Эффективность коррекции клинических и морфологических признаков сахарного диабета 2 типа при трансплантации клеток костного мозга в зависимости от стадии заболевания

О.И. Степанова, В.Н. Каркищенко, Н.Н. Каркищенко, Н.А. Онищенко*, О.В. Баранова, Х.Х. Семенов, Т.Б. Бескова, Н.В. Касинская

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область
** — Научный центр Трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова, Минзравсоцразвития РФ, Москва*

Контактная информация: к.б.н. Степанова Ольга Ивановна scbmt@yandex.ru

Впервые применен метод лечения СД 2 типа с помощью аллогенных и изогенных культивированных клеток костного мозга на отечественной генетической модели СД 2 типа (мыши db/db), воспроизводящей клинические проявления СД 2 типа у человека. В работе были установлены условия, при которых оптимизируются эффекты лечения с помощью стволовых и прогениторных клеток костного мозга. Установлено, что пролонгированный клинический эффект регуляции углеводного обмена и предотвращение глубоких структурных патогенетических нарушений во внутренних органах наступают при использовании клеток костного мозга в раннюю стадию развития СД 2 типа в высоких дозах или многократном применении умеренных доз клеток, что позволяет длительно компенсировать углеводный обмен за счет сохранения адекватной функциональной активности островкового аппарата поджелудочной железы. Полученный метод можно рассматривать как предклинический этап изучения возможности и перспективности применения клеток костного мозга в комплексном лечении СД 2 типа.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, мыши db/db, поджелудочная железа, клетки костного мозга.

Сахарный диабет (СД) остается одним из наиболее распространенных хронических заболеваний, приводящих к глубокой инвалидизации и гибели людей трудоспособного возраста во всем мире. Эксперты прогнозируют дальнейший рост этой патологии, особенно СД 2 типа, что заставляет искать новые, более эффективные способы терапии. В связи с развитием клеточных технологий и отсутствием работ по применению их при данном заболевании, было решено в эксперименте изучить различные режимы применения клеток костного мозга на модели СД 2 типа. Отсутствие в России такой экспериментальной модели и, соответственно, данных об изменениях клинических проявлений СД 2 типа под влиянием аллогенных или изогенных клеток костного мозга и определило актуальность данного исследования.

Целью настоящего исследования явилось изучение целесообразности использования мутантных мышей линии C57BL/KsJYLepr^{db}/+ в качестве модели при проведении экспериментальных работ по коррекции СД 2 типа методом трансплантации клеток костного мозга.

Материалы и методы

Для достижения намеченной цели работа проводилась по трем основным направлениям: по пути изучения динамики патофизиологических изменений состоя-

ния животных в генетической модели СД 2 типа, по пути освоения техники применения клеточных технологий и по пути исследования возможностей коррекции СД 2 типа с помощью аллогенных и изогенных клеток костного мозга (ККМ).

Патофизиологические изменения в организме при СД 2 типа изучали на мутантных мышах C57BL/KsJYLepr^{db}/+ (B/Ks-Lepr^{db}/+), которые несут рецессивный ген leptin receptor-Lepr^{db} — (db) (8-я группа сцепления, 4-я хромосома). Ген db в гомозиготном состоянии вызывает диабет, сходный с diabetes mellitus, с дегрануляцией β-клеток в островках поджелудочной железы (ПЖ), но без дефицита инсулина. Мыши-диабетики B/Ks-Lepr^{db}/Lepr^{db} (db/db) обоих полов бесплодны [1, 4, 8]. Для контроля динамики развития СД 2 типа использовали группу здоровых мышей — фенотипически здоровые гетерозиготные мыши той же линии B/Ks-Lepr^{db}/+ (db/+).

Для коррекции клинических и морфологических признаков СД 2 типа использовали модель гомозиготных мутантных мышей линии db/db. Контрольную группу составили мыши с СД 2 типа без введения ККМ.

В опытных группах на фоне развития СД вводили ККМ мышам в возрасте 1 мес., т. е. на первой стадии СД, и в возрасте 3–4 мес., т. е. на второй стадии развития СД.

В опытных группах для коррекции клинических и морфологических нарушений в организме использовали аллогенные клетки (гемопоэтической и стромальной фракций) КМ от здоровых доноров мышей линии B10.GFP или изогенные клетки (гемопоэтической и стромальной фракций) КМ от фенотипически здоровых гетерозиготных мышей той же линии db/+.

Все работы по выделению клеток и их культивированию проводились в соответствии с общими принципами культуральных исследований на живых и трупных донорах (срок гибели животных 30–40 мин). Исследовали жизнеспособность гемопоэтических клеткок костного мозга (ГПККМ) и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (фибробластоподобные клетки) (ММСК КМ) по их окраске трипановым синим, а также исследовали пролиферативную активность в культуре ММСК КМ по скорости образования монослоя.

Введение ККМ проводили внутрибрюшинно, возраст доноров соответствовал возрасту реципиентов, сроки наблюдения составили 2 и 4 мес.

При введении ККМ на второй стадии заболевания (3–4 мес.), когда имели место выраженные клинические признаки, было выполнено 6 опытных серий, из них 3 серии с трансплантацией аллогенных ККМ от здоровых доноров мышей B10.GFP:

серия 1.1 — мышам db/db в возрасте 3 мес. вводили однократно гемопоэтические ККМ (ГПККМ) в количестве 4,5–5 млн; клетки были культивированы 4 суток;

серия 1.2 — мышам db/db в возрасте 3 мес. вводили однократно некультивированные ККМ в количестве 4,5–5 млн;

серия 1.3 — мышам db/db в возрасте 3,5-4 мес. производили 7-кратное введение ККМ — сначала ГПККМ (мононуклеарная фракция), культивированных в течение 5 суток, и затем ММСК КМ, культивированных в течение 14 суток.

Реципиентам мононуклеарную фракцию ККМ вводили по 4,5–5 млн 4-х-кратно (18–20 млн) с интервалом в 7 дней; ММСК КМ вводили по 2–2,5 млн 3-х-кратно (6–7,5 млн) с интервалом в 14 дней, от пер-

вого введения мононуклеарной фракции.

Также было проведено 3 серии с трансплантацией изогенных ККМ от фенотипически здоровых гетерозиготных мышей той же линии db/+:

серия 2.1 — мышам db/db в возрасте 3 мес. производили трехкратное введение ГПККМ по 8–13 млн (всего 24–39 млн клеток) с интервалом в 3–4 дня; клетки были предварительно культивированы 4 суток;

серия 2.2 — мышам db/db в возрасте 3 мес. производили трехкратное введение ММСК КМ, которые были культивированы в течение 14 суток и вводились с интервалом в 7–14 дней по 8–10 млн (24–30 млн) клеток;

серия 2.3 — мышам db/db в возрасте 3 мес. производили однократное введение ГПККМ в количестве 100 млн, клетки были культивированы в течение 5 суток.

Создаваемые серии опытов различались между собой фенотипом клеток, дозами и способами подготовки их к введению.

При введении ККМ на первой стадии заболевания (1 мес.), характеризующейся начальными признаками СД, в опытной группе было выполнено 2 опытных серии, где нами были использованы наиболее эффективные схемы введения ККМ:

серия 1 — это 7-кратное введение смеси аллогенных гемопоэтических и стромальных ККМ в суммарной дозе 24–27,5 млн клеток;

серия 2 — однократное введение изогенных гемопоэтических в дозе 100 млн клеток.

У мышей-реципиентов в динамике определяли в крови содержание глюкозы, гликозилированного гемоглобина (HbA1c), измеряли массу тела и массу внутренних органов; определяли объем выпитой воды и съеденного корма.

Проводили в динамике гистологиче-

Таблица 1

Значения показателей уровня глюкозы и гликозилированного гемоглобина у мышей с СД 2 типа после введения алло- и изогенных ККМ (в возрасте 5 мес. после рождения)

Серии опытов	Глюкоза, ммоль/л	HbA1c, %
Серия 1.1 (n=25)	17,5±5,42*	6,9±0,48*
Серия 1.2 (n=25)	22,1±3,57*	7,7±0,56*
Серия 1.3 (n=25)	17,2±4,18*	6,7±0,81*
Серия 2.1 (n=30)	19,3±2,49*	7,2±0,67*
Серия 2.2 (n=30)	19,4±4,18*	7,3±0,61*
Серия 2.3 (n=30)	17,1±5,52*	6,6±0,46*
Серия 1 (n=30)	6,9±2,82*	4,4±0,55*
Серия 2 (n=30)	6,7±2,18*	4,4±0,57*
Контроль с СД 2 типа без ККМ (n=25)	26,3±3,61	8,7±0,80
Группа без СД (норма) (n=30)	5,7±0,65	3,9±0,57

где * — $p<0,05$ по сравнению с контролем СД 2 типа без терапии ККМ

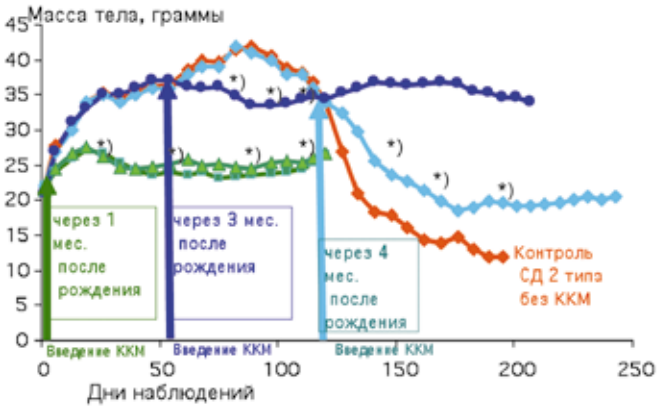

Рис. 1. Динамика изменения массы тела у мышей с СД 2 типа после клеточной терапии на разных стадиях болезни.
* — p <0,05 по сравнению с контрольной группой СД 2 типа без терапии ККМ.

ские исследования поджелудочной железы, печени, почек и селезенки.

Результаты и их обсуждение

После трансплантации ККМ при СД 2 типа на стадии ранних (1 мес. после рождения) и выраженных (3–4 мес. после рождения) патогенетических нарушений в организме выявлено, что при введении ККМ на стадии выраженных клинических проявлений СД 2 типа (3–4 мес.) во всех сериях опытов к 5-ому мес. имеет место снижение глюкозы и HbA1c по сравнению с контролем (табл. 1). Более выраженное снижение было получено в серии 1.3 — при 7-кратном введении аллогенных ККМ разных фракций (ГПККМ и ММСК КМ) и в серии 2.3 с однократным введением максимальной дозы 100 млн изогенных ГПККМ.

В сериях 2.1 и 2.2 (где были введены разные фракции изогенных ККМ почти в одинаковых дозах) были получены равноценные результаты, что также было подтверждено нами гистологически; менее выраженное снижение показателей углеводного обмена получено в серии 1.2, где были введены некультивированные аллогенные ККМ.

Однако при введении алло- и изогенных ККМ на раннем этапе развития СД 2 типа (через 1 мес.) в исследуемых сериях 1-2 к 5-ому мес. мы наблюдали нормальные значения показателей уровней глюкозы и HbA1c, т.е. мы показали, что заблаговременное введение ККМ предотвращало развитие основных клинических проявлений СД: к 5-му мес. уровень глюкозы и HbA1c был достоверно ниже не только по сравнению с контролем, но и по сравнению с опытами, где клеточную терапию проводили на стадии развернутой клинической картины СД (по сравнению с 1.1-2.3).

Из рис. 1 видно, что при введении ККМ на стадии выраженных клинических проявлений (т.е. на 3-й мес.) отмечается лишь стабилизация массы тела и предотвращение её снижения на этапе декомпенсации метаболизма и развития терминальных нарушений в организме, которые возникают в контроле.

- При введении ККМ через 4 мес. предотвратить снижение массы тела не

Таблица 2

Показатели объема выпитой воды и съеденного корма в течение 30 дней после проведения клеточной терапии у мышей на разных стадиях развития СД 2 типа

Серии опытов	Объем выпитой воды, мл	Объем съеденного корма, г
Серия 1.1 (n=25)	13,7±1,41*	5,9±0,24*
Серия 1.2 (n=25)	17,6±1,75*	6,7±0,15*
Серия 1.3 (n=25)	9,44±0,92	4,97±0,34*
Серия 2.1(n=30)	12,5±0,69*	5,54±0,23*
Серия 2.2 (n=30)	12,4±0,92*	5,62±0,32*
Серия 2.3 (n=30)	8,0±1,51*	4,48±0,34*
Серия 1 (n=30)	5,04±0,37*	3,96±0,42*
Серия 2 (n=30)	5,11±0,61	4,02±0,83*
Контроль с СД 2 типа без ККМ (n=25)	25,7±1,18	8,9±0,29
Группа без СД (норма) (n=30)	4,69±0,35	3,74±0,096

где * — $p<0,05$ по сравнению с контрольной группой СД 2 типа без терапии ККМ.

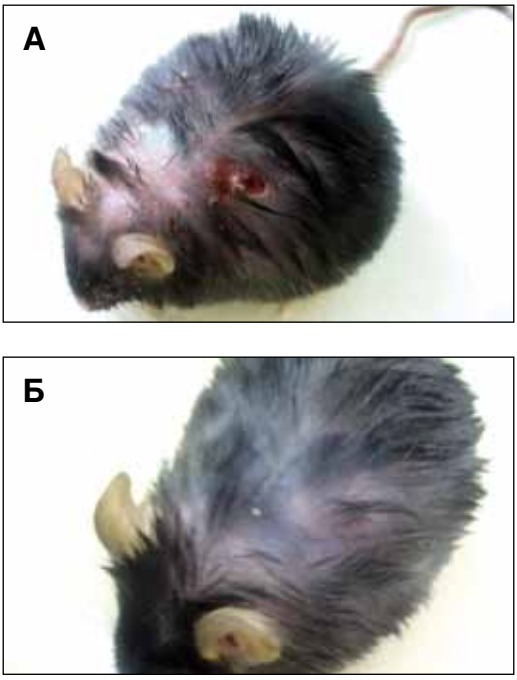

Рис. 2. Состояние кожных покровов у мышей с СД 2 типа до и после проведения аллогенной клеточной терапии (через 120 дней после рождения).
А — Мацерация кожи до введения ККМ.
Б — Заживление кожных ран через 21 день после введения ККМ (серия опыта 1.3).

удавалось, хотя степень снижения её была менее выраженной (масса тела стабилизировалась к 56-ому дню и достоверно удерживалась практически так же до конца эксперимента).

- При раннем введении (через 1 мес.) масса животных в течение 120 дней наблюдений достоверно не отличалась от нормы.

Показатели объема выпитой воды и съеденного корма у мышей с СД 2 типа (табл. 2) менялись в соответствии с другими клиническими показателями. Было отмечено снижение полидипсии и полифагии после алло- и изогенной клеточной терапии во всех сериях, особенно в сериях при введении ККМ на ранних сроках развития болезни (сериях 1 и 2); хорошие результаты были получены на поздних сроках введения ККМ в сериях 1.3 и 2.3, где нами вводились клетки многократно (7 раз) и в максимально высокой дозе. Отмечен регресс трофических изменений кожных покровов: например,

Таблица 3

Сроки жизни животных с СД 2 типа после алло и изогенной трансплантации ККМ на разных стадиях развития СД 2 типа

Серии опытов	Кол-во животных на дожитие	Срок жизни, дни	
		Длительность жизни	Средний срок
Серия 1.1.	5	324, 330, 337, 345, 349	337±10,3*
Серия 1.3.	5	412, 417, 424, 432, 435	424±9,7*
Серия 2.3.	5	431, 442, 447, 456, 459	447±11,3*
Серия 1.	5	486, 505, 508, 513, 520	506±12,7*
Серия 2.	5	514, 526, 539, 548, 557	537±17,1*
Контроль с СД 2 типа без ККМ	5	138, 159, 167, 185, 199	169±23,2

где * — $p<0,05$ по сравнению с контрольной серией СД 2 типа без ККМ.

при введении аллогенных ККМ на поздних сроках в серии 1.3 на рис. 2 показана мацерация кожи до введения, после введения мацерация полностью исчезла. При введении ККМ на ранних сроках мацерация кожных покровов не возникала в течение всего срока наблюдений (120 дней).

При раннем применении ККМ мы наблюдали в течение всего исследуемого срока (120 дней) не только сохранение нормальных показателей клинического состояния животных, но и достоверно более длительные сроки жизни таких животных (табл. 3), не только по сравнению с контролем, но и с животными, получавшими ККМ на поздних сроках жизни (болезни).

При морфологических исследованиях оказалось, что у животных, получивших ККМ на ранней стадии развития СД, в ПЖ через 5 мес. сохраняется большая площадь ОЛ, большее количество клеток в ОЛ и более выраженная базофильность этих клеток (табл. 4 и рис. 3), свидетельствующие об их более высокой функциональной активности, чем в контроле (СД 2 типа без ККМ).

С целью подтверждения присутствия нейроэндокринных (α и β) клеток в составе ОЛ во всех сериях опытов нами проводился иммуногистохимический анализ ОЛ с маркером специфических нейроэндокринных гранул — хромогранином-А, который экспрессируется в цитоплазме клеток эндокринной части ПЖ при их восстановительной регенерации.

Наши результаты показали, что положительное цитоплазматическое окрашивание было выявлено в значительном количестве клеток в островках при позднем, но особенно при раннем введении алло- и изогенных ККМ, и эти данные мы представили на рис. 4А. В контроле с СД 2 типа без введения ККМ положительное цитоплазматическое окрашивание было выявлено только в клетках периферических отделов островков, в

Таблица 4

Морфометрическое исследование островковой ткани ПЖ у мышей db/db
в разных опытных сериях в возрасте 5 мес. после рождения

Серия опытов	Площадь ОЛ ПЖ в усл.ед.	Количество клеток в ОЛ
1.1 (n=16)	37858,73±1021*	131±21*
1.2 (n=17)	31565,25±1025*	112±17
1.3 (n=13)	96555,2±6578*	258±103*
2.1 (n=13)	44284,01±1756*	142±23*
2.2 (n=13)	41327,5±1437*	135±22*
2.3 (n=13)	63696,1±1922*	199±45*
1.1 (n=13)	102143,1±2712*	313±69*
1.2 (n=17)	92299,5±2103*	306±84*
Контроль СД 2 типа без ККМ (n=25)	11318,8±783	81±27
Группа без СД (норма) (n=20)	58954,7±1134	226±40

где * — $p<0,05$ по сравнению со значениями аналогичных показателей контроля (СД 2 типа без ККМ).

зонах нахождения α-клеток, тогда как в центральных участках — местах расположения β-клеток — клетки были хромогранин-А-негативными (рис. 4Б). Данные результаты свидетельствовали об отсутствии признаков восстановительной регенерации островковых клеток в контроле. Примечательно, что метод окрашивания хромоганином-А позволил выявить не выявляемые гистологически рассеянные мелкие скопления положительно окрашенных клеток — от 3 до 6 клеток (рис. 4В, Г) в ткани ПЖ (возможно, новообразующиеся островки?). Часть этих клеток располагалась вблизи протоков ПЖ, что соответству-

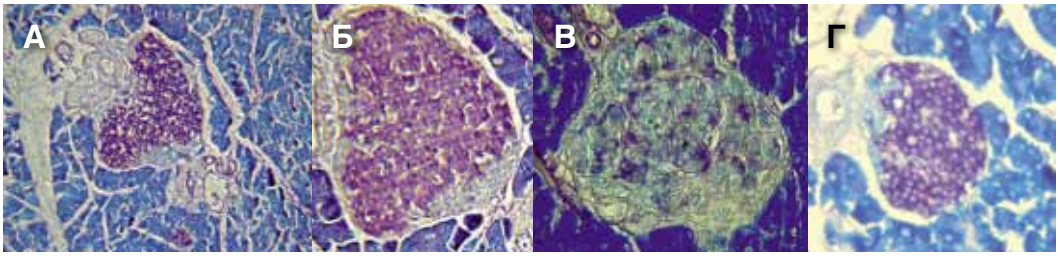

Рис. 3. Островковая ткань поджелудочной железы мышей db/db с СД 2 типа через 120 дней после раннего введения ККМ (через 30-35 суток после рождения). Окраска альдегид-фуксином по Гомори.
А, Б — Базофильные β-клетки в ОЛ при СД после введения ККМ;
А — Увел. х 100;
Б — Увел. х 400; по результатам гистохимического окрашивания количество активно функционирующих β-клеток в ОЛ при сравнении с нормой (Г) было практически одинаковым (визуальная оценка);
В — Уменьшение числа базофильных β-клеток в ОЛ в контроле — СД без ККМ, Увел. х 400;
Г — Базофильные β-клетки в ОЛ ПЖ здоровых мышей db/+ (норма), Увел. х 400.

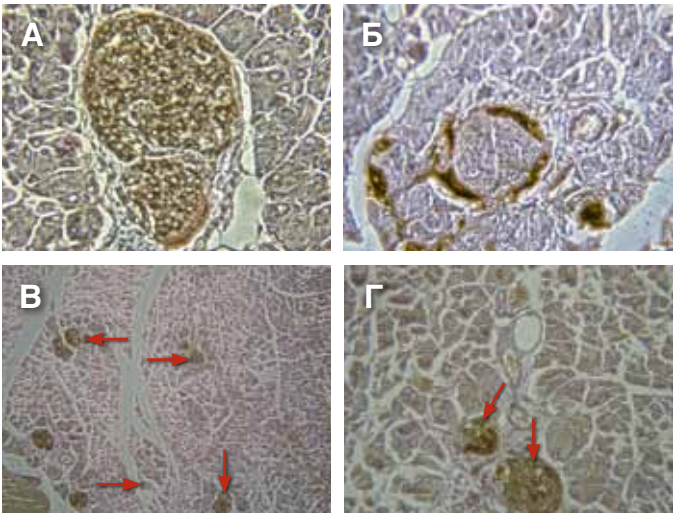

Рис. 4. Иммуногистохимическое исследование поджелудочной железы с хромогранином-А маркером нейроэндокринных гранул в ОЛ (парафиновые срезы).
А — Хромоганин-А в цитоплазме клеток ОЛ на 120 сутки после введения ККМ (опытная серия IV.1), Увел. Х 200;
Б — Хромогранин-А в цитоплазме отдельных клеток периферических участков ОЛ после введения «мертвых» ККМ (дополнительный контроль), Увел. х 200;
В — Хромогранин-А в мелких скоплениях клеток вблизи протоков в ПЖ (указано стрелками) на 120 сутки после введения ККМ (опытная серия 1.3), Увел. х 200;
Г — Хромогранин-А в мелких скоплениях клеток вблизи протоков в ПЖ (указано стрелками) на 120 сутки после введения ККМ (опытная серия 2.3.), Увел. х 400.

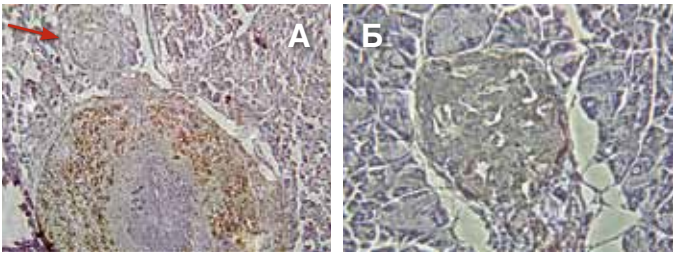

Рис. 5. Иммуногистохимическое выявление через 120 дней после введения ККМ репликации ДНК в ядрах клеток ОЛ ПЖ антителами к Ki-67 (парафиновые срезы).
А — Ki-67-позитивные клетки ОЛ (указано стрелками) после проведения клеточной терапии в опытной серии III.2.3 (свидетельство пролиферативной активности в ОЛ) на фоне высокой пролиферативной активности клеток лимфатического узла (внутренний контроль), Увел. х 200;
Б — Ki-67-негативные клетки ОЛ после введения «мертвых» ККМ контроль, Увел. х 400.

ет представлениям о новообразовании островковых клеток из стволовых клеток, располагающихся вблизи протоков. Эти наблюдения свидетельствуют о стимуляции дифференцировки дуктального эпителия в островковые клетки.

С целью изучения пролиферативной активности клеток островковой части ПЖ после введения ККМ (стволовых и прогениторных клеток) нами было выполнено иммуногистохимическое исследование с использованием маркера репликации ДНК — антитела Ki-67 (маркер пролиферативной активности). По результатам наших исследований установлено, что Ki-67-положительно окрашенные клетки составляют приблизительно от 5 до 15% всех клеток островка — как при позднем, так при раннем сроке введения ККМ. На рис. 5 — положительное окрашивание ядер отдельных клеток ОЛ на фоне высокой пролиферативной активности лимфатического узла. В группах контроля СД без ККМ пролиферативная активность клеток отсутствовала.

Позитивная динамика была отмечена в состоянии других органов. В печени — более выраженное накопление гликогена, лучшая сохранность балочной структуры, а также отсутствие признаков жировой дистрофии (рис. 6), которые наблюдались в контроле к 120-му дню наблюдения, мы также отмечали отсутствие жировой дистрофии гепатоцитов и накопление в них гликогена.

В почках после применения ККМ признаки выраженных дистрофических

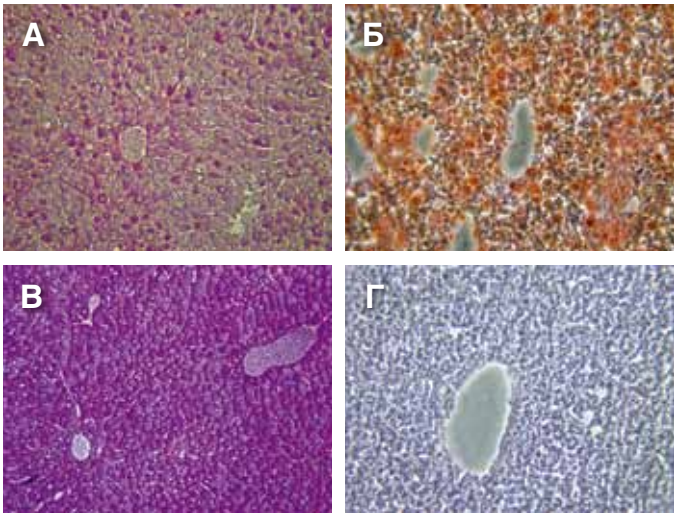

Рис. 6. Ткань печени мышей с СД 2 типа через 120 дней после раннего введения ККМ (через 30-35 суток после рождения).
А — Резкое снижение накопления гликогена в гепатоцитах печени у контрольных мышей db/db через 5 мес. после рождения, окраска PAS — реакцией; Увел. х 400;
Б — Мелко-крупнокапельная жировая дистрофия ткани печени у контрольных мышей db/db через 5 мес. после рождения, окраска Суданом III; Увел. х 400;
В — Полное накопление гликогена в гепатоцитах печени после ранней клеточной терапии, окраска PAS — реакцией; Увел. х 100 (5 мес. после рождения);
Г — Отсутствие жировой дистрофии в ткани печени после ранней клеточной терапии, окраска Суданом III; Увел. х 400 (5 мес. после рождения).

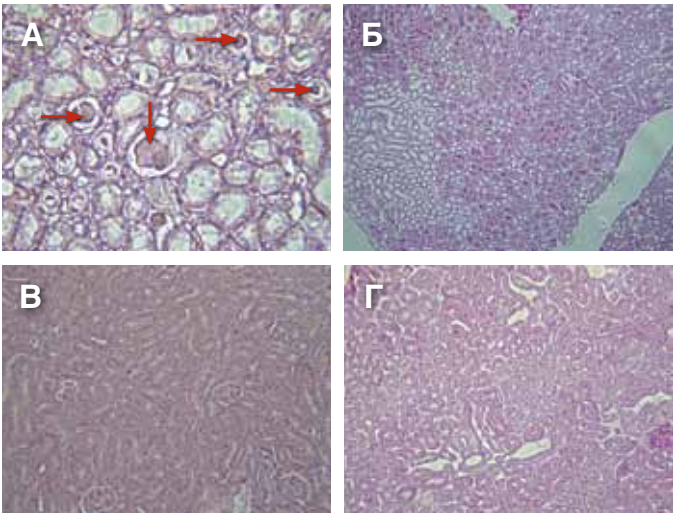

Рис. 7. Ткань почки мышей db/db с СД 2 типа через 120 дней после раннего введения ККМ (на 30–35 сутки после рождения).
А — Эозинофильные массы (указаны стрелками) в просвете извитых канальцев и собирательных трубочек у мыши с СД 2 типа без введения ККМ (контроль); окраска гематоксилин-эозином, Увел. х 400 (5 мес. после рождения);
Б — Отсутствие эозинофильных масс в просвете извитых канальцев и собирательных трубочек в почке у мыши с СД 2 типа после введения ККМ; окраска гематоксилин-эозином, Увел. х 400 (5 мес. после рождения);
В — PAS-положительные массы в просвете канальцев у мыши с СД 2 типа без введения ККМ (контроль), Увел. х 200 (5 мес. после рождения);
Г — Отсутствие PAS-положительных масс вблизи апикальных поверхностей эпителия канальцев в почках при СД 2 типа после клеточной терапии, Увел. х 200 (5 мес. после рождения).

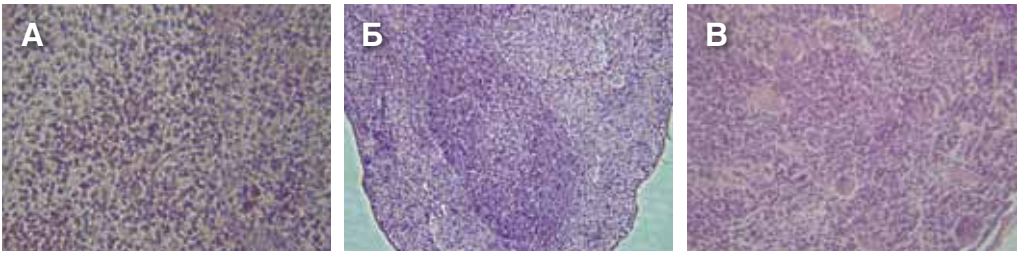

Рис. 8. Ткань селезенки мышей с СД 2 типа без клеточной терапии и через 120 дней после раннего введения ККМ (через 30-35 суток после рождения), окраска гематоксилин-эозином.
А — СД 2 типа без применения ККМ (контроль). Рисунок ткани селезенки стерт, признаки гипоплазии (5 мес. после рождения), Увел. х 200;
Б — Серия 1. СД 2 типа с введением ККМ. Сохранение четкой структуры лимфоидных фолликулов, Увел. х 400;
В — Серия 1. Выраженный мегакариоцитоз (указаны стрелками мегакариоциты) в ткани селезенки после введения ККМ; Увел. х 400.

изменений канальцев, а также скопление в их просвете эозинофильных белковых и PAS-положительных масс отсутствовали (рис. 7), тогда как в контроле они были резко выраженными.

Установленная сохранность структур органов, участвующих в патогенезе СД и его осложнений, свидетельствует, прежде всего, о более высоком регенерационном потенциале тканей этих органов и о более высоком их адаптационном и компенсаторном резерве. Т. к. ведущая роль в процессах адаптации и регенерации принадлежит иммунной системе, мы исследовали морфологическое состояние органов иммуногенеза.

Мы установили, что под действием ККМ в ткани селезенки формируются крупные лимфоидные фолликулы, наблюдается интенсивная бластотрансформация лимфоидных клеток (рис. 8), что свидетельствует о восстановлении структуры селезенки как иммунокомпетентного органа и о восстановлении её иммунорегуляторной активности. Важно подчеркнуть, что нами впервые был установлен факт, что в ткани селезенки под влиянием как изогенных, так и аллогенных ККМ возникают нетипичные для этого органа признаки активизации кроветворения (мегакариоцитоз) (рис. 8 В). Тогда как в контроле рисунок ткани стерт и имеются все признаки гипоплазии этого органа.

Для выявления связи возникновения позитивных клинических, биохимических и морфологических изменений в организме мышей с СД 2 типа при введении ККМ с их жизнеспособностью в течение длительного срока (120 дней) нами были проведены исследования по выявлению распределенных по органам жизнеспособных аллогенных донорских клеток от мышей B10.GFP. Мы установили, что донорские ККМ в криопрепаратах из разных органов (рис. 9) — по крайней мере, в течение 120 дней — не погибают, а сохраняют свою жизнеспособность. Сохраняющаяся люминесценция криосрезов разных органов позволила нам по святящемуся зеленому белку ККМ выявить донорские клетки в органах и связать возникающие в них изменения (морфологические и функциональные) со стимуляцией в этих органах процессов адаптации и компенсации функции паренхимы клеток.

Гистологическим методом мы выявили у реципиентов во внутренних органах присутствие донорского гена зеленого белка на 60-е и 120-е сутки после введения, также нами было подтверждено (пробы из печени) с помощью более точного (проведением полимеразной цепной реакции (ПЦР)) метода присутствие донорских клеток у реципиентов в те же сроки (рис. 10) [11].

Ставя перед собой цель изучить целесообразность применения алло- и изогенных ККМ для коррекции метаболических и морфологических нарушений при СД 2 типа как более распространенной и более социально значимой патологии, нам необходимо было не только оптимизировать дозу используемых клеток, определить эффекты фенотипа ККМ и значения их гистосовместимости, но также провести исследования на модели СД 2 типа у животных. Оказалось, что охарактеризованная экспериментальная модель СД 2 типа отсутствует, и поэтому наши исследования по применению стволовых и прогениторных ККМ мы начали с изучения пригодности генетической модели с нарушением углеводного обмена у животных, используя для этого мутантных мышей линии C57BL/KsJYLepr^{db}/+ (B/Ks-Lepr^{db}/+). Оказалось, что мыши с

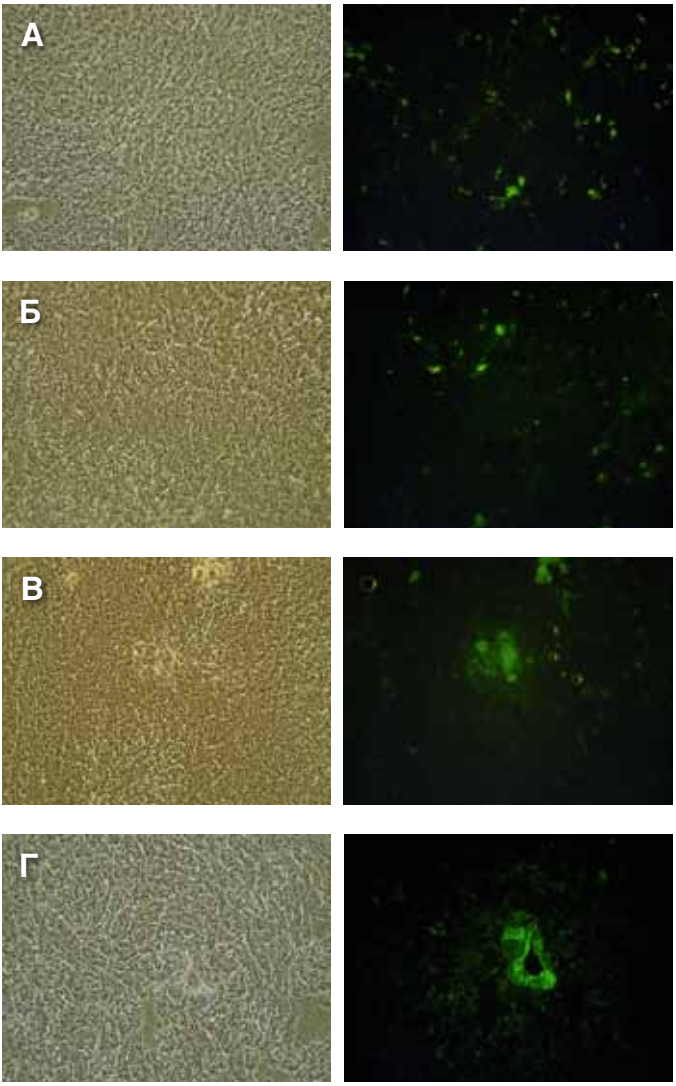

Рис. 9. Распределение донорских ККМ (мыши B10.GFP) в органах через 120 суток после внутрибрюшинного введения реципиентам db/db. Увел. х 200.
А — поджелудочная железа;
Б — печень;
В — селезенка;
Г — флюоресцентное свечение в периваскулярных участках почечной артерии; слева — фазово-контрастная микроскопия; справа — люминесцентная микроскопия.

нарушением углеводного обмена несут рецессивный ген leptin receptor-Lepr^{db} — (db) (8-я группа сцепления, 4-я хромосома), где ген db в гомозиготном состоянии вызывает диабет, сходный с diabetes mellitus, с дегрануляцией β-клеток в островках ПЖ, но без дефицита инсулина, где мыши-диабетики db/db обоих полов бесплодны [2, 5, 9]. Эти мыши были предоставлены нам лабораторией генетики НЦБМТ РАМН. Мутантные мыши линии B/Ks-Lepr^{db}/+ были подвергнуты динамическому обследованию от рождения до их естественной гибели. У этих мышей проводились исследования содержания в крови глюкозы, HbA1c, массы тела, исследовали пищевой и питьевой режим, а также клинические проявления нарушения углеводного обмена, включая гистологические и гистохимические исследования состояния внутренних органов. Контролем к опытным мышам db/db служили здоровые гетерозиготные мыши db/+ той же линии B/Ks-Lepr^{db}/+ и мыши линии C57BL/10 (B10). Оказалось, что у исследуемых мышей db/db по сравнению с двумя другими контролями наблюдались типичные изменения углеводного обмена, быстрое нарастание массы тела, изменения со стороны кожных покровов и внутренних органов, характерные для СД 2 типа. Внутренние органы мышей db/db характеризовались стадийными изменениями, прежде всего тканей ПЖ. На ранней стадии развития СД 2 типа у мышей db/db ко 2-му мес. развивается гиперплазия ОЛ, достоверно увеличивается их площадь и количество базофильных клеток в ОЛ по сравнению с контролями. С увеличением возраста мышей db/db (к 4–6 мес.) площадь ОЛ и количество базофильных клеток в ОЛ достоверно снижается по сравнению с контролем, причем это снижение становится более выраженным к 6-ому мес. К 2–4-ому мес., но особенно к 4-ому мес., у мышей db/db появляются другие клинические признаки СД 2 типа, такие как развитие ангиопатии и дисфункции иммунной системы. Проявлениями этих нарушений были мацерация кожных покровов в области холки и резкое ожирение, которое к 5–6-ому мес. переходило к стадии кахексии и гибели животных на фоне снижения массы

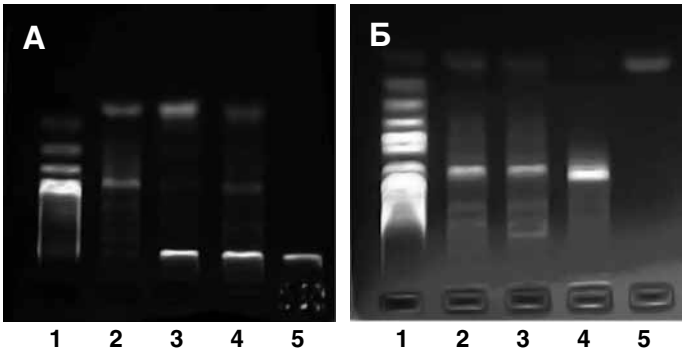

Рис. 10. Электрофоретический спектр продуктов амплификации от мышей реципиентов db/db на 60-120 сутки после введения аллогенных ККМ.
А — на 60 сутки после введения ККМ: 1 — маркер молекулярной массы, 2 — без гена зеленого белка, 3-5 — наличие гена зеленого белка;
Б — на 120 сутки после введения ККМ: 1 — маркер молекулярной массы, 2-4 — наличие гена зеленого белка, 5 — без гена зеленого белка.

селезенки к 6-му мес. Изменения структуры селезенки связаны с уменьшением площади фолликулов белой пульпы. Указанные изменения свидетельствуют о снижении неспецифического иммунитета у мышей db/db при СД 2 типа к 5–6-ому мес. жизни, что подтверждается данными литературы об ингибировании гликолиза в лимфоцитах [6], т. е. основного пути образования энергии в этих клетках. Уменьшение концентрации фруктозо-2,6-бисфосфата (Ф-2,6-Р2) в лимфоцитах, являющегося мощным регулятором гликолиза в этих клетках, тормозит энергообразование и делает невозможным нормальное функционирование лимфоцитов и иммунной системы в целом при тяжелой (декомпенсированной) форме СД (в нашем эксперименте, это больные мыши 5–6-мес. возраста с явлениями выраженной глюкоземии). Исследование изменений содержания Ф-2,6-Р2 в лимфоцитах периферической крови, тимуса и селезенки у больных СД 2 типа (по данным литературы) [13, 14] показало, что при отсутствии лечения в начальной стадии СД наблюдается повышение уровня Ф-2,6-Р2 почти в 2,5 раза по сравнению с контрольной группой, у больных с компенсированной в результате лечения пероральными антидиабетическими препаратами формой диабета уровень Ф-2,6-Р2 нормализуется, а у больных с тяжелой (декомпенсированной) формой СД концентрация Ф-2,6-Р2 резко снижается [6]. Таким образом, данные литературы объясняют обнаруженные нами изменения со стороны лимфоидной ткани у мутантных мышей db/db, больных СД 2 типа, развивающиеся к 5–6 мес. жизни.

Гистологически в печени мышей db/db были выявлены признаки жировой дистрофии и снижение содержания гликогена. В почках имело место накопление эозинофильных и PAS-положительных субстанций, которое свидетельствовало о глубоких нарушениях углеводного и белкового обменов в организме. Полученные данные позволили прийти к заключению, что мутантные мыши db/db являются адекватной моделью постепенного развития (3 стадии) СД 2 типа в организме [10]. Именно эти мыши оказались пригодными для динамического изучения различных корректирующих воздействий, в том числе стволовыми и прогениторными ККМ, что в наших экспериментах и было целью исследования.

При использовании стволовых и прогениторных ККМ нам было необходимо установить эффективную дозу, фенотип (ГПККМ или ММСК КМ) клеток, который оказывает выраженный корректирующий эффект (с визуализацией), и значение гистосовместимости (алло- или изогенных) клеток донора и реципиента, а также выявить ту стадию СД, которая поддается наиболее выраженной регуляции. Для ответа на эти вопросы нами были выполнены 2 основные группы исследований. В 1-ой группе исследований стволовые и прогениторные ККМ трансплантировали на этапе выраженной клинической картины заболевания, которая имела место через 3–4 мес. после рождения мышей db/db. А во 2-ой группе — стволовые и прогениторные ККМ в больших дозах трансплантировали на этапе ранних сроках развития СД 2 типа (через 1 мес. после рождения), когда имела место лишь гипергликемия в результате инсулинорезистентности.

В 1-й группе исследований были проведены опытные серии аллогенными ККМ с геном зеленого белка (GFP) (1.1, 1.2, 1.3) и серии изогенными ККМ (2.1, 2.2, 2.3).

В серии 1.1 — трансплантировали однократно 4,5–5 млн культивированных гемопоэтических клеток (ГПККМ), в серии 1.2 — такое же количество некультивированных ККМ, а в серии 1.3 — проводили 7-ми-кратное введение сначала ГПККМ, а затем ММСК КМ, общее количество которых составляло 24–27,5 млн.

В опытной серии 2.1 — 3-х-кратно трансплантировали ГПККМ в количестве 24–39 млн, в серии 2.2 — 3-х-кратно трансплантировали ММСК КМ в количестве 24–30 млн, а в серии 2.3 — однократно вводили ГПККМ в количестве 100 млн.

Во 2-й группе экспериментов в первой серии опытов (1) трансплантировали 7-ми-кратно аллогенные ККМ (сначала ГПККМ, а потом — ММСК КМ), общая доза 24–27,5 млн, а во второй серии (2) трансплантировали однократно 100 млн изогенных ГПККМ.

Во всех сериях и группах опытов клетки КМ вводили внутрибрюшинно. Клеточную терапию проводили без диет (в свободном доступе животных к брикетированному корму, кашам с растительным маслом, овощам, сухому молоку, хлебным сухарям и воде), что максимально приближало исследования к реальным условиям. ККМ получали либо от аллогенных (B10.GFP), либо от изогенных (db/+) здоровых доноров. Все работы по выделению клеток и их культивированию проводились в соответствии с общими принципами культуральных исследований на живых и трупных донорах (срок гибели животных 30–40 мин). Исследовали жизнеспособность клеток гемопоэтической и стромальной фракций ККМ по окраске трипановым синим, а также исследовали пролиферативную активность в культуре стромальных ККМ по скорости образования монослоя. При этом нами были получены микрофотографии, доказывающие подлинность культуры ГПККМ, что было подтверждено на проточном цитофлуориметре. Подлинность культуры ММСК КМ также подтверждена микрофотографиями, для идентификации фибробластоподобных ММСК КМ был использован иммуногистохимический метод на коллаген I типа.

Важно подчеркнуть, что во всех сериях опытов, кроме серии 1.2, донорские клетки КМ предварительно культивировали для активизации биорегуляторной активности стволовых и прогениторных ККМ. Необходимость применения культивированных изогенных ККМ от здоровых доноров у мышей db/db с СД 2 типа была обусловлена тем, что собственные аутологичные ККМ (стволовые и прогениторные клетки) у больных с хронической патологией, какой является СД, имеют сниженный биорегуляторный потенциал [3].

Наши исследования по трансплантации алло- или изогенных ККМ на этапе выраженной клинической картины СД 2 типа показали, что эффективность этого метода недостаточна для коррекции всех развивающихся нарушений. Нами было установлено, что трансплантация ККМ мышам db/db с СД 2 типа через 3–4 мес. после рождения приводила во всех сериях опытов с применением алло- или изогенных ККМ к снижению уровня глюкозы и HbA1c в крови, к достоверному снижению массы тела или сохранению массы тела на одном уровне в течение 60-70 дней после трансплантации клеток КМ. Однако снижение этих показателей не достигало значения нормы, было нестабильным и непродолжительным. При применении культивированных алло- или изогенных ККМ у животных с СД 2 типа удавалось

снизить признаки полидипсии, полифагии и полиурии, особенно при многократном применении аллогенных клеток в серии 1.3 и при однократном применении изогенных клеток в дозе 100 млн (серия 2.3), отмечался регресс трофических изменений кожных покровов в серии 1.3, в остальных опытных сериях мацерация не возникала, т.к. животные использовались в эксперименте в возрасте 3 мес., и к достижению возраста 120 дней им уже была проведена клеточная терапия. Между тем, длительность жизни животных, получивших терапию ККМ, увеличивалась в 1,7–2,3 раза, и этот факт мы связываем с позитивным изменением морфологического состояния внутренних органов в возрасте 5-ти мес., которое сохранялось на более отдаленных сроках наблюдения (120 дней). В возрасте 5-ти мес. после клеточной терапии у мышей db/db в ПЖ были отмечены явления гипертрофии и гиперплазии ОЛ в ПЖ. Они заключались в достоверном увеличении площади ОЛ и количества в них клеток во всех сериях опытов в 1 группе экспериментов, особенно сильно увеличивалась площадь ОЛ и повышалось количество базофильно окрашенных, активно функционирующих клеток в ОЛ в сериях 1.3 и 2.3, в которых применяли или многократное введение аллогенных ККМ (ГПККМ+ММСК КМ), или однократное введение изогенных ККМ (ГПККМ) в высокой дозе. Отсутствие достоверных различий между остальными сериями опытов позволило нам прийти к заключению, что эффективность применения стволовых и прогениторных ККМ не зависит от фенотипа используемых клеток (ГПККМ или ММСК КМ) и их гистосовместимости (аллогенная или изогенная) с реципиентами, но зависит от дозы и кратности их введения. О позитивном эффекте ККМ, повышающем резистентность тканей к повреждающему действию гипергликемии, свидетельствуют и другие исследования — в частности, иммуногистохимические исследования с хромогранином-А и с антителами к маркеру репликации ДНК Ki-67. При использовании ГПККМ в максимальной дозе (100 млн клеток) эти исследования подтверждают, что ККМ активизируют процессы регенерации и адаптации тех структур, которые участвуют в нормализации углеводного обмена в организме. Показано [7, 12], что стволовые и прогениторные ККМ участвуют в нормализации метаболизма путем ингибирования процессов клеточного апоптоза. Они ингибируют процессы перекисного окисления мембранных структур клеток, способствуют активизации процессов неоангиогенеза и устранению иммунной дезрегуляции, что неизбежно сопровождается восстановлением структур клеток и органов, повышением устойчивости к действию повреждающих факторов и активизации процессов репаративной регенерации. Именно этим, очевидно, объясняется, что при проведении морфологических исследований внутренних органов нами были отмечены позитивные изменения состояния этих органов по сравнению с контролями (СД без ККМ и СД с мертвыми ККМ). При исследовании ткани печени в возрасте 5 мес. после введения ККМ мы констатировали накопление гликогена в гепатоцитах и снижение выраженности жировой дистрофии, причем в большей части наблюдений жировая дистрофия отсутствовала полностью. Морфологические исследования через 120 суток после введения ККМ также подтвердили благоприятное состояние ткани печени этих животных по сравнению с контролем. Аналогичная

позитивная динамика была отмечена в состоянии почек, селезенки и лимфатического узла. Нами было отмечено, что у животных в возрасте 5-ти мес. после введения ККМ имело место во всех опытах с применением алло- или изогенных ККМ достоверное увеличение площади фолликулов селезенки и массы ткани селезенки, причем так же как при морфометрическом исследовании ОЛ ПЖ мы отметили, что наибольшая площадь фолликулов селезенки и наибольшая масса селезенки наблюдались в опытных сериях (1.3 и 2.3). Примечательно, что эти показатели были достоверно выше аналогичных у нормальных животных. Это дает нам право утверждать, что позитивный эффект ККМ связан со стимуляцией органов иммуногенеза и повышением резервов их адаптационных возможностей. Для выявления связи клинических, биохимических и морфологических изменений, наступающих в организме мышей db/db с СД 2 типа после проведения клеточной терапии, с распределением ККМ в организме и их жизнеспособностью нами были проведены исследования с аллогенными донорскими ККМ мышей B10.GFP. Исследование показало, что на 60-е и 120-е сутки после внутрибрюшинного введения введенные клетки достигают разных органов (печень, почки, ПЖ, лимфоидная ткань) и не погибают, а сохраняют свою жизнеспособность.

Недостаточно выраженное влияние ККМ на показатели уровней глюкозы и HbA1c в крови позволило нам предположить, что к моменту применения ККМ (через 3–4 мес. после рождения) регенерация ОЛ оказывается недостаточной для восстановления нарушенного гемостаза и секреторной активности β-клеток. Это заставило нас провести отдельную серию опытов, в которой ККМ вводили не на стадии глубокого повреждения островкового аппарата, а лишь на стадии относительной инсулиновой недостаточности (инсулинорезистентности). В этих исследованиях нами использовались только культивированные ККМ и только в большей или многократной веденной дозе клеток (1 и 2), причем эти клетки трансплантировали через 30–35 суток после рождения.

Наше исследование показало, что в течение 120 суток после трансплантации показатели глюкозы и HbA1c в крови и масса животных поддерживались на уровне нормальных величин и сохранялись на более отдаленных сроках наблюдения (180 дней). Подтверждением нормализации метаболизма у мышей db/db может служить динамическое измерение количества съедаемого корма и выпитой воды, значения которых достоверно отличались от аналогичных у контрольных мышей db/db с СД 2 типа и недостоверно — от нормы. Продолжительность жизни животных этой группы была выше, чем в 1-й группе исследований, и соответствовала, в среднем, 506±12,7 дней и 537±17,1 дней, что в 2,5–2,7 раза больше по сравнению с контролем. Повышение выживаемости мышей db/db, очевидно, связано с лучшей сохранностью состояния паренхимы внутренних органов, что было морфологически подтверждено. При морфологических исследованиях ткани ПЖ и селезенки оказалось, что площадь ОЛ ПЖ и количество клеток в них, а также площадь фолликулов селезенки и её массы были достоверно выше, чем в контроле, и соответствовали значениям этих показателей в 1-й группе опытов в сериях 1.3 и 2.3. Эти данные позволили нам прийти к заключению, что ККМ, используемые во 2-й группе эксперимента, так же активны как в 1-й группе. Однако более выраженное влияние их на показатели углевод-

ного обмена (нормализация глюкозы и HbA1c), очевидно, связано с отсутствием повреждения инсулярного аппарата ПЖ, количество клеток и островков которого остается достаточным для обеспечения адекватной регуляции углеводного обмена. Об этом свидетельствует большое количество базофильных клеток в ОЛ. О более выраженной регуляторной активности ККМ, введенных на раннем этапе развития СД 2 типа, свидетельствуют морфологические изменения печени, почек, но особенно морфологические изменения ткани селезенки, в которой (через 120–180 суток после введения ККМ) отмечается не только четкий рисунок структуры лимфоидных фолликулов, но и выявляются многочисленные участки мегакариоцитоза, не свойственные ткани селезенки. Они свидетельствуют об участии этого органа не только в регуляции иммунной системы у данных животных, но и в регуляции кроветворения, продукции многочисленных цитокинов и ростовых факторов, т. к. известно, что эти мегакариоциты продуцируют, в частности, трансформирующий ростовой фактор, который играет ведущую роль в регуляции аутоиммунных процессов, процессов регенерации и адаптации.

Наши данные свидетельствуют о том, что ККМ, использованные в биологически активных дозах и при отсутствии необратимого повреждения органов-мишеней, могут стать эффективным средством в профилактике развития СД 2 типа, особенно популяции с ожирением и метаболическим синдромом, относящимися к группе риска СД 2 типа.

Использование ККМ на стадии выраженных клинических проявлений СД 2 типа может стать эффективным вспомогательным средством в профилактике развития осложнений и способствовать улучшению качества и сроков жизни у таких больных.

Выводы

Корригирующий эффект терапии клетками костного мозга СД 2 типа впервые изучен на отечественной генетической модели СД 2 типа у мутантных мышей линии C57BL/KsJYLepr^{db}/+. Мутантные мыши линии C57BL/KsJYLepr^{db}/+ отвечают всем требованиям экспериментальной генетической модели СД 2 типа, т. к. воспроизводят стадийность течения заболевания и соответствующие патогенетические, функциональные и структурные изменения в организме.

Развитие СД 2 типа у мышей db/db проходит 3 стадии: 1-я стадия (на 1–2-м мес. со дня рождения) характеризуется гипергликемией за счет гипертрофии и гиперплазии островков Лангерганса в поджелудочной железе (стадия инсулинорезестентности); 2-я стадия (на 3–4-м мес. со дня рождения) характеризуется снижением количества функционирующих β-клеток в островках Лангерганса. На этой стадии возникают ожирение и выраженные изменения со стороны внутренних органов, которые отражают нарушения углеводного и липидного обмена, а также недостаточность иммунной системы (гипоплазия лимфоидной ткани); 3-я стадия (на 5-6-м мес. после рождения) характеризуется развитием кахексии, глубоких изменений внутренних органов, которые прогрессируют и заканчиваются гибелью животного.

Отработанные методы выделения, культивирования и трансплантации гемопоэтической и стромальной фракций клеток костного мозга позволяют осуществлять эффективную коррекцию патогенетических нарушений в организме при СД 2 типа.

Трансплантация аллогенного или изогенного костного мозга животным с СД 2 типа является безопасной и эффективной процедурой, позволяющей корригировать клинические, метаболические и структурные нарушения в организме.

Выраженность терапевтического эффекта от применения клеток костного мозга у мышей с СД 2 типа находится в прямой зависимости от дозы и кратности введения культивированных клеток от здоровых доноров, а также от стадии развития болезни, но не зависит от фенотипа использованных клеток (гемопоэтических или стромальных клеток костного мозга) и их гистосовместимости (изогенные или аллогенные).

Введение культивированных клеток костного мозга на ранней стадии развития СД 2 типа (через 1 мес. после рождения) позволяет пролонгированно сохранять (в течение 5 мес.) нормальные уровни глюкозы и гликозилированного гемоглобина в крови, а также сохранять значения массы тела в пределах нормы за счет индукции пролонгированной гипертрофии и гиперплазии островков Лангерганса в поджелудочной железе и торможения развития патологических изменений во внутренних органах (печень, почки, органы иммуногенеза). Введение клеток костного мозга позволяет в 2,5–2,7 раза увеличить сроки жизни животных по сравнению с контролем (СД 2 типа без клеток костного мозга).

Введение культивированных клеток костного мозга на стадии выраженных клинических проявлений СД 2 типа (3–4 мес. после рождения) не сопровождается достоверным и стабильным снижением уровней гликемии и гликозилированного гемоглобина, однако снижает выраженность патоморфологических изменений во внутренних органах, что способствует сохранению их адекватной функции и пролонгирует сроки жизни животных в 1,7–2,3 раза по сравнению с контролем (СД 2 типа без клеток костного мозга).

Пролонгированное поддержание восстановительного морфогенеза поврежденных органов при моделировании СД 2 типа обусловлено длительным (120 дней) сохранением жизнеспособности введенных клеток костного мозга, что подтверждается люминесценцией клеток костного мозга мышей B10.GFP, содержащих ген зеленого белка.

Список литературы

1. ***Бландова З.К., Малашенко А.М., Крышкина В.П., Семенов Х.Х., Шмидт Е.Ф.*** Правила разведения инбредных лабораторных животных: Методические указания / АМН СССР, НИЛ экспериментально-биологических моделей. М. 1979.
2. ***Бландова З.К., Душкин В.А., Малашенко А.М., Шмидт Е.Ф.*** Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований.: М. Наука. 1983. 42. 105 с.
3. ***Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В. и др.*** Состояние пулов стволовых клеток при экспериментальном сахарном диабете. Клеточные технологии в биологии и медицине 2007. 3: С. 123–126.
4. ***Каркищенко Н.Н.*** Основы биомоделирования. М: ВПК. 2004. 217 с.
5. ***Каркищенко Н.Н.*** Альтернативы биомедицины. Том 1. Основы биомедицины и фармакомоделирования. М: ВПК. 2007. 320 с.
6. ***Коровин Б.Ф., Беляева Н.Ф., Краевой С.А., Голубев М.А., Городецкий В.К., Маркова М.С., Кольченко О.Л.*** Изменение содержания фруктозо-2,6-биофосфата в лимфоцитах пери-

ферической крови больных сахарным диабетом. М.: Вопросы медицинской химии. 1999. № 3. С. 37–43.

7. ***Расулов М.Ф.*** Использование мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и эмбриональных фибробластов в лечении ожоговых ран. М: Тихоокеанский мед. журнал. 2004. № 1 (15). С. 7–9.
8. ***Сарвилина И.В., Каркищенко В.Н., Горшкова Ю.В.*** Междисциплинарные исследования в медицине. М: Техносфера. 2007. 368 с.
9. ***Степанова О.И., Каркищенко Н.Н., Баранова О.В., Галахова Т.В., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б., Степанова Е.А., Закирьянов А.Р., Онищенко Н.А.*** Мутантные мыши линии C57BL/KsLepr^{db}/+ как генетическая модель сахарного диабета 2-го типа. М: Бюллетень экспер. биол. и мед. 2007. № 12. С. 664–667.
10. ***Степанова О.И., Каркищенко В.Н., Баранова О.В., Галахова Т.В., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б., Онищенко Н.А., Касинская Н.В.*** Генетическая модель сахарного диабета 2 типа на мутантных мышах линии C57BL/KsLepr^{db}/+ М: Биомедицина. 2009. № 2. С. 28–40.
11. ***Касинская Н.В., Степанова О.И., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б., Капанадзе Г.Д., Ревякин А.О., Деньгина С.Е.*** Ген зеленого белка как маркер при трансплантации стволовых и прогениторных клеток костного мозга. М: Биомедицина. 2011. № 2. С. 30–34.
12. ***Потапов И.В., Крашенинников М.Е., Онищенко Н.А.*** Клеточная кардиомиопластика. М: Вестник трансплантологии и иск. органов. 2001. № 2. С. 54–62.
13. ***Теппермен Дж., Теппермен Х.*** Физиология обмена веществ и эндокринной системы. / Пер. с англ. Под ред. Я.И. Ажипы — М.: Мир. 1989. С. 488–599.
14. ***Hers H.G.*** The discovery and biological role of fructose 2,6 biphosphate. Biochem. Soc. Trans. 1984. 12: 729.

Efficiency of correction of clinical and morphological symptoms of diabetes 2 types at transplantation of stem cells depending on a disease stage

O.I. Stepanova, V.N. Karkischenko, N.N. Karkischenko, N.A. Onischenko, O.V. Baranova, H.H. Semenov, T.B. Beskova, N.V. Kasinskaya

For the first time the method of treatment of diabetes 2 types by means of allogenic and isogenic cultivated stem cells from native biomodel of diabetes 2 types wich reproduce clinical manifestation of human diabetes. The conditions which optimized treatment with stem and progenitory cells were determined. It was demonstrated that prolong clinical effect of carbohydrate exchange and prevention of deep structural pathogenetic violation in an internal come when stem cells used in an early stage of diabetes 2 types in high doses or repeated application of average cells doses that allows to compensate a carbohydrate exchange for a long time by preservation of adequate functional activity of the islets by pancreas. This method may be considered as a preclinical stage in studing of possibilities and prospects of stem cells application in complex treatment of diabetes of 2 types.

Key words: diabetes 2 types, mice of db/db, pancreas, stem cells.