

Патофизиологические особенности репаративных процессов при адъювантной терапии туберкулеза почек внеклеточными везикулами в эксперименте

А.Н. Муравьев^{1,2}, А.Н. Ремезова¹, Т.И. Виноградова¹, Н.В. Орлова¹,
Н.М. Юдинцева³, П.К. Яблонский^{1,4}

¹Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии

²Санкт-Петербургский медико-социальный институт

³Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург

⁴Санкт-Петербургский государственный университет

Pathophysiological features of reparative processes in adjuvant therapy of renal tuberculosis with extracellular vesicles in an experiment

A. Muraviev^{1,2}, A. Remezova¹, T. Vinogradova¹, N. Orlova¹,
N. Yuditseva³, P. Yablonskiy^{1,4}

¹St.Petersburg Research Institute of Phtisiopulmonology

²St. Petersburg Medico-Social Institute

³The Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg

⁴St. Petersburg State University

© Коллектив авторов, 2024 г.

Резюме

В настоящее время различные исследования сосредоточены на потенциале стволовых клеток в качестве адъювантной терапии туберкулеза. Кроме того, наблюдается значительный интерес к применению внеклеточных везикул (ВВ), поскольку в сравнении с цельноклеточной терапией ВВ, полученные из мезенхимных стромальных клеток (МСК), имеют много преимуществ, таких как хорошая переносимость, низкая иммуногенность, отсутствие риска злокачественного новообразования, более стабильная мембранная структура, чем у МСК и т.д. Эти преимущества открывают широкие перспективы для лечения большого числа заболеваний. В настоящем исследовании мы изучили белковый состав внеклеточных везикул и оценили их терапевтический потенциал на кроличьей модели ту-

беркулеза почек в сочетании со стандартным противотуберкулезным лечением. **Материалы и методы.** В исследовании были использованы 20 кроликов с туберкулезом почек, которым внутривенно вводились внеклеточные везикулы, выделенные из мезенхимных стволовых клеток. Терапевтическую эффективность оценивали путем анализа изменений уровня провоспалительных цитокинов, а также с помощью компьютерной томографии почек с последующим гистологическим и морфометрическим исследованием. Белковый состав внеклеточных везикул определялся с помощью методов жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. **Результаты.** Дополнение внеклеточных везикул к стандартному противотуберкулезному лечению приводило к статистически значимому увеличению противовоспалительных цитокинов

и снижению провоспалительных цитокинов, а также к значительному уменьшению площади специфического воспаления в сравнении с группами с традиционным лечением, что во многом обусловлено белками, входящими в состав внеклеточных везикул. **Заключение.** Применение внеклеточных везикул в качестве компонента комплексной противотуберкулезной терапии повышает эффективность лечения туберкулеза почек за счет ускорения репаративных процессов в зоне специфического воспаления.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, внеклеточные везикулы, туберкулез почек

Summary

Currently, various studies are focusing on the potential of stem cells as adjuvant therapy for tuberculosis. In addition, there is significant interest in the use of extracellular vesicles (EVs), since compared with whole-cell therapy, EVs derived from mesenchymal stromal cells (MSCs) have many advantages such as good tolerability, low immunogenicity, no risk of malignancy, more stable membrane structure than MSCs, etc. These advantages open up broad prospects for the treatment of a large number of diseases. In the present study, we investigated the protein composition of extracellular vesicles and assessed their

therapeutic potential in a rabbit model of renal tuberculosis in combination with standard anti-TB treatment. **Materials and methods.** The study involved 20 rabbits with renal tuberculosis, which were intravenously injected with extracellular vesicles isolated from mesenchymal stem cells. Therapeutic efficacy was assessed by analyzing changes in the level of anti- and pro-inflammatory cytokines, as well as by computed tomography of the kidneys with subsequent histological and morphometric examination. The protein composition of extracellular vesicles was determined using liquid chromatography and mass spectrometry. **Results.** The addition of extracellular vesicles to standard anti-tuberculosis treatment resulted in a statistically significant increase in anti-inflammatory cytokines and a decrease in pro-inflammatory cytokines, as well as a significant decrease in the area of specific inflammation compared to groups with standard treatment, which was largely due to the proteins included in the extracellular vesicles. **Conclusion.** The use of extracellular vesicles as a component of complex anti-tuberculosis therapy increases the effectiveness of renal tuberculosis treatment by accelerating reparative processes in the area of specific inflammation.

Keywords: mesenchymal stem cells, extracellular vesicles, renal tuberculosis

Введение

Почечная патология является одной из глобальных проблем общественного здравоохранения, затрагивающей свыше 750 млн человек повсеместно [1]. К одной из угроз здоровью почек относят нефротуберкулез (НТ). НТ диагностируется поздно (77,6%), когда у больных уже развиваются те или иные осложнения [2, 3]. Фиброзные процессы, характерные для длительного течения специфического воспаления, приводят к хронической болезни почек у 5,7% пациентов [4], а также требуют выполнения реконструктивных операций на верхних мочевых путях или нефрэктомии [5]. В связи с этим актуальность изучения поражения почек при НТ не оставляет сомнений.

Для восстановления структуры и функции поврежденных органов и тканей все чаще используется клеточная терапия, основанная на трансплантации мезенхимных стволовых клеток (МСК) и выделенных из них внеклеточных везикул (МСК-ВВ) в пораженный орган [6]. МСК-ВВ имеют высокий профиль безопасности, обладают низкой иммуногенностью и высокой биосовместимостью [7–9], а также содержат активные молекулы, поддерживающие иммунный ответ [интерлейкин-6 (IL-6), IL-10] и обладающие противовоспалительным действием (IL-4, IL-13, фактор

некроза опухоли альфа — TNF- α), противовирусным/антибактериальным (лизозим и т.д.) эффектами и способствуют восстановлению эпителия и регенерации тканей (трансформирующий фактор роста) [10–12]. При туберкулезе почек трансплантация МСК-ВВ потенциально может оказывать существенное влияние на воспалительную реакцию и скорость репарации [12]. В этой связи особую актуальность представляет экспериментальная разработка подходов к использованию МСК-ВВ, направленная на сохранение функционирующей почечной паренхимы.

Материалы и методы исследования

Лабораторные животные. В исследование включены результаты наблюдения (рис. 1) за 20 кроликами-самцами породы шиншилла (поступление животных из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» ФГБУ «Национальный центр «Курчатовский институт»), которые содержались в условиях сертифицированного вивария на базе ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами». На проведение настоящего исследования получено разрешение Независимого этического комитета ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России.

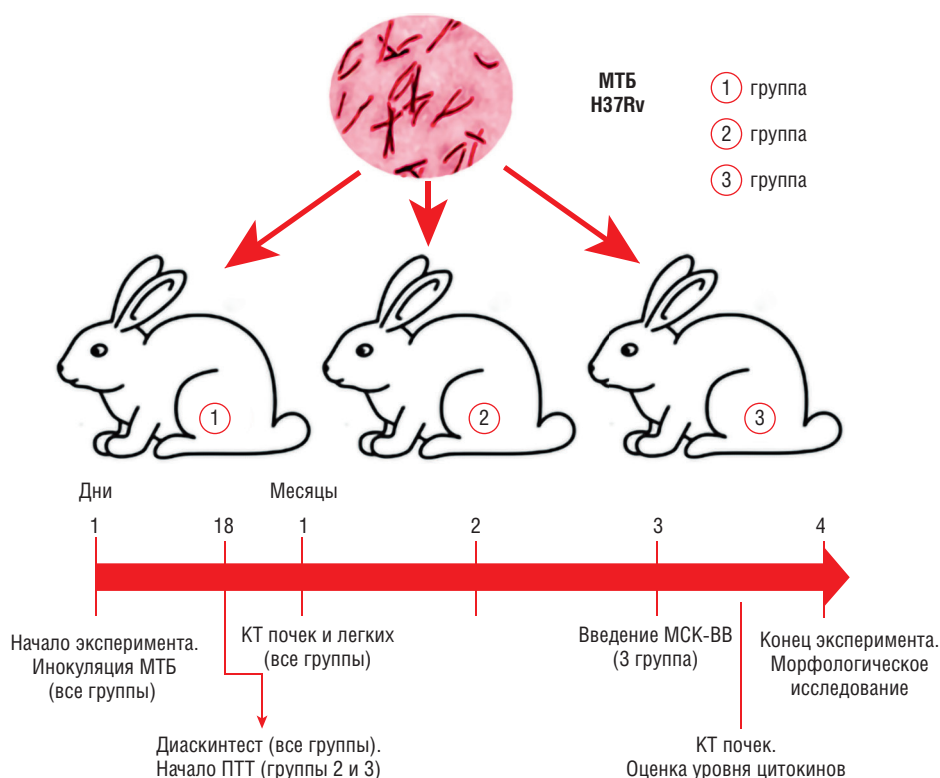


Рис. 1. Дизайн исследования

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

Визуализацию МСК-ВВ осуществляли с помощью ТЭМ Libra 120 (Carl Zeiss, Оберкохен, Германия). Для получения электронных микрофотографий использовали метод окрашивания 1% водным раствором уранилацетата (АО ВЕКТОН, Россия). Гидродинамический размер МСК-ВВ оценивали методом динамического рассеяния света с использованием Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Малверн, Великобритания); общий белок МСК-ВВ — на спектрофотометре NanoDrop One (Fisher Scientific, Массачусетс, США). Для определения общего количества белка в ВВ был применен анализ Брэдфорда. Измерение оптической плотности проводили при 595 нм.

Идентификация и определение белкового состава внеклеточных везикул. Для обнаружения некоторых характерных белков МСК-ВВ применяли вестерн-блоттинг. Использовали первичные антитела против Hsp70,

антитела против CD63, антитела против CD9. На следующий день мембраны инкубировали с вторичными антителами (Cell Signaling Technology, 7074P2, 1:10000). В дальнейшем хемилюминесцентные сигналы вестерн-блота усиливали с использованием набора Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (34095, Thermo Scientific, США) и записывали в режиме накопления сигнала с помощью системы Chemi Doc Touch Imaging System (Bio-Rad, США).

Протеомный профиль МСК-ВВ исследовали с помощью жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (МС). Использовали систему Ultimate 3000 Nano LC (Thermo Fisher Scientific, США), соединенную с масс-спектрометром Q Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, США) через источник наноэлектроспрея (Thermo Fisher Scientific, США). Для последующего анализа данных необработанные файлы МС анализировали с помощью Peaks studio 10.0 (Bioinformatics Solutions Inc.). Идентификацию белков осуществляли путем поиска по базе данных *Oryctolagus cuniculus* Uniprot FASTA версии от 09.07.2021. Список белков, выявленных с помощью МС, загружали в онлайн-инструмент поиска STRING88 с целью получения сети белковых взаимодействий (protein-protein interaction, PPI). В результате мы получили сеть с количеством узлов, равным 302. Белковые комплексы идентифицировали с помощью марковского алгоритма кластеризации [13]. Каждому кластеру с более чем

двумя белками было присвоено название (биологический процесс, белковый комплекс или функциональная группа). Для графического отображения сеть PPI была загружена в программу Gephi.

Инфицирование животных. Протокол моделирования включал несколько стадий [14].

1-я стадия — обеспечение анестезиологического пособия: использовался тилетамин гидрохлорид/золазепам гидрохлорид (Zoletil, Virbac SA, Франция) в дозе 25 мг/кг внутривенно; миорелаксант ксилазина гидрохлорид (Ксила, Bioveta, Чехия) в виде 2% раствора внутримышечно в объеме 1,0–1,5 мл.

2-я стадия — фиксация лабораторного животного на специальном станке.

3-я стадия — удаление шерсти в области локализации левой почки.

4-я — осуществление хирургического доступа: кожный покров обрабатывали дважды 5% раствором йода; с применением ультразвукового контроля (на аппарате Samsung Medison RS80A-RUS с использованием линейного датчика) выполняли тонкоигольную пункцию коркового слоя паренхимы нижнего полюса левой почки и инокулировали суспензию микобактерий *M. tuberculosis* H37Rv в дозе 10⁶ микробных клеток/0,2 мл; место инъекции обрабатывали 5% раствором йода.

Профилактика инфекционных осложнений проводилась в течение 5 дней с использованием цефазолина курсом (в дозе 50 тыс. ЕД/кг, 1,5 мл внутримышечно, АО «Фармасинтез», Россия).

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 изотонического раствора натрия хлорида 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.

После верификации туберкулезного процесса в почках кролики были разделены на несколько групп с помощью онлайн-генератора случайных чисел: 1-я группа — кролики, зараженные без последующего лечения (контроль заражения, n=6); 2-я группа — кролики, получающие лечение только противотуберкулезными препаратами в средних терапевтических дозах (контроль лечения, n=7); 3-я группа — животные, получавшие противотуберкулезную терапию в комплексе с МСК-ВВ (экспериментальная, n=7).

Противотуберкулезная терапия (ПТТ) во 2-й и 3-й группах была начата через 21 день после заражения. Противотуберкулезные препараты назначали в соответствии с чувствительностью используемых для инфицирования штаммов МБТ: 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). Длительность ПТТ составила 3 мес.

Через 2 мес после начала стандартной ПТТ кроликам 3-й группы в латеральную вену уха вводили суспензию МСК-ВВ (концентрация белка 0,2 мг/мл) в объеме 0,2 мл.

Через 24 ч, 1, 2 и 4 нед после введения МСК-ВВ у кроликов всех групп были взяты образцы крови для оценки концентрации интерлейкина IL-4, IL-10, INF-γ и TNF-α в плазме периферической крови методом иммуноферментного анализа (ИФА) по протоколу производителя (Cloud-Clone Corp., Техас, США).

Компьютерную томографию (КТ) почек и легких проводили на томографе Toshiba One Aquilion через 30 дней после инокуляции инфекта с целью оценки состояния ткани почек, а также дополнительно выполняли КТ почек через 3 мес от начала лечения для оценки эффективности терапии. КТ выполняли совместно с болюсным введением контрастного вещества Ультравист-370 (4 мл со скоростью 1 мл/мин) в краевую ушную вену. Затем в течение 30 с получали последовательные изображения брюшной полости, которые служили основой для карты перфузии. Сканирование проводилось в программе Pediatric 1,0 при заранее установленных настройках.

Через 4 мес от начала эксперимента животных подвергали эвтаназии путем введения в краевую ушную вену анестезирующих средств в дозах, превышающих среднюю терапевтическую: натрия тиопентала (250 мг) и пипекурония бромида (1 мг).

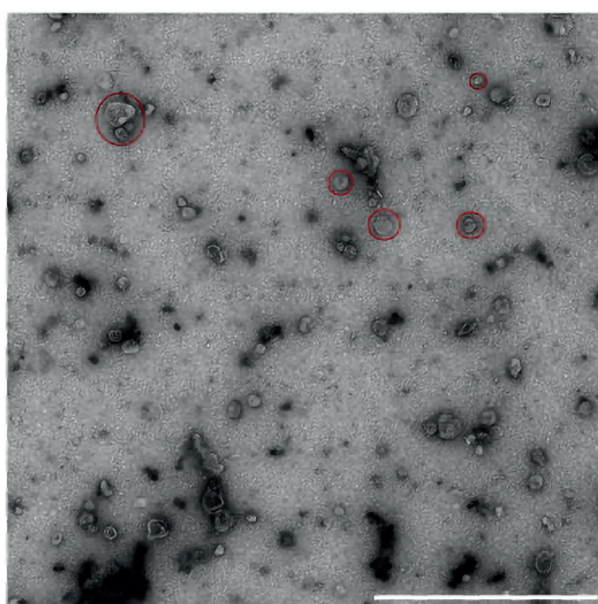
Микроскопическое и морфометрическое исследование проводили на срезах почек, окрашенных гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону и по Цилю–Нельсену. Микропрепараты сканировали (Leica Aperio AT2 (LEICAMICROSYSTEMS, Германия; объектив: 20×/0.75 PlanApo) и анализировали с использованием программного обеспечения Aperio Image Scope. Морфометрическое исследование проводили с использованием программы NIH Image J версии 1.52a (National Institutes of Health, США). Определяли ширину коркового и мозгового вещества, площадь специфического воспаления, некротических очагов, воспалительной инфильтрации и площадь участков фиброза, толщину стенки лоханки и толщину эпителия лоханки, параметры клубочков, диаметр проксимальных и дистальных канальцев, междольковой артерии и вены.

Методы статистической обработки результатов. Результаты морфометрического и биохимического исследований 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.

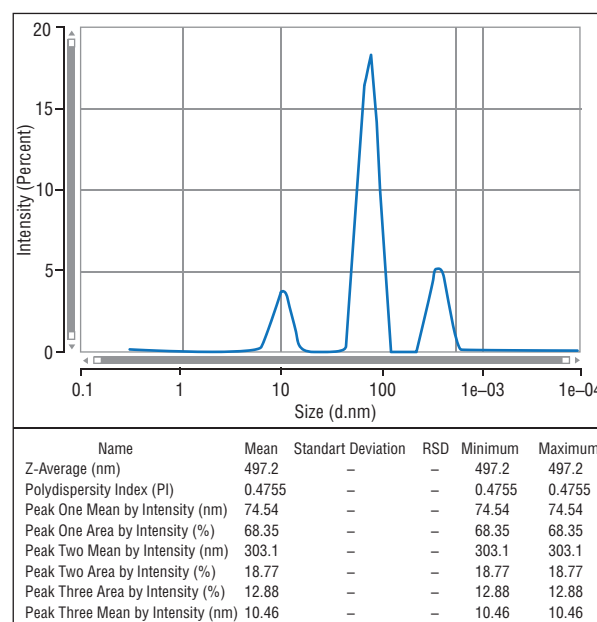
Результаты исследования

Протеомный профиль внеклеточных везикул

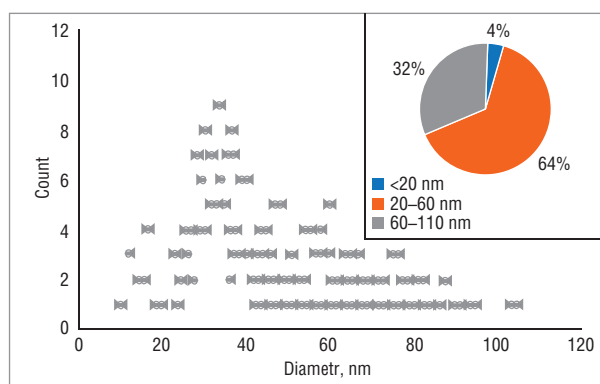
Оценка МСК-ВВ. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) выявлено, что МСК-ВВ имеют сферическую морфологию (рис. 2, а), диаметр достигал 105 ± 5 нм (при этом 70% наблюдаемых везикул имели диаметр до 60 ± 3 нм) (рис. 2, б). По данным динамического светорассеяния раствора МСК-ВВ, три группы ВВ имели диапазон диаметров 10–300 нм ($10 \pm 0,5$; $70 \pm 5,1$; $300 \pm 3,3$ нм) (рис. 2, 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 ВВ-специфичных маркеров,



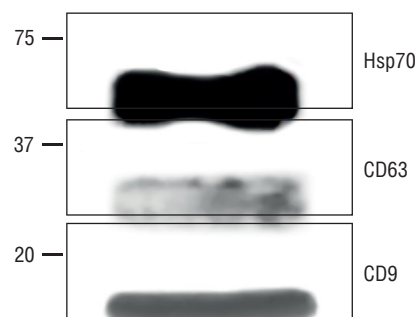
а



б



в



г

Рис. 2. Характеристика МСК-ВВ: 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 ≤ 20 , 20–60 и 60–110 нм; в — гидродинамическое распределение МСК-ВВ по размерам, измеренное с помощью ДСР. 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 наличие специфичных маркеров Hsp70, CD63 и CD9

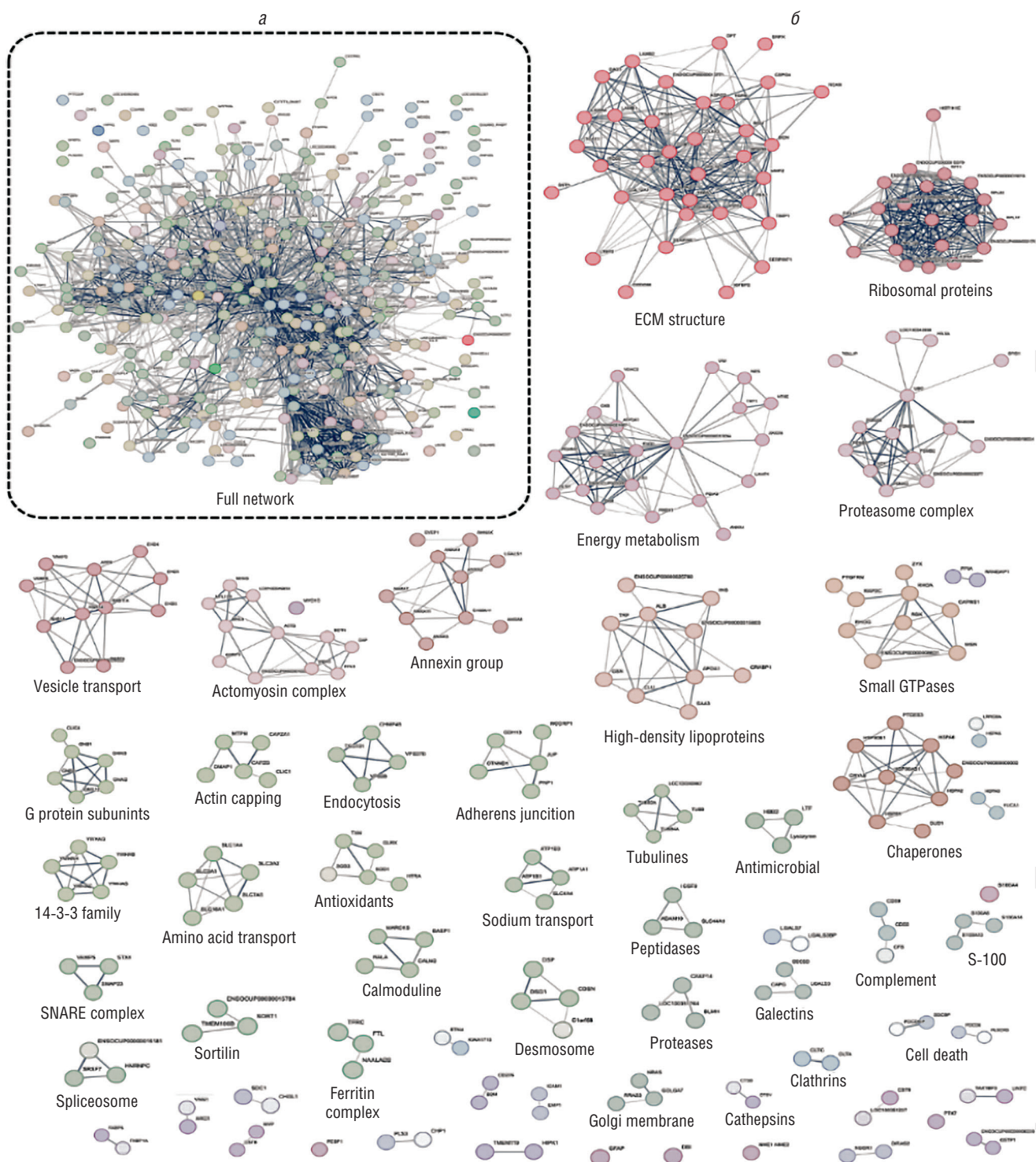


Рис. 3. PPI-анализ протеома МСК-ВВ, полная сеть STRING PPI (а) была разделена на кластеры с помощью Марковского алгоритма кластеризации (б). Для каждого кластера, содержащего более двух белков, присвоенное имя представляет одну из трех субонтологий (биологический процесс, белковый комплекс или функциональная группа). Отдельные кластеры представлены разными цветами

включая Hsp70, CD63, CD9 (рис. 2, з). Концентрация общего белка в зондах МСК-ВВ (n=3) составляла 200 мкг/мл.

Характеристика протеома МСК-ВВ методом масс-спектрометрии. Всего было идентифицировано 473 белка, включая биомаркеры ВВ, белки теплового

шока, аннексины и CD63 (рис. 3). Кластеризация выявила 32 группы, среди которых тремя крупнейшими были белки внеклеточного матрикса (БВМ), протеасомный комплекс и группа белков энергетического метаболизма (рис. 3, б). Среди протеома МСК-ВВ обнаружены

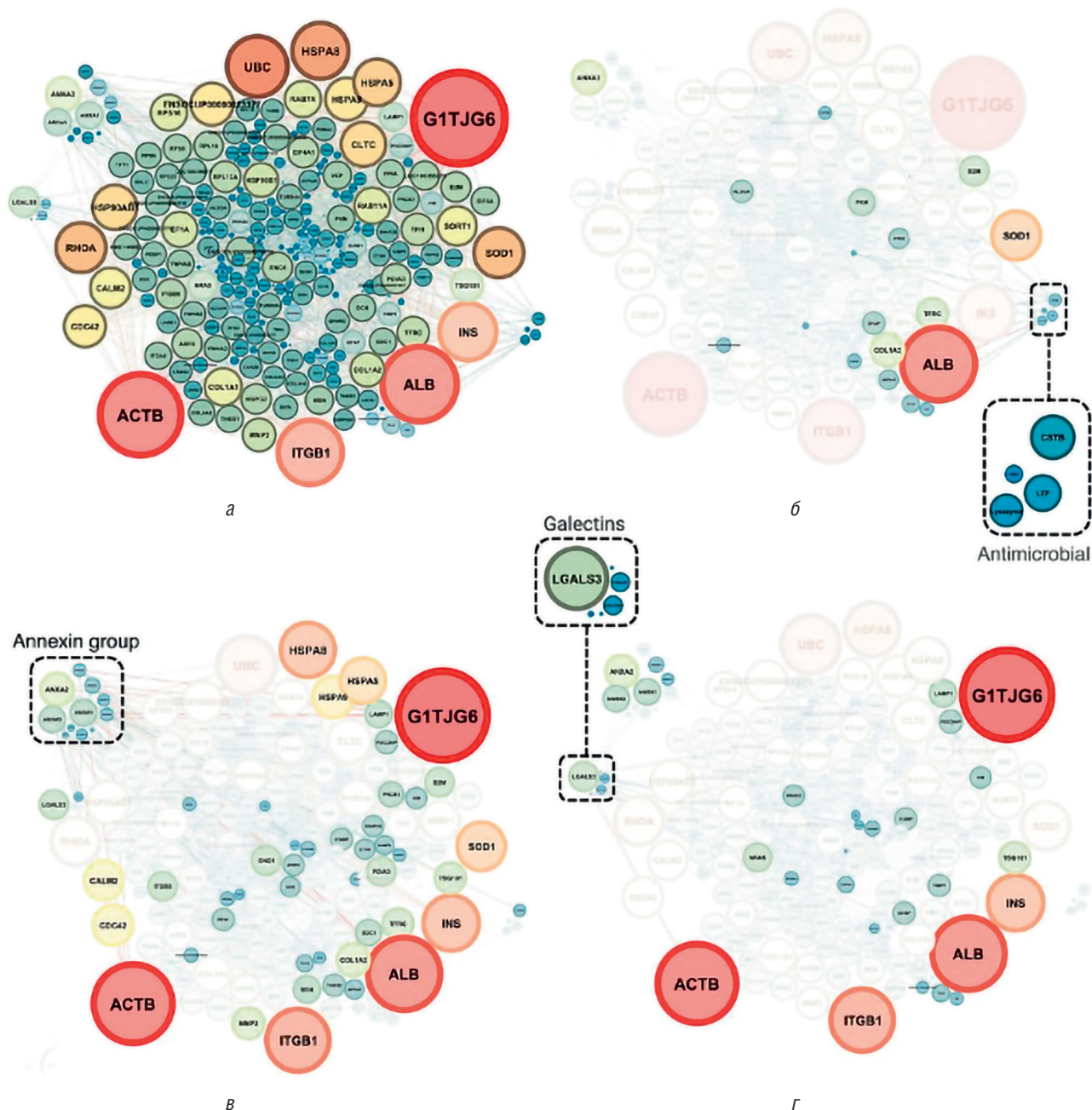


Рис. 4. Сеть PPI протеома МСК-ВВ, извлеченная из базы данных STRING, с размерами узлов, масштабированными в соответствии с принадлежностью узла (а). Из полученной сети были выделены некоторые белковые кластеры, при этом отмечены только те белки, которые взаимодействуют с белками кластера согласно базе данных STRING: антимикробные (б), группа аннексинов (в) и галектины (г)

белки, о которых известно, что они связаны с антимикробной и противовоспалительной активностью, а также белки, участвующие в иммунном ответе (рис. 4). Некоторые из этих белков перечислены в табл. 1.

Патофизиологические изменения инфекционного процесса под воздействием внеклеточных везикул

Оценка иммунологических показателей в плазме периферической крови кроликов. Минимальный уро-

вень противовоспалительных цитокинов (IL-4 и IL-10) на протяжении всего периода наблюдения выявлен в 1-й группе. На 1-е сутки после введения МСК-ВВ уровень IL-4 был самым высоким в 3-й группе по сравнению с 1-й и 2-й группами. Однако через 4 нед различий между уровнем IL-4 во 2-й и 3-й группах не было (табл. 2). Значение уровня IL-10 в 1-й группе было самым низким и в дальнейшем медленно снижалось (с 7,15 до 6,41 пг/мл). В то же время во 2-й и 3-й группах уровень IL-10 был в разы выше, чем в 1-й группе.

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

Наименование белка	Кластер	Биологическое действие
<ul style="list-style-type: none"> Субъединица гемоглобина бета-2. Лактотрансферрин. Лизоцим. Цистатин В 	Противомикробный	<ul style="list-style-type: none"> Иммунный ответ. Антимикробная защита. Регуляция воспаления. Модуляция цитоскелета
Аннексин А	Группа аннексинов	Противовоспалительный ответ
<ul style="list-style-type: none"> Аполипопротеин Е. Аполипопротеин А-I 	Липопротеины высокой плотности	Связывание липидов
<ul style="list-style-type: none"> Галектин. Галектин-3 	Галектины	<ul style="list-style-type: none"> Клеточная адгезия. Воспалительная реакция

Таблица 2

Концентрация цитокинов в плазме крови кроликов с экспериментальным нефротуберкулезом (пг/мл)

Показатели	Экспериментальные группы											
	1				2				3			
	1 день	1 нед	2 нед	4 нед	1 день	1 нед	2 нед	4 нед	1 день	1 нед	2 нед	4 нед
IL-4	16,77	13,3	12,1	10,4	17,95	15,61	14,87 [*]	14,07	18,36 [*]	16,87	15,32	14,09 [*]
IL-10	7,15	7,80	8,58	6,41	17,02 ^{**}	18,45	18,36 [*]	50,36 [*]	50,66	40,77	47,11 ^{**}	78,23 [*]
INF-γ	53,06	57,81	71,1	48,26	30,66	53,29 [*]	55,27	36,53 [*]	30,12	37,31	54,51	31,2 ^{**}
TNF-α	29,19	29,43	22,57	22,71	18,58	15,9	15,41 ^{**}	15,45 [*]	18,02	15,99 [*]	5,95 [*]	5,78 [*]

Примечание. Статистически значимые различия, показанные для групп по сравнению с 1-й группой: *0,05>p>0,01; **0,01>p>0,001; сроки указаны от введения МСК-ВВ.

Через 4 нед он еще более значительно увеличился (50,36 и 78,23 пг/мл).

Во всех группах максимальный уровень провоспалительного цитокина TNF-α выявлен в течение первой недели. Однако его значение было самым высоким в 1-й группе (71,1 пг/мл) по сравнению со 2-й и 3-й группами (55,27 и 54,51 пг/мл). В первые сутки уровень INF-γ для 2-й и 3-й групп не имел различий и был ниже по сравнению с 1-й группой. Через 4 нед во 2-й и 3-й группах наблюдалось статистически значимое снижение INF-γ по сравнению с 1-й группой, что может свидетельствовать об эффективности лечения туберкулеза (табл. 2).

Оценка гистологических показателей. У животных 1-й контрольной группы (инфицированных и нелеченых) размер левой почки был больше, чем правой. Кортикальный и мозговой слои дифференцированы, лоханка расширена (рис. 5, е). Участок казеозного некроза (около 40,6 мм²) выявлялся преимущественно в мозговом веществе. На границе казеозно-некротических масс сформировалась соединительнотканная капсула (рис. 5, б). Активное специфическое воспаление с макрофагально-лимфоцитарной инфильтрацией (рис. 5, б) наблюдалось во всех исследуемых группах только в левой, но не в правой почке. Однако кислотоустойчивые микобактерии (КУМ) были выявлены только в 1-й груп-

пе. У животных 2-й и 3-й групп не выявлено различия в размерах левой и правой почек (рис. 5, а). Кортикальный и мозговой слои 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 2-й и 3-й групп по сравнению с 1-й группой. Следует отметить, что площадь специфического воспаления в 3-й группе (0,34±0,04 мм²) была более чем в 120 раз меньше по сравнению с 1-й (40,6±3,5 мм²) и 2-й (6,5±9,5 мм²) группами соответственно (рис. 5, з, д; табл. 3).

По большинству количественных показателей клубочков почек между животными 2-й и 3-й групп достоверных различий не выявлено. Однако некоторые показатели, такие как диаметр капилляров клубочков у животных 2-й и 3-й групп (5,4±1,1 и 5,5±1,3 мкм) по сравнению с 1-й группой (9,8±0,9 мкм), могут быть признаком застоя в инфицированной почке (рис. 5, д). Во 2-й и 3-й 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 1-й группе

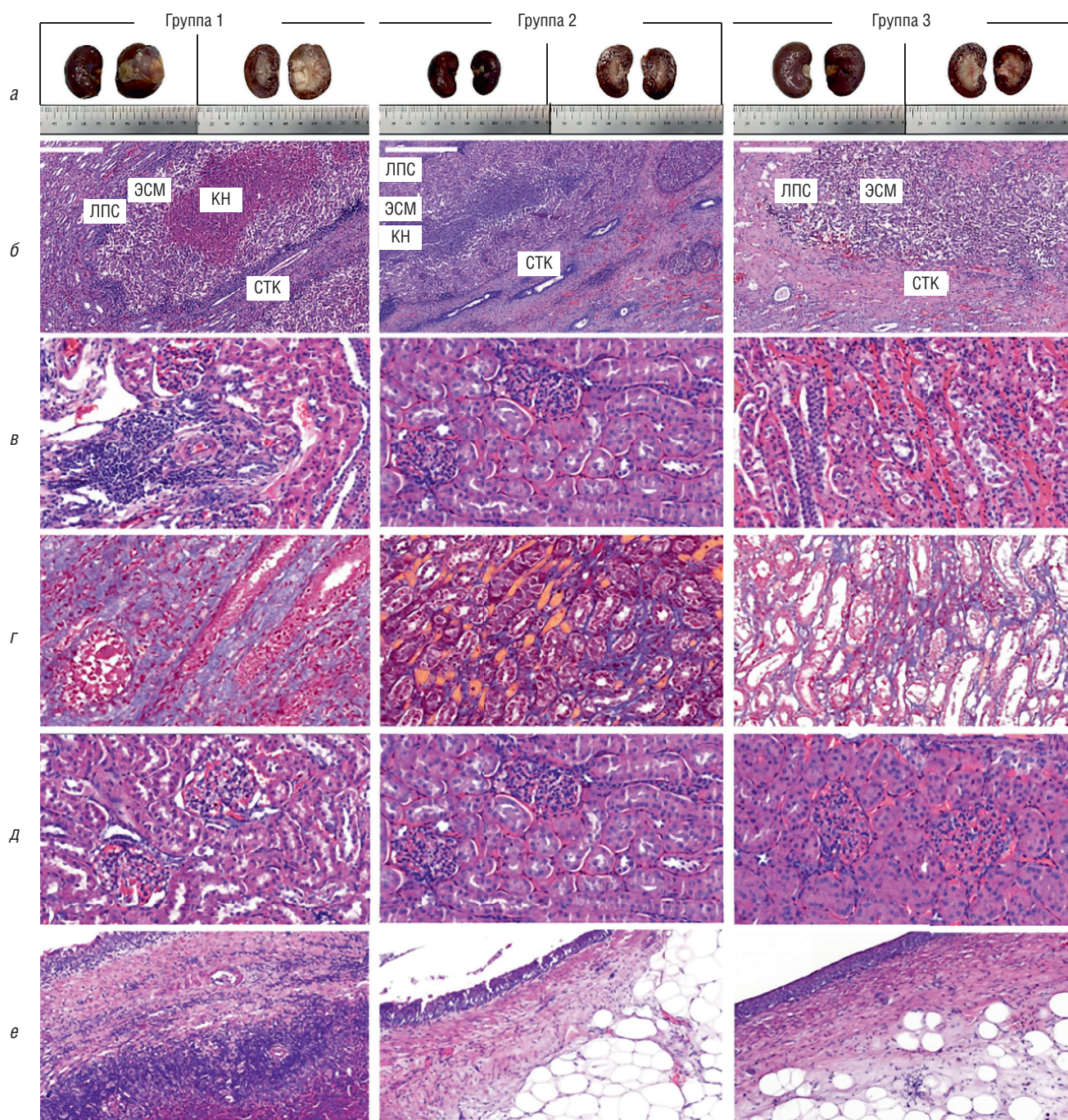


Рис. 5. Гистологический срез почки: *а* — макрофотографии почки: орган целиком (левый столбец); поперечное сечение (правый столбец); инфицированная почка (слева), контрольная почка (справа); *б* — активное специфическое воспаление почки: казеозный некроз (КН); эпителиоидный слой макрофагов (ЭСМ); лимфоцитно-плазматический 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*)

(74,5 и 743,7 мкм) (рис. 5, *е*). Эти показатели свидетельствуют о меньшей степени ремоделирования и инфильтрации стенки почечной лоханки, особенно для 3-й группы. Количественные параметры почечной сосудистой сети существенно не изменились в группе животных, как получавших, так и не получавших лечение, за исключением толщины стенки междольковой

вены и ее диаметра, который был меньше для 1-й группы по сравнению с другими группами.

Компьютерная томография почек в 1-й группе показала наличие инфильтрации почки с массивной гиповаскулярной зоной в корковом и мозговом слоях и вовлечением прилегающей жировой клетчатки. Наблюдалось сморщивание стенки за счет рубцевания,

Количественные показатели структурных изменений почек

Исследуемые показатели	Исследуемые группы			p
	1	2	3	
Ширина коркового вещества мм	4,1±0,42	3,5±0,37	3,3±0,31	0,30
Ширина мозгового вещества, мм	9,3±0,8	12,1±2,1	11,8±1,3	0,48
Площадь специфического воспаления, мм ²	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 2-й и 3-й групп с 1-й группой.

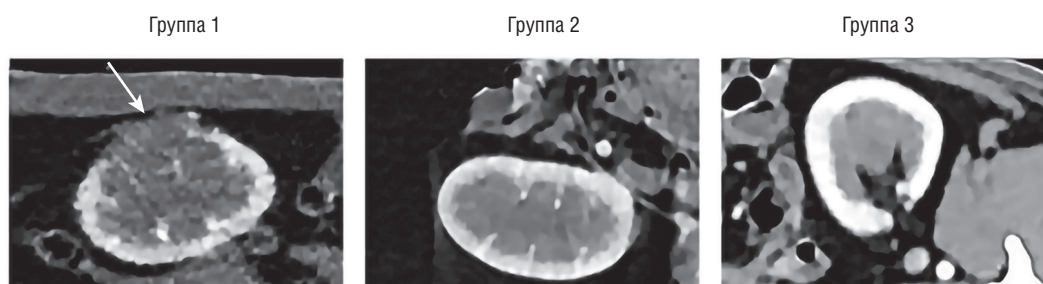


Рис. 6. КТ почек, кортикомедуллярная фаза: в 1-й группе имеется массивная гиповаскулярная зона, во 2-й и 3-й группах изменений нет. Стрелка указывает на патологические изменения в почке

истончение коркового слоя и фиброзные поствоспалительные изменения. Однако зон деструкции и инфильтрации в паренхиме, а также зон пониженной перфузии во 2-й и 3-й группах не выявлено (рис. 6).

Итак, полученные данные подтверждают 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. Таким образом, МСК-ВВ могут стать перспективным компонентом комплексного лечения различных инфекционных заболеваний, в частности нефротуберкулеза.

Обсуждение результатов

Терапевтический эффект МСК-ВВ может быть связан с белками, обладающими противомикробным, противовоспалительным и иммуномодулирующим действием. Ряд исследований показал, что терапевтический потенциал МСК-ВВ связан с антибактериальной активностью клеток, направленной против различных возбудителей посредством секреции антимикробных пептидов [7, 8, 15]. В составе МСК-ВВ обнаружены некоторые антимикробные пептиды, которые выполняют

многочисленные биологические функции, включая модуляцию иммунных ответов, а также обладают противомикробным, противовирусным, антиоксидантным и противовоспалительным действием.

Анализ протеома МСК-ВВ выявил некоторые белки с антимикробными свойствами, такие как НВВ2, ЛТФ, лизоцим и цистатин В, а также 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, а также играет многофункциональную роль в иммунитете, воспалении, апоптозе, вирусной, бактериальной инфекции и т.д. [16–18].

Галектины представляют собой семейство эндогенных гликансвязывающих белков, которые выполняют множество функций, включая регуляцию воспалительного ответа и модуляцию процессов, связанных с фиброзом. Галектин-3 обладает противомикробной активностью в отношении бактерий и грибов, а также обладает иммуногенными свойствами [19]. 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 [20].

T-клеточный иммунитет, опосредованный такими цитокинами, как IFN- γ и TNF- α , играет ключевую роль в контроле туберкулезной инфекции [21]. Максимальный уровень провоспалительных цитокинов (IFN- γ и TNF- α), выявленный для 1-й группы, свидетельствует о наличии активной формы туберкулеза. Хотя иммунологические механизмы туберкулеза еще не до конца изучены, некоторые исследования показали, что T-клетки, продуцирующие IFN- γ /TNF- α , связаны с активным туберкулезом [22].

Противовоспалительный эффект МСК-BB 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 дендритные клетки, иммуносупрессивные M2 макрофаги, а также в T-регуляторные клетки. Кроме того, МСК-BB могут активировать аутофагию и/или ингибировать апоптоз, некроз и окислительный стресс в поврежденных клетках, особенно клетках почек, способствуя их протекции и регенерации. Результаты исследования показали, что введение МСК-BB, вероятно, может индуцировать продукцию противовоспалительных цитокинов (IL-4 и IL-10) и снижать уровень провоспалительных цитокинов (то есть IFN- γ , TNF- α).

Данные гистологических методов исследования не показали достоверной разницы между группой, получавшей лечение только ПТТ, и группой, получавшей ПТТ в комплексе с МСК-BB, поскольку у животных этих групп были минимальные признаки воспаления.

Морфометрический анализ выявил существенные различия между 2-й и 3-й 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-BB.

Значительное уменьшение площади специфического воспаления, нормализация биохимических показателей, повышение уровня противовоспалительных и снижение уровня провоспалительных цитокинов может указывать на иммуномодулирующие свойства МСК-BB и позволяет рассматривать их как перспективный компонент в комплексной терапии туберкулеза.

Выводы

В протеомном профиле внеклеточных везикул обнаружены белки, которые связаны с антимикробной и противовоспалительной активностью, белки, участвующие в иммунном ответе, а также идентифицированы факторы роста.

Терапия противотуберкулезными препаратами в сочетании с внеклеточными везикулами приводила к значимому повышению уровня противовоспалительных цитокинов IL-4, IL-10, сокращению распространенности туберкулезного процесса в тканях инфицированной почки и уменьшению его активности.

Дополнение стандартной противотуберкулезной терапии системным введением внеклеточных везикул мезенхимных стромальных клеток повышает эффективность комплексного лечения туберкулеза почек за счет ускорения репаративных процессов в зоне специфического воспаления.

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. [Akimenko M.A. Pathogenetic mechanisms of nephron changes in unilateral upper urinary tract obstruction in an experiment: diS.... kand. med. nauk: 3.3.3 / Akimenko Marina Anatolevna. Rostov-na-Donu, 2023; 15–26 (In Russ.)].
2. Кульчавеня Е.В. Туберкулез как заболевание, передающееся половым путем: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2023. 160 с. [Kulchavenya E.V. Tuberculosis as a Sexually Transmitted Disease: A Guide for Physicians. Moscow: GEOTAR-Media, 2023; 160 (In Russ.)]. doi: 10.33029/9704-7559-1-KEV-2023-1-160.
3. Merchant S., Bharati A., Merchant N. Tuberculosis of the genitourinary system-Urinary tract tuberculosis: Renal tuberculosis-Part I. Indian Journal of Radiology and Imaging 2013; 23 (1): 46–63. doi: 10.4103/0971-3026.113615.
4. Park M., Kon O.M. Use of Xpert MTB/RIF and Xpert Ultra in extrapulmonary tuberculosis. Expert review of anti-infective therapy 2021; 19 (1): 65–77. doi: 10.1080/14787210.2020.1810565.
5. Mittal A. et al. Surgical management of genitourinary tuberculosis: Our experience and review of literature. Polish Journal of Surgery 2020; 92 (6): 1–6. doi: 10.5604/01.3001.0014.3579.
6. Виноградова Т.И. и др. Свидетельство о гос. регистрации базы данных № 2023622275. Эффективность мезенхимных стволовых клеток в комплексной терапии экспериментальной туберкулеза почек с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя / Виноградова Т.И., Муравьев А.Н., Эсмедяева Д.С., Дьякова М.Е., Ремезова А.Н., Богданова Е.О., Блюм Н.М., Гарапач И.А., Маслак О.С., Заболотных Н.В., Догондзе М.З., Витовская М.Л., Кириллов Ю.А., Полякова В.О., Яблонский П.К.; заявитель ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России. № 2023621582: заявл. 29.05.2023; опублик. 07.07.2023 [Vinogradova T.I. et al. Certificate of state registration of the database No. 2023622275. Efficiency of mesenchymal stem cells in the complex therapy of experimental tuberculosis of the kidneys with multiple drug resistance of the pathogen /

- Vinogradova T.I., Murav'ev A.N., Jesmedljaeva D.S., D'jakova M.E., Remezova A.N., Bogdanova E.O., Bljum N.M., Garapach I.A., Maslak O.S., Zabolotnyh N.V., Dogonadze M.Z., Vitovskaja M.L., Kirillov Yu.A., Poljakova V.O., Jablonskij P.K.; zjavitel' FGBU «SPb NIIF» Minzdrava Rossii. N 2023621582: zjavl. 29.05.2023: opubl. 07.07.2023 (In Russ.).
7. Sutton M.T. et al. Antimicrobial properties of mesenchymal stem cells: therapeutic potential for cystic fibrosis infection, and treatment. *Stem cells international* 2016; 2016: 5303048. doi: 10.1155/2016/5303048.
 8. Harman R.M. et al. Antimicrobial peptides secreted by equine mesenchymal stromal cells inhibit the growth of bacteria commonly found in skin wounds. *Stem cell research and therapy* 2017; 8 (1): 1–14. doi: 10.1186/s13287-017-0610-6.
 9. Zhang X. et al. Mesenchymal Stem Cells and Tuberculosis: Clinical Challenges and Opportunities. *Frontiers in Immunology* 2021; 12: 695278. doi: 10.3389/fimmu.2021.695278.
 10. Zhang X. et al. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells modulate monocytes/macrophages and alleviate atherosclerosis. *Frontiers in immunology* 2018; 9: 878. doi: 10.3389/fimmu.2018.00878.
 11. Ren W. et al. 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. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 2019; 38: 1–14. doi: 10.1186/s13046-019-1027-0.
 12. Yudincheva N. et al. Evaluation of the biodistribution of mesenchymal stem cells in a pre-clinical renal tuberculosis model by non-linear magnetic response measurements. *Frontiers in physics* 2021; 9: 625622. doi: 10.3389/fphy.2021.625622.
 13. Wang J. et al. Recent advances in clustering methods for protein interaction networks. *BMC genomics* 2010. 11 (3): 1-19. doi: 10.1186/1471-2164-11-S3-S10.
 14. Муравьев А.Н. и др. Способ моделирования туберкулеза почки. Патент на изобретение 2776130 С1, 13.07.2022. Заявка № 2021120918 от 14.07.2021. [Murav'ev A.N. et al. Method for Modeling Kidney Tuberculosis. Patent RF N 2776130. 13.07.2022 (In Russ.).]
 15. Chow L. et al. Antibacterial activity of human mesenchymal stem cells mediated directly by constitutively secreted factors and indirectly by activation of innate immune effector cells. *Stem Cells Translational Medicine* 2020; 9 (2): 235–249. doi: 10.1002/sctm.19-0092.
 16. Mangaraj M., Nanda R., Panda S. Apolipoprotein AI: a molecule of diverse function. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 2016; 31 (3): 253–259. doi: 10.1007/s12291-015-0513-1.
 17. Gao P. et al. Apolipoprotein E mediates cell resistance to influenza virus infection. *Science Advances* 2022; 8 (38): 6668. doi: 10.1126/sciadv.abm6668.
 18. Puthia M. et al. Antibacterial and anti-inflammatory effects of apolipoprotein E. *Biomedicines* 2022; 10 (6): 1430. doi: 10.3390/biomedicines10061430.
 19. Loimaranta V. et al. Galectin-3-binding protein: A multitask glycoprotein with innate immunity functions in viral and bacterial infections. *Journal of leukocyte biology* 2018; 104 (4): 777–786. doi: 10.1002/JLB.3VMR0118-036R.
 20. Dong R. et al. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy. *International journal of molecular medicine* 2018; 41 (2): 599–614. doi: 10.3892/ijmm.2017.3311.
 21. Kaufmann S.H.E. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature Reviews Immunology* 2001. 1 (1): 20–30. doi: 10.1038/35095558.
 22. Kim J.Y. et al. Combined IFN- γ and TNF- α release assay for differentiating active tuberculosis from latent tuberculosis infection. *Journal of Infection* 2018; 77 (4): 314–320. doi: 10.1016/j.jinf.2018.04.011.

Поступила в редакцию: 05.07.2024 г.

Сведения об авторах:

Муравьев Александр Николаевич — кандидат медицинских наук, доцент, ученый секретарь, ведущий научный сотрудник, руководитель научно-исследовательской лаборатории клеточной биологии и регенеративной медицины ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России; доцент кафедры хирургических болезней ЧОУ ВО «Санкт-Петербургский медико-социальный институт»; 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2–4; e-mail: urolog5@gmail.com; ORCID 0000-0002-6974-5305;

Ремезова Анна Николаевна — аспирант, младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории клеточной биологии и регенеративной медицины ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России; 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2–4; e-mail: urolog-remezovaanna@yandex.ru; ORCID 0000-0001-8145-4159;

Виноградова Татьяна Ивановна — доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник, руководитель научно-исследовательской лаборатории экспериментальной медицины ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России; 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2–4; e-mail: vinogradova@spbniif.ru; ORCID 0000-0002-5234-349X;

Орлова Надежда Валерьевна — старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории клеточной биологии и регенеративной медицины ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России; 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2–4; e-mail: nadinbat@gmail.com; ORCID 0000-0002-6572-5956;

Юдинцева Наталия Михайловна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГБУ «Институт цитологии Российской академии наук»; 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., д. 4; e-mail: yudincheva@mail.ru; ORCID 0000-0002-7357-1571;

Яблонский Петр Казимирович — доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач Российской Федерации, директор ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России; 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2–4; проректор по медицинской деятельности, заведующий кафедрой госпитальной хирургии медицинского факультета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»; 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9; e-mail: glhirurb2@mail.ru; ORCID 0000-0003-4385-9643.