

DOI: 10.15825/1995-1191-2024-3-147-158

НАРУШЕНИЯ В СИСТЕМЕ КЛЕТОК КРОВИ И КОСТНОГО МОЗГА НА ЭТАПАХ ПРОГРЕССИРУЮЩЕГО РАЗВИТИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА У МЫШЕЙ

Н.А. Онищенко¹, М.Ю. Карганов², И.Б. Алчинова², А.Б. Черепов², О.И. Степанова³,
А.А. Метелкин², А.О. Никольская¹, Р.А. Клесов³, Х.Х. Семенов³, Е.А. Волкова¹,
М.Ю. Шагидулин^{1, 4}, Ю.Б. Басок¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Российская Федерация

³ ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства России, Московская область, Российская Федерация

⁴ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация

Цель: изучить динамику состояния клеток крови и костного мозга (КМ) при прогрессирующем течении сахарного диабета (СД) в зависимости от степени тяжести нарушения показателей тканевого метаболизма. **Материалы и методы.** Использована генетическая модель СД2 у мутантных мышей db/db (опытная группа, n = 30). Контролем служили здоровые мыши той же линии – db/+m (n = 10) и линии B10 (n = 5). В течение 6–6,5 мес. контролировали динамику лабораторно-клинических показателей (глюкоза крови, гликозилированный гемоглобин, масса тела) и показателей окислительного метаболизма в тканях с помощью аппарата «Лазма-СТ». В течение того же срока исследовали состояние клеток крови (эритроциты, лейкоциты, тромбоциты) и КМ. Статистическую обработку результатов проводили с предварительным использованием теста Шапиро–Уилкса; достоверность различий с контролем оценивали с помощью параметрического t-критерия Стьюдента, при p < 0,05. **Результаты.** В развитии СД2 выявлено 3 стадии прогрессирующего нарушения метаболизма: I – стадия адаптации (1–2 мес.); II – стадия прогрессирующей дезадаптации (2,5–4,5 мес.); III – стадия декомпенсации (с 5,0–6,5 мес. до гибели). Установлено, что у мышей с СД2 уже в I–III стадиях в крови снижено содержание эритроцитов, Hb и лейкоцитов, но во II и особенно в III стадиях отмечается повышение количества тромбоцитов и процентного содержания нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов при снижении лимфоцитов. В КМ в I, II и на ранних сроках III стадии сохраняется высокий процент живых клеток; на поздних сроках III стадии часто выявляется низкий процент живых клеток; на всех сроках III стадии отчетливо снижено общее содержание клеток в КМ. **Заключение.** По мере прогрессирования СД2 в КМ затормаживаются процессы кроветворения. Индивидуальная оценка состояния КМ и его клеток на стадиях прогрессирующего развития СД2 может оказаться полезной для прогностических целей.

Ключевые слова: сахарный диабет, окислительно-восстановительные процессы, клетки крови, клетки костного мозга.

Для корреспонденции: Шагидулин Мурат Юнусович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (968) 919-06-21. E-mail: dr.shagidulin@mail.ru

Corresponding author: Murat Shagidulin. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: (968) 919-06-21. E-mail: dr.shagidulin@mail.ru

BLOOD AND BONE MARROW CELL DISORDERS IN THE STAGES OF PROGRESSIVE DIABETES IN MICE

N.A. Onishchenko¹, M.Yu. Karganov², I.B. Alchinova², A.B. Cherepov², O.I. Stepanova³, A.A. Metelkin², A.O. Nikolskaya¹, R.A. Klesov³, Kh.Kh. Semenov³, E.A. Volkova¹, M.Yu. Shagidulin^{1, 4}, Yu.B. Basok¹

¹ Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

² Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation

³ Research Center for Biomedical Technologies, Moscow, Russian Federation

⁴ Sechenov University Moscow, Russian Federation

Objective: to examine how the severity of tissue metabolic disorders affects the dynamics of the state of blood cells and bone marrow (BM) cells in patients with progressive diabetes mellitus (DM). **Materials and methods.** The genetic model of type 2 diabetes (T2DM) in db/db mutant mice (experimental group, n = 30) was used. Healthy mice of the same line – db/+m (n = 10) and line B10 (n = 5) served as control. The dynamics of laboratory and clinical parameters (blood glucose, glycosylated hemoglobin, body weight) and oxidative metabolism indicators in tissues were monitored FOR 6–6.5 months using Lasma-ST device. The state of blood cells (red blood cells, white blood cells, platelets) and BM cells were examined during the same period. Statistical processing of the results was done with preliminary use of the Shapiro–Wilk test; the significance of differences with the control was assessed using the parametric Student’s t test, at p < 0.05. **Results.** In the development of T2DM, 3 stages of progressive metabolic disorders were identified: I – adaptation stage (1–2 months); II – progressive maladaptation stage (2.5–4.5 months); III – decompensation stage (from 5.0–6.5 months to death). It was found that in T2DM mice, blood content of red blood cells, Hb and leukocytes was reduced already in stages I–III; but in stage II and especially in stage III, there was increased platelet count and percentage of neutrophils, monocytes, eosinophils with a decrease in lymphocytes. A high percentage of live cells is preserved in the BM in stages I, II and early periods of stage III; in late periods of stage III, live cell percentages are frequently found to be low; in all periods of stage III, the total cell content in the BM is clearly reduced. **Conclusion.** Hematopoietic processes are inhibited in the BM as T2DM progresses. Individual assessment of the state of BM and its cells at the progressive stages of T2DM may be useful for prognostic purposes.

Keywords: diabetes mellitus, redox processes, blood cells, bone marrow cells.

ВВЕДЕНИЕ

Заболеваемость сахарным диабетом (СД) в мире прогрессивно увеличивается и в настоящее время уже приобрела характер пандемии [1]. Хроническое течение, развитие тяжелых сосудистых осложнений, ранняя инвалидизация и высокая смертность среди больных СД указывают на необходимость продолжения совершенствования терапии этого заболевания на основе результатов углубленных исследований патогенетических механизмов.

Существует 2 наиболее распространенных типа СД – СД1 и СД2, которые различаются механизмами развития и клиническими проявлениями на ранних стадиях заболевания.

Общим клиническим признаком СД 1-го и 2-го типа является прогрессирующая гипергликемия, которая сама по себе создает в организме условия для возникновения опасных для жизни осложнений [2–4]. Показано [5], что гипергликемия оказывает повреждающее воздействие на различные ткани организма за счет токсичности накапливающихся в клетках гликозилированных белков и липопротеи-

дов. Среди жизненно важных органов костный мозг (КМ), ежедневно продуцирующий различные типы клеток крови (эритроциты, лейкоциты, тромбоциты), оказался наиболее подверженным повреждающему воздействию гликозилированных белков, которые накапливаются в эритроцитах в виде гликозилированного гемоглобина [6]. В результате эритроциты изменяют свои функциональные свойства (снижается мембранный потенциал) и вместе с лейкоцитами, продуцирующими провоспалительные цитокины [7], и тромбоцитами становятся активными участниками развития опасных для жизни макро- и микрососудистых осложнений [8]. Развитию нарушений в состоянии клеток крови и КМ при СД, особенно при СД2, способствует также действие других патогенетических факторов, возникающих при прогрессирующем течении заболевания. К ним относятся системное воспаление на фоне развивающейся дисфункции иммунитета, оксидативный стресс и стресс эндоплазматического ретикулума в клетках, а также нарушения в состоянии кишечного микробиома и барьерных свойств слизистой оболочки кишечника

и другое, как результат токсического повреждения его клеток [9–12]. Совокупно действуя, эти факторы усугубляют нарушения метаболизма в организме путем угнетения окислительно-восстановительных процессов (ОВП) в клетках всех органов и тканей, в том числе в клетках крови и КМ.

В последние годы в связи с развитием клеточных технологий стали проводиться исследования целесообразности применения клеток костного мозга (ККМ) для коррекции метаболических нарушений при СД1 и СД2. В основу этих исследований были положены современные представления о том, что КМ является не только центральным органом иммуногенеза, но и главным регулятором процессов восстановительной регенерации в организме [13]. Однако выяснилось, что аутологичные ККМ, полученные от больных СД для индукционной терапии, даже на ранних стадиях заболевания обладают сниженной регуляторной активностью [14, 15] и не всегда пригодны для целей регенеративной терапии [16] по сравнению с ККМ от здоровых аллогенных доноров. Данных о состоянии ККМ на поздних более тяжелых стадиях развития СД, когда больному проводится не только медикаментозная терапия, но и терапия методами тканевой (трансплантация островковых клеток поджелудочной железы) или органной (поджелудочная железа) трансплантации, мы в литературе не обнаружили. Между тем можно полагать, что результаты тканевой и органной трансплантации больному с тяжелой стадией СД будут определяться, в том числе, состоянием клеток его КМ, их способностью адаптировать организм к трансплантату и поддерживать жизнедеятельность трансплантата в организме реципиента.

Цель настоящей работы – на генетической модели СД 2-го типа у мышей изучить динамику изменений в состоянии клеток крови и КМ в зависимости от степени тяжести нарушения показателей метаболизма в тканях организма при прогрессирующем течении СД.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Динамику нарушений метаболизма, а также изменений в состоянии клеток крови и костного мозга при СД2 изучали на мутантных (гомозиготных) мышцах C57BL/KsJYLeprdb/(B/Ks-Leprdb/+) – (db/db), которые несут рецессивный ген – *leptin receptor* – *Leprdb* – (db) (8-я группа сцепления, 4-я хромосома). Ген db в гомозиготном состоянии вызывает прогрессирующее развитие СД, что обусловлено снижением рецептор-опосредованной чувствительности клеток организма к эндогенному инсулину. Развивающийся СД сходен с СД2 у людей и характеризуется деградацией клеток в островках поджелудочной железы, но без дефицита выработки инсулина на ранних сроках. Общее количество мутантных мышшей-диабетиков

линии B/Ks-Leprdb/Leprdb (db/db) обоих полов, использованных в эксперименте, составило 30 голов (n = 30). Контролем служили фенотипически здоровые гетерозиготные мыши той же линии – B/Ks-Leprdb/+ – (db/+m) (n = 10) и мыши недиабетической линии C57BL/10 – (B10) (n = 5). Таким образом, количество мышшей, использованных в эксперименте, составило 45 голов исходно одинакового возраста.

У этих мышшей в течение 6,0–6,5 мес. в динамике изучали изменения ряда функциональных показателей, развивающихся при СД2, которые отражают степень тяжести клинического состояния животного. Измеряли содержание глюкозы и гликозилированного гемоглобина (HbA1c) в крови, массу тела, а также проводилась оценка состояния ОВП в тканях организма. Содержание глюкозы определяли в свежей венозной крови фотометрическим методом на приборе Ассu-Сhek (Швейцария), а процентное содержание HbA1c – на приборе Nycu Card REDER (Норвегия), который предназначен для быстрого определения *in vitro* HbA1c методом боратного аффинного анализа. Массу тела животных определяли с помощью весов Mettler BD202 (Швейцария). Динамическая оценка состояния ОВП производилась неинвазивно с помощью аппарата лазерной доплеровской флуометрии – «Лазма-СТ» [17]. Этот аппарат позволяет измерять микроциркуляцию крови и лимфы в тканях хвоста грызунов, определять в этих тканях уровень активности митохондриальных коферментов – НАДН, ФАД – и на основании полученных результатов автоматически рассчитывать показатель окислительного метаболизма (ПОМ) [17]. Определение в динамике в процессе жизни животных тканевого уровня микроциркуляции, активности митохондриальных коферментов, показателя окислительного метаболизма, а также содержания глюкозы в крови позволило выявить 3 стадии развивающихся нарушений метаболизма в организме мышшей с СД2 (см. раздел статьи «Результаты»). Именно на этих стадиях у мышшей с СД2 было проведено исследование динамики изменения состояния клеток крови и костного мозга.

Для исследования клеток крови в динамике развития СД2 смешанную (артериально-венозную) кровь брали из шейных артерий и вен путем декапитации мышши, предварительно наркотизируя их с помощью инъекции раствора Золетила в физиологическом растворе в дозе 40 мг/кг. Кровь собирали в пробирки с К₃ЭДТА (трикалийевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты). Оценку гематологических показателей – RBC – эритроциты (10¹²/л), HGB – гемоглобин (г/л), HCT – гематокрит (%), MCV – средний объем эритроцита (fl), MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците (pg), MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците (г/л),

RDW-CV – ширина распределения эритроцитов (%), RDW-SD – ширина распределения эритроцитов (стандартное отклонение) (%), PLT – тромбоциты ($10^9/л$), PDW – относительная ширина распределения тромбоцитов по объему (%), PCT – тромбокрит (%), MPV – средний объем тромбоцита (fl), WBC – лейкоциты ($10^9/л$), Neu – нейтрофилы (%), Lymph – лимфоциты (%), Mono – моноциты (%), Eosi – эозинофилы (%), Baso – базофилы (%) – проводили на автоматическом гематологическом анализаторе DYMIND VET DF50 (Китай) в соответствии с рекомендациями производителя. Данные представляли как средний результат из трех промеров.

ККМ выделяли из бедренной и большой берцовой костей мышей с использованием стандартного протокола [18]. Выделенные цельные кости очищали от мышц и связок, затем отсекали эпифизы и кости помещали в 0,5 мл стандартные пластиковые центрифужные пробирки с заранее проколотым с помощью иглы (G18–21) дном. Эти пробирки помещали внутрь пластиковых центрифужных пробирок объемом 1,5 мл и центрифугировали 10 с при 10 000 g. Образец ККМ, очищенный от костных тканей, после центрифугирования находился в нижней пробирке объемом 1,5 мл.

Для оценки выраженности апоптоза ККМ использовали детекцию фосфатидилсерина на внешней мембране клеток с помощью меченого аннексина V. Количество аннексин-положительных клеток оценивали, используя «набор для определения апоптотических клеток с помощью аннексина V-AF 488» (Lumiprobe, Россия) по стандартному протоколу с последующей проточной цитометрией [19].

Полученные ККМ были суспендированы пипетированием в 100 мкл буфера при комнатной температуре. Из этой суспензии отбирали такое количество клеток, чтобы их концентрация в реакционном объеме (100 мкл) составляла $1 \times 10^5 \dots 1 \times 10^6$ клеток/мл. Добавляли аннексин V-AF488 до концентрации 3 мкг/мл и инкубировали 15 минут при комнатной температуре. Затем добавляли 400 мкл охлажденного буфера для связывания.

Для определения целостности клеточной мембраны использовали йодистый пропидий (PI). Его добавляли в пробы перед измерением на проточном цитометре до концентрации 0,5–1 мкг/мл.

Свежеприготовленные образцы анализировали на проточном цитометре BD FACSCalibur (Becton Dickson, USA), оснащенном аргоновым лазером (488 нм). Эмиссию флуоресценции (AF488, FITS) регистрировали в канале FL1 (515–545 нм) и в диапазоне йодистого пропидия FL2 (620 нм). Для каждого образца накапливали от 15 000 до 25 000 событий. Сбор данных проводили с помощью программы CELLQuest (Becton Dickson, USA). Данные, полученные в пилотном исследовании, обрабатывали в

программе FlowJo. Анализ результатов проводили с учетом рекомендаций [19] без установки таргетного гейта.

Численные значения показателей окислительного метаболизма, глюкозы, HbA1c и массы тела подвергали статистической обработке с предварительным использованием теста Шапиро–Уилкса на небольшом количестве выборок ($n < 5$) для доказательства нормального распределения данных, характеризующих метаболизм в отдельные периоды. Достоверность различия сравниваемых показателей оценивали с помощью t-критерия Стьюдента (стандартный программный пакет Microsoft Excel 2019, при $p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты динамического исследования показателей клинического состояния животных при прогрессирующем развитии СД2 и показателей окислительного метаболизма в тканях их организма в те же возрастные (временные) сроки представлены в табл. 1 и на рис. 1. Уже через 1 мес. жизни мышей с

Таблица 1

Возрастная динамика изменений содержания глюкозы, HbA1c % и массы тела у мышей линий db/db, db/+m и B10
Age dynamics of glucose content, HbA1c% and body weight in db/db, db/+m and B10 mice

Показатели углеводного обмена и массы тела	Линии мышей		
	db/db (СД2) 1-я группа (n = 30)	db/+m (контроль) 2-я группа (n = 10)	B10 (контроль) 3-я группа (n = 5)
<i>Возраст 1 месяца</i>			
Глюкоза, ммоль/л	10,3 ± 2,4*	5,4 ± 0,5	5,6 ± 0,3
HbA1c, %	4,9 ± 1,0*	3,5 ± 0,07	3,0 ± 0,08
Масса тела, г	21 ± 2,5*	13 ± 1,2	15 ± 1,8
<i>Возраст 2 месяца</i>			
Глюкоза, ммоль/л	18,7 ± 3,83*	5,8 ± 0,42	5,9 ± 0,03
HbA1c, %	7,9 ± 1,11*	3,6 ± 0,1	3,2 ± 0,13
Масса тела, г	39 ± 2,37*	15 ± 2,69	18 ± 2,49
<i>Возраст 4 месяца</i>			
Глюкоза, ммоль/л	25,5 ± 3,49*	4,6 ± 0,39	4,9 ± 0,69
HbA1c, %	8,6 ± 1,16*	3,7 ± 0,25	3,7 ± 0,22
Масса тела, г	48 ± 2,68*	19 ± 2,26	21 ± 2,27
<i>Возраст 6 месяцев</i>			
Глюкоза, ммоль/л	27,4 ± 2,09*	5,7 ± 0,65	5,4 ± 0,38
HbA1c, %	8,9 ± 1,25*	3,9 ± 0,57	3,8 ± 0,49
Масса тела, г	20 ± 2,35*	24 ± 1,80	27 ± 1,64

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольными группами.

Note. * – $p < 0.05$ compared to control groups.

СД2 достоверно увеличивается содержание глюкозы и HbA1c в крови, а также масса тела по сравнению с контролями. Продолжающееся исследование содержания глюкозы и HbA1c у мышей с СД2 на 2, 4 и 6-м мес. позволило установить их дальнейшее прогрессирующее увеличение. Масса тела мышей с СД2 на 2-м и 4-м мес. жизни также продолжала увеличиваться по сравнению с контролями, свидетельствуя о развитии ожирения. Однако начиная с 5–6 мес. масса тела этих мышей становилась достоверно ниже контролей, и животные приобретали истощенный вид.

Характерные клинические признаки СД2, такие как полидипсия, полифагия и полиурия, становились отчетливо выраженными со 2-го мес. после рождения. В среднем за сутки эти мыши выпивали $25,74 \pm 1,18$ мл воды, тогда как в контроле $4,69 \pm 0,35$ мл, $p < 0,05$; съедали кормов $8,9 \pm 0,29$ г, тогда как в контро-

ле $3,74 \pm 0,096$ г, $p < 0,05$ (контроль проводился по брикетированному корму).

При динамическом измерении микроциркуляторно-тканевых показателей, характеризующих состояние ОВП в тканях организма, и сопоставлении их с показателями лабораторно-клинического состояния животных нами были выявлены стадии нарастающих изменений в организме мышей с СД2. Установлено, что на сроке 1,0–1,5 мес. на фоне нарастающей гипергликемии повышалась амплитуда активности коферментов НАДН и ФАД и снижались значения ПОМ (показателя окислительного метаболизма); однако при сравнении с контролями выявленные изменения ОВП были недостоверны. Этот срок развития СД2 был признан I стадией СД2 и назван стадией адаптации. Формирование клинических признаков дезадаптации обнаруживается на сроке 2,0–2,5 мес. (значительное повышение массы тела, уровня гликемии, HbA1c (глюкозотоксичность), появление поли-

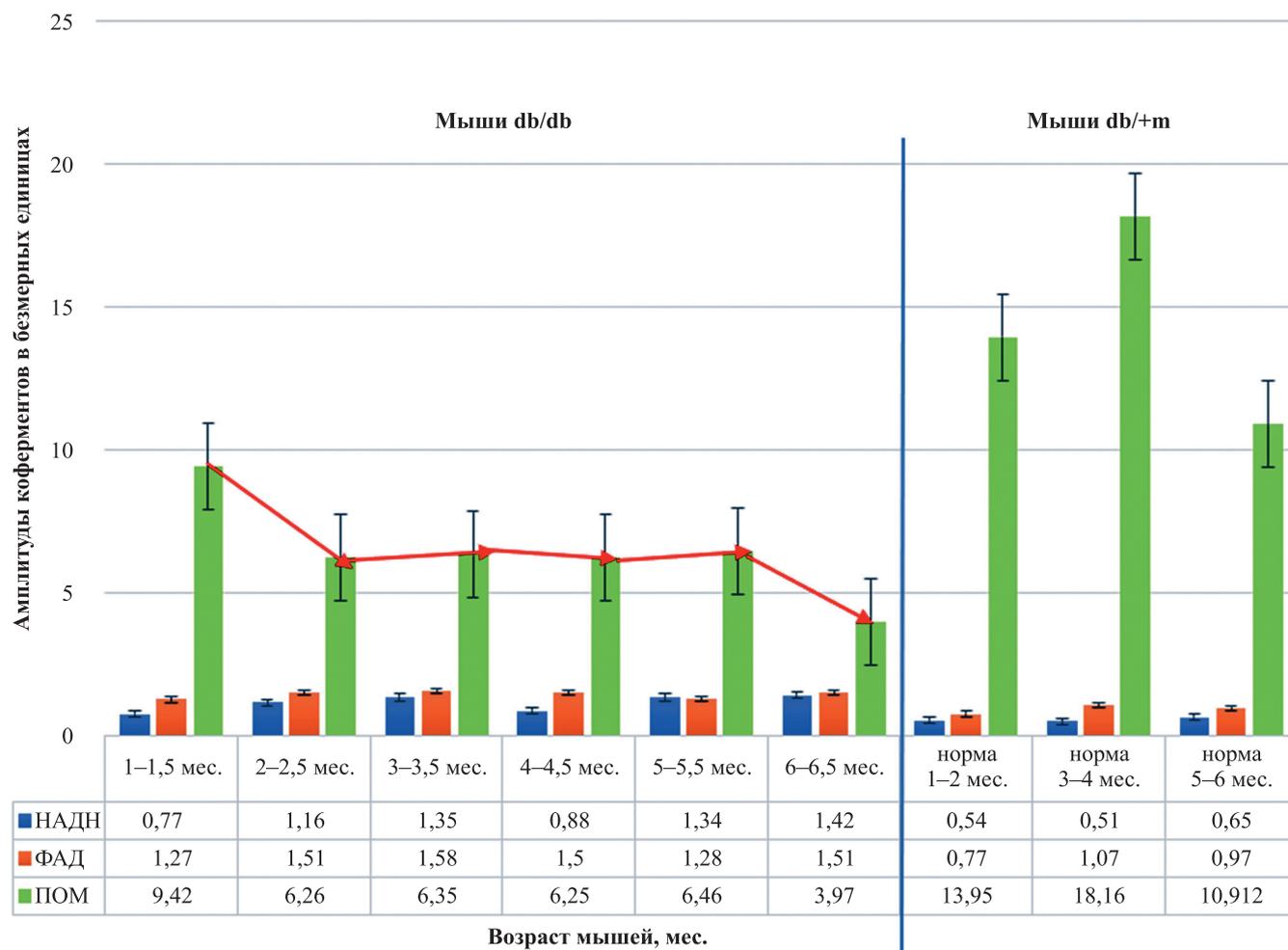


Рис. 1. Динамика изменения микроциркуляторно-тканевых показателей у мышей db/db с СД и у мышей без СД db/+m (норма) в разном возрасте (возраст мышей указан под амплитудами измеряемых показателей: НАДН, ФАД и ПОМ) [17]

Fig. 1. Dynamics of microcirculatory and tissue parameters in db/db mice with DM and in db/+m mice without DM (normal) at different ages (the age of mice is indicated under the amplitudes of measured parameters: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), flavin adenine dinucleotide (FAD) and oxidative metabolism parameters (OMP) [17]

урии, полифагии), и их нарастание продолжается до 4,0–4,5 мес. В этом временном периоде достоверно прогрессирует тяжесть нарушения показателей ОВП (рис. 1), но еще не появляются явные осложнения. Период 2,0–4,5 мес. был определен нами как II стадия СД2 и назван стадией прогрессирующей дезадаптации. В возрасте 5,0–6,5 мес. у мышей с СД2 на фоне усугубляющегося нарушения клинических показателей и показателей, характеризующих состояние ОВП в организме (НАДН, ФАД и ПОМ), из которых ПОМ достигает крайне низких значений и составляет $3,97 \pm 1,39$ против $10,91 \pm 2,04$ в контроле на этом же сроке жизни, у 30% животных развились поздние осложнения (мацерация кожи, чаще всего в области холки), которые сохранялись в виде обширной раны вплоть до гибели животных (к 7–10 мес.). Этот период (с 5,0–6,5 мес. и до гибели животных) был нами определен как III стадия развития СД2 – стадия декомпенсации адаптационных механизмов с развитием глубокой тканевой гипоксии, клеточного апоптоза и некроза [8].

Выявив 3 клинические стадии в прогрессировании метаболических нарушений при СД2, мы приступили к изучению состояния клеток крови (эритроциты, тромбоциты и разные типы лейкоцитов) и КМ, осуществляющего их продукцию, т. к. именно состояние и функциональные свойства этих клеток в значительной степени определяют адекватность течения ОВП в тканях организма. В табл. 2 представлены результаты пилотного исследования состояния эритроцитов и тромбоцитов у здоровых

мышей – db/+m (контроль) и у мышей db/db (модель СД2) на разных стадиях прогрессирования СД2 (аббревиатура исследуемых показателей приведена в разделе «Материалы и методы»).

Уже на ранних сроках жизни мышей с СД2 (1,5–2,0 мес. – стадия адаптации) в их крови отмечается более низкое содержание эритроцитов (RBC) и сниженное содержание в эритроцитах HGB по сравнению с контролем (мыши db/+m). Повышение RBC на стадии декомпенсации, по-видимому, является следствием сгущения крови на фоне развившейся полиурии.

Кроме того, уже на раннем сроке жизни мышей с СД2 наметилась тенденция к повышению MCV, RDW-SD и PLT, а также к снижению MCHC. На этапе прогрессирующей дезадаптации, а также на этапе декомпенсации сохранялась та же тенденция к повышению или снижению отдельных характеристик эритроцитов, что, по-видимому, свидетельствует о развивающихся структурных изменениях этих клеток.

При исследовании PLT отчетливо выявлено резкое увеличение количества этих клеток в крови на этапе декомпенсации ОВП и углеводного метаболизма у мышей с СД2. При исследовании содержания WBC в крови (табл. 3) нами также было выявлено снижение общего количества лейкоцитов уже на ранних сроках жизни мышей с СД2 (1,5–2,0 мес.) по сравнению с контролем – $5,22 \times 10^9$ /л против $9,92 \times 10^9$ /л.

По мере увеличения срока жизни мышей с СД2 снижение WBC прогрессировало и характеризова-

Таблица 2

Результаты динамического исследования состояния клеток крови (эритроцитов и тромбоцитов) у мышей линий db/+m (контроль) и db/db (модель СД2)
Results of dynamic study of the state of blood cells (red blood cells and platelets) in db/+m (control) and db/db (T2DM model) mice

Исследуемые показатели	db/+m		db/db (СД2)		
	1,5–2 мес.	3–4 мес.	1,5–2 мес. (период адаптации)	2,5–4,5 мес. (период прогрессирующей дезадаптации)	5,0–6,0–6,5 мес. (период декомпенсации)
RBC, 10^{12} /л	8,68	8,36	7,5	7,73	8,12
HGB, г/л	157,5	154,5	132,25	147,3	155,7
HCT, %	40,75	40,35	39,15	40,8	43,88
MCV, fl	46,95	48,25	52,15	52,8	54,18
MCH, pg	18,1	18,45	17,6	19,07	19,18
MCHC, г/л	386	383	337,25	361	354,42
RDW-CV, %	15,35	13,65	18,42	17,53	17,4
RDW-SD, %	27,9	25,8	38,42	36,8	37,22
PLT, 10^9 /л	881	732	898	753	1044,37
MPV, fl	6,7	6,7	6,85	6,33	6,7
PDW, %	6,5	6,75	6,22	7,2	8,07
PCT, %	0,59	0,49	0,61	0,48	0,69

Примечание. fl – в фемтолитрах, pg – в пикограммах.

Note. fl – in femtoliters; pg – in picograms.

лось изменением соотношения их отдельных популяций. На ранних сроках жизни мышей с СД2 отмечено начинающееся повышение процентного содержания нейтрофилов (Neu), моноцитов (Mono) и эозинофилов (Eosi), а также снижение лимфоцитов (Lymph). Эти изменения усиливались и становились отчетливо выраженными на этапах прогрессирующей дезадаптации и особенно при декомпенсации в состоянии ОВП.

Неуклонное повышение содержания тромбоцитов, нейтрофилов, моноцитов и эозинофилов на фоне прогрессирующего снижения процентного содержания лимфоцитов, а также резкое повышение отношения процентного содержания нейтрофилов к лимфоцитам свидетельствуют об усиливающейся активации при СД2 системной воспалительной реакции и торможении репаративных процессов, создающих условия для развития микро- и макрососудистых осложнений [25–27].

Выявленное снижение в крови количественного содержания эритроцитов и лейкоцитов уже на ранних сроках жизни мышей с СД2 по сравнению с контролем свидетельствовало о торможении процессов гемопоэза и необходимости оценить у этих мышей состояние КМ, ответственного за процессы кроветворения и регуляцию гомеостаза в организме. Цитометрическое исследование прежде всего выявило различия в распределении ККМ по размеру и фактуре в проходящем (FSC) и отраженном (SSC) свете на разных сроках жизни контрольных мышей и мышей с СД2 (рис. 2).

При развитии СД2 заметно снижается процент крупных и средних (пролиферирующих) клеток на I, II и ранней III стадии по сравнению с контролем. На III поздней (терминальной) стадии СД2 резко увеличивается процент разрушенных и мелких (неделяющихся) клеток. Исследование процентного содержания живых и поврежденных клеток в КМ показало,

что у здоровых мышей db/+m (контроль) на сроке жизни 2 мес. доля живых клеток в среднем составила 68,95%, а клетки в состоянии некроза, апонекроза и апоптоза – 31,05% (рис. 3). У мышей db/db с СД2 на этом же сроке жизни (период адаптации) доля живых клеток составила 71,35%, а клетки в состоянии некроза, апонекроза и апоптоза суммарно составили 28,65%. На 4-м мес. жизни (период развивающейся дезадаптации) по мере прогрессирования СД2 процентное содержание живых клеток практически не изменилось и составило 70,5%, а среди поврежденных клеток, которые суммарно составили 29,5%, наибольший % составили клетки в состоянии апоптоза (21%).

В раннем периоде декомпенсации на сроке 5–6 мес. нами, однако, при исследовании КМ не было выявлено отклонений в процентном содержании живых и поврежденных клеток по сравнению с периодом прогрессирующей дезадаптации (до 4–4,5 мес.). Между тем на этом сроке, как и на более отдаленных сроках клинической декомпенсации, нами было отмечено выраженное снижение в КМ общего количества клеток: КМ становится опустошенным, и для исследования его клеток требовалось собирать КМ из 2–3 трубчатых костей.

На отдаленных сроках периода декомпенсации (7,0–9,5 мес.) доля живых клеток в КМ мышей с СД2 существенно снижалась и достигала 30,4%, а клетки в состоянии некроза, апонекроза и апоптоза суммарно составляли 69,6%, причем наибольший процент поврежденных составляли клетки в состоянии апонекроза (44,7%). Было отмечено также, что при СД2 даже на отдаленных сроках развития стадии декомпенсации у отдельных животных в КМ определялся высокий процент живых клеток на фоне снижения общего количества клеток при выделении их из трубчатых костей (т. е. кости содержали минимальное количество клеточного материала).

Таблица 3

Результаты динамического исследования состояния клеток крови (лейкоциты) у мышей линий db/+m (контроль) и db/db (модель СД2)

Results of dynamic study of blood cells (white blood cells) in db/+m (control) and db/db (T2DM model) mice

Исследуемые показатели	db/+m	db/db (СД2)		
	2–4 мес.	1,5–2 мес. (стадия адаптации)	2,5–4,5 мес. (стадия прогрессирующей дезадаптации)	5,0–6,5 мес. (стадия декомпенсации)
WBC, 10 ⁹ /л	9,92	5,22	4,37	3,32
Neu, %	11,2	15,95	39,83	81,9
Lymph, %	87,75	81,17	56,1	9,54
Mono, %	0,65	1,22	2,3	6,14
Eosi, %	0,3	1,57	1,67	2,33
Baso, %	0,1	0,075	0,1	0,11
Neu/Lymph	0,13	0,20	0,71	8,58

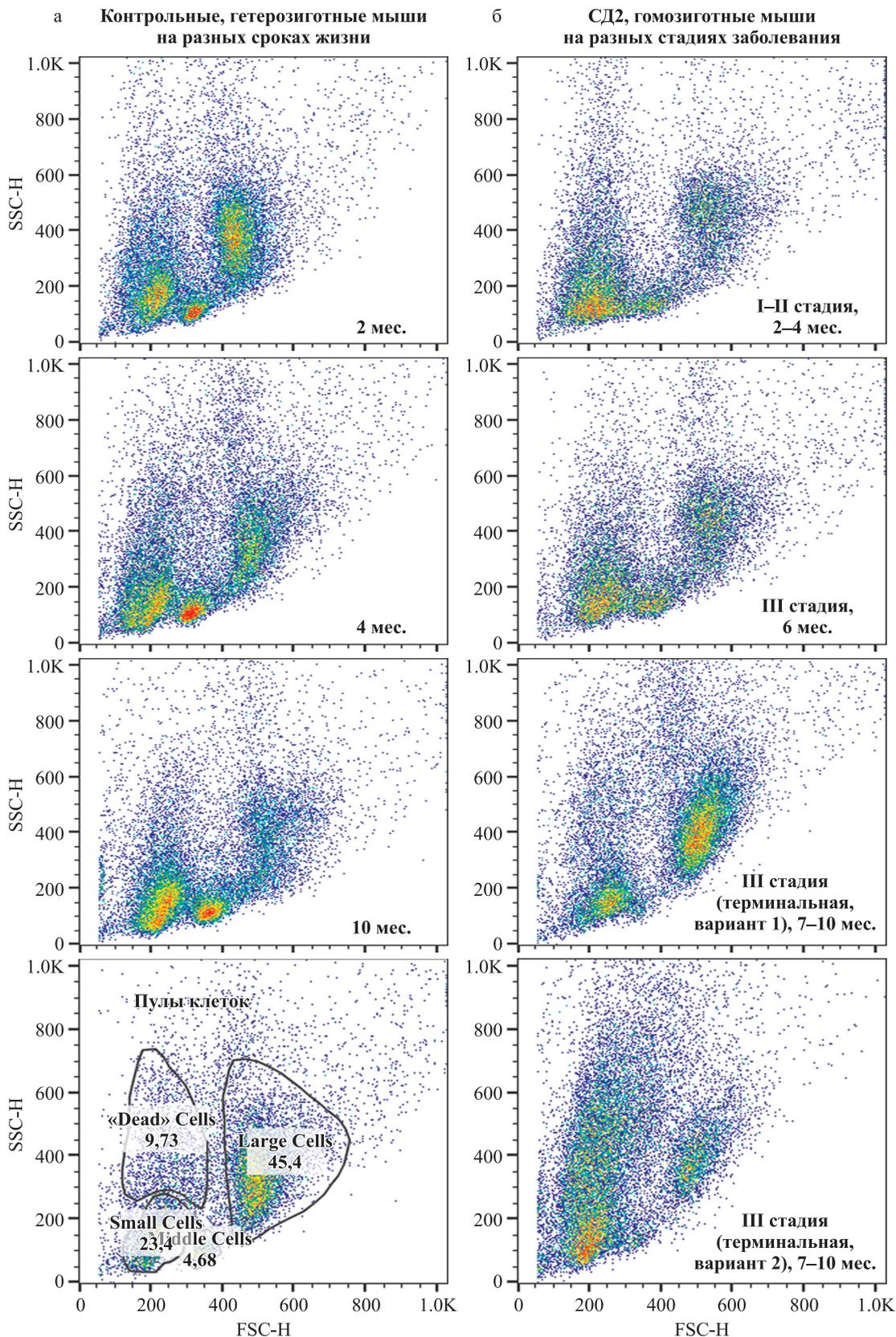


Рис. 2. Распределение клеток КМ по размеру и фактуре в проходящем (FSC) и отраженном (SSC) свете у контрольных мышей (а) и мышей с СД2 (б) на разных сроках жизни (стадиях заболевания). Внизу слева показано распределение КМ по популяциям у контрольных мышей: Small cells (мелкие), Middle cells (средние), Large cells (крупные), Dead cells (гибнущие)

Fig. 2. Distribution of BM cells by size and texture in transmitted (FSC) and reflected (SSC) light in control mice (a) and mice with T2DM (б) at different life stages (disease stages). Bottom left shows the distribution of FSMs by population in control mice: small cells, middle cells, large cells, dead cells

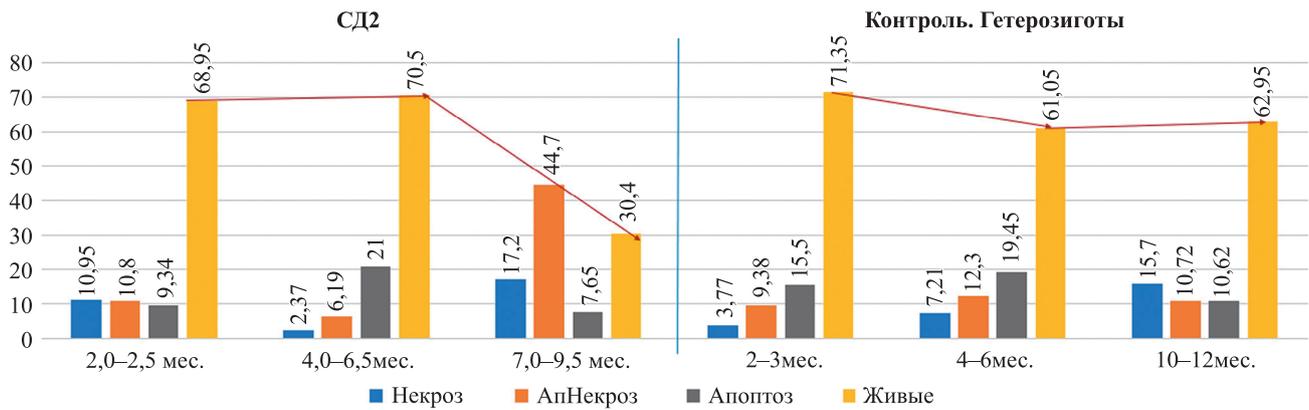


Рис. 3. Динамика изменения состояния клеток костного мозга при развитии СД 2-го типа (в %)

Fig. 3. Dynamics of changes in the state of bone marrow cells during the development of type 2 diabetes (in %)

Таким образом, при СД2 по мере прогрессирования метаболических нарушений и снижения эффективности ОВП в КМ также неуклонно нарастает угнетение процессов кроветворения, а также усиливаются процессы клеточного некроза, апонекроза и апоптоза, которые ослабляют регуляторную роль КМ и создают условия для развития в организме осложнений (мацерация кожи) и состояния необратимости. Однако важно подчеркнуть, что даже на стадии клинической декомпенсации, на раннем ее этапе, а у отдельных животных и на терминальном этапе, пул клеток КМ истощен, но не поврежден необратимо, свидетельствуя, по нашему мнению, о сохранности регуляторного и регенерационного потенциала КМ в организме.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проблема влияния клинических проявлений СД и тяжести развивающихся нарушений тканевого метаболизма на состояние клеток крови и КМ, особенно на поздних стадиях заболевания, остается недостаточно изученной. Между тем результативность терапии, и прежде всего трансплантационными методами (трансплантация островковых клеток или трансплантация поджелудочной железы), применяемыми на поздних стадиях заболевания, в значительной степени определяется сохранностью систем, поддерживающих состояние гомеостаза в организме. К ним в первую очередь относится КМ, который, как известно, является не только центральным органом иммуногенеза, но и главным регулятором восстановительной регенерации в организме [13]. В связи с этим нами была поставлена задача изучить в эксперименте влияние прогрессирующего нарушения углеводного и тканевого метаболизма при СД на динамику изменений в состоянии клеток крови и КМ. Для изучения этой проблемы была использована генетическая модель СД2 на мутантных мышях db/db (n = 30). Контролем служили здоровые мыши той

же линии (db/+m) (n = 10) и мыши линии В10 (n = 5). У всех этих мышей в течение 6,0–6,5 мес. от момента рождения контролировали в динамике лабораторно-клинические показатели (глюкоза в крови, содержание HbA1c, масса тела и др.), а также состояние ОВП (по уровню микроциркуляции в тканях, амплитудам активности коферментов – НАДН, ФАД и значениям ПОМ – показатель окислительного метаболизма) с помощью аппарата «Лазма-СТ» [17]. Развитие СД2 характеризовалось прогрессирующим повышением гипергликемии и глюкозотоксичности (повышение HbA1c) до конца срока исследования метаболизма (табл. 1). В динамике изменения массы тела было выявлено 2 фазы: избыточное нарастание массы тела в течение 4 мес. и последующее резкое снижение ее к 5,0–6,5 мес. на фоне сохраняющейся гипергликемии и высокого уровня HbA1c. Этот факт указывал на развитие глубоких нарушений метаболизма и необходимость осуществления динамического контроля метаболизма. Контроль за состоянием ОВП в тканях мышей db/db позволил выявить 3 стадии прогрессирующего развития СД2 (рис. 1), которые характеризовались нарастанием во времени тяжести нарушения всех исследуемых показателей: I – стадия адаптации (до 2 мес.); II – стадия прогрессирующей дезадаптации (2,5–4,5 мес.) и III – стадия клинической декомпенсации (с 5–6,5 мес. до гибели животных), на которой уже проявлялись сосудистые осложнения (у 30% мышей мацерация кожи). Далее для решения поставленной задачи на трех указанных стадиях нами было выполнено пилотное исследование состояния клеток крови и КМ. Установлено, что на I стадии на фоне гипергликемии и повышения HbA1c количество эритроцитов (RBC), Hb (HGB) и лейкоцитов (WBC) становилось отчетливо сниженным и сохранялось до конца наблюдения (табл. 2). Этот факт можно объяснить тем, что гликирование белковых мембран эритроцитов и других клеток крови ведет к снижению их отрицательного мембранного потенциала,

вследствие чего развивается ускоренное старение и сокращение срока жизни клеток крови [15]. Кроме того, снижение мембранного потенциала клеток крови при гипергликемии способствует повышению микровязкости, агрегации или адгезии этих клеток, что сначала снижает их выход из КМ, а затем продукцию этих клеток в КМ [16]. В клинике снижение эритроцитов крови у больных с СД2 отмечают при длительных сроках гипергликемии [17] и уже при наличии микрососудистых осложнений [18]. Полагают также, что снижение уровня эритроцитов может быть следствием дефицита выработки эритропоэтина у больных с диабетической нефропатией или результатом резистентности к этому гормону, а также следствием деструкции эритроцитов, развивающейся при макро- и микроангиопатиях на длительных сроках течения СД2 [19]. Мы, однако, полагаем, что в наших опытах снижение количества эритроцитов и лейкоцитов в крови уже на I стадии развития СД2 использованной модели может быть связано со снижением мембранного потенциала клеток в результате раннего и ускоренного гликирования мембранных белков этих клеток, обусловленного генетическими особенностями мышей db/db. На II стадии развития СД2 сохраняющееся снижение клеток крови может быть обусловлено всеми вышеуказанными факторами, а также происходящим повышением массы тела. Развитие тучности, как известно, сопровождается состоянием хронического воспаления и высоким уровнем циркулирующих провоспалительных цитокинов, которые, длительно воздействуя на гемopoэтическую систему и ниши костного мозга, угнетают процессы кроветворения в них [6]. Справедливость такого мнения подтверждается нашими данными о повышении процентного содержания нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов и снижении лимфоцитов в крови (табл. 3). Повышение отношения нейтрофилы/лимфоциты свидетельствует об активации системной воспалительной реакции в организме [20, 21] и даже служит в клинике предиктором ухудшения прогноза при развитии диабетической нефропатии [22, 23] и диабетических язв на ногах [24]. Цитометрическое исследование состояния клеток КМ, тем не менее, показало, что на I, II и даже на ранних сроках III стадии СД2 (5–6 мес.) в КМ сохраняется высокий процент (около 70%) живых клеток. В то же время уже на ранних сроках III стадии всегда отмечается существенное снижение общего количества клеток в пунктате КМ. На отдаленных сроках прогрессирующего развития III стадии СД2 (7,0–9,5 мес.) также всегда отмечается выраженное снижение общего количества клеток в пунктате КМ, часто отмечается выраженное снижение пула живых клеток (до 30,4%) и высокий процент поврежденных клеток (до 69,6%); однако на поздних сроках III стадии СД2 также возможно сохранение у части животных высокого процента

живых клеток. Эти данные позволяют признать, что при СД2 даже на стадии декомпенсации клинических и метаболических показателей (как на ранних, так и на поздних сроках) остаются животные, клетки КМ которых сохраняют резистентность к повреждающему воздействию и гипергликемии и развивающейся гипоксии. Очевидно, высокий процент содержания живых клеток в КМ животных на терминальной стадии СД2 указывает на способность их участвовать в регуляции и поддержании гомеостаза в организме, а выявление их в КМ на стадии декомпенсации позволяет прогнозировать более высокую результативность проведения им лечебных мероприятий. Аналогичное мнение выражено в статье S.V. Gautier et al. (2015) [30], которые считают целесообразным прогнозировать результативность операций по трансплантации органов (печени) по предварительному измерению в периферической крови содержания CD34+ клеток КМ, уровень которых в крови характеризует регенерационный потенциал клеток всех тканей организма [31].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. При прогрессирующем развитии СД2 у мышей линии db/db выявляются 3 стадии, которые различаются по степени повышения тяжести нарушения ОВП и метаболических показателей: I – на сроке жизни 1–2 мес. – стадия адаптации; II – на сроке 2,5–4,5 мес. – стадия прогрессирующей дезадаптации; III – на сроке с 5,0–6,5 мес. и до гибели животного – стадия декомпенсации.
2. Прогрессирующее развитие СД2 происходит на фоне усиливающейся гипергликемии, увеличения содержания HbA1c в эритроцитах, повышения массы тела на I и II стадиях и снижения массы тела на III стадии. Эти изменения клинических показателей происходят на фоне постепенного снижения эффективности показателей ОВП (повышение амплитуд коферментов НАДН, ФАД и снижение ПОМ), особенно выраженном на III стадии.
3. При пилотном исследовании состояния клеток крови у мышей с СД2 уже на I стадии отмечается снижение содержания эритроцитов, Hb и лейкоцитов, которое сохраняется на II и III стадиях. На II и особенно на III стадии наступает резкое повышение количества тромбоцитов и процентного содержания нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов, снижение лимфоцитов, а также повышение процентного отношения нейтрофилы/лимфоциты, которое свидетельствуют о развитии системной воспалительной реакции.
4. В образцах костного мозга мышей с СД2 на I, II и на ранних сроках III стадии (5–6 мес.) в КМ сохраняются исходные значения процентного содержания живых и поврежденных клеток; на поздних сроках III стадии (7,0–9,5 мес.) в КМ часто насту-

- пает резкое снижение процентного содержания живых клеток и повышение поврежденных; на всех сроках III стадии диагностируется снижение общего количества клеток в образцах КМ. Сохранение высокого процента живых клеток в КМ на ранних и поздних сроках развития стадии декомпенсации позволяет предполагать у таких животных возможность более высокой результативности применения лечебных мероприятий.
5. Индивидуальная оценка состояния клеток крови и КМ при прогрессирующем развитии СД2 может оказаться полезной для прогностических целей.

Работа частично выполнена в рамках государственного задания по теме: «Оценка адаптивных реакций организма на действие физико-химических и экологических факторов среды» (№ FGFU-2022-0010).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9 edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019 Nov; 157: 107843. doi: 10.1016/j.diabres.2019.107843.
2. Henning RJ. Type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Future Cardiol.* 2018 Nov; 14 (6): 491–509. doi: 10.2217/fca-2018-0045.
3. Hosseini MS, Rostami Z, Saadat A, Saadatmand SM, Naemi E. Anemia and microvascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nephrourol Mon.* 2014 Jul 5; 6 (4): e19976. doi: 10.5812/numonthly.19976.
4. Malandrino N, Wu WC, Taveira TH, Whitlatch HB, Smith RJ. Association between red blood cell distribution width and macrovascular and microvascular complications in diabetes. *Diabetologia.* 2012 Jan; 55 (1): 226–235. doi: 10.1007/s00125-011-2331-1.
5. Alamri BN, Bahabri A, Aldereihim AA, Alabduijabbar M, Alsubaie MM, Alnaqeb D et al. Hyperglycemia effect on red cells indices. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019 Mar; 23 (5): 2139–2150. doi: 10.26355/eur-rev_201903_17259.
6. Benites BD, Gilli SC, Saad ST. Obesity and inflammation and the effect on the hematopoietic system. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2014 Mar; 36 (2): 147–151. doi: 10.5581/1516-8484.20140032.
7. Luo XM, Yan C, Zhang YJ, Meng LJ, Lu GT, Yin JM, Feng YM. Diabetic Bone Marrow Cell injection accelerated acute pancreatitis progression. *J Immunol Res.* 2021 Aug 21; 2021: 5123823. doi: 10.1155/2021/5123823.
8. Kojima H, Kim J, Chan L. Emerging roles of hematopoietic cells in the pathobiology of diabetic complications. *Trends Endocrinol Metab.* 2014 Apr; 25 (4): 178–187. doi: 10.1016/j.tem.2014.01.002.
9. Xie D, Zhao X, Chen M. Prevention and treatment strategies for type 2 diabetes based on regulating intestinal flora. *Biosci Trends.* 2021 Nov 21; 15 (5): 313–320. doi: 10.5582/bst.2021.01275.
10. Wu J, Yang K, Fan H, Wei M, Xiong Q. Targeting the gut microbiota and its metabolites for type 2 diabetes mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023 May 9; 14: 1114424. doi: 10.3389/fendo.2023.1114424.
11. Ruze R, Liu T, Zou X, Chen JSY, Xu R, Yin X, Xu Q. Obesity and type 2 diabetes mellitus: connections in epidemiology, pathogenesis and treatments. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023 Apr 21; 14: 1161521. doi: 10.3389/fendo.2023.1161521.
12. Szerafin L, Jakó J. Haematological aspects of the gut flora. *Orv Hetil.* 2019 May; 160 (20); 774–779. doi: 10.1556/650.2019.31403.
13. Бабаева АГ, Тишевская НВ, Геворкян НМ. О морфогенетических свойствах РНК лимфоидных и стволовых клеток при восстановительных процессах. М.: Изд-во НИИ морфологии человека РАН, 2016; 272. Babayeva AG, Tishevskaya NV, Gevorkyan NM. O morfogeneticheskikh svoystvakh RNK limfoidnykh i stvolovykh kletok pri vosstanovitel'nykh protsessakh. M.: Izd-vo NII morfologii cheloveka RAN, 2016; 272.
14. Izadi M, Nejad ASH, Moazenchi M, Masoumi S, Rabani A, Kompani F et al. Mesenchymal stem cell transplantation in newly diagnosed type-1 diabetes patients: a phase I/II randomized placebo-controlled clinical trial. *Stem Cell Res Ther.* 2022 Jun 20; 13 (1): 264. doi: 10.1186/s13287-022-02941-w.
15. Nguyen LT, Hoang DM, Nguyen KT, Bui DM, Nguyen HT, Le HTA et al. Type 2 diabetes mellitus duration and obesity after the efficacy of autologously transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cells Transl Med.* 2021 Sep; 10 (9): 1266–1278. doi: 10.1002/sctm.20-0506.
16. Zhu Yu, Jia Y, Wang Y, Xu J, Chai Y. Impaired Bone Regenerative Effect of exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells in type 1 Diabetes. *Stem Cells Transl Med.* 2019 Jun; 8 (6): 593–605. doi: 10.1002/sctm.18-0199.
17. Степанова ОИ, Клесов РА, Семенов ХХ, Помыткин ИА, Онищенко НА, Каркищенко ВН. Способ неинвазивного изучения тканевых нарушений при сахарном диабете 2-го типа у мышей db/db с помощью лазерной доплеровской флоуметрии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67 (2): 118–129. Stepanova OI, Klesov RA, Semenov KhKh, Pomytkin IA, Onishchenko NA, Karkischenko VN. A method for noninvasive studying tissue disorders in type 2 diabetes mellitus in db/db mice using laser Doppler flowmetry. *Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal.* 2023; 67 (2): 118–129. doi: 10.25557/0031-2991.2023.02.118-129.
18. Amend SR, Valkenburg KC, Pienta KJ. Murine Hind Limb Long Bone Dissection and Bone Marrow Isolation. *J Vis Exp.* 2016 Apr 14; (110): 53936. doi: 10.3791/53936. PMID: 27168390; PMCID: PMC4941920.

19. Kimura T, Kaneto H, Kanda-Kimura Y, Shimoda M, Kamei S, Anno T et al. Seven-year observational study on the association between glycemic control and the new onset of macroangiopathy in Japanese subjects with type 2 diabetes. *Intern J Med*. 2016; 55: 1419–1424. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.55.4952>.
20. Mazzanti L, Faloia E, Rabini RA, Staffolani R, Kantar A, Fiorini R et al. Diabetes mellitus induces red blood cell plasma membrane alterations possibly affecting the aging process. *Clin Biochem*. 1992 Feb; 25 (1): 41–46. doi: 10.1016/0009-9120(92)80044-h.
21. Nada AM. Red cell distribution width in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2015 Oct 30; 8: 525–533. doi: 10.2147/DMSO.S85318.
22. Verma M, Paneri S, Badi P, Raman PG. Effect of increasing duration of diabetes mellitus type 2 on glycosylated hemoglobin sensitivity. *Indian J Clin Biochem*. 2006 Mar; 21 (1): 142–146. doi: 10.1007/BF02913083.
23. Wang ZS, Song ZC, Bai JH, Li F, Wu T, Qi J, Hu J. Red blood cell count as an indicator of microvascular complications in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Manag*. 2013; 9: 237–243. doi: 10.2147/VHRM.S43211.
24. Kimura T, Kaneto H, Kanda-Kimura Y, Shimoda M, Kamei S, Anno T et al. Seven-year observational study on the association between glycemic control and the new onset of macroangiopathy in Japanese subjects with type 2 diabetes. *Intern Med*. 2016; 55 (11): 1419–1424. doi: 10.2169/internalmedicine.55.4952.
25. Sharif-Askari FS, Sharif-Askari NS, Guella A, Alabdullah A, Al Sheleh HB, AlRawi AMH et al. Blood Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Urine IL-8 Levels Predict the Type of Bacterial Urinary Tract Infection in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Infect Drug Resist*. 2020 Jun 2; 13: 1961–1970. doi: 10.2147/IDR.S251966.
26. He J, Bian X, Song C, Zhang R, Yuan S, Yin D, Dou K. High neutrophil to lymphocyte ratio with type 2 diabetes mellitus predicts poor prognosis in patients undergoing percutaneous coronary intervention: a large-scale cohort study. *Cardiovasc Diabetol*. 2022 Aug 13; 21 (1): 156. doi: 10.1186/s12933-022-01583-9.
27. He X, Qi S, Zhang X, Pan J. The relationship between the neutrophil-to-lymphocyte ratio and diabetic retinopathy in adults from the United States: results from the National Health and nutrition examination survey. *BMC Ophthalmol*. 2022 Aug 17; 22 (1): 346. doi: 10.1186/s12886-022-02571-z.
28. Darwish NM, Elnahas YM, AlQahtany FS. Diabetes induced renal complications by leukocyte activation of nuclear factor κ -B and its regulated genes expression. *Saudi J Biol Sci*. 2021 Jan; 28 (1): 541–549. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.10.039.
29. Arıcan G, Kahraman HÇ, Özmeriç A, İltar S, Alemdaroğlu KB. Monitoring the Prognosis of Diabetic Foot Ulcers: Predictive Value of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Red Blood Cell Distribution. *Width Int J Low Extrem Wounds*. 2020 Dec; 19 (4): 369–376. doi: 10.1177/1534734620904819.
30. Gautier SV, Shevchenko OP, Tsiurulnikova OM, Kurabekova RM, Lugovskaya SA, Naumova EV et al. The hematopoietic stem cell number in the peripheral blood of pediatric recipients correlates with the outcome after living donor liver transplantation. *Pediatr Transplant*. 2015 Aug; 19 (5): 531–537. doi: 10.1111/ptr.12482.
31. Bichari C, Anand L, Rooge S, Kumar D, Saxena P, Shubham S et al. Bone marrow stem cells and their niche components are adversely affected in advanced cirrhosis of the liver. *Hepatology*. 2016 Oct; 64 (4): 1273–1288. doi: 10.1002/hep.28754.

Статья поступила в редакцию 25.04.2024 г.

The article was submitted to the journal on 25.04.2024