, № 1. – С. 89-115.
40. Ткачук, В.Н. Туберкулез мочеполовой системы: Руководство для врачей / В.Н. Ткачук, Р.К. Ягафарова, С.Х. Аль-Шукри. – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2004. – 319 с.

41. Туберкулез у взрослых: клинические рекомендации. – Москва, 2022. – URL:<https://login.consultant.ru/link/?req=doc&base=LAW&n=411386&dst=100079> (дата обращения 30.05.2023).
42. Холтобин, Д.П. Маски урогенитального туберкулеза как причина диагностических ошибок / Д.П. Холтобин, Е.В. Кульчавеня // Урология. – 2017. – № 5. – С. 100-105.
43. Чотчаев, Р.М. Совершенствование диагностики и лечения заболеваний мочеполовой системы и их осложнений у больных туберкулезом: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.01.16, 14.01.23 / Чотчаев Радмир Махтиевич. – Москва, 2019. – 15-16 с.
44. Шаманская, Т.В. Технологии культивирования мезенхимальных стволовых клеток ex vivo для клинического использования / Т.В. Шаманская, Е.Ю. Осипова, С.А. Румянцев // Онкогематология. – 2009. – № 3. – Р. 69-76.
45. Швецов, М.Ю. Хроническая болезнь почек как общемедицинская проблема: современные принципы нефропрофилактики и нефропротективной терапии / М.Ю. Швецов // Consilium medicum. – 2014. – Т. 16, № 7. – С. 51-64.
46. Шутов, А.М. Хроническая болезнь почек – глобальная проблема XXI века / А.М. Шутов // Клиническая медицина. – 2014. – Т. 95, № 5. – С. 5-10.
47. Яблонский, П.К. Значение современных иммунологических тестов в диагностике туберкулеза у детей / П.К. Яблонский, И.Ф. Довгалюк, А.А. Старшинова, О. А. Якунова // Медицинская иммунология. – 2013. – Т. 15, № 1. – С. 37-44.
48. Яблонский, П.К. Российская фтизиатрия сегодня-выбор пути развития / П.К. Яблонский // Медицинский альянс. – 2013. – № 3. – С. 5-24.
49. Ягафарова, Р.К. Физиоэнзимотерапия с применением террилитина в комплексном лечении туберкулеза почек : автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.26; 14.00.40 / Ягафарова Роза Каюмовна. – Ленинград, 1986. – 24 с.
50. Ярыгин, К.Н. Модуляция иммунных реакций мезенхимными стромальными клетками / К.Н. Ярыгин, А.Ю. Лупатов, Г.Т. Сухих // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2016. – № 2. – С. 79-84.

51. Aggarwal, S. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses / S. Aggarwal, M.F. Pittenger // *Blood*. – 2005. – Vol. 105, № 4. – P. 1815-1822. – doi: 10.1182/blood-2004-04-1559.
52. Augello, A. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway / A. Augello, R. Tasso, S.M. Negrini [et al.] // *European journal of immunology*. – 2005. – Vol. 35, № 5. – P. 1482-1490. – doi: 10.1002/eji.200425405.
53. Baveja, C.P. Drug-resistant genital tuberculosis of the penis in a human immunodeficiency virus non-reactive individual / C.P. Baveja, G. Vidyanidhi, M. Jain [et al.] // *Journal of medical microbiology*. – 2007. – Vol. 56, № 5. – P. 694-695. – doi: 10.1099/jmm.0.46960-0.
54. Bello, A.K. Assessment of global kidney health care status / A.K. Bello, A. Levin, M. Tonelli [et al.] // *Jama*. – 2017. – Vol. 317, № 18. – P. 1864-1881. – doi: 10.1001/jama.2017.4046.
55. Bentala, H. Removal of phosphate from lipid A as a strategy to detoxify lipopolysaccharide / H. Bentala, W.R. Verweij, A. Huizinga-Van der Vlag [et al.] // *Shock*. – 2002. – Vol. 18, № 6. – P. 561-566.
56. Bin, A. The ecto-enzymes CD73 and adenosine deaminase modulate 5'-AMP-derived adenosine in myofibroblasts of the rat small intestine / A. Bin, V. Caputi, M. Bistoletti [et al.] // *Purinergic Signalling*. – 2018. – Vol. 14. – P. 409-421. – doi: 10.1007/s11302-018-9623-6.
57. Böcker, W. IKK-2 is required for TNF- $\alpha$ -induced invasion and proliferation of human mesenchymal stem cells / W. Böcker, D. Docheva, W.C. Prall [et al.] // *Journal of Molecular Medicine*. – 2008. – Vol. 86. – P. 1183-1192. – doi: 10.1007/s00109-008-0378-3.
58. Börger, V. Mesenchymal stem/stromal cell-derived extracellular vesicles and their potential as novel immunomodulatory therapeutic agents / V. Börger, M. Bremer, R. Ferrer-Tur [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – Vol. 18, № 7. – P. 1450. – doi: 10.3390/ijms18071450.

59. Bros, M. RhoA as a key regulator of innate and adaptive immunity / M. Bros, K. Haas, L. Moll, S. Grabbe // *Cells*. – 2019. – Vol. 8, № 7. – P. 733. – doi: 10.3390/cells8070733.
60. Bruno, S. Role of extracellular vesicles in stem cell biology / S. Bruno, G. Chiabotto, E. Favaro [et al.] // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. – 2019. – Vol. 317, № 2. – P. 303-313. – doi: 10.1152/ajpcell.00129. 2019.
61. Cagliani, J. Immunomodulation by mesenchymal stromal cells and their clinical applications / J. Cagliani, D. Grande, E.P. Molmenti [et al.] // *Journal of stem cell and regenerative biology*. – 2017. – Vol. 3, № 2. – P. 1-14. – doi: 10.15436/2471-598.17.022.
62. Campagnoli, C. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow / C. Campagnoli, I.A. Roberts, S. Kumar [et al.] // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2001. – Vol. 98, № 8. – P. 2396-2402. – doi: 10.1182/blood.V98.8.2396.
63. Cantaluppi, V. Rationale of mesenchymal stem cell therapy in kidney injury / V. Cantaluppi, L. Biancone, A. Quercia [et al.] // *American Journal of Kidney Diseases*. – 2013. – Vol. 61, № 2. – P. 300-309. – doi: 10.1053/j.ajkd.2012.05.027.
64. Caplan, A.I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine / A.I. Caplan // *Journal of cellular physiology*. – 2007. – Vol. 213, № 2. – P. 341-347. – doi: 10.1002/jcp.21200.
65. Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells / A.I. Caplan // *Journal of orthopedic research*. – 1991. – Vol. 9, № 5. – P. 641-650. – doi: 10.1002/jor.1100090504.
66. Chermnykh, E. Extracellular matrix as a regulator of epidermal stem cell fate / E. Chermnykh, E. Kalabusheva, E. Vorotelyak // *International journal of molecular sciences*. – 2018. – Vol. 19, № 4. – P. 1003. – doi: 10.3390/ijms19041003.
67. Chow, L. Antibacterial activity of human mesenchymal stem cells mediated directly by constitutively secreted factors and indirectly by activation of innate immune effector cells / L. Chow, V. Johnson, R. Impastato [et al.] // *Stem Cells Translational Medicine*. – 2020. – Vol. 9, № 2. – P. 235-249. – doi: 10.1002/sctm.19-0092.

68. Collino, F. AKI recovery induced by mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles carrying microRNAs / F. Collino, S. Bruno, D. Incarnato [et al.] // *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. – 2015. – Vol. 26, № 10. – P. 2349-2360. – doi: 10.1681/ASN.2014070710.
69. Colombo, M. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles / M. Colombo, G. Raposo, C. Thery // *Annual review of cell and developmental biology*. – 2014. – Vol. 30. – P. 255-289. – doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
70. Corcione, A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions / A. Corcione, F. Benvenuto, E. Ferretti [et al.] // *Blood*. – 2006. – Vol.107, № 1. – P. 367-372. – doi: 10.1182/blood-2005-07-2657.
71. Crivelli, B. Mesenchymal stem/stromal cell extracellular vesicles: From active principle to next generation drug delivery system / B. Crivelli, T. Chlapanidas, S. Perteghella [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2017. – Vol. 262. – P. 104-117. – doi: 10.1016/j.jconrel.2017.07.023.
72. Danjuma, L. Modulatory and regenerative potential of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells on rifampicin-induced kidney toxicity / L. Danjuma, P.L. Mok, A. Higuchi [et al.] // *Regenerative therapy*. – 2018. – Vol. 9. – P. 100-110. – doi: 10.1016/j.reth.2018.09.001.
73. Das, B. CD271+ bone marrow mesenchymal stem cells may provide a niche for dormant *Mycobacterium tuberculosis* / B. Das, S.S. Kashino, I. Pulu [et al.] // *Science translational medicine*. – 2013. – Vol. 5, № 170. – P. 17013. – doi: 10.1126/scitranslmed.3004912.
74. Degirmenci, B. GLI1-expressing mesenchymal cells form the essential Wnt-secreting niche for colon stem cells / B. Degirmenci, T. Valenta, S. Dimitrieva [et al.] // *Nature*. – 2018. – Vol. 558, № 7710. – P. 449-453. – doi: 10.1038/s41586-018-0190-3.
75. Della Bella, E. The Epigenetics in Osteogenic and Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells / E. Della Bella, S. Pagani, F. Martini, M. De Mattei //

- Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2021. – Vol. 9. – P. 784-791. – doi: 10.3389/fcell.2021.784791.
76. Desai, U. Extrapulmonary drug-resistant tuberculosis at a drug-resistant tuberculosis center, Mumbai: Our experience – Hope in the midst of despair / U. Desai, J.M. Joshi // Lung India: Official Organ of Indian Chest Society. – 2019. – Vol. 36, № 1. – P. 3-7. – doi: 10.4103/lungindia.lungindia\_192\_18.
77. Dias, N. Review of 175 Cases of Tuberculosis Infections Affecting the Urogenital System / N. Dias, T. Pina-Vaz, P. Abreu-Mendes [et al.] // Turkish Journal of Urology. – 2022. – Vol. 48, № 6. – P. 440-445. – doi: 10.5152/tud.2022.22148.
78. Dipankar, P. Functional and therapeutic relevance of Rho GTPases in innate immune cell migration and function during inflammation: An in silico perspective / P. Dipankar, P. Kumar, S.P. Dash, P.P. Sarangi // Mediators of Inflammation. – 2021. – Vol. 2021. – P. 6655412. – doi: 10.1155/2021/6655412.
79. Dong, R. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy / R. Dong, M. Zhang, Q. Hu [et al.] // International journal of molecular medicine. – 2018. – Vol. 41, № 2. – P. 599-614. – doi: 10.3892/ijmm.2017.3311.
80. Espinal, M.A. Global trends in resistance to antituberculosis drugs / M.A. Espinal, A. Laszlo, L. Simonsen [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2001. – Vol. 344, № 17. – P. 1294-1303. – doi: 10.1056/NEJM200104263441706.
81. Fatima, S. Mycobacterium tuberculosis programs mesenchymal stem cells to establish dormancy and persistence / S. Fatima, S.S. Kamble, V.P. Dwivedi [et al.] // The Journal of clinical investigation. – 2020. – Vol. 130, № 2. – P. 655-661. – doi: 10.1172/JCI128043.
82. Favaro, E. Human mesenchymal stem cell-derived microvesicles modulate T cell response to islet antigen glutamic acid decarboxylase in patients with type 1 diabetes / E. Favaro, A. Carpanetto, S. Lamorte [et al.] // Diabetologia. – 2014. – Vol. 57. – P. 1664-1673. – doi: 10.1007/s00125-014-3262-4.
83. Figueiredo, A.A. Epidemiology of urogenital tuberculosis worldwide / A.A. Figueiredo, A.M. Lucon, R.F. Junior, M. Srougi // International journal of urology. – 2019. – Vol. 15. – P. 827-832. – doi: 10.1111/j.1442-2042.2008.02099.x.

84. Foo, J.B. Comparing the therapeutic potential of stem cells and their secretory products in regenerative medicine / J.B. Foo, Q.H. Looi, P.P. Chong [et al.] // *Stem cells international*. – 2021. – Vol. 2021. – P. 2616807. – doi: 10.1155/2021/2616807.
85. Friedenstein, A.J. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs / A.J. Friedenstein, J.F. Gorskaja, N.N. Kulagina // *Experimental hematology*. – 1976. – Vol. 4, № 5. – P. 267-274.
86. Fromigué, O. Distinct osteoblastic differentiation potential of murine fetal liver and bone marrow stroma-derived mesenchymal stem cells / O. Fromigué, Z. Hamidouche, S. Chateauvieux [et al.] // *Journal of cellular biochemistry*. – 2008. – Vol.104, № 2. – P. 620-628. – doi: 10.1096/fj.08-106302.
87. Gao, P. Apolipoprotein E mediates cell resistance to influenza virus infection / P. Gao, M. Ji, X. Liu [et al.] // *Science Advances*. – 2022. – Vol. 8, № 38. – P. 6668. – doi: 10.1126/sciadv.abm6668.
88. Gattazzo, F. Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche / F. Gattazzo, A. Urciuolo, P. Bonaldo // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. – 2014. – Vol. 1840, № 8. – P. 2506-2519. – doi: 10.1016/j.bbagen.2014.01.010.
89. Geginat, J. The light and the dark sides of Interleukin-10 in immune-mediated diseases and cancer / J. Geginat, P. Larghi, M. Paroni [et al.] // *Cytokine and growth factor reviews*. – 2016. – Vol. 30. – P. 87-93. – doi: 10.1016/j.cytogfr.2016.02.003.
90. Ghannam, S. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications / S. Ghannam, C. Bouffi, F. Djouad [et al.] // *Stem cell research and therapy*. – 2010. – Vol. 1, № 1. – P. 1-7. – doi: 10.1186/scrt2.
91. Gonda, A. Cellular-defined microenvironmental internalization of exosomes / A. Gonda, R. Moyron, J. Kabagwira [et al.] // *Extracellular Vesicles and Their Importance in Human Health*. – 2019. – P. 1-30. – doi: 10.5772/intechopen.86020.

92. Goossens, S.N. Mechanisms of drug-induced tolerance in *Mycobacterium tuberculosis* / S.N. Goossens, S.L. Sampson, A. Van Rie // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2020. – Vol. 34, № 1. – P. 10.1128/cmr.00141-20.
93. Gopaldaswamy, R. Extrapulmonary tuberculosis – an update on the diagnosis, treatment and drug resistance / R. Gopaldaswamy, V.A. Dusthacker, S. Kannayan, S. Subbian // *Journal of Respiration*. – 2021. – Vol. 1, № 2. – P. 141-164. – doi: 10.3390/jor1020015.
94. Götherström, C. Immunomodulatory effects of human foetal liver-derived mesenchymal stem cells / C. Götherström, O. Ringden, M. Westgren [et al.] // *Bone marrow transplantation*. – 2003. – Vol. 32, № 3. – P. 265-272. – doi: 10.1038/sj.bmt.1704111.
95. Gould, S.J. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles / S.J. Gould, G. Raposo // *Journal of extracellular vesicles*. – 2013. – Vol. 2, № 1. – P. 20389. – doi: 10.3402/jev.v2i0.20389.
96. Grange, C. Stem cell-derived extracellular vesicles and kidney regeneration / C. Grange, R. Skovronova, F. Marabese, B. Bussolati // *Cells*. – 2019. – Vol. 8, № 10. – P. 1240-1248. – doi: 10.3390/cells8101240.
97. Guan, Q. Inducible indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 and programmed death ligand 1 expression as the potency marker for mesenchymal stromal cells / Q. Guan, Y. Li, T. Shpiruk [et al.] // *Cytotherapy*. – 2018. – Vol. 20, № 5. – P. 639-649. – doi: 10.1016/j.jcyt.2018.02.003.
98. Gudleviciene, Z. Quick and effective method of bone marrow mesenchymal stem cell extraction / Z. Gudleviciene, G. Kundrotas, R. Liudkeviciene [et al.] // *Open Medicine*. – 2015. – Vol. 10, № 1. – P. 44-49. – doi: 10.1515/med-2015-0008.
99. Guillot, P.V. Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC / P.V. Guillot, C. Götherstrom, J. Chan // *Stem cells*. – 2007. – Vol. 25, № 3. – P. 646-654. – doi: 10.1634/stemcells.2006-0208.
100. Gusejnova, F.M. The impact of cellular therapy with mesenchymal stem cell of bone marrow on reparation at experimental tuberculous salpingitis /

- F.M. Gusejnova, T.I. Vinogradova, N.V. Zabolotnyh [et al.] // *Med. Alliance*. – 2017. – № 3. – P. 35-44.
101. Gutierrez, M.G. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages / M.G. Gutierrez, S.S. Master, S.B. Singh [et al.] // *Cell*. – 2004. – Vol. 119, № 6. – P. 753-766. – doi: 10.1016/j.cell.2004.11.038.
102. Harman, R.M. Antimicrobial peptides secreted by equine mesenchymal stromal cells inhibit the growth of bacteria commonly found in skin wounds / R.M. Harman, S. Yang, M.K. He, G.R. Van de Walle // *Stem cell research and therapy*. – 2017. – Vol. 8, № 1. – P. 1-14. – doi: 10.1186/s13287-017-0610-6.
103. Hochepped, T.  $\alpha$ 1-Acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties / T. Hochepped, F.G. Berger, H. Baumann, C. Libert // *Cytokine and growth factor reviews*. – 2003. – Vol. 14, № 1. – P. 25-34. – doi: 10.1016/S1359-6101(02)00054-0.
104. Huang, F.J. Interleukin-4-and NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3-independent mechanisms of alum enhanced T helper type 2 responses on basophils / F.J. Huang, Y.L. Ma, R.Y. Tang [et al.] // *Immunology*. – 2016. – Vol. 149, № 2. – P. 238-251. – doi: 10.1111/imm.12636.
105. Humphreys, B.D. Mesenchymal stem cells in acute kidney injury / B.D. Humphreys, J.V. Bonventre // *Annual Review of Medicine*. – 2008. – Vol. 59. – P. 311-325. – doi: 10.1146/annurev.med.59.061506.154239.
106. Ikarashi, K. Bone marrow cells contribute to regeneration of damaged glomerular endothelial cells / K. Ikarashi, B. Li, M. Suwa [et al.] // *Kidney international*. – 2005. – Vol. 67, № 5. – P. 1925-1933. – doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00291.x.
107. Islam, M.N. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury / M.N. Islam, S.R. Das, M.T. Emin [et al.] // *Nature medicine*. – 2012. – Vol. 18, № 5. – P. 759-765. – doi: 10.1038/nm.2736.
108. Ivanova-Todorova, E. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-

- derived mesenchymal stem cells / E. Ivanova-Todorova, I. Bochev, M. Mourdjeva [et al.] // *Immunology letters*. – 2009. – Vol. 126, № 1-2. – P. 37-42. – doi: 10.1016/j.imlet.2009.07.010.
109. Jagodziński J. Tuberculosis of the urogenital tract in adults in a tertiary referral center / J. Jagodziński, T.M. Zielonka, K. Peplińska, K. Życińska // *Clinical Research Involving Pulmonary Disorders*. – 2018. – Vol. 19, № 5. – P. 29-37. – doi: 10.1007/5584\_2017\_103.
110. Jain, N. Mesenchymal stem cells offer a drug-tolerant and immune-privileged niche to *Mycobacterium tuberculosis* / N. Jain, H. Kalam, L. Singh [et al.] // *Nature Communications*. – 2020. – Vol. 11, № 1. – P. 1-15. – doi: 10.1038/s41467-020-16877-3.
111. Jiang D. Suppression of neutrophil-mediated tissue damage – a novel skill of mesenchymal stem cells / D. Jiang, J. Muschhammer, Y. Qi [et al.] // *Stem Cells*. – 2016. – Vol. 34, № 9. – P. 2393-2406. – doi: 10.1002/stem.2417.
112. Jiang, X.X. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells / X.X. Jiang, Y.I. Zhang, B. Liu [et al.] // *Blood*. – 2005. – Vol. 105, № 10. – P. 4120-4126. – doi: 10.1182/blood-2004-02-0586.
113. Jones, G.N. Ontological differences in first compared to third trimester human fetal placental chorionic stem cells / G.N. Jones, D. Moschidou, T.I. Puga-Iglesias [et al.] // *Plos ONE*. – 2012, Vol. 7, № 9. – P. 43395. – doi: 10.1371/journal.pone.0043395.
114. Joshi, L. Mesenchymal stromal cell therapy in MDR/XDR tuberculosis: a concise review / L. Joshi, L.K. Chelluri, S. Gaddam // *Archiv umimmunologiae et therapiae experimentalis*. – 2015. – Vol. 63. – P. 427-433. – doi: 10.1007/s00005-015-0347-9.
115. Junttila, I.S. Tuning the cytokine responses: an update on interleukin (IL)-4 and IL-13 receptor complexes / I.S. Junttila // *Frontiers in immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 888. – doi: 10.3389/fimmu.2018.00888.

116. Kaufmann, S.H.E. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? / S.H.E. Kaufmann // *Nature Reviews Immunology*. – 2001. – Vol. 1, № 1. – P. 20-30. – doi: 10.1038/35095558.
117. Khan, A. Mesenchymal stem cells internalize *Mycobacterium tuberculosis* through scavenger receptors and restrict bacterial growth through autophagy / A. Khan, L. Mann, R. Papanna [et al.] // *Scientific reports*. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 15010. – doi: 10.1038/s41598-017-15290-z.
118. Khundmiri, S.J. Effect of reversible and irreversible ischemia on marker enzymes of BBM from renal cortical PT subpopulations / S.J. Khundmiri, M. Asghar, F. Khan [et al.] // *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. – 1997. – Vol. 273, № 6. – P. 849-856. – doi: 10.1152/ajprenal.1997.273.6.F849.
119. Kim, E.J. Chronic kidney disease with genitourinary tuberculosis: old disease but ongoing complication / E.J. Kim, W. Lee, W.Y. Jeong [et al.] // *BMC nephrology*. – 2018. – Vol. 19, № 1. – P. 1-8. – doi: 10.1186/s12882-018-0994-2.
120. Kim, J.Y. Combined IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  release assay for differentiating active tuberculosis from latent tuberculosis infection / J.Y. Kim, J.H. Park, M.C. Kim [et al.] // *Journal of Infection*. – 2018. – Vol. 77, № 4. – P. 314-320. – doi: 10.1016/j.jinf.2018.04.011.
121. Kooijmans, S.A. Display of GPI-anchored anti-EGFR nanobodies on extracellular vesicles promotes tumor cell targeting / S.A. Kooijmans, C.G. Aleza, S.R. Roffler [et al.] // *Journal of extracellular vesicles*. – 2016. – Vol. 5, № 1. – P. 31053. – doi: 10.3402/jev.v5.31053.
122. Krampera, M. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide / M. Krampera, S. Glennie, J. Dyson [et al.] // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2003. – Vol. 101, № 9. – P. 3722-3729. – doi: 10.1182/blood-2002-07-2104.
123. Kulchavenya, E. Chges in urogenital tuberculosis / E. Kulchavenya D. Kholto bin, S. Shevchenko // *World Journal of Urology*. – 2020. – Vol. 38, № 1 – P. 89-94. – doi: 10.1007/s00345-019-02767-x.

124. Labuz, D. Interleukin-4 induces the release of opioid peptides from M1 macrophages in pathological pain / D. Labuz, M.Ö. Celik, V. Seitz, H. Machelska // *Journal of Neuroscience*. – 2021. – Vol. 41, № 13. – P. 2870-2882. – doi: 10.1523/JNEUROSCI.3040-20.2021.
125. Lee, H.Y. Drug-resistance pattern of *Mycobacterium tuberculosis* strains from patients with pulmonary and extrapulmonary tuberculosis during 2006 to 2013 in a Korean tertiary medical center / H.Y. Lee, J. Lee, Y.S. Lee [et al.] // *The Korean Journal of Internal Medicine*. – 2015. – Vol. 30, № 3. – P. 325-334. – doi: 10.3904/kjim.2015.30.3.325.
126. Levitte, S. Mycobacterial acid tolerance enables phagolysosomal survival and establishment of tuberculous infection in vivo / S. Levitte, K.N. Adams, R.D. Berg [et al.] // *Cell host and microbe*. – 2016. – Vol. 20, № m2. – P. 250-258. – doi: 10.1016/j.chom.2016.07.007.
127. Li, P. Therapeutic effects of human gingiva-derived mesenchymal stromal cells on murine contact hypersensitivity via prostaglandin E2–EP3 signaling / P. Li, Y. Zhao, L. Ge // *Stem cell research and therapy*. – 2016. – Vol. 7. – P. 1-14. – doi: 10.1186/s13287-016-0361-9.
128. Liang, C. Interferon- $\gamma$  mediates the immunosuppression of bone marrow mesenchymal stem cells on T-lymphocytes in vitro / C. Liang, E. Jiang, J. Yao [et al.] // *Hematology*. – 2018. – Vol. 23, № 1. – P. 44-49. – doi: 10.1080/10245332.2017.1333245.
129. Lima, N.A. Review of genitourinary tuberculosis with focus on end-stage renal disease / N.A. Lima, C.C. Vasconcelos, P.H.O. Filgueira [et al.] // *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. – 2012. – Vol. 54, № 1. – P. 57-60. – doi: 10.1590/S0036-46652012000100011.
130. Lin, F. Intrarenal cells, not bone marrow–derived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney / F. Lin, A. Moran, P. Igarashi // *The Journal of clinical investigation*. – 2005. – Vol. 115, № 7. – P. 1756-1764. – doi: 10.1172/JCI23015.

131. Lin, F. Renal repair: role of bone marrow stem cells / F. Lin // *Pediatric Nephrology*. – 2008. – Vol. 23, № 6. – P. 851-861. – doi: 10.1007/s00467-007-0634-8.
132. Liu, Y. MSC-derived exosomes promote proliferation and inhibit apoptosis of chondrocytes via lncRNA-KLF3-AS1/miR-206/GIT1 axis in osteoarthritis / Y. Liu, L. Lin, R. Zou [et al.] // *Cell cycle*. – 2018. – Vol. 17, № 21-22. – P. 2411-2422. – doi: 10.1080/15384101.2018.1526603.
133. Lobov, A.A. Proteomic profiling of the human fetal multipotent mesenchymal stromal cells secretome / A.A. Lobov, N.M. Yudin, A.G. Mittenberg [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25, № 22. – P. 5283. –doi: 10.3390/molecules25225283.
134. Loimaranta, V. Galectin-3-binding protein: A multitask glycoprotein with innate immunity functions in viral and bacterial infections / V. Loimaranta, J. Hepojoki, O. Laaksoaho, A.T. Pulliainen // *Journal of leukocyte biology*. – 2018. – Vol. 104, № 4. – P. 777-786. – doi: 10.1002/JLB.3VMR0118-036R.
135. Lou, G. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases / G. Lou, Z. Chen, M. Zheng, Y. Liu // *Experimental and molecular medicine*. – 2017. – Vol. 49, № 6. – P. 346. – doi: 10.1038/emm.2017.63.
136. Lu, G. Two small extracellular vesicle sRNAs derived from *Mycobacterium tuberculosis* serve as diagnostic biomarkers for active pulmonary tuberculosis / G. Lu, X. Jiang, A. Wu [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 642559. – doi: 10.3389/fmicb.2021.642559.
137. Mangaraj, M. Apolipoprotein AI: a molecule of diverse function / M. Mangaraj, R. Nanda, S. Panda // *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. – 2016. – Vol. 31, № 3. – P. 253-259. – doi: 10.1007/s12291-015-0513-1.
138. Matthay, M.A. Mesenchymal Stem Cells for Acute Lung Injury: Preclinical Evidence / M.A. Matthay, A. Goolaerts, J.P. Howard, J.W. Lee // *Critical care medicine*. – 2010. – Vol. 38, № 10. – P. 569-573. – doi: 10.1097/CCM.0b013e3181f1ff1d.

139. Mehaffy, C. Extracellular Vesicles in Mycobacteria and Tuberculosis / C. Mehaffy, J.M. Ryan, N.A. Kruh-Garcia, K.M. Dobos // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2022. – Vol. 12. – P. 912831. – doi: 10.3389/fcimb.2022.912831.
140. Mehaffy, C. Identification of Mycobacterium tuberculosis peptides in serum extracellular vesicles from persons with latent tuberculosis infection / C. Mehaffy, N.A. Kruh-Garcia, B. Graham [et al.] // *Journal of clinical microbiology*. – 2020. – Vol. 58, № 6. – P. 00393. – doi: 10.1128/JCM.00393-20.
141. Meirelles, L.D.S. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells / L.D.S. Meirelles, A.M. Fontes, D.T. Covas, A.I. Caplan // *Cytokine and growth factor reviews*. – 2009. – Vol. 20, № 5-6. – P. 419-427. – doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.10.002.
142. Merchant, S. Tuberculosis of the genitourinary system-Urinary tract tuberculosis: Renal tuberculosis-Part I / S. Merchant, A. Bharati, N. Merchant // *Indian Journal of Radiology and Imaging*. – 2013. – Vol. 23, № 1. – P. 46-63. – doi: 10.4103/0971-3026.113615.
143. Miceli, V. Therapeutic properties of mesenchymal stromal/stem cells: the need of cell priming for cell-free therapies in regenerative medicine / V. Miceli, M. Bulati, G. Iannolo // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, № 2. – P. 763. – doi: 10.3390/ijms22020763.
144. Minguell, J.J. Mesenchymal stem cells / J.J. Minguell, A. Erices, P. Conget // *Experimental biology and medicine*. – 2001. – Vol. 226, № 6. – P. 507-520. – doi: 10.1177/153537020122600603.
145. Mishima, Y. Chemotaxis of human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells / Y. Mishima, M. Lotz // *Journal of Orthopaedic Research*. – 2008. – Vol. 26, № 10. – P. 1407-1412. – doi: 10.1002/jor.20668.
146. Mittal, A. Surgical management of genitourinary tuberculosis: Our experience and review of literature / A. Mittal, S. Ranjan, T. Narain, V. Panwar // *Polish Journal of Surgery*. – 2020. – Vol. 92, № 6. – P. 1-6. – doi: 10.5604/01.3001.0014.3579.
147. Mohammadzadeh, R. Mycobacterium tuberculosis extracellular vesicles: exploitation for vaccine technology and diagnostic methods / R. Mohammadzadeh,

- K. Ghazvini, H. Farsiani, S. Soleimanpour // *Critical Reviews in Microbiology*. – 2021. – Vol. 47, № 1. – P. 13-33. – doi: 10.1080/1040841X.2020.1830749.
148. Mokarizadeh, A. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells: potent organelles for induction of tolerogenic signaling / A. Mokarizadeh, N. Delirezh, A. Morshedi [et al.] // *Immunology letters*. – 2012. – Vol. 147, № 1-2. – P. 47-54. – doi: 10.1016/j.imlet.2012.06.001.
149. Morigi, M. Life-sparing effect of human cord blood-mesenchymal stem cells in experimental acute kidney injury / M. Morigi, C. Rota, T. Montemurro [et al.] // *Stem cells*. – 2010. – Vol. 28, № 3. – P. 513-522. – doi: 10.1002/stem.293.
150. Morigi, M. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure / M. Morigi, B. Imberti, C. Zoja [et al.] // *Journal of the American Society of Nephrology*. – 2004. – Vol. 15, № 7. – P. 1794-1804. – doi: 10.1097/01.ASN.0000128974.07460.34.
151. Muneer, A. Urogenital tuberculosis – epidemiology, pathogenesis and clinical features / A. Muneer, B. Macrae, S. Krishnamoorthy, A. Zumla // *Nature reviews urology*. – 2019. – Vol. 16, № 10. – P. 573-598. – doi: 10.1038/s41585-019-0228-9.
152. Murphy, D.E. Extracellular vesicle-based therapeutics: natural versus engineered targeting and trafficking / D.E. Murphy, O.G. de Jong, M. Brouwer [et al.] // *Experimental and molecular medicine*. – 2019. – Vol. 51, № 3. – P. 1-12. – doi: 10.1038/s12276-019-0223-5.
153. Nassar, W. Umbilical cord mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles can safely ameliorate the progression of chronic kidney diseases / W. Nassar, M. El-Ansary, D. Sabry [et al.] // *Biomaterials research*. – 2016. – Vol. 20, № 1. – P. 1-11. – doi: 10.1186/s40824-016-0068-0.
154. Nauta, A.J. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34<sup>+</sup>-derived and monocyte-derived dendritic cells / A.J. Nauta, A.B. Kruisselbrink, E. Lurvink [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2006. – Vol. 177, № 4. – P. 2080-2087. – doi: 10.4049/jimmunol.177.4.2080.
155. Nenasheva, T. The introduction of mesenchymal stromal cells induces different immunological responses in the lungs of healthy M. tuberculosis infected mice /

- T. Nenasheva, A. Nikolaev, D. Diykanov [et al.] // PLoS ONE. – 2017. – Vol. 12, № 6. – P. 0178983. – doi: 10.1371/journal.pone. 0178983.
156. Neuen, B.L. Chronic kidney disease and the global NCDs agenda / B.L. Neuen, S.J. Chadban, A.R. Demaio [et al.] // BMJ global health. – 2017. – Vol. 2, № 2. – P. e000380. – doi: 10.1136/bmjgh-2017-000380.
157. Newman, R.E. Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells / R.E. Newman, D. Yoo, M.A. Le Roux, A. Danilkovitch-Miagkova // Inflammation and Allergy Drug Targets. – 2009. – Vol. 8, № 2. – P. 110-123. – doi: 10.2174/187152809788462635.
158. Nicolay, N.H. Mesenchymal stem cells—a new hope for radiotherapy-induced tissue damage? / N.H. Nicolay, R.L. Perez, J. Debus, P.E. Huber // Cancer letters. – 2015. – Vol. 366, № 2. – P. 133-140. – doi: 10.1016/j.canlet.2015.06.012.
159. Orlova, N.V. Experimental urinary bladder reconstruction using allogeneic tissue engineering products / N.V. Orlova, A.N. Muraviov, T.I. Vinogradova [et al.] // Cellular Therapy and Transplantation. – 2019. – Vol. 8, № 2. – P. 68-73. – doi: 10.18620/ctt-1866-8836-2019-8-2-68-73.
160. Owen, M. Marrow stromal stem cells / M. Owen // Journal of cell science. Supplement. – 1988. – Vol. 10 – P. 63-76. – doi: 10.1242/jcs.1988. Supplement\_10.5.
161. Parida, S.K. Cellular therapy in tuberculosis / S. K. Parida, R. Madansein, N. Singh [et al.] // International Journal of Infectious Diseases. – 2015. – Vol. 32. – P. 32-38. – doi: 10.1016/j.ijid.2015.01.016.
162. Park, M. Use of Xpert MTB/RIF and Xpert Ultra in extrapulmonary tuberculosis / M. Park, O.M. Kon // Expert review of anti-infective therapy. – 2021. – Vol. 19, № 1. – P. 65-77. – doi: 10.1080/14787210.2020.1810565.
163. Perico, L. Human mesenchymal stromal cells transplanted into mice stimulate renal tubular cells and enhance mitochondrial function / L. Perico, M. Morigi, C. Rota [et al.] // Nature communications. – 2017. – Vol. 8, № 1. – P. 1-17. – doi: 10.1038/s41467-017-00937-2.

164. Pittenger, M.F. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress / M.F. Pittenger, D.E. Discher, B.M. Péault [et al.] // *NPJ Regenerative medicine*. – 2019. – Vol. 4, № 1. – P. 1-15. – doi: 10.1038/s41536-019-0083-6.
165. Prieto, C.P. Netrin-1 acts as a non-canonical angiogenic factor produced by human Wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSC) / C.P. Prieto, M.C. Ortiz, A. Villanueva [et al.] // *Stem Cell Research and Therapy*. – 2017. – Vol. 8, № 1. – P. 1-15. – doi: 10.1186/s13287-017-0494-5.
166. Psaltis, P.J. Vascular wall progenitor cells in health and disease / P.J. Psaltis, R.D. Simari // *Circulation research*. – 2015. – Vol. 16, № 8. – P. 1392-1412. – doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305368.
167. Puthia, M. Antibacterial and anti-inflammatory effects of apolipoprotein E / M. Puthia, J.K. Marzinek, G. Petruk [et al.] // *Biomedicines*. – 2022. – Vol. 10, № 6. – P. 1430. – doi: 10.3390/biomedicines10061430.
168. Rahmati, S. An overview of current knowledge in biological functions and potential theragnostic applications of exosomes / S. Rahmati, F. Shojaei, A. Shojaeian [et al.] // *Chemistry and physics of lipids*. – 2020. – Vol. 226. – P. 104836. – doi: 10.1016/j.chemphyslip.2019.104836.
169. Raghuvanshi, S. Mycobacterium tuberculosis evades host immunity by recruiting mesenchymal stem cells / S. Raghuvanshi, P. Sharma, S. Singh [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 107, № 50. – P. 21653-21658. – doi: 10.1073/pnas.1007967107.
170. Ramasamy, R. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle / R. Ramasamy, H. Fazekasova, E.W.F. Lam [et al.] // *Transplantation*. – 2007. – Vol. 83, № 1. – P. 71-76. – doi: 10.1097/01.tp.0000244572.24780.54.
171. Ren, G. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide / G. Ren, L. Zhang, X. Zhao [et al.] // *Cell stem cell*. – 2008. – Vol. 2, № 2. – P. 141-150. – doi: 10.1016/j.stem.2007.11.014.

172. Ren, W. Extracellular vesicles secreted by hypoxia pre-challenged mesenchymal stem cells promote non-small cell lung cancer cell growth and mobility as well as macrophage M2 polarization via miR-21-5p delivery / W. Ren, J. Hou, C. Yang [et al.] // *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. – 2019. – Vol. 38. – P. 1-14. – doi: 10.1186/s13046-019-1027-0.
173. Roberts, V.S. The role of adenosine receptors A2A and A2B signaling in renal fibrosis / V.S. Roberts, P.J. Cowan, S.I. Alexander [et al.] // *Kidney international*. – 2014. – Vol. 86, № 4. – P. 685-692. – doi: 10.1038/ki.2014.244.
174. Rubtsov, Y. Molecular mechanisms of immunomodulation properties of mesenchymal stromal cells: a new insight into the role of ICAM-1 / Y. Rubtsov, K. Goryunov, A.Y. Romanov [et al.] // *Stem Cells International*. – 2017. – Vol. 2017. – P. 6516854. – doi: 10.1155/2017/6516854.
175. Ryan, J.M. Interferon- $\gamma$  does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells / J.M. Ryan, F. Barry, J.M. Murphy, B.P. Mahon // *Clinical and experimental immunology*. – 2007. – Vol. 149, № 2. – P. 353-363. – doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03422.x.
176. Sachdeva, K. The interplay of host lysosomes and intracellular pathogens / K. Sachdeva, V. Sundaramurthy // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2020. – Vol. 10. – P. 595502. – doi: 10.3389/fcimb.2020.595502.
177. Sagaradze, G.D. Mesenchymal stromal cells as critical contributors to tissue regeneration / G.D. Sagaradze, N.A. Basalova, A.Y. Efimenko, V.A. Tkachuk // *Frontiers in cell and developmental biology*. – 2020. – Vol. 8. – P. 576176. – doi: 10.3389/fcell.2020.576176.
178. Saraiva, M. The regulation of IL-10 production by immune cells / M. Saraiva, A. O'garra // *Nature reviews immunology*. – 2010. – Vol. 10, № 3. – P. 170-181. – doi: 10.1038/nri2711.
179. Schrepfer, S. Stem cell transplantation: the lung barrier / S. Schrepfer, T. Deuse, H. Reichenspurner [et al.] // *Transplantation proceedings*. – 2007. – Vol. 39, № 2. – P. 573-576. – doi: 10.1016/j.transproceed.2006.12.019.

180. Shah, N.S. Worldwide emergence of extensively drug-resistant tuberculosis / N.S. Shah, A. Wright, G.H. Bai [et al.] // *Emerging infectious diseases*. – 2007. – Vol. 13, № 3. – P. 380-387. – doi: 10.3201/eid1303.061400.
181. Shaw, T.C. Regulation of IL-10 secretion after phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytic cells / T.C. Shaw, L.H. Thomas, J.S. Friedland // *Cytokine*. – 2000. – Vol. 12, № 5. – P. 483-486. – doi: 10.1006/cyto.1999.0586.
182. Shevtsov, M.A. Ionizing radiation improves glioma-specific targeting of superparamagnetic iron oxide nanoparticles conjugated with cmHsp70.1 monoclonal antibodies (SPION–cmHsp70.1) / M.A. Shevtsov, B.P. Nikolaev, V.A. Ryzhov [et al.] // *Nanoscale*. – 2015. – Vol. 48, № 7. – P. 20652-20664. – doi: 10.1039/C5NR06521F.
183. Shin, K.Y. Role of early endourologic management of tuberculous ureteral strictures / K.Y. Shin, H.J. Park, J.J. Lee [et al.] // *Journal of endourology*. – 2002. – Vol. 16, № 10. – P. 755-758. – doi: 10.1089/08927790260472917.
184. Siddiqui, M.M. Urologic assessment of decreasing renal function / M.M. Siddiqui, W.S. McDougal // *Medical Clinics*. – 2011. – Vol. 95, № 1. – P. 161-168. – doi: 10.1016/j.mcna.2010.08.031.
185. Sinclair, K. Mesenchymal stem cells and the lung / K. Sinclair, S.T. Yerkovich, D.C. Chambers // *Respirology*. – 2013. – Vol. 18, № 3. – P. 397-411. – doi: 10.1111/resp.12050.
186. Skrahin, A. Autologous mesenchymal stromal cell infusion as adjunct treatment in patients with multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis: an open-label phase 1 safety trial / A. Skrahin, R.K. Ahmed, G. Ferrara [et al.] // *The lancet Respiratory medicine*. – 2014. – Vol. 2, № 2. – P. 108-122. – doi: 10.1016/S2213-2600(13)70234-0.
187. Skrahin, A. Effectiveness of a novel cellular therapy to treat multidrug-resistant tuberculosis / A. Skrahin, H.E. Jenkins, H. Hurevich [et al.] // *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*. – 2016. – Vol. 4. – P. 21-27. – doi: 10.1016/j.jctube.2016.05.003.

188. Sotiropoulou, P.A. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells / P.A. Sotiropoulou, S.A. Perez, A.D. Gritzapis [et al.] // *Stem cells*. – 2006. – Vol. 24, № 1. – P. 74-85. – doi: 10.1634/stemcells.2004-0359.
189. Spaggiari, G.M. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation / G.M. Spaggiari, A. Capobianco, S. Becchetti [et al.] // *Blood*. – 2006. – Vol. 107, № 4. – P. 1484-1490. – doi: 10.1182/blood-2005-07-2775.
190. Spees, J.L. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration / J.L. Spees, S.D. Olson, M.J. Whitney, D.J. Prockop // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – Vol. 103, № 5. – P. 1283-1288. – doi: 10.1073/pnas.0510511103.
191. Sturgill-Koszycki, S. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase / S. Sturgill-Koszycki, P.H. Schlesinger, P. Chakraborty [et al.] // *Science*. – 1994. – Vol. 263, № 5147. – P. 678-681. – doi: 10.1126/science.8303277.
192. Sun, Y.F. Emerging role of exosomes in tuberculosis: from immunity regulations to vaccine and immunotherapy / Y.F. Sun, J. Pi, J.F. Xu // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 628973. – doi: 10.3389/fimmu.2021.628973.
193. Sutton, M.T. Antimicrobial properties of mesenchymal stem cells: therapeutic potential for cystic fibrosis infection, and treatment / M.T. Sutton, D. Fletcher, S.K. Ghosh [et al.] // *Stem cells international*. – 2016. – Vol. 2016. – P. 5303048. – doi: 10.1155/2016/5303048.
194. Tan, J. Induction therapy with autologous mesenchymal stem cells in living-related kidney transplants: a randomized controlled trial / J. Tan, W. Wu, X. Xu [et al.] // *Jama*. – 2012. – Vol. 307, № 11. – P. 1169-1177. – doi: 10.1001/jama.2012.316.
195. Tardif, S. Testing efficacy of administration of the antiaging drug rapamycin in a nonhuman primate, the common marmoset / S. Tardif, C. Ross, P. Bergman [et al.] // *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*. – 2015. – Vol. 70, № 5. – P. 577-588. – doi: 10.1093/gerona/glu101.

196. Togel, F. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms / F. Togel, Z. Hu, K. Weiss [et al.] // *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. – 2005. – Vol. 289, № 1. – P. 31-42. – doi: 10.1152/ajprenal.00007.2005.
197. Tonelli, M. Chronic kidney disease and mortality risk: a systemic review / M. Tonelli, N. Wiebe, A. House [et al.] // *Journal of the American Society of Nephrology*. – 2006. – Vol. 17, № 6. – P. 2034-2047. – doi: 10.1681/ASN.2005101085.
198. Trohatou, O. Mesenchymal stem/stromal cells in regenerative medicine: past, present, and future / O. Trohatou, M.G. Roubelakis // *Cellular reprogramming*. – 2017. – Vol. 19, № 4. – P. 217-224. – doi: 10.1089/cell.2016.0062.
199. Tropea, K.A. Bronchioalveolar stem cells increase after mesenchymal stromal cell treatment in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia / K.A. Tropea, E. Leder, M. Aslam [et al.] // *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2012. – Vol. 302, № 9. – P. 829-837. – doi: 10.1152/ajplung.00347.2011.
200. Vallon, V. Adenosine and kidney function / V. Vallon, B. Muhlbauer, H. Osswald // *Physiological reviews*. – 2006. – Vol. 86, № 3. – P. 901-940. – doi: 10.1152/physrev.00031.2005.
201. van der Wel, N.M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells / N.M. van der Wel, D. Hava, D. Houben [et al.] // *Cell*. – 2007. – Vol. 129, № 7. – P. 1287-1298. – doi: 10.1016/j.cell.2007.05.059.
202. Wang, J. Recent advances in clustering methods for protein interaction networks / J. Wang, M. Li, Y. Deng, Y. Pan // *BMC genomics*. – 2010. – Vol. 11, № 3. – P. 1-19. – doi: 10.1186/1471-2164-11-S3-S10.
203. Wang, L.T. Advances in mesenchymal stem cell therapy for immune and inflammatory diseases: Use of cell-free products and human pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells / L.T. Wang, K.J. Liu, H.K. Sytwu [et al.] // *Stem cells translational medicine*. – 2021. – Vol. 10, № 9. – P. 1288-1303. – doi: 10.1002/sctm.21-0021.

204. World Health Organization. Global tuberculosis report 2023 / World Health Organization. – Geneva: World Health Organization, 2023. – URL: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports> (date accessed: 12.02.2024). – Text: electronic.
205. World Health Organization. The end TB strategy: global strategy and targets for tuberculosis prevention, care and control after 2015. Geneva: World Health Organization, 2014. – URL: <https://iris.who.int/handle/10665/172886> (date accessed: 12.02.2024). – Text: electronic.
206. Wu, J. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit dendritic cells differentiation and maturation by microRNA-23b / J. Wu, C. Ji, F. Cao [et al.] // *Bioscience Reports*. – 2017. – Vol. 37, № 2. – P. 7153584. – doi: 10.1042/BSR20160436.
207. Xiang, E. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells prevent the progression of early diabetic nephropathy through inhibiting inflammation and fibrosis / E. Xiang, B. Han, Q. Zhang [et al.] // *Stem Cell Research and Therapy*. – 2020. – Vol. 11, № 1. – P. 1-14. – doi: 10.1186/s13287-020-01852-y.
208. Xu, J. A small GTPase, RhoA, inhibits bacterial infection through integrin mediated phagocytosis in invertebrates / J. Xu, M.Q. Diao, G.J. Niu [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1928. – doi: 10.3389/fimmu.2018.01928.
209. Xu, J. Human perivascular stem cell-derived extracellular vesicles mediate bone repair / J. Xu, Y. Wang, C.Y. Hsu [et al.] // *Elife*. – 2019. – Vol. 8. – P. 48191. – doi: 10.7554/eLife.48191.
210. Yan, K. MicroRNA-20b carried by mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles protects alveolar epithelial type II cells from *Mycobacterium tuberculosis* infection in vitro / K. Yan, G. Xu, Z. Li // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2022. – Vol. 101. – P. 105292. – doi: 10.1016/j.meegid.2022.105292.
211. Yang, C.W. Global case studies for chronic kidney disease/end-stage kidney disease care / C.W. Yang, D. Harris, V.A. Luyckx [et al.] // *Kidney international supplements*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 24-48. – doi: 10.1016/j.kisu.2019.11.010.

212. Yudintceva, N. Application of the allogenic mesenchymal stem cells in the therapy of the bladder tuberculosis / N. Yudintceva, I.O. Bogolyubova, A.N. Muraviov [et al.] // *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. – 2018. – Vol. 12, № 3. – P. 1580-1593. – doi: 10.1002/term.2583.
213. Yudintceva, N. Evaluation of the biodistribution of mesenchymal stem cells in a pre-clinical renal tuberculosis model by non-linear magnetic response measurements / N. Yudintceva, N. Mikhailova, D. Bobkov [et al.] // *Frontiers in physics*. – 2021. – Vol. 9. – P. 625622. – doi: 10.3389/fphy.2021.625622.
214. Yudintceva, N. Experimental bladder regeneration using a poly-l-lactide/silk fibroin scaffold seeded with nanoparticle-labeled allogenic bone marrow stromal cells / N. Yudintceva, Y.A. Nashchekina, M.I. Blinova [et al.] // *International journal of nanomedicine*. – 2016. – Vol. 11. – P. 4521- 4533. – doi: 10.2147/IJN.S111656.
215. Yudintceva, N. Mesenchymal stem cells and MSCs-derived extracellular vesicles in infectious diseases: From basic research to clinical practice / N. Yudintceva, N. Mikhailova, V. Fedorov [et al.] // *Bioengineering*. – 2022. – Vol. 9, № 11. – P. 662. – doi: 10.3390/bioengineering9110662.
216. Yudintceva, N. Urethroplasty with a bilayered poly-D, L-lactide-co- $\epsilon$ -caprolactone scaffold seeded with allogenic mesenchymal stem cells / N. Yudintceva, Y.A. Nashchekina, N.A. Mikhailova [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. – 2020. – Vol. 108, № 3. – P. 1010-1021. – doi: 10.1002/jbm.b.34453.
217. Zakrzewski, W. Stem cells: past, present, and future / W. Zakrzewski, M. Dobrzyński, M. Szymonowicz, Z. Rybak // *Stem cell research and therapy*. – 2019. – Vol. 10, № 1. – P. 1-22. – doi: 10.1186/s13287-019-1165-5.
218. Zhang, C. Supramolecular nanofibers containing arginine-glycine-aspartate (RGD) peptides boost therapeutic efficacy of extracellular vesicles in kidney repair / C. Zhang, Y. Shang, X. Chen [et al.] // *ACS nano*. – 2020. – Vol. 14, № 9. – P. 12133-12147. – doi: 10.1021/acsnano.0c05681.

219. Zhang, X. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells modulate monocytes/macrophages and alleviate atherosclerosis/ X. Zhang, F. Huang, W. Li [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 878. – doi: 10.3389/fimmu.2018.00878.
220. Zhang, X. Mesenchymal Stem Cells and Tuberculosis: Clinical Challenges and Opportunities / X. Zhang, Q. Xie, Z. Ye [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 695278. – doi: 10.3389/fimmu.2021.695278.
221. Zhe, Z. Bladder acellular matrix grafts seeded with adipose-derived stem cells and incubated intraperitoneally promote the regeneration of bladder smooth muscle and nerve in a rat model of bladder augmentation / Z. Zhe, D. Jun, Z. Yang [et al.] // *Stem Cells and Development*. – 2016. – Vol. 25, № 5. – P. 405-414. – doi: 10.1089/scd.2015.0246.
222. Zhou, Y. The immunomodulatory functions of mesenchymal stromal/stem cells mediated via paracrine activity / Y. Zhou, Y. Yamamoto, Z. Xiao, T. Ochiya // *Journal of clinical medicine*. – 2019. – Vol. 8, № 7. – P. 1025-1025. – doi: 10.3390/jcm8071025.
223. Zhu, X. Adenosine deaminase is a potential molecular marker for diagnosis and prognosis of haemorrhagic fever with renal syndrome / X. Zhu, J. Hu // *Infection and Drug Resistance*. – 2022. – P. 5197-5205. – doi: 10.2147/IDR.S379228.