

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук Каюковой Светланы Ивановны на диссертационную работу Ремезовой Анны Николаевны по теме: **«Применение мезенхимных стволовых клеток в комплексном лечении туберкулеза почек (экспериментальное исследование)»**, представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям: 3.1.26. Фтизиатрия, 3.1.13. Урология и андрология

Актуальность темы диссертационной работы не вызывает сомнений. В результате мер, принятых Правительством и органами здравоохранения РФ, в XXI веке эпидемическая ситуация по туберкулезу в нашей стране заметно улучшилась. Однако проблема внелегочных локализаций туберкулеза остается серьезной; их частота составляет 15-45%.

Одной из жизненно важных клинических форм внелегочного туберкулеза является нефротуберкулез (НТ), который диагностируется, как правило, поздно, в запущенной стадии, с осложнениями и необратимыми изменениями (77,6%). Чаще всего хронический специфический процесс в почках приводит к уретерогидронефротической трансформации за счет прогрессирующего фиброзного процесса (55-85% случаев). Эти состояния не редко требуют дорогостоящего лечения и выполнения реконструктивно-пластических операций на мочевых путях, вплоть до нефрэктомии.

Помимо применения противотуберкулезных препаратов и хирургического лечения в настоящее время активно идет поиск новых методов патогенетической терапии НТ, который позволил обратить внимание на использование мезенхимных стволовых клеток для восстановления структуры и функции поврежденных органов мочевыводящей системы. Известно, что мезенхимные стволовые клетки (МСК) обладают антимикробными свойствами, выраженным регенеративным потенциалом и иммуномодулирующим эффектом. Однако возможности применения МСК и их внеклеточных везикул (МСК-ВВ) в терапии урологического туберкулеза до настоящего времени не изучены. Поэтому исследование и экспериментальная оценка эффективности применения мезенхимных стволовых клеток и внутриклеточных везикул в комплексном лечении нефротуберкулеза для дальнейшей апробации в клинике и предотвращения инвалидизации больных НТ представляют несомненную научную актуальность и практическую значимость.

Целью исследования явилось обосновать возможность применения мезенхимных стволовых клеток и внеклеточных везикул в лечении экспериментального туберкулеза почки.

Для осуществления поставленной цели автором сформулировано 4 задачи, соответствующие основным разделам диссертационного исследования.

Научная новизна. Впервые создана мало инвазивная, методологически воспроизводимая экспериментальная модель нефротуберкулеза на кроликах.

Впервые изучена динамика развития специфического процесса и патофизиологических изменений в почке у кроликов в модели экспериментального нефротуберкулеза.



Впервые после однократного внутривенного введения МСК показано их распределение, жизнеспособность и накопление в зоне специфического поражения почки.

Впервые в модели НТ, вызванного штаммами микобактерий туберкулеза (МТБ) с различной лекарственной чувствительностью, показана возможность применения МСК и МСК-ВВ в сочетании с противотуберкулезной терапией.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученная экспериментальная модель нефротуберкулеза позволит проводить доклинические исследования по оценке эффективности противотуберкулезной и патогенетической терапии.

Установленное при экспериментальном моделировании туберкулеза почек нарушение баланса в системе протеиназы/ингибиторы в виде сдвига в сторону протеолиза позволит расширить представления о патогенезе НТ и взаимосвязи биохимических, морфологических, сосудистых и тубулоинтерстициальных изменений.

Выявленное биораспределение МСК позволит прогнозировать миграцию мезенхимных клеток у инфицированных *M. tuberculosis* экспериментальных животных при разработке комплексного лечения нефротуберкулеза.

Доказанная эффективность применения мезенхимных стволовых клеток и их внеклеточных везикул в сочетании с противотуберкулезной терапией позволит снизить распространенность и активность специфического воспаления в почках, а также ускорить процессы репарации при экспериментальном нефротуберкулезе и рассмотреть перспективы апробации в клинических исследованиях.

Личное участие соискателя в получении результатов. Диссертация является результатом самостоятельной работы автора от разработки научной гипотезы и дизайна исследования до постановки цели и задач оценки результатов, подведения итогов, формулировки выводов. Автором проведены поиск и анализ литературы по теме диссертации; выполнены все этапы экспериментальной работы, включая моделирование нефротуберкулеза у кроликов; анализ данных клинических, иммунологических, лучевых, биохимических, морфологических исследований. Автором выполнены статистическая обработка полученных данных, их интерпретация, подготовка научных публикаций и апробация результатов диссертационного исследования.

Достоверность и обоснованность полученных результатов, а также выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, обеспечены четко и адекватно поставленными целью и задачами исследования, методами медицинской математической статистики, а также тщательным анализом полученных результатов.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, 2-х глав собственных наблюдений, заключения, выводов, практических рекомендаций, указателя литературы, содержащего 50 отечественных и 173 зарубежных источников. Работа выполнена на 150 страницах машинописного текста, иллюстрирована 7 таблицами, 33 рисунками.

Во **Введении** обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, степень разработанности темы исследования, методология и методы исследования; положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация полученных

результатов, соответствие диссертации паспорту научной специальности и связь темы диссертации с планом основных научно – исследовательских работ учреждения, внедрение результатов исследования, публикации и личный вклад автора в получение научных результатов, а также сведения о структуре и объеме диссертации.

В **Обзоре литературы** диссертантом проведен анализ современных представлений о туберкулезе почек, включая эпидемиологию, этиологию, патогенез, диагностику, лечение. Представлены данные о возможности экспериментального моделирования туберкулезной инфекции почек. Рассмотрены основные характеристики и механизмы действия мезенхимных стволовых клеток и внеклеточных везикул. Отдельное внимание уделено роли мезенхимных стволовых клеток и внеклеточных везикул в улучшении репаративных процессов в органах и тканях.

В **главе 2** представлены материалы и методы исследования. Автором представлена характеристика экспериментального материала и описаны условия содержания кроликов, а также методы их исследования. Показаны методика подготовки штаммов микобактерий туберкулеза, используемых для заражения; протокол моделирования экспериментального нефротуберкулеза; постановка внутрикожной пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным. Отдельно представлены методика выделения и культивирования мезенхимных стволовых клеток костного мозга; методики оценки внеклеточных везикул, выделенных из мезенхимных стволовых клеток; методика изучения биораспределения мезенхимных стволовых клеток в организме кроликов с нефротуберкулезом; протокол проведения противотуберкулезной терапии и введения мезенхимных стволовых клеток и внеклеточных везикул, выделенные из мезенхимных стволовых клеток. Подробно описаны клинические, биохимические, иммунологические, микробиологические, лучевые, гистологические и морфометрические методы исследования. Перечислены и описаны методы статистической обработки полученных результатов.

В **главе 3** диссертантом описано экспериментальное моделирование нефротуберкулеза после введения *M. tuberculosis* H37Rv в корковый слой нижнего полюса левой почки кроликов. Успешность разработанной экспериментальной модели через 3,5 месяца после заражения была подтверждена статистически значимым дефицитом массы тела, положительной реакцией иммунологической пробы с АТР (эритемой $15,3 \pm 2,8$ мм), визуализацией очага деструкции в левой почке при КТ органов брюшной полости, бактериовыделением в моче ($76,6 \pm 8,3$ КОЕ), выявлением КУМ в препаратах ткани почки при окраске по Цилю - Нельсену, морфологическими признаками туберкулеза почек (наличием каверны, казеозного некроза, гигантских многоядерных клеток Лангханса).

Изучено биораспределение мезенхимных стволовых клеток, меченных SPIONs, методом конфокальной микроскопии при введении в краевую вену уха кроликов, инфицированных *M. tuberculosis* H37Rv. У животных с нефротуберкулезом установлено наличие МСК, меченных наночастицами, в тканях легких, печени, селезенки, но преимущественно - почек; при окраске по Перлсу МСК обнаружены также и в интактных почках.

Рассмотрена эффективность применения МСК в сочетании с противотуберкулезными препаратами (ПТТ) в комплексном лечении

нефротуберкулеза, вызванного лекарственно чувствительным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv. По сравнению с не лечеными кроликами доказана более высокая эффективность лечения нефротуберкулеза у животных через 3,5 месяца комплексного лечения (ПТТ+МСК) в виде статистически значимого снижения маркера острого повреждения почек (креатинина, 74 мкмоль/л) и воспалительного ответа (церулоплазмина, 0,21 г/л), а также положительной динамики по данным морфологического исследования в виде продуктивного характера инфильтрации с сохранением в центральной части участков скопления макрофагов, ангиоматоза, формирования зрелой, волокнистой соединительной ткани на месте очагов некроза при окраске по Ван-Гизону, отсутствия КУМ при окраске по Цилю – Нельсену и ускорения репаративных процессов в виде выявления очагов скопления макрофагов с обилием гемосидерина и мелких клеток с вытянутым ядром и Перлс - позитивными включениями, расположенных как в строме, между коллагеновыми волокнами, так и в стенках мелких сосудов, предположительно МСК. Кроме того, у кроликов, получивших комплексную терапию (ПТТ+МСК) по сравнению с не лечеными животными установлена положительная динамика по данным морфометрии в виде превышения в 1,4-2,4 раза клубочковых параметров (площади внутренней поверхности капсулы Шумлянско-Боумана, площади капсулярного пространства; площади, занимаемой клубочковыми капиллярами).

Интересные данные получены по эффективности применения МСК в сочетании с противотуберкулезными препаратами (ПТТ) в комплексном лечении нефротуберкулеза, вызванного клиническим штаммом лекарственно устойчивой *M. tuberculosis* 5582 генотипа Beijing. По сравнению с не лечеными кроликами доказана более высокая эффективность лечения нефротуберкулеза у животных через 22 недели после инфицирования в виде прироста массы тела, стойкого снижения воспалительного ответа (концентрации альбумина, церулоплазмина, протеиназы, ингибитора катепсина), отсутствия морфологических признаков специфического воспаления и КУМ при окраске по Цилю – Нельсену, ускорения репаративных процессов в виде наличия Перлс-положительных включений (предположительно МСК). Однако сохранялись признаки неспецифического компонента воспаления в виде интерстициальной лимфоцитарной инфильтрации различной выраженности. Кроме того, у кроликов, получивших комплексную терапию (ПТТ+МСК) по сравнению с не лечеными животными установлена положительная динамика по данным морфометрии в виде меньшей ширины мозгового вещества почки, более выраженного склероза стромы, уменьшения диаметра перитубулярных капилляров, снижения диаметра междольковой артерии и толщины стенки лоханки. Развитие интерстициального фиброза в группе кроликов, получивших ПТТ+МСК, возможно связано с дифференцировкой мезенхимных клеток в фибробласты.

Проведен подробный анализ применения внеклеточных везикул, выделенных из мезенхимных стволовых клеток, в терапии нефротуберкулеза, вызванного клиническим штаммом *M. tuberculosis* H37Rv у 20 кроликов-самцов породы «Советская шиншилла». По сравнению с не лечеными кроликами доказана более высокая эффективность лечения нефротуберкулеза у животных через 18 дней и 3,5 месяца комплексного лечения (ПТТ+МСК-ВВ) в виде статистически значимого прироста массы тела, отсутствия зон деструкции по данным КТ почек, снижения уровня альбумина, креатинина, щелочной фосфатазы; повышения уровня

противовоспалительных (IL-4, IL-10) и снижения провоспалительных (INF- γ , TNF- α) цитокинов. Противовоспалительный эффект МСК-ВВ основан на доставке иммуномодулирующих белков к воспалительным иммунным клеткам - дендритным клеткам (ДК), макрофагам М1, клеткам CD4+Th1 и Th17, что обеспечивает их фенотипическую конверсию в толерогенные ДК, иммуносупрессивные М2 макрофаги, а также толерогенные ДК и Т-регуляторные клетки. Кроме того, МСК-ВВ могут активировать аутофагию и/или ингибировать апоптоз, некроз и окислительный стресс в поврежденных клетках почек, способствуя снижению воспаления и регенерации поврежденной ткани. У кроликов, получивших комплексную терапию (ПТТ+МСК-ВВ) по сравнению с не лечеными животными установлена положительная динамика по данным морфометрии в виде статистически значимого уменьшения площади специфического и интерстициального воспаления коркового слоя и коллагеновой зоны мозгового вещества почек, а также высоты эпителия и толщины лоханки. Однако, гистологических различий между группами кроликов с ПТТ и ПТТ+МСК-ВВ не наблюдали.

Отдельно представлены данные протеомного анализа МСК-ВВ в виде списка характерных белков ВВ, выявленных с помощью масс-спектрометрического анализа с указанием их наименования, кластера и биологического действия.

В заключении нашли отражение все разделы диссертационного исследования, объединены наиболее важные данные, полученные автором в процессе экспериментальной научной работы. Выводы и практические рекомендации соответствуют цели, задачам и вытекают из данных, полученных в результате научного исследования.

Результаты диссертационного исследования внедрены в научную и клиническую работу ФГБУ «Санкт–Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» МЗ РФ. Полученные результаты включены в образовательные программы подготовки врачей фтизиатров и урологов 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»).

Автореферат диссертационной работы соответствует всем требованиям к его оформлению, а также содержанию и выводам диссертации.

По материалам диссертации опубликовано 19 печатных работ, в том числе 5 в журналах, включенных в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 2 в зарубежных журналах, индексируемых в международных системах WoS и Scopus, получены 1 патент на изобретение РФ № 2776130 и одно свидетельство о

регистрации базы данных RU 2023622275. 10 работ опубликовано в материалах научно-практических мероприятий различного уровня.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на 8-ми национальных конгрессах и конференциях различного уровня.

Диссертационная работа соответствует плану НИР ФГБУ «Санкт – Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» МЗ РФ в рамках Государственного задания МЗ РФ «Разработка и применение биологических и математических моделей для изучения туберкулеза различных локализаций» (Рег. № НИОКТР 121112600145-2).

Представленная работа соответствует шифру и формуле специальности 3.1.26. Фтизиатрия – области медицинской науки о туберкулезе как инфекционном заболевании человека, области исследования согласно паспорту научной специальности:

п.1. Общие вопросы фтизиатрии

п. 5. Внелегочные формы туберкулеза: диагностика, выявление, тактика ведения, профилактика, лечение

п.7. Фармакологические вещества и лекарственные формы для лечения и профилактики социально значимых заболеваний. Новые биоматериалы и нанотехнологии в лечении социально значимых заболеваний.

Также представленная работа соответствует шифру и формуле научной специальности 3.1.13. Урология и Андрология – науке о мочевыделительной системе и мужском репродуктивном здоровье, области исследования согласно паспорту научной специальности:

п.1 Исследования по изучению этиологии, патогенеза и распространенности урологических и андрологических заболеваний (мочекаменная болезнь, воспалительные процессы; травмы; гидронефроз; стриктуры мочеточника и уретры; кисты почек; склероз шейки мочевого пузыря; инородные тела; врожденные пороки развития мочеполовых органов; расстройства сексуальной функции; бесплодие; варикоцеле; гидроцеле; фимоз; новообразования; нейрогенные расстройства мочеиспускания; недержание мочи; уrogenитальный пролапс; туберкулез мочеполовых органов; реконструктивная и восстановительная хирургия; осложнения урологических и андрологических заболеваний);

п.3. Экспериментальная и клиническая разработка методов лечения урологических и андрологических заболеваний и внедрение их в клиническую практику.

Работа выполнена на высоком современном научном и методическом уровне. Принципиальных замечаний по диссертационной работе А.Н. Ремезовой нет.


ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Ремезовой Анны Николаевны на тему «Применение мезенхимных стволовых клеток в комплексном лечении туберкулеза почек (экспериментальное исследование)», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям: 3.1.26. Фтизиатрия, 3.1.13. Урология и андрология, является законченной научно – квалификационной работой, в которой содержится решение важной актуальной научной проблемы - обоснования возможности применения мезенхимных стволовых клеток и их внеклеточных везикул в лечении туберкулеза почек для снижения распространенности и активности специфического воспаления, а также ускорения

процессов репарации при экспериментальном нефротуберкулезе и рассмотрения перспектив апробации в клинических исследованиях, что имеет важное научное и практическое значение для фтизиатрии и урологии.

По актуальности, научной новизне, объему исследования диссертационная работа Ремезовой Анны Николаевны на тему «Применение мезенхимных стволовых клеток в комплексном лечении туберкулеза почек (экспериментальное исследование)», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ от 24.09.2013г. №842 в редакции Постановления Правительства РФ от 21.04.2016г. №335), предъявляемых к кандидатским диссертациям, а ее автор Ремезова Анна Николаевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям: 3.1.26. Фтизиатрия, 3.1.13. Урология и андрология.

Официальный оппонент:

Ведущий научный сотрудник
отдела иммунологии ФГБНУ «ЦНИИТ»,
доктор медицинских наук  Каюкова Светлана Ивановна (3.1.26. Фтизиатрия)

"10" сентября 2024 года

Почтовый адрес: 107564, Россия, Москва, Яузская аллея, д.2, ФГБНУ
«Центральный научно – исследовательский институт туберкулеза»
Телефон: +7(915)396-85-34 E-mail: kajukovalnp@gmail.com

Подпись д.м.н. Каюковой Светланы Ивановны заверяю

Ученый секретарь Ученого Совета
ФГБНУ «ЦНИИТ», к.п.н.  Золотова Наталья Владимировна

