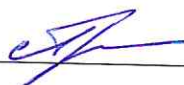


*Министерство науки и высшего образования Российской Федерации*  
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ»**

ДОПУСТИТЬ К ПРЕДСТАВЛЕНИЮ ГЭК

Руководитель отдела научно-  
организационной деятельности и  
образования, к. биол. наук Л.В. Гришина

  
« 08 » июля

2020 г.

**Хабалова Татьяна Семеновна**

**НАУЧНЫЙ ДОКЛАД**

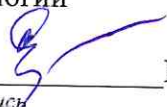
об основных результатах подготовленной научно – квалификационной работы  
(диссертации)

**ХАРАКТЕРИСТИКА ПАРАМЕТРОВ Т-КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА  
МЫШЕЙ С ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ В ПРОЦЕССЕ ЛЕЧЕНИЯ  
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ И  
ПРОДУЦИРУЕМЫМИ ИМИ ВНЕКЛЕТОЧНЫМИ ВЕЗИКУЛАМИ**  
по основной образовательной программе подготовки научно-педагогических кадров в  
аспирантуре

Направление подготовки 30.00.00 – Фундаментальная медицина

Научная специальность: 14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

Научный руководитель  
д-р. мед. наук, зав.лаб клет.  
биотехнологий

  
подпись Г.В.Селедцова  
« 22 » 06. 2020 г.

Аспирант:

  
подпись Хабалова Т.С.

*Новосибирск 2020*

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### *Актуальность темы*

Распространенность заболеваний почек неуклонно растет во всем мире, однако до сих пор нет эффективного лечения (Foreman KJ, Lancet. 2018; 392:2052–2090.). Терапевтический выбор ограничивается поддерживающей и превентивной терапиями, увеличивающими продолжительность жизни пациентов, однако уровень заболеваемости и смертности по-прежнему сохраняется на высоком уровне.

Ранее считалось, что гломерулонефрит, являющийся основным компонентом хронической почечной недостаточности (ХПН) является иммуноопосредованным, в то время как острая почечная недостаточность, являющаяся результатом механического или токсического разрушения ткани почки не является иммунозависимой. Однако, исследования последних лет доказали, что переход острого воспалительного процесса почек в хронический полностью контролируется и определяется клетками иммунной системы, инфильтрирующими почечную паренхиму. При токсическом остром повреждении почек в воспалительном экссудате обнаруживается весь спектр клеток иммунной системы- нейтрофилы, макрофаги, дендритные клетки и лимфоциты (M.N. Martina, 2014). Показано, Th1-лимфоциты, продуцирующие IFN-gamma, способствуют утяжелению течения ОПН, Th2- лимфоциты , продуцирующие IL-4, 5, 13) обладают протективным эффектом. Переход острого воспаления в хроническую форму тоже определяется субпопуляционными отношениями Т-клеток в пораженном органе. При переходе в хроническую форму, происходит инфильтрация селезенки мышей CD4+ лимфоцитами со значительным усилением продукции IFN-gamma, что говорит о вовлеченности клеток иммунной системы в процессы почечного восстановления с возможной последующей деструкцией (Burne-Taney M.J. 2005). Большую роль в процессах восстановления или деструкции почечной ткани играют регуляторные CD4+CD25+ лимфоциты. Обладая противовоспалительным потенциалом, Трег-лимфоциты способствуют усилению репарации при ОПН. Показано, инаktivация Т-рег моноклональными PC61 АТ через 24 часа после ишемии приводит к усилению тубулярного и медулярного некроза, снижению пролиферации эпителиоцитов и, как следствие, усилению тяжести течения заболевания. В экспериментах с дополнительными инъекциями Т-рег клеток, показано значительное усиление восстановительного потенциала тубулярного слоя в почках (V.W.S.Lee, 2008).



В качестве нового метода лечения почек на сегодняшний день активно изучаются мезенхимальные стромальные клетки (МСК/МСС) и внеклеточные везикулы (EV's).

Клеточная терапия на основе мезенхимальных стволовых клеток (МСС) - это инновационный подход в регенерации многих тканей, который может быть использован в лечении почечной недостаточности. В настоящее время были проведены десятки исследований по разработке методик использования МСК, по источникам забора МСК, по условиям предварительной подготовки и путям инъекций в доклинических и клинических исследованиях [A. Eirin, 2005; N. Kim, 2013; W. Zhang, *etal.*, 2014, A. UrF Filho, *et al.*, 2016; M. Morigi, P. De, 2014; S. Liu, *et al.*, 2016]. Однако, множество научных данных констатируют, что благоприятное воздействие МСК при почечном повреждении обусловлено не непосредственным воздействием, а стимуляцией эндогенной регенерации резидентных клеток через секрецию цитокинов, факторов роста и внеклеточных везикул. Внеклеточные везикулы включают в себя эктосомы, экзосомы, апоптотические тела и др. В настоящее время лучше всего описаны экзосомы и эктосомы. Экзосомы представляют собой небольшие везикулы (40-100 нм), участвующие в межклеточной коммуникации. Они встречаются в различных биологических жидкостях, таких как плазма, сыворотка и грудное молоко. Микровезикулы представляют собой внеклеточные везикулы размером от 100 до 1000 нм с различной формой. Они формируются путем регулируемой регрессии внешнего почкования плазматической мембраны. Микровезикулы могут активировать фибробласты, повышать пролиферацию и продуцировать матричные белки, могут стимулировать неоангиогенез, транспорт мРНК, микроРНК и вовлекаться в клеточную связь [Souza-Schorey C, Clancy JW., 2012; Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, *etal.* 2008]. Таким образом, дальнейшее изучение влияния МСК и микровезикул на поврежденные почки, а также сравнительный анализ полученных данных может помочь в разработке наиболее эффективного и безопасного метода лечения.

**Цель работы** – Охарактеризовать эффективность и параметры Т-клеточного звена иммунитета у мышей с почечной недостаточностью в процессе лечения мезенхимальными стромальными клетками и продуцируемыми ими внеклеточными везикулами.

**Задачи исследования:**

1. Оценить эффективность трансплантации мезенхимальных стромальных клеток (МСК) и продуцируемых ими внеклеточных везикул, на функцию и гистологическую картину поражения почек при острой и хронической почечной недостаточностях (ОПН и ХПН) в эксперименте.
2. Определить эффективность трансплантации мезенхимальных стромальных клеток (МСК) и внеклеточных частиц различного (L929, B16, LLC) на функцию и гистологическую картину поражения почек в экспериментальной модели хронической почечной недостаточности (ХПН).
3. Исследовать содержание регуляторных Т-клеток и Т-клеток памяти в экспериментальной модели острой и хронической почечной недостаточностях (ОПН и ХПН) при трансплантации МСК и продуцируемыми ими внеклеточных везикул.

**Апробация работы** основные положения работы были доложены и обсуждены на Конгрессе молодых учёных «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (Томск, 2018), Научно-практической конференции «Фундаментальная и клиническая онкология: достижения и перспективы развития» (Томск, 2019).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, из них 2 статьи в Российском иммунологическом журнале, входящем в перечень ВАК.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Модель глицерол-индуцированной ОПН и ХПН*

Эксперимент проведен на линейных мышах линии СВА возрастом 3-4 месяца. Глицерол 50% вводился внутримышечно в дозе 8,6 мг/кг, для ОПН – однократно, для ХПН – трехкратно с интервалом в 7 дней. Получаемый при этом рабдомиолиз оказывает смешанное (ишемическое, токсическое, ретенционное) воздействие на почки, с преимущественным поражением эпителия проксимальных канальцев.

### *Получение мезенхимальных стромальных клеток костного мозга*

Мезенхимальные стромальные клетки получали из костного мозга сингенных мышей методом адгезии к культуральному пластику. Костный мозг, полученный из бедренных и большеберцовых костей, суспендировали в RPMI с 10% FCS. Строму костного мозга разрушали механическим способом стеклянным гомогенизатором, дважды отмывали и помещали в культуральные матрасы в полной среде на основе RPMI 1640. Неприлипающую фракцию клеток костного мозга удаляли при сменах культуральной среды, начиная с 3 дня. МСК имели классический фибробластоподобный фенотип и образовывали сплошной монослой к 4 неделе культивирования. Снятие МСК проводили 0,25% раствором версен-трипсина, дважды отмывали от культуральной среды и ресуспендировали в физиологическом растворе.

### *Получение внеклеточных везикул*

Опухолевые линии B16, LLC, фибробластоподобная линия L929 были разморожены, помещены в культуральные матрасы в полной среде на основе RPMI 1640 с 10% FCS. После достижения монослоя, часть клеток, включая МСК, подвергали апоптозу путем культивирования в условиях депривации кислорода и в бессывороточной среде в течение 1 суток. В указанных условиях клетки переходят в состояние апоптоза, продукция ими внеклеточных везикул, особенно фракции 100 – 1000 нм, значительно увеличивается. Через 24 часа супернатант центрифугировали при 2000 g в течение 15 минут для удаления клеточного дебриса. Надосадок дополнительно центрифугировали при 14000 g в течение 60 минут при 4°C. Полученный в итоге осадок ресуспендировали в 100 мкл физиологического раствора.



### ***Введение МСК и МВ, экспериментальные группы***

МСК или МВ вводили внутривенно (в хвостовую вену) через три недели после третьей инъекции глицерола при ХПН, через сутки после индукции ОПН. МСК вводили в количестве 1 млн на мышь, дозу МВ рассчитывали как эквивалентную (полученную из) 1 млн МСК. Животных выводили из эксперимента на 4 и 11 сутки после введения клеток/микровезикул.

### ***Определение уровня альбумина, креатинина, FABP1***

Уровень альбумина определялся в моче набором Mouse Albumin ELISA Kit ab 108792. Уровни креатинина и FABP1 определялись в сыворотке крови наборами Creatinine (Mouse) ELISA Kit Cat # E4369-100 и Mouse/Rat FABP1/L-FABP Immunoassay Elisa Kit Cat#RFBP10 соответственно.

### ***Оценка внеклеточных частиц***

Для оценки размера внеклеточных частиц использовался проточный цитометр CytoFlex. В настройках использованы наночастицы TruCOUNT (TC) согласно методическим рекомендациям производителя. В качестве раствора использовалась деионизированная вода.

### ***Гистологическое исследование***

Почки мышей фиксировали в 4 % растворе формалина, затем обезвоживали по стандартной методике и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм получали с помощью ротационного микротомы HM 340E («Carl Zeiss», Германия), окрашивали гематоксилином и эозином, сириусом красным и по Маллори. Светооптическое исследование и микрофотосъемку проводили на микроскопе Axioskop 40 («Carl Zeiss», Германия).

***Морфометрический анализ*** структур почек проводили на парафиновых срезах. Определяли величины следующих морфометрических параметров: - диаметры суперфициальных почечных клубочков (почечных телец); диаметры собирательных трубочек и высоту их клеток, измеренных в средней трети мозгового вещества почки.

Морфометрический подсчёт был выполнен в поле зрения при окуляре 10х/25 и объективе 63х.

**Проточная цитофлуориметрия** для определения маркеров использовали моноклональные анти-CD4,-CD8,-CD44,-CD62,-CD25,-Foxp3 антитела, меченых фикоэритрином (PE), флуорисцеина изотиоцианатом (FITC), алофикоцианин (APC), (Bioscience, США).

### ***Статистическая обработка результатов***

Полученные в ходе исследования данные обрабатывались с помощью программы GraphPad Prism 8, использовался непараметрический метод Вилкоксона значимыми изменениями считались при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Влияние МСК и МВ на функцию почек в модели ОПН*

#### *Уровень альбуминурии при ОПН*

После внутримышечного введения 50% глицерола, уровень альбумина повышался у мышей на 4-е сутки в контрольной группе в 3 раза (298,6 ng/ml против 98,2 ng/ml у интактных мышей) и снижался к 11-м суткам до 187,4 ng/ml. Использование МСК привело к резкому снижению уровня альбумина по сравнению с контрольной группой ОПН в 6 раз, что значительно ниже уровня у интактных мышей. Использование МВ также привело к снижению уровня альбумина, однако менее показательному (264,5 ng/ml. К 11-м суткам уровень мочевины составил 138,2 ng/ml после введения МСК и 172,6 ng/ml после введения МВ, что ниже на 27% и 8% соответственно, чем в глицерол-контроле (рис.1).

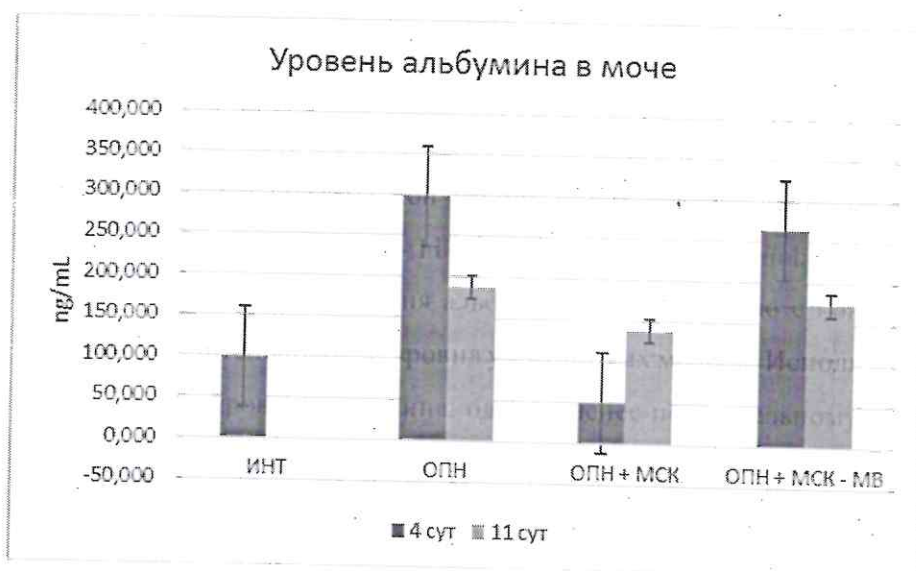


Рис. 1. Уровень альбуминурии у мышей с ОПН после введения МСК и МВ. n=7

#### *Уровень креатинина сыворотки крови мышей при ОПН*

На 11-е сутки уровень креатинина выше в 1,4 раза в группе глицерол-контроля по сравнению с интактной группой (3,1 ng/ml против 2,2 ng/ml). Использование МСК снизило уровень креатинина до 2,7 ng/ml (на 13%), а при использовании МСК-МВ уровень снизился до 1,9 ng/ml (на 39%). (Рис.2.)





Рис. 2. Уровень креатинина сыворотки крови у мышей с ОПН после введения МСК и МСК-МВ. n=7

Таким образом, ренопротективный эффект наблюдается как при применении МСК, так и МВ, однако протекает через различные механизмы, что подтверждается оценкой соответствующих клинических параметров: снижением уровня альбумина при применении МСК и снижением уровня креатинина при применении МВ.

### ***Влияние МСК и МВ на функцию почек в модели ХПН***

#### ***Уровень альбуминурии при ХПН***

Через 3 недели после третьей внутримышечной инъекции 50% глицерола соответствующим группам вводились МСК и МВ, полученные из различных источников. Уровень альбумина в ХПН-контроле выше в 2,7 раза по сравнению с интактной группой. На 4-е сутки трансплантация МСК и МСК-МВ привела практически к одинаковому результату: уровень альбумина снизился на 34% и 40% соответственно. К 11 суткам положительный эффект уменьшился: при трансплантации МСК уровень альбумина вернулся к уровню ХПН-контроля, при МСК-МВ снижение составило всего 14%. (Рис.3)

Использование внеклеточных везикул, полученных из опухолевых линий L929 и LLC продемонстрировало неожиданный результат, не соответствующий научным публикациям по данной теме. Лучше всего продемонстрировали результат LLC-МВ,

уровень альбуминурии при трансплантации которых снизился до уровня альбуминурии у интактных мышей (98,4 ng/ml и 97,2 ng/ml соответственно). (Рис.4).

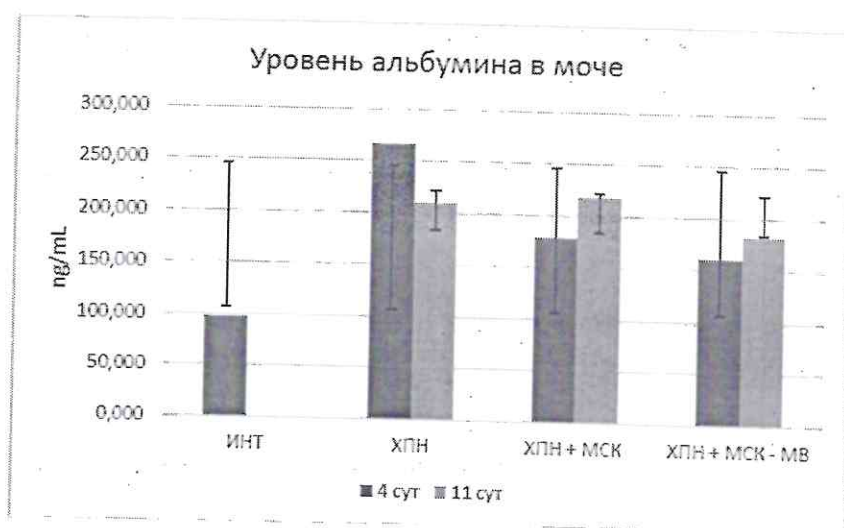


Рис. 3. Уровень альбуминурии у мышей с ХПН после введения МСК и МВ. n=7

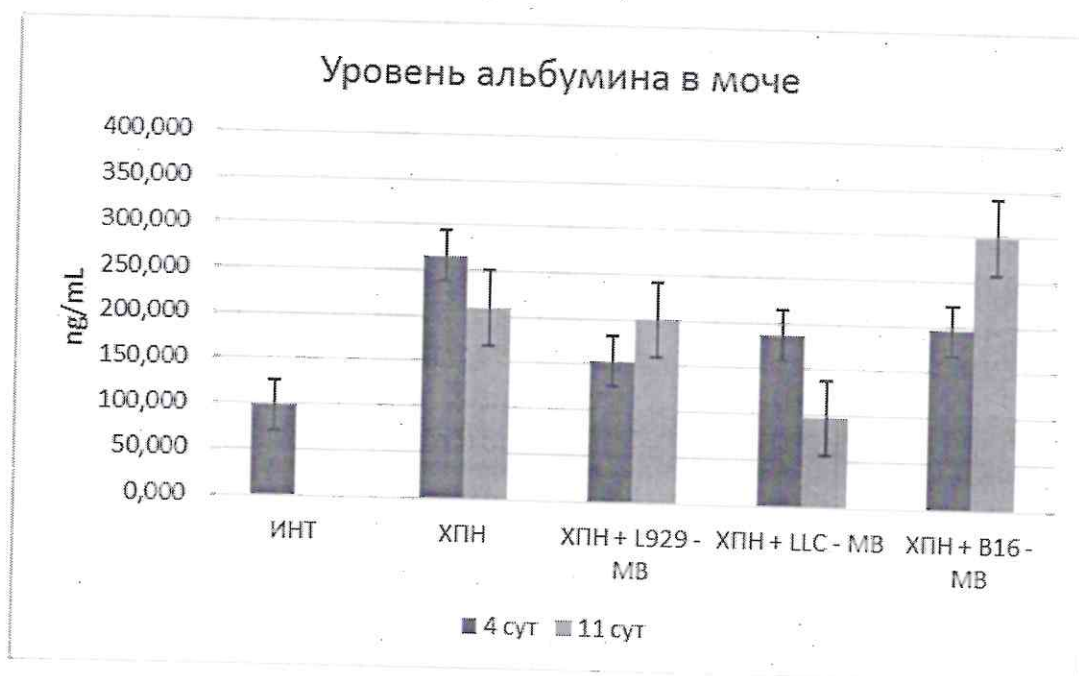


Рис. 4. Уровень альбуминурии у мышей с ХПН после введения МВ различного происхождения. n=7

## Уровень креатинина сыворотки крови мышей при ХПН

Уровень креатинина в группе ХПН-контроля в 2 раза выше по сравнению с интактной группой (4,8 ng/ml против 2,2 ng/ml). Использование МСК и МСК-МВ показало сопоставимые результаты: на 4 сутки резкое повышение уровня креатинина в 1,6 раз по сравнению с ХПН-контролем, к 11 суткам резкое снижение в 1,4-1,7 раз (по сравнению с уровнем на 4 сутки). (Рис.5)

Все внеклеточные частицы, полученные из опухолевых линий, продемонстрировали высокий репаративный потенциал, снизив уровень креатинина до значений от интактных групп и ниже. (Рис.6).



Рис. 5. Уровень креатинина сыворотки крови у мышей с ХПН после введения МСК и МСК-МВ. n=7



Рис. 6. Уровень креатинина сыворотки крови у мышей с ХПН после введения МСК и МСК-МВ. n=7



Из приведенных выше данных следует, что при ХПН трансплантация МСК и МСК-МВ может спровоцировать усугубление заболевания в первые 4 суток, при этом кратковременно положительно повлияв на уровень альбуминурии. Клинические показатели пришли в норму при использовании микровезикул, полученных из опухолевых линий, что открывает потенциал для дальнейшего изучения этого вопроса.

### ***Морфологическое исследование почек мышей при острой и хронической почечной недостаточности***

Полученные в ходе исследования данные обрабатывались методом one-way ANOVA. Значения рассчитывали с помощью программы GraphPad Prism 8.

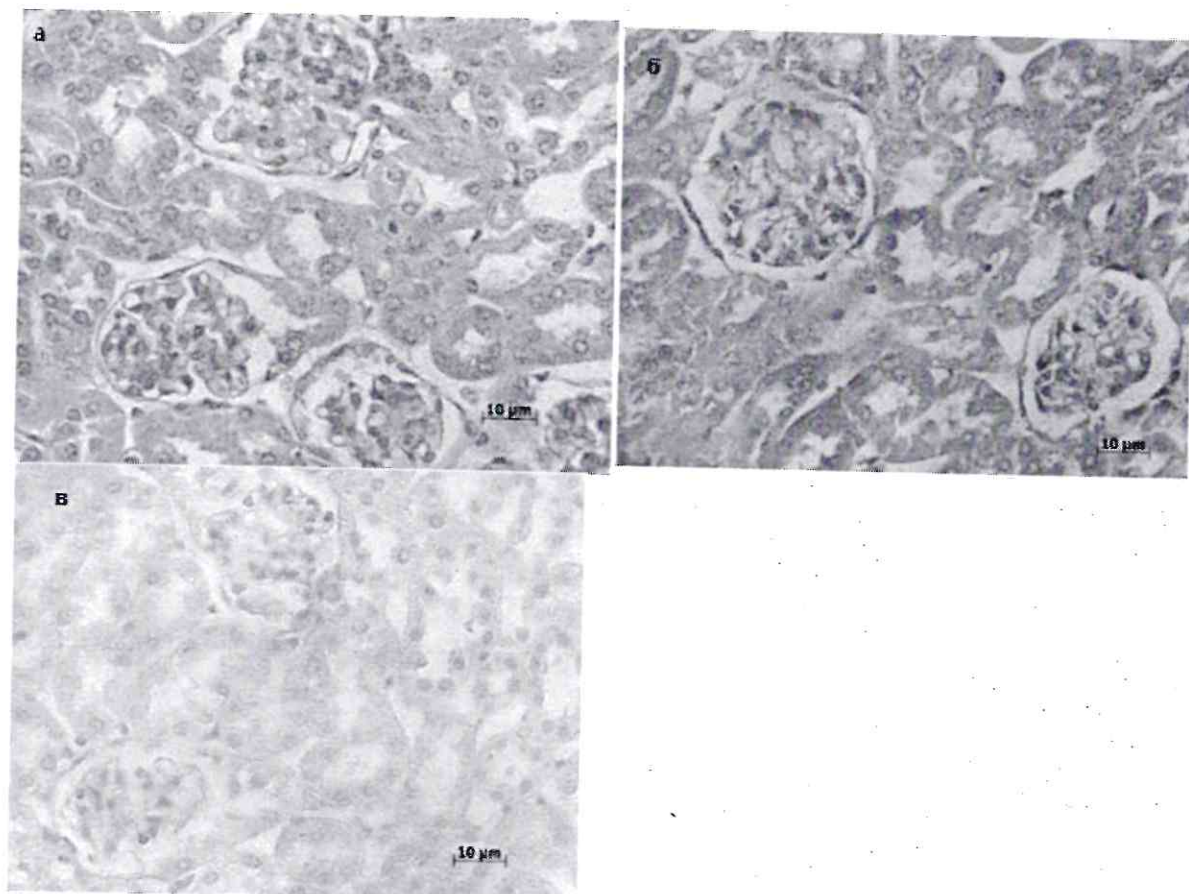
Обозначения:

Высота клеток собирательных трубочек, измеренных в средней трети мозгового вещества почек –  $h$ ; Диаметр собирательных трубочек, измеренных в средней трети мозгового вещества почек –  $d$ ; Наибольший поперечный диаметр суперфициальных клубочков почек –  $d_{\max}$ .

Достоверно значимыми данные считались при  $p < 0,05^*$ , очень значимыми  $p < 0,01^{**}$ , максимально значимыми  $p < 0,001^{***}$ .

#### ***Острая почечная недостаточность (ОПН) на 4 сутки***

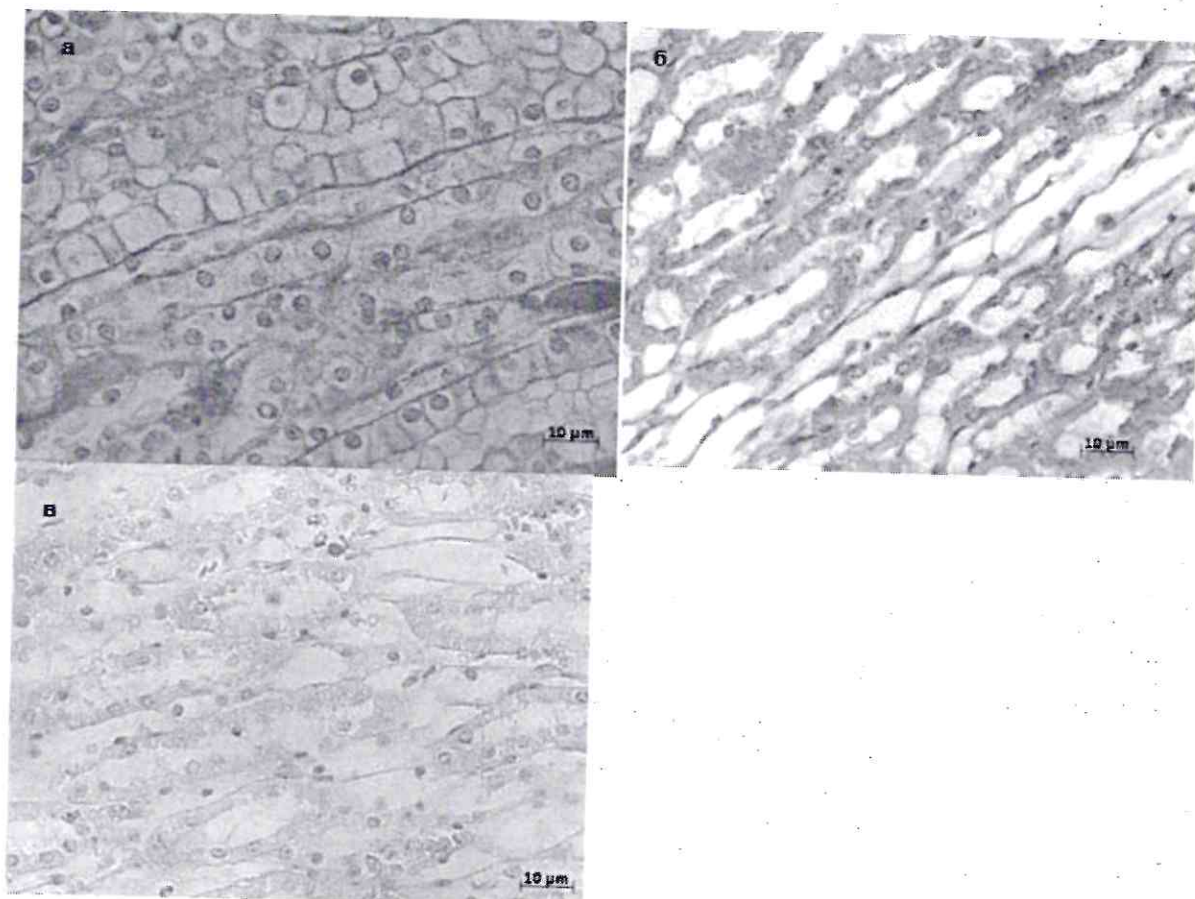
В сравнении с интактной группой на 4 сутки развития ОПН увеличились  $d$  и  $d_{\max}$   
 $p < 0,05$



**Рис. 7.** Клубочки почки, проксимальные и дистальные каналы.  
 (а) Группа ОПН. (б) Группа ОПН+МСК. (в) Группа ОПН+МСК-МВ  
 Окраска гематоксилином и эозином.

Диаметр собирательных трубочек, измеренных в средней трети мозгового вещества почек –  $d$  при ОПН на 4 сутки в сравнении с ОПН+МСК также был достоверно увеличен  $p < 0,05^*$

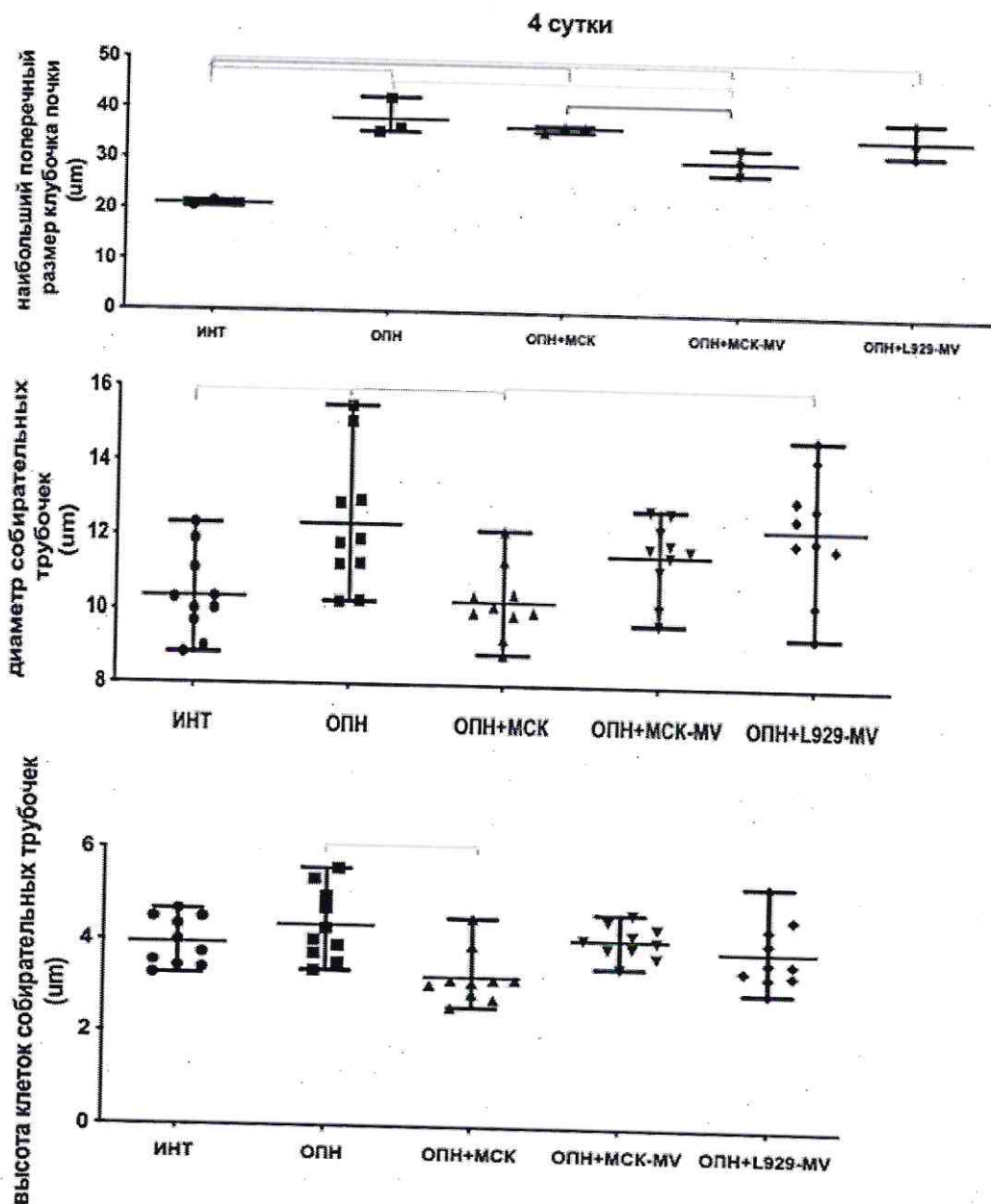
Наибольший поперечный диаметр суперфициальных клубочков почек –  $d_{\max}$  при ОПН на 4 сутки в сравнении с ОПН+МСК-МВ также был достоверно увеличен  $p < 0,01^{**}$



**Рис. 8.** Протоки Беллини и петли Генли в мозговом веществе почки.  
 (а) Группа ОПН. (б) Группа ОПН+МСК. (в) Группа ОПН+МСК-МВ  
 Окраска гематоксилином и эозином.



# ИЗМЕРЕНИЕ СТРУКТУР ПОЧКИ ПРИ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ



## Приложение 1

### Острая почечная недостаточность (ОПН) на 11 сутки

По сравнению с интактной группой сравнения в корковом веществе почки практически не детектируется мочевое пространство в клубочках почек, что, вероятно, вызвано уменьшенным количеством фильтруемой мочи. По сравнению с группой сравнения ОПН на 4 сутки наблюдается резкая дистрофия клеток клубочков почек

(уменьшены размеры мезангиальных клеток, межклеточного вещества), однако при этом не регистрируются изменения поперечного размера самих клубочков.

В мозговом веществе почек высота клеток собирательных трубочек по сравнению с группой «ОПН + МСК-МВ» достоверно выше. Отмечается светлых и темных клеток собирательных трубочек, клеток петель Генле, а также клеток протоков Беллини.

В группе ОПН+МСК-МВ на 11 сутки в корковом веществе дистрофических изменений не зарегистрировано.

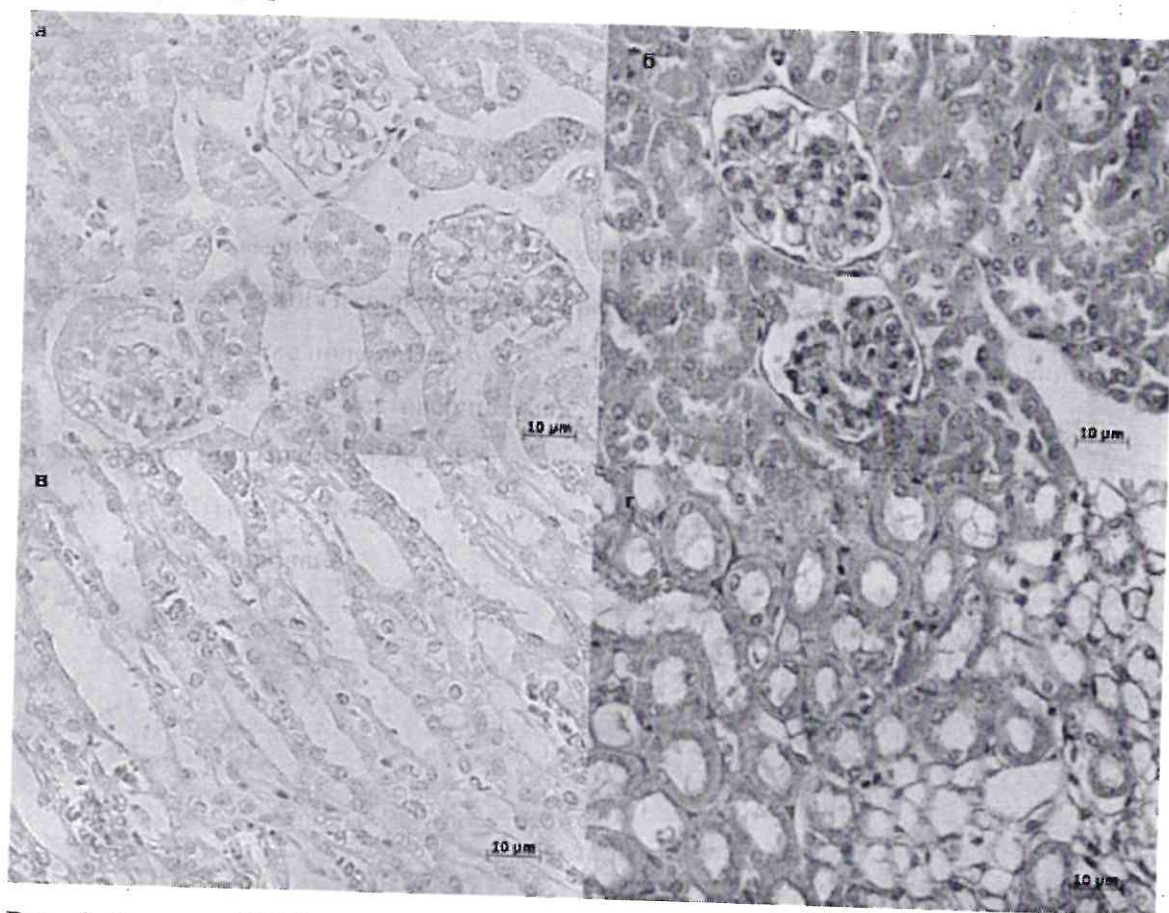
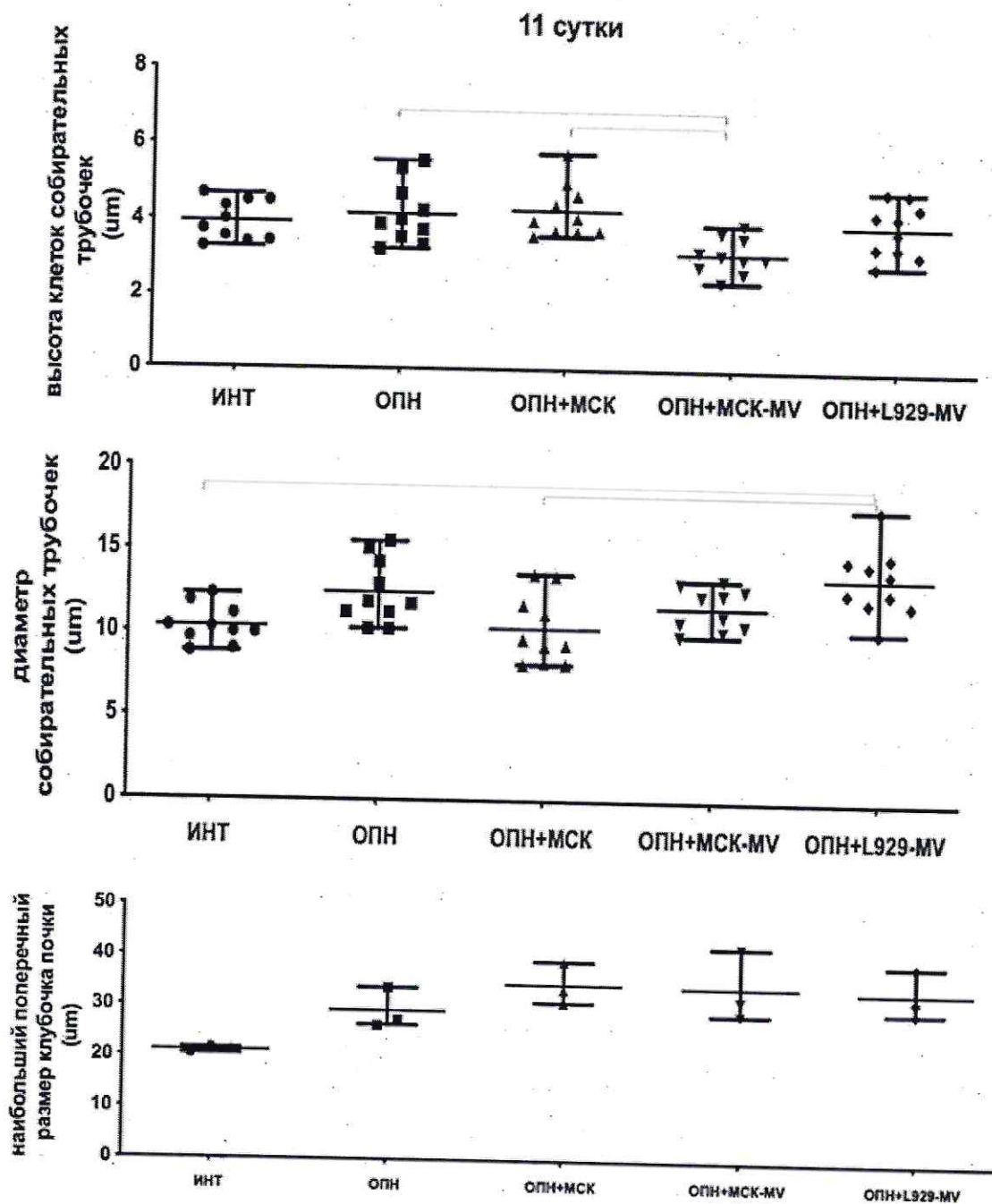


Рис. 9. Группа «ОПН 11 с». (а) Клубочки почки, проксимальные и дистальные каналы. (в) Собирательные трубочки и петли Генле в мозговом веществе почки. Группа «ОПН 11 с». Группа ОПН+МСК-МВ (б) Клубочки почки, проксимальные и дистальные каналы. (г) Собирательные трубочки и петли Генле в мозговом веществе почки.

Окраска гематоксилином и эозином.

# ИЗМЕРЕНИЕ СТРУКТУР ПОЧКИ ПРИ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ



Приложение 2.

## Хроническая почечная недостаточность (ХПН) на 4 сутки

В группе ХПН на 4 сутки в корковом веществе отмечается локальная дистрофия клеток дистального отдела нефрона связующего канальца, в том числе клеток плотного пятна (рис.10 а).



В мозговом веществе почки отмечается гипертрофия клеток собирательных трубочек (как светлых (главных) так и темных клеток), по отношению ко всем группам сравнения на 4 сутки (ИНТ; ХПН+МСК; ХПН+МСК-MV; ХПН+L929-MV; ХПН+B16-MV; ХПН+LLC-MV). Кроме того, детектируется гипертрофия клеток петлей Генле (рис. 10б). Диаметр собирательных трубочек достоверно выше практически ко всем аналогичным показателям от групп сравнения (ИНТ; ХПН+МСК; ХПН+L929-MV; ХПН+B16-MV; ХПН+LLC-MV).

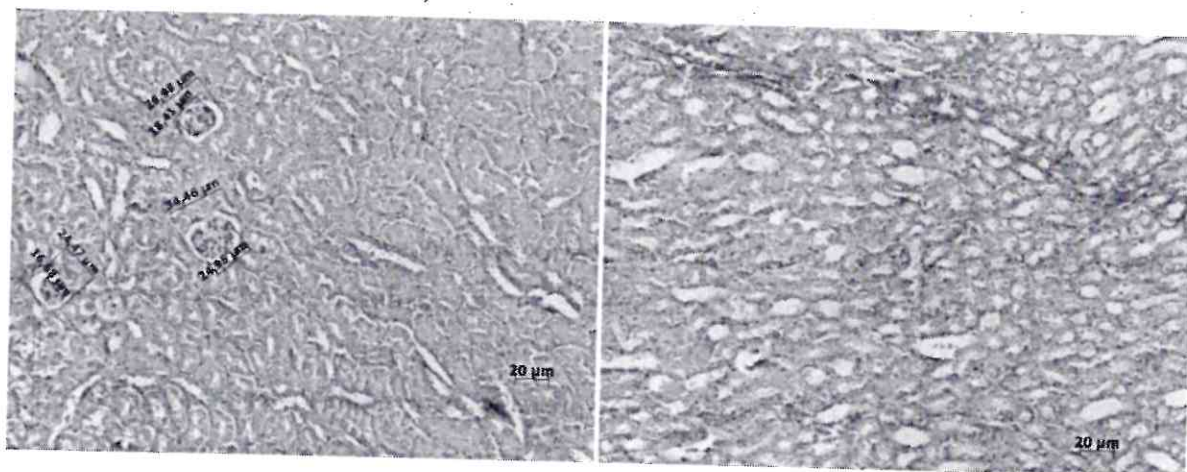


Рисунок 10. Группа «ХПН». (а) Клубочки почки, проксимальные и дистальные каналцы. (б) Собирательные трубочки и петли Генле в мозговом веществе почки.

Окраска гематоксилином и эозином.

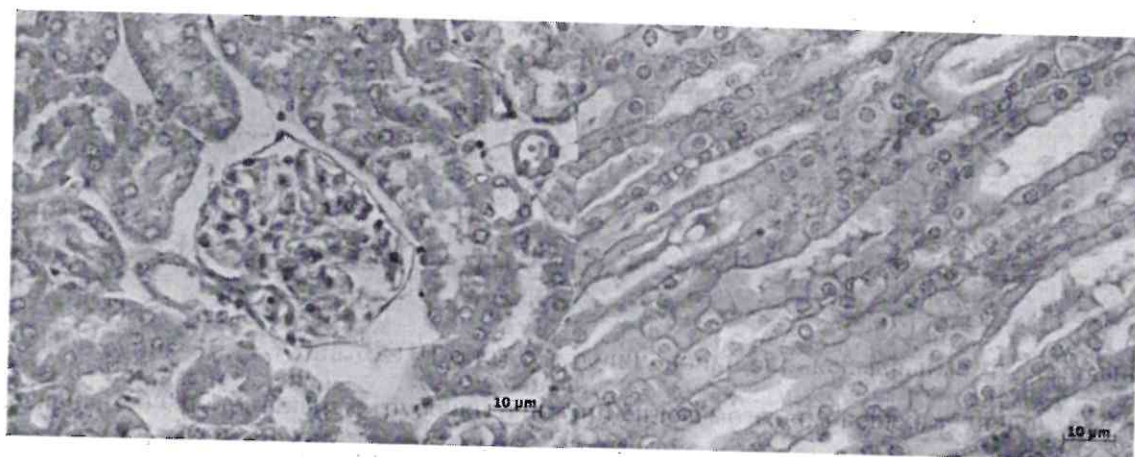


Рисунок 11. Группа «ХПН+МСК-MV 4 с». (а) Клубочки почки, проксимальные и дистальные каналцы. (б) Собирательные трубочки и петли Генле в мозговом веществе почки. Окраска гематоксилином и эозином.

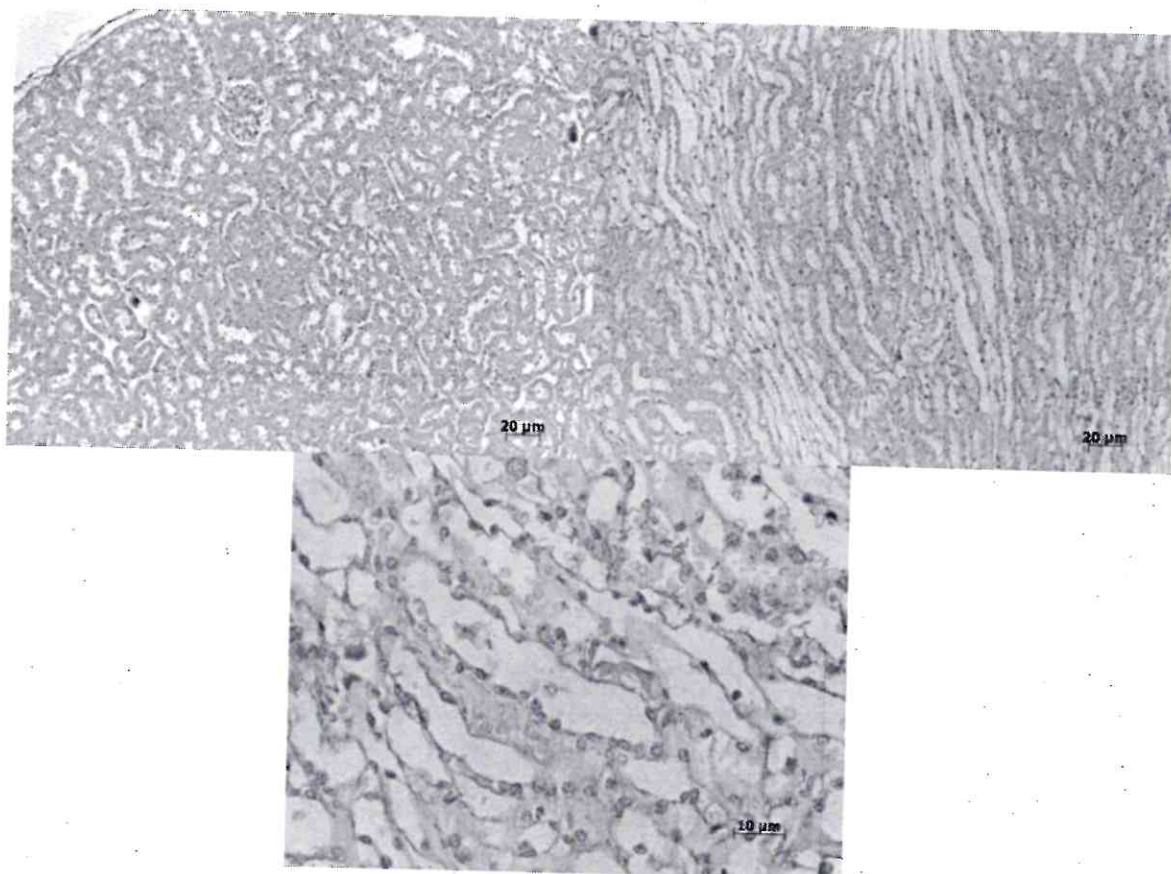


Рисунок 12. Группа «ХПН+L929 4 с». (а) Клубочки почки, проксимальные и дистальные каналцы. (б) Собирательные трубочки и петли Генле в верхней части мозгового вещества почки. (в) Собирательные трубочки и петли Генле в средней части мозгового вещества почки. Окраска гематоксилином и эозином.

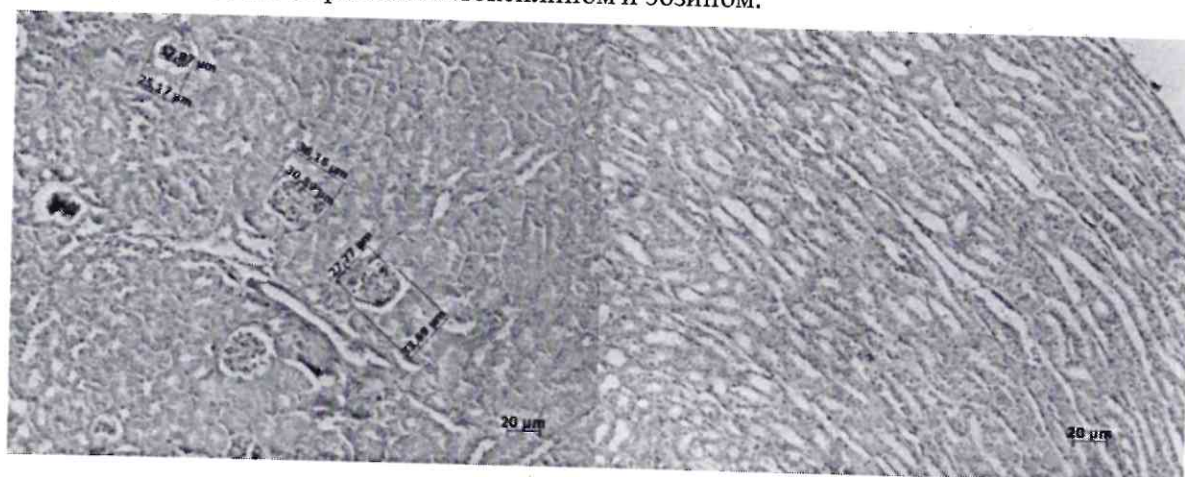


Рисунок 13. Группа «ХПН+В16 4 с». (а) Клубочки почки, проксимальные и дистальные каналцы. (б) Собирательные трубочки и петли Генле в средней части мозгового вещества почки. Окраска гематоксилином и эозином.



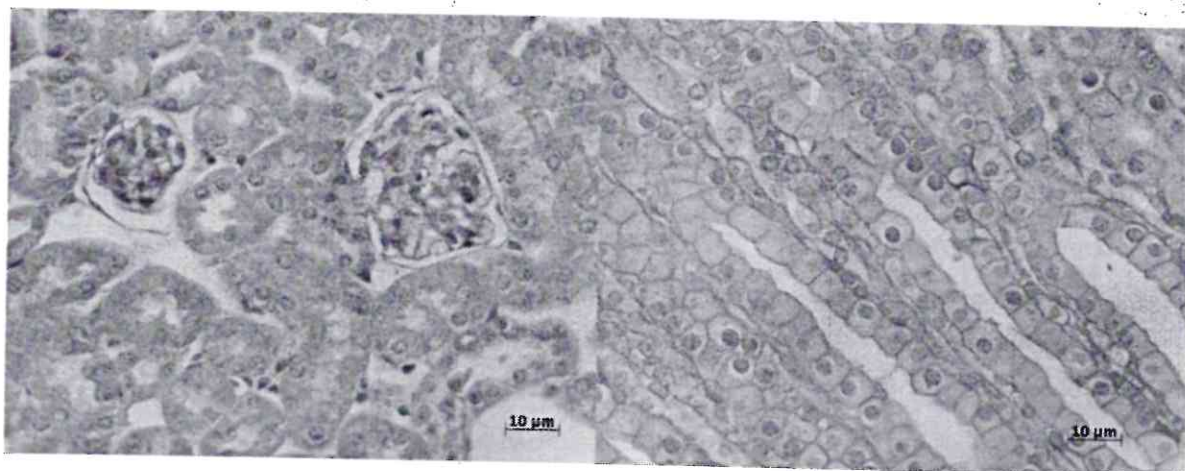


Рисунок 14. Группа «ХПН+LLC-MV 4 с». (а) Клубочки почки, проксимальные и дистальные каналцы. (б) Протоки Беллини. Окраска гематоксилином и эозином.

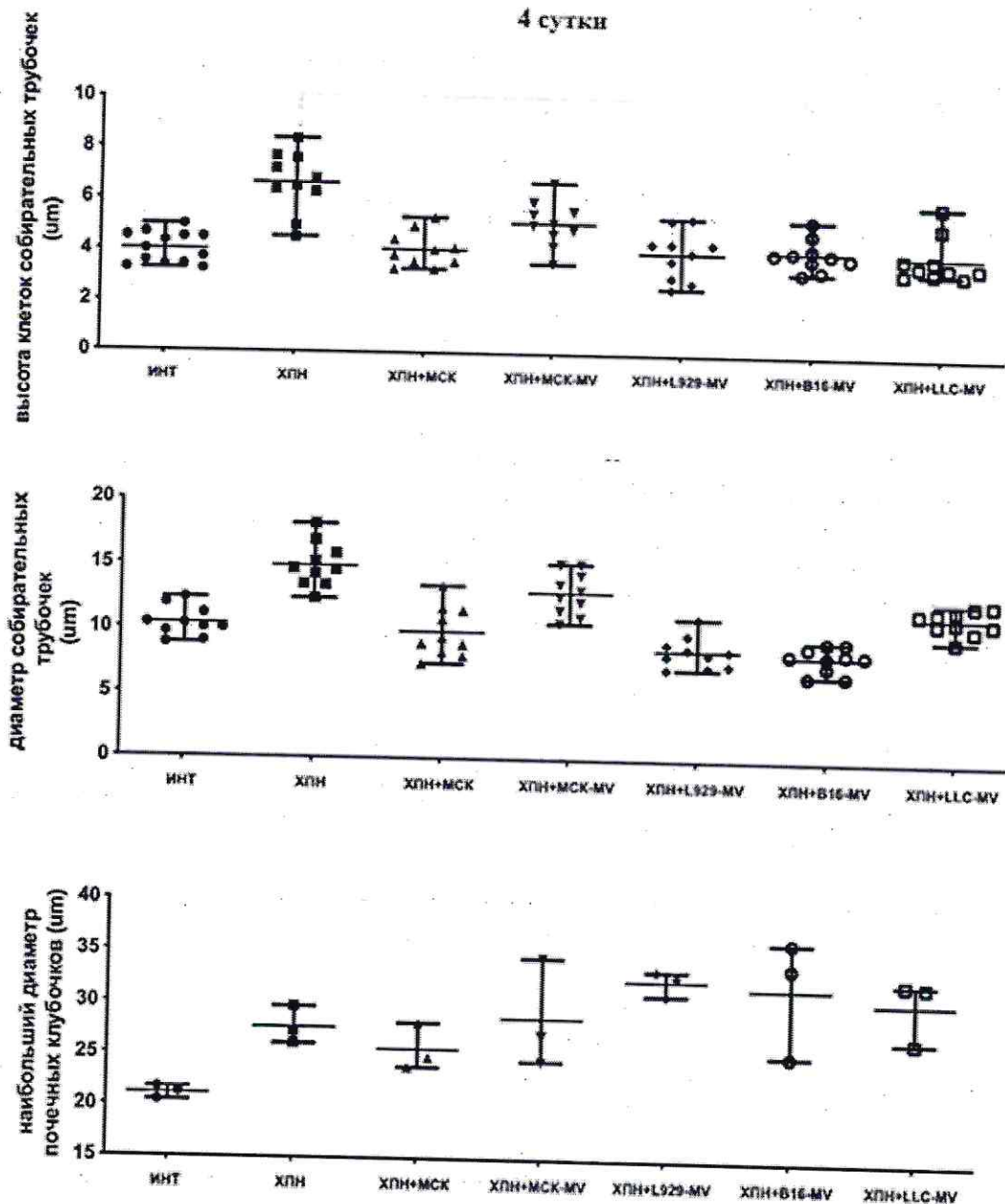
На 4 сутки при добавлении МСК достоверно ниже диаметр собирательных трубочек по сравнению с показателями от групп «ХПН» и «ХПН+МСК-MV» на 4 сутки. Высота клеток собирательных трубочек достоверно ниже по отношению к показателям группы «ХПН». Визуально регистрируется дистрофия клеток собирательных трубочек и петель Генле в корковом и мозговом веществе почки. Наблюдается нарушение реологических свойств крови. Терапевтическое действие микровезикул, полученных из МСК заметно меньше по морфологическим признакам по сравнению с самими клетками: достоверно выше диаметр собирательных трубочек, выше высота клеток собирательных трубочек. Также визуально отмечается дистрофия клеток собирательных трубочек средней и нижней частей мозгового вещества, а также клеток протоков Беллини.

В группе ХПН+В16-MV нет дистрофии клубочков почек. Париетальные и висцеральные листки капсулы Боумена-Шумлянского четко выражены и детектируется мочевое пространство. Нет ярко выраженной дистрофии собирательных трубочек, расположенных как в корковом, так и в мозговом веществе почки.

В группе ХПН+LLC-MV Диаметр клубочков почек достоверно выше по отношению к показателям интактной группы. Париетальные и висцеральные листки капсулы Боумена- Шумлянского четко выражены и детектируется мочевое пространство. Протоки Беллини не изменены.



## Измерение структур почки при хронической почечной недостаточности



Приложение 3.

### *Хроническая почечная недостаточность (ХПН) на 11 сутки*

В группе ХПН на 11 сутки достоверно выше диаметр собирательных трубочек по сравнению с показателями от интактной группы. Визуально регистрируется дистрофия клеток собирательных трубочек и петель Генле в средней и нижней частях мозгового вещества почки (рис. 15 в). Гипертрофированы клетки протоков Беллини (рис. 15 б).

Сладж эритроцитов.

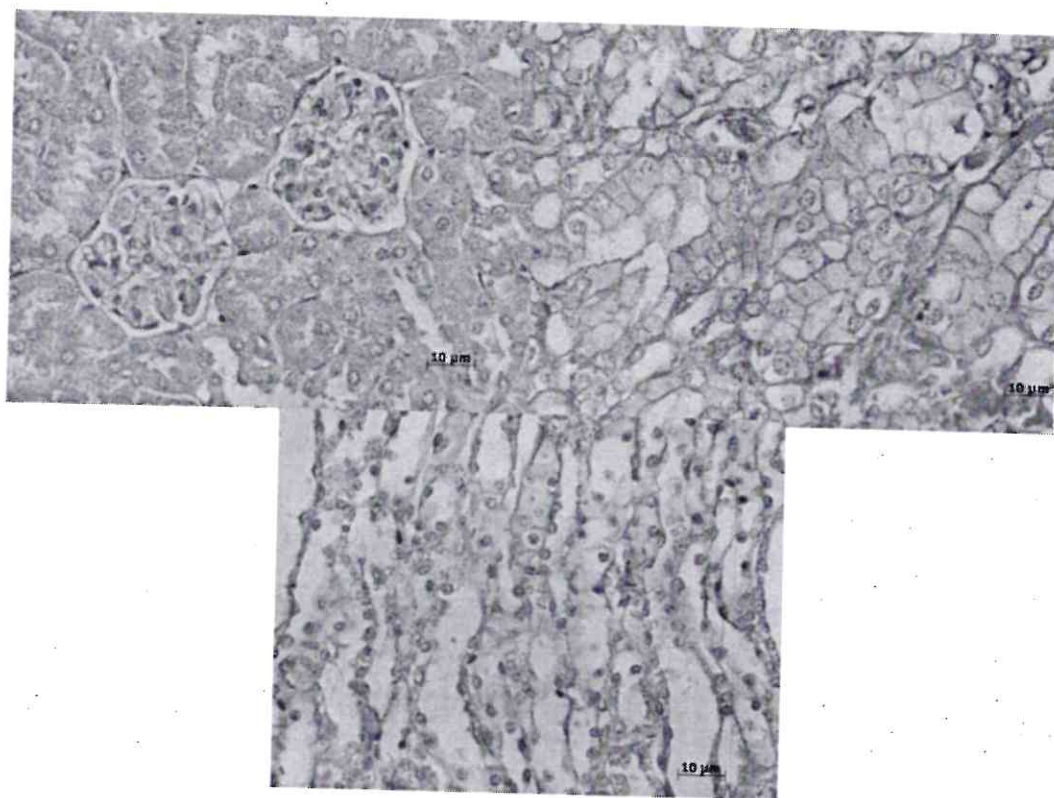


Рисунок 15. Группа «ХПН 11 с». (а) Клубочки почки, проксимальные и дистальные канальцы. (б, в) Собирательные трубочки и петли Генле в мозговом веществе почки. Окраска гематоксилином и эозином.

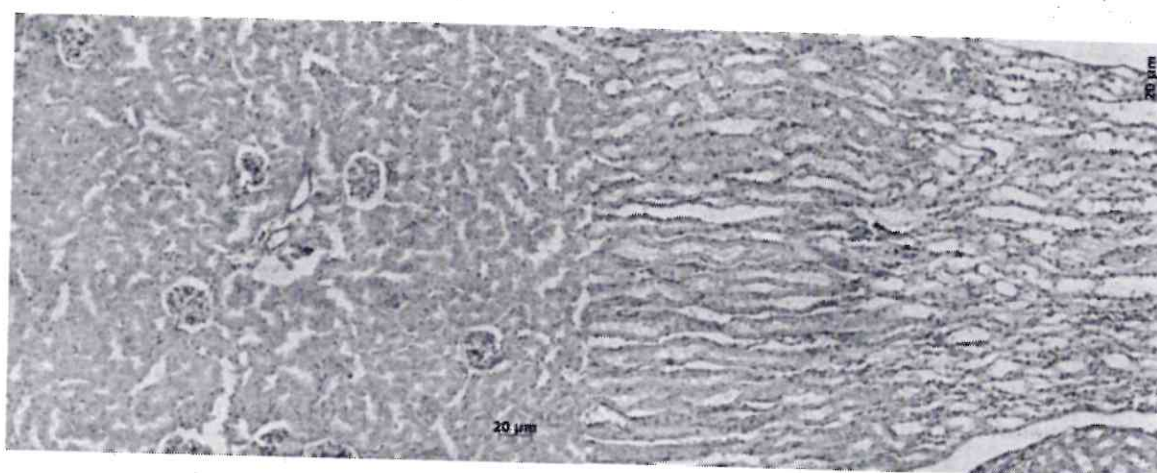


Рисунок 16. Группа «ХПН+МСК 11 с». (а) Клубочки почки, проксимальные и дистальные канальцы. (б) Собирательные трубочки и петли Генле на границе коркового вещества и мозгового вещества почки. Окраска гематоксилином и эозином.

В группах ХПН+В16-МВ и ХПН+ЛЛС-МВ нет дистрофии клубочек почек. Париетальные и висцеральные листки капсулы Боумена-Шумлянского четко выражены и детектируется мочевое пространство (рис. 17-18). В группе с микровезикулами из В16



наблюдается дистрофия собирательных трубочек, расположенных в мозговом веществе почки, однако сохранность структур почки лучше по сравнению с ХПН. В группе ХПН+LLC-MV отмечается визуальная сохранность почки. Нет дистрофии или гипертрофии клеток, только сладж эритроцитов.

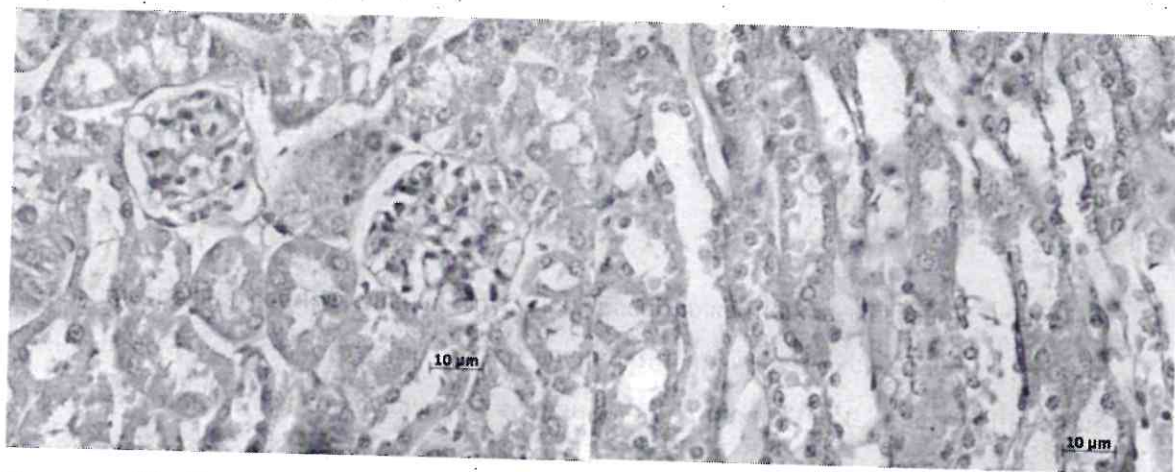


Рисунок 17. Группа «ХПН+В16 11 с». (а) Клубочки почки, проксимальные и дистальные каналцы. (б) Собирательные трубочки и петли Генле в средней части мозгового вещества почки. Окраска гематоксилином и эозином.

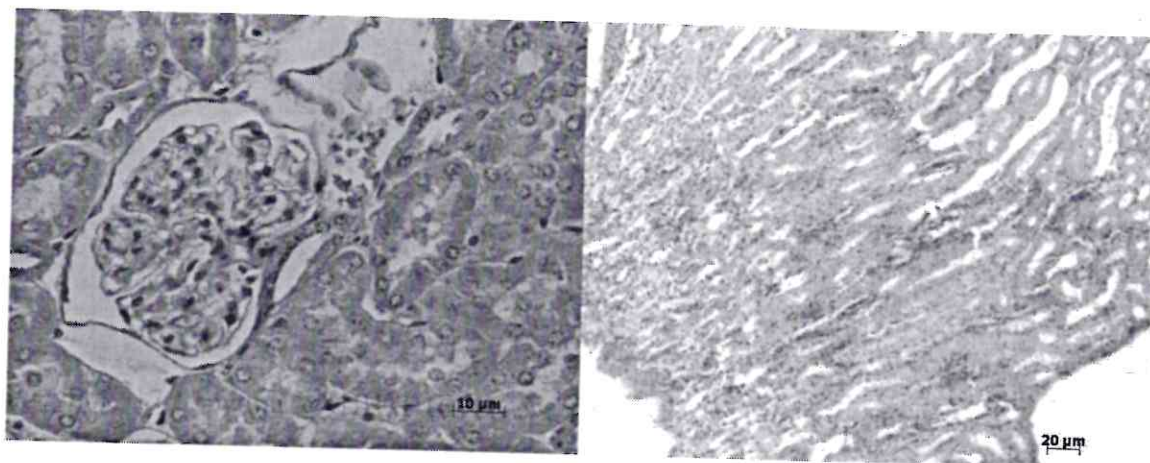
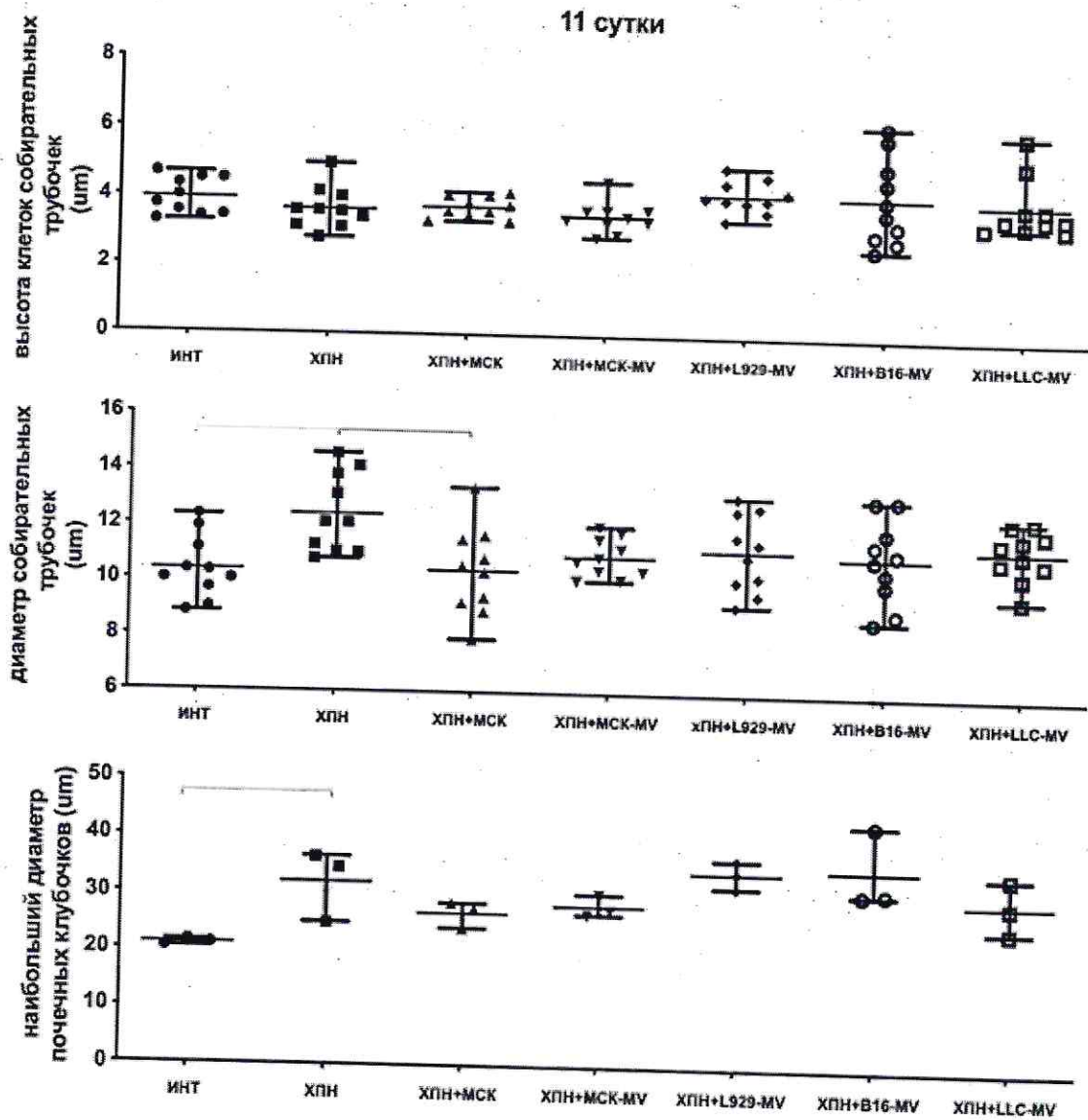


Рисунок 18. Группа «ХПН+LLC-MV 11 с». (а) Клубочек почки и проксимальные каналцы. (б) Протоки Беллини сосочка почки. Окраска гематоксилином и эозином.



ИЗМЕРЕНИЕ СТРУКТУР ПОЧКИ ПРИ  
ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ



Приложение 4.

## Проточная цитофлуориметрия

### T-регуляторные клетки $CD4+CD25+Foxp3+$

В процессе постановки эксперимента обнаружена тенденция при оста регуляторных  $CD4+CD25+Foxp3+$  Т-клеток как при использовании МСК и L929, так и полученных из них микровезикул при ОПН. Природа используемых клеток и полученных из них микровезикул не оказывала существенного значения на конечный результат экспериментов (Рис.19-20).

При хронической почечной недостаточности трансплантация МСК и МСК-МВ тенденция противоположная. Влияние МСК и МСК-МВ сопоставимы между собой. (Рис.21)

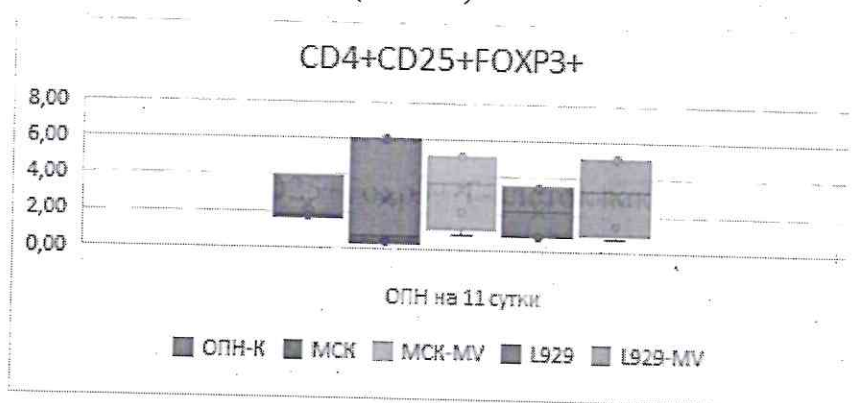


Рис. 19. Содержание  $CD4+CD25+Foxp3+$  в клетках селезенки мышей ( $n=7$ ) с ОПН на 11 сутки после трансплантации им МСК, фибробластов L929 (А,) или микровезикул (В), полученных из МСК (МСК-МВ) или L929 (L929-МВ). ОПН-К- контроль без воздействия.

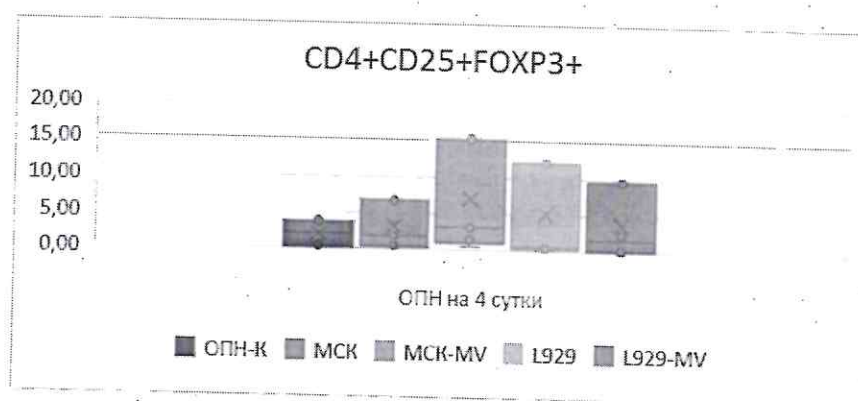


Рис.20. Содержание  $CD4+CD25+FoxP3+$  в клетках селезенки мышей ( $n=7$ ) с ОПН на 4 сутки после трансплантации им МСК, фибробластов L929 (А,) или микровезикул (В), полученных из МСК (МСК-МВ) или L929 (L929-МВ). ОПН-К- контроль без воздействия.

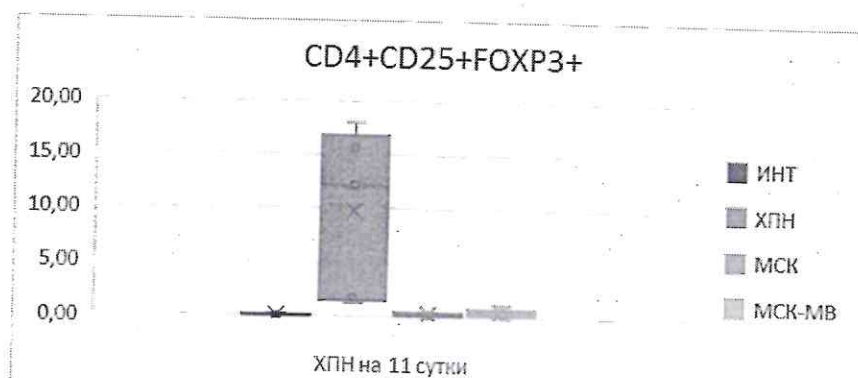


Рис.21. Содержание CD4+CD25+FoxP3+ в клетках селезенки мышей (n= 7) с ХПН на 11 сутки после трансплантации им МСК и МСК-МВ. ХПН – контроль без воздействия.

### *T* клетки памяти CD4+CD44+CD62L+

Содержание клеток памяти CD4+CD44+CD62L+ резко повышается при имплантации как МСК, так и МСК-МВ по сравнению с ХПН-контролем. (Рис.22).

При ОПН наблюдается спонтанное снижение CD4+CD44+CD62L+ на 11 сутки по сравнению с 4 сутками эксперимента.

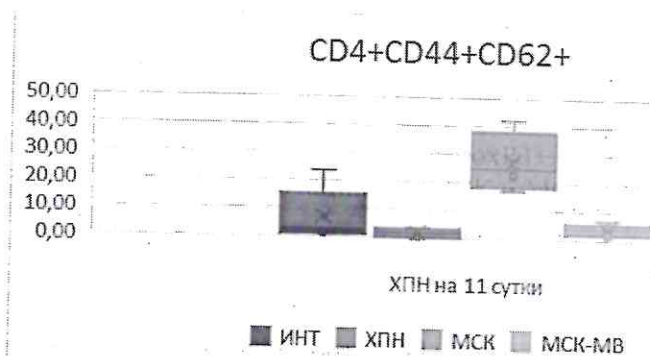


Рис. 22. Содержание CD4+CD44+CD62L+ в клетках селезенки мышей (n= 7) с ХПН на 11 сутки после трансплантации им МСК и МСК-МВ. ХПН – контроль без воздействия.



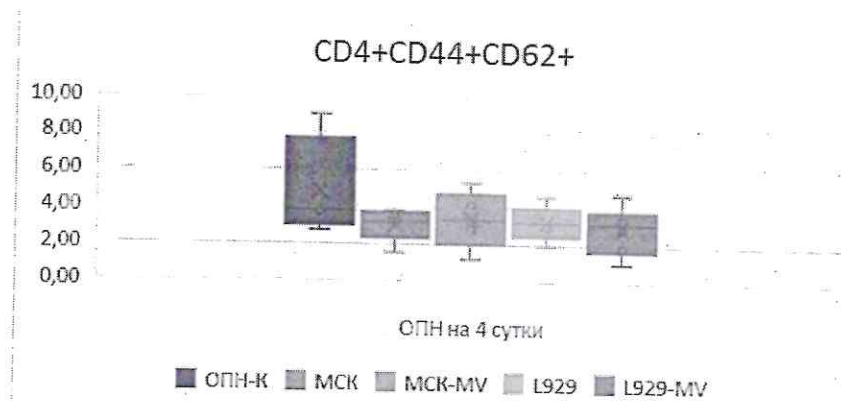


Рис.23. Содержание CD4+CD44+CD62L+ в клетках селезенки мышей ( n= 7) с ОПН на 4 сутки после трансплантации им МСК, L929 или внеклеточных везикул, полученных из МСК ( МСК- MV) или L929 (L929- MV). ОПН-К- контроль без воздействия.

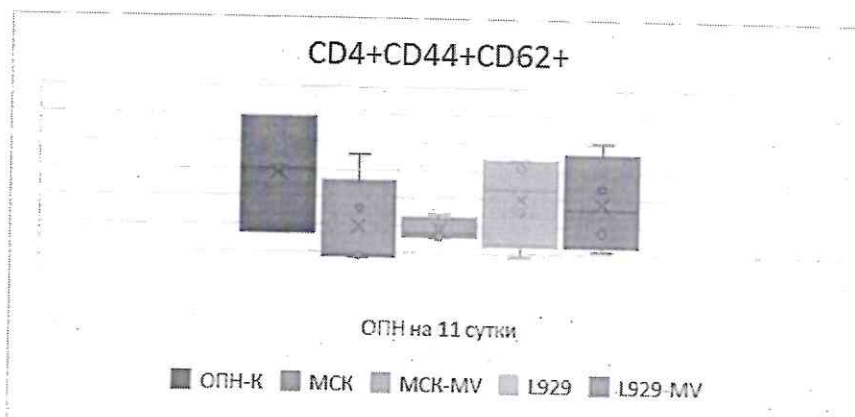


Рис. 24. Содержание CD4+CD44+CD62L+ в клетках селезенки мышей ( n= 7) с ОПН на 11 сутки после трансплантации им МСК, L929 (А,) или внеклеточных везикул, полученных из МСК ( МСК- MV) или L929 (L929- MV). ОПН-К- контроль без воздействия.

*Т* клетки памяти  $CD8+CD44+CD62L+$

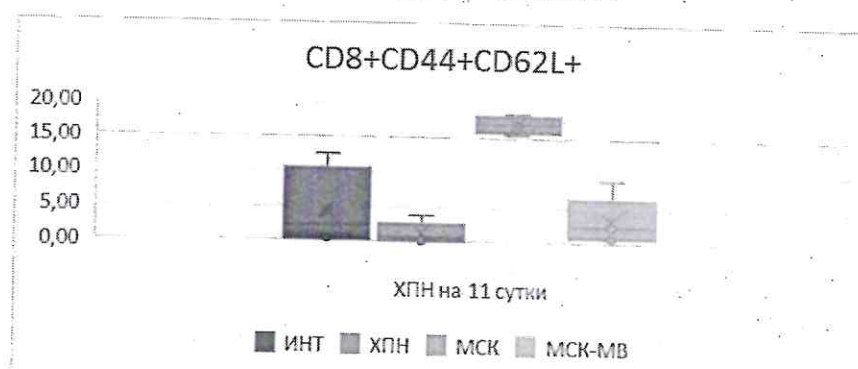


Рис.25. Содержание  $CD8+CD44+CD62L+$  в клетках селезенки мышей ( $n=7$ ) с ХПН на 11 сутки после трансплантации им МСК или внеклеточных везикул, полученных из МСК (МСК-МВ). ХПН – контроль без воздействия.

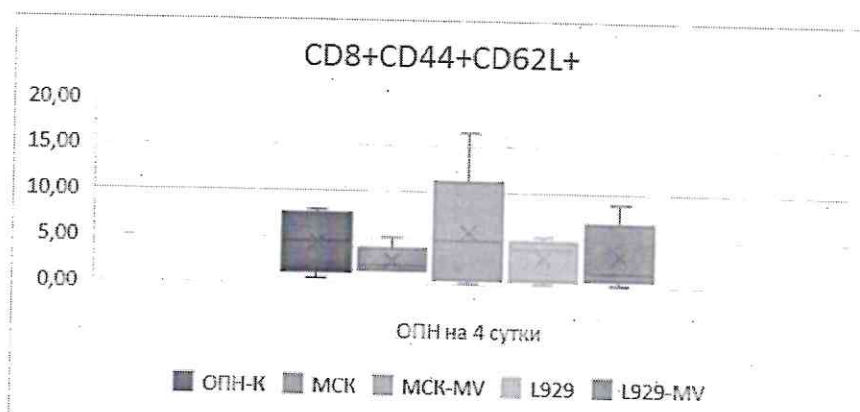


Рис.26. Содержание  $CD8+CD44+CD62L+$  в клетках селезенки мышей ( $n=7$ ) с ОПН на 4 сутки после трансплантации им МСК, фибробластов L929 (А,) или внеклеточных везикул, полученных из МСК (МСК-МВ) или L929 (L929-МВ). ОПН-К-контроль без воздействия.

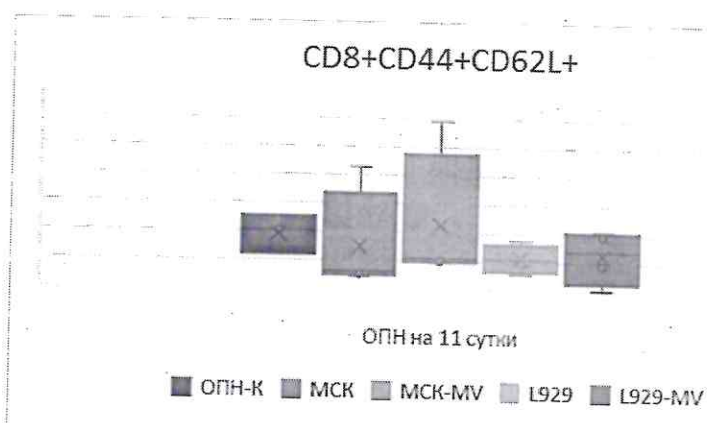


Рис.27. Содержание  $CD8+CD44+CD62L+$  в клетках селезенки мышей ( $n=7$ ) с ОПН на 4 сутки после трансплантации им МСК, фибробластов L929 (А,) или

внеклеточных везикул, полученных из МСК (МСК- MV) или L929 (L929- MV). ОПН-К-контроль без воздействия.

Эффекты применения клеток и микровезикул не существенно отличались по воздействию на клетки иммунной системы. Более выраженным действием обладали микровезикулы, причем MV из L929 снижали содержание клеток памяти более выражено на 11 сутки эксперимента (Рис. 23-27).

## ВЫВОДЫ

1. При острой почечной недостаточности (ОПН) трансплантация мезенхимальных стромальных клеток и полученных из них внеклеточные везикул привела к снижению уровня креатинина и альбумина, сопровождалась улучшением гистологической картины почек, что говорит об их сопоставимой эффективности.
2. При хронической почечной недостаточности (ХПН) трансплантация как МСК, так и продуцируемые ими внеклеточные везикулы, привели к улучшению гистологической картины почек, но практически не повлияли на уровень альбумина и креатинина.
3. При хронической почечной недостаточности (ХПН) трансплантация внеклеточные везикул различного генеза (L929, B16, LLC), показывают улучшение гистологической картины и данных по уровню альбумина и креатинина.
4. При хронической почечной недостаточности (ХПН) мезенхимальные стромальные клетки и продуцируемые ими внеклеточные везикулы, приводят к уменьшению уровня Т-регуляторных клеток памяти и повышению уровня Т-клеток памяти.
5. При острой почечной недостаточности (ОПН) трансплантация мезенхимальных стромальных клеток и внеклеточных частиц, полученных из них, практически в равной степени, приводят к повышению уровня Т-регуляторных клеток и снижению уровня Т-клеток памяти, что говорит об иммуноопосредованных механизмах работы МСК и внеклеточных везикул.



## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) Хабалова Т.С., Кащенко Э.А. Влияние трансплантации мезенхимальных стромальных клеток (МСК) и ими продуцируемых микровезикул (MV) на содержание Т-клеток памяти и Т-регуляторных клеток в модели острой почечной недостаточности мышей (ОПН)// Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины: сборник материалов конгресса молодых ученых, 24–25 мая, 2018 г, С.496-499.
- 2) Хабалова Т. С. Оценка влияния трансплантации микровезикул, продуцируемых мезенхимальными стволовыми клетками, на пролиферацию спленоцитов и почечных эпителиоцитов *in vitro*// VI Международная конференция молодых ученых: сборник тезисов конференции, 2019г, С.200-202.
- 3) Хабалова Т.С., Кащенко Э.А. Влияние трансплантации мезенхимальных стромальных клеток и ими продуцируемых микровезикул на содержание Т-клеток памяти и Т-регуляторных клеток в модели хронической почечной недостаточности мышей//Фундаментальная и клиническая онкология: достижения и перспективы развития, 2019, С.234-237.
- 4) Хабалова Т.С., Кащенко Э.А., Селедцова Г.В. Сравнительная характеристика содержания Т-клеток памяти и Т-регуляторных клеток при трансплантации мезенхимальных стромальных клеток и полученных из них внеклеточных везикул в модели почечной недостаточности// Гены и Клетки, 2019. Т. XIV, С.246.
- 5) Хабалова Т.С., Кащенко Э.А., Селедцова Г.В. Иммунорегуляторные свойства и прорегенеративное действие микровезикул (МВ), продуцируемых мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) в модели острой почечной недостаточности (ОПН) мышей// РИЖ, 2019, том 13 (22), №2-3, С. 259-261
- 6) Хабалова Т.С., Кащенко Э.А., Селедцова Г.В. Влияние трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и ими продуцируемых микровезикул (МВ) на содержание Т-клеток памяти и Т-регуляторных клеток в модели острой почечной недостаточности (ОПН) мышей// РИЖ, 2019, том 13 (22), №2-3, С. 262-264