

DOI: 10.15825/1995-1191-2026-2-152-162

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ИНТАКТНЫХ И АПОПТОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ПРОГРЕССИРУЮЩЕГО РАЗВИТИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА

А.О. Никольская¹, Н.А. Онищенко¹, Е.А. Волкова¹, О.И. Степанова², Н.В. Баранова¹,
А.С. Пономарева¹, Р.А. Клесов², Х.Х. Семенов², Н.П. Можейко¹, М.Ю. Шагидулин^{1, 3},
Ю.Б. Басок¹

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

² ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России», Московская область, г.о. Красногорск, п. Светлые Горы, Российская Федерация

³ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация

Цель работы: сравнить эффективность корректирующего воздействия интактных и апоптотических клеток костного мозга на разных стадиях прогрессирующего развития сахарного диабета 2-го типа (СД2). **Материалы и методы.** Опыты проведены на генетической модели СД2 (на мутантных мышах db/db, n = 52, возраст 0,5–1,0 мес. жизни). Эти мыши составили 4 группы: 1-я – контроль (n = 10); во 2-й (n = 14), 3-й (n = 14) и 4-й (n = 14) опытных группах однократно внутрибрюшинно вводили мононуклеарные клетки аллогенного костного мозга (МККМ) от здоровых доноров (n = 20) в дозе 40–45 × 10⁶ клеток на разных сроках развития СД2 – на 1, 3 и 7-м месяце после рождения соответственно. В каждой опытной группе было дополнительно выделено 2 подгруппы: с применением интактных свежeweделенных МККМ (иМККМ) и апоптотических МККМ (аМККМ). аМККМ получали путем инкубации иМККМ в ионсбалансированном консервирующем растворе НТК Бредшнейдера, чтобы получить иМККМ в состоянии обратимого апоптоза. Состояние мышей db/db после введения МККМ контролировали в динамике, исследуя содержание глюкозы в крови, массу тела, состояние окислительного метаболизма, автоматически рассчитывая суммарный показатель окислительного метаболизма (ПОМ), и гистологические препараты печени. Достоверность полученных результатов оценивали статистическими методами на персональном компьютере с использованием теста Шапиро–Уилка и t-критерия Стьюдента. **Результаты.** Установлено, что аМККМ и иМККМ оказывают регуляторное воздействие на метаболизм на всех этапах развития СД2, однако мощность и эффективность воздействия аМККМ на исследуемые показатели была всегда более выраженной и находилась в прямой зависимости от значений ПОМ при введении клеток. На ранних этапах развития СД2 (на стадии адаптации – 1 мес. и стадии прогрессирующей дезадаптации – 3 мес.), когда значения ПОМ в тканях еще сохраняются на достаточно высоком уровне, иМККМ, но особенно аМККМ оказывают выраженный корректирующий эффект. На поздней стадии развития СД2 (на стадии декомпенсации метаболизма – 7 мес.), когда значения ПОМ снижаются ниже критического уровня, иМККМ, но особенно аМККМ способны усилить повреждение метаболизма и ускорить гибель животных. **Заключение.** МККМ (иМККМ и аМККМ) являются эффективным вспомогательным средством корректирующей терапии на ранних этапах развития СД2, так как развитие их терапевтического действия реализуется за счет сохранившихся стресс-адаптивных резервов в тканях организма.

Ключевые слова: клетки костного мозга, сахарный диабет 2-го типа, окислительные процессы в тканях.

Для корреспонденции: Шагидулин Мурат Юнусович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (499) 196-87-90. E-mail: dr.shagidulin@mail.ru

Corresponding author: Murat Shagidulin. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: (499) 196-87-90. E-mail: dr.shagidulin@mail.ru

COMPARATIVE EFFICACY OF INTACT AND APOPTOTIC BONE MARROW CELLS AT DIFFERENT STAGES OF TYPE 2 DIABETES PROGRESSION

A.O. Nikolskaya¹, N.A. Onishchenko¹, E.A. Volkova¹, O.I. Stepanova², N.V. Baranova¹, A.S. Ponomareva¹, R.A. Kleosov², Kh.Kh. Semenov², N.P. Mozheiko¹, M.Yu. Shagidulin^{1, 3}, Yu.B. Basok¹

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

² Research Center for Biomedical Technologies, Moscow region, Krasnogorsk, Svetlye Gory village, Russian Federation

³ Sechenov University, Moscow, Russian Federation

Objective: to compare the therapeutic efficacy of intact and apoptotic bone marrow mononuclear cells (BMMCs) at different stages of type 2 diabetes mellitus (T2D) progression. **Materials and methods.** The study was conducted using a genetic model of T2D in db/db mice (n = 52; age 0.5–1.0 months). Animals were divided into four groups: control (n = 10) and three experimental groups (n = 14 each), which received allogeneic BMMCs from healthy donors at a dose of $40\text{--}45 \times 10^6$ cells at different stages of disease progression (1, 3, and 7 months of age). Each experimental group was further subdivided into two subgroups: one receiving freshly isolated intact BMMCs (iBMMCs) and the other apoptotic BMMCs (aBMMCs). Apoptotic cells were obtained by incubating intact cells in Bradschneider's ion-balanced preservative solution to induce reversible apoptosis. Outcomes were assessed by measuring blood glucose levels, body weight, total oxidative metabolism index (TOM), and histological liver changes. Reliability of the results was assessed using statistical methods on a personal computer, employing the Shapiro–Wilk test and the Student's t-test. **Results.** Both iBMMCs and aBMMCs demonstrated regulatory effects on metabolism at all stages of T2D progression; however, apoptotic BMMCs showed consistently greater efficacy. The therapeutic effect was directly associated with baseline tissue oxidative metabolism (TOM) levels at the time of administration. In early stages (adaptation at 1 month and progressive maladaptation at 3 months), when TOM levels remained relatively high, both cell types, particularly apoptotic BMMCs, produced pronounced corrective effects. In contrast, in the late stage (metabolic decompensation at 7 months), when TOM levels dropped below a critical threshold, iBMMCs, but especially aBMMCs, aggravated metabolic damage and increased animal mortality. **Conclusion.** Intact and apoptotic BMMCs may serve as effective adjunctive therapy in the early stages of T2D, with their therapeutic efficacy dependent on the body's preserved stress-adaptive reserves in tissues.

Keywords: bone marrow cells, type 2 diabetes, tissue oxidative processes.

ВВЕДЕНИЕ

Заболеваемость сахарным диабетом (СД) в современном мире уже приобрела характер пандемии и стала серьезной медико-социальной проблемой во многих странах, в том числе и в России. По прогнозам ВОЗ, численность больных СД в мире к 2030 году превысит 439 млн человек [1], причем у большинства из них (90–95%), как и в настоящее время, будет диагностироваться СД 2-го типа (СД2) [2].

По современным представлениям, СД2 – хроническое мультифакторное заболевание [2, 3], ранним клиническим проявлением которого является гипергликемия, обусловленная развитием резистентности тканей к инсулину. Возникающая инсулинорезистентность первоначально сопровождается усилением секреции инсулина (инсулинемией), которая в последующем сменяется истощением функции островковых клеток поджелудочной железы и развитием истинного дефицита инсулина в организме.

Клинически СД2 обычно начинает проявляться после 40–50 лет, а ремиссия достигается путем коррекции режима питания (ограничение поступления в организм углеводов и несбалансированных липидов) [4], повышения физических нагрузок (активизация мышечной системы пациента для повышения ее утилизации глюкозы) [5], а также устранения сопутствующего кишечного дисбиоза [6–8] (использование про- и пребиотиков, привнесение в кишечник полезной микрофлоры, утилизирующей углеводы из кишечника [9–11]). Эффективность таких мероприятий позволила связать развитие СД2 с постепенным накоплением в организме ряда эпигенетических нарушений [3, 12–14], которые возникают как следствие нарушения физико-химических и функциональных свойств клеточных мембран организма в ответ на избыточное содержание глюкозы в крови и межклеточной жидкости, способствующих дисбалансу экспрессии генома. Последнее выражается дисфункцией отдельных или множества генов [15, 16], обеспечи-

вающих регуляцию трансмембранного транспорта углеводов путем связывания инсулина рецепторами цитоплазматических мембран и биопереноса глюкозы внутрь клеток гормоно-рецепторным комплексом [16]. При дисфункции генов углеводного обмена нарушается метаболизм гликогена, активируется полиоловый путь метаболизма глюкозы, нарушается адекватность окислительно-восстановительных и энергетических процессов, что сопровождается развитием оксидативного стресса и накоплением в клетках токсичных супероксидных радикалов [17]. Инсулинорезистентность сопровождается также развитием дислипидемии и ожирения, поскольку избыток инсулина стимулирует липогенез, ведет к накоплению липопротеидов низкой и очень низкой плотности, что создает условия для развития жировой дистрофии печени и атеросклероза сосудов [17, 18, 20]. С инсулинорезистентностью связывают также нарушение функции протеинкиназы C-3 и накопление токсичных гликированных липопротеидов и белков с измененными антигенными свойствами, которые способствуют активации врожденного и адаптивного иммунитета, а также развитию сосудистого воспаления, ответственного за возникновение макро- и микрососудистых осложнений при СД2 [17, 20].

По современным представлениям, прогрессирование иммунной дисфункции при СД2, как и при других хронических заболеваниях, повышает чувствительность организма пациента к инфекциям и инфекционным осложнениям [21, 22]. Кроме того, иммунная дисфункция препятствует достижению ремиссии и восстановительной регенерации тканей из-за дезадаптации и стрессорного истощения способности клеток иммунной системы (прежде всего лимфоцитов) осуществлять адресный перенос регенерационных сигналов в зоны повреждения [23].

В последние десятилетия для активизации регенерационных процессов в поврежденных органах и тканях при различных хронических заболеваниях было предложено использовать донорские гемопоэтические и стромальные клетки костного мозга – центрального органа иммуногенеза в организме, которые, как известно, обладают в организме наиболее высоким регуляторным и регенерационным потенциалом. Было показано, что применение мононуклеарных и стромальных клеток костного мозга (ККМ) здоровых аллогенных доноров способно индуцировать ремиссию клинических проявлений СД 1-го и 2-го типа, но только на ранних стадиях заболевания [24, 25].

Из литературы последних лет стало известно [26], что эффективность клеточной терапии может быть усилена путем использования не интактных (свежевыделенных), а апоптотически измененных ККМ. Эти клетки при введении в организм реципиента подвергаются апоптозу, превращаются в секретомы и способны более мощно продуцировать многочис-

ленные рост-стимулирующие паракринные факторы (нано-везикулы, липиды, экзосомы, различные микроРНК, белки [27] и другие компоненты), тем самым повышая результативность восстановительных процессов в поврежденных органах. Между тем в доступной литературе мы не обнаружили данных о степени эффективности терапии СД2 апоптотическими ККМ на разных стадиях заболевания, что позволило сформулировать цель настоящего следования.

Цель настоящей работы – сравнить эффективность коррекции патогенетических нарушений в организме при использовании интактных (свежевыделенных) и апоптотических ККМ здорового аллогенного донора у животных с СД2 на разных этапах прогрессирующего развития заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Патогенетические изменения в организме при СД2 и возможность их коррекции при использовании клеточной терапии изучали на генетической модели СД на мутантных мышах C57BL/KsJYLepr db/+(B/Ks-Leprdb/+) – (db/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 СД2, с дегрануляцией β -клеток в островках поджелудочной железы, но без дефицита инсулина на ранних стадиях [24]. Все экспериментальные исследования с использованием лабораторных животных проводили в строгом соответствии с законодательством Российской Федерации (в соответствии с Правилами лабораторной практики, утвержденными приказом Минздрава России № 708 от 23.08.2010 г.), а также стандартом ГОСТ Р ИСО 10993-2-2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к условиям содержания животных») и с соблюдением биоэтических принципов, утвержденных Европейской конвенцией о защите позвоночных животных (2005 г.).

Общее количество мышей с диабетом B/Ks-Lepr db/Lepr db (db/db), использованных в экспериментах, составило 52 головы, возраст 0,5–1,0 месяца, когда клинические симптомы заболевания находились еще в состоянии компенсации. Эти мыши были включены в 4 экспериментальные группы: 1-я группа – контроль (n = 10), в которой были выявлены стадии (этапы) прогрессирующего развития СД2 без применения корректирующих воздействий; во 2-й (n = 14), 3-й (n = 14) и 4-й (n = 14) опытных группах изучали эффективность корректирующего воздействия однократного внутрибрюшинного введения несортированных мононуклеарных клеток аллогенного костного мозга (МККМ) от здорового донора в дозе 40–45 × 10⁶ клеток. Различие второй, третьей и четвертой групп состояло в том, что приготовленные МККМ вводили в организм мышей на разных стадиях (сроках) прогрессирующего развития СД2, которые были

выявлены нами ранее [28]. Во 2-й группе МККМ вводили через 1 мес. после рождения (стадия адаптации), когда клинические симптомы были частично компенсированы и слабо выражены. В 3-й группе МККМ вводили на 3-м мес. после рождения, когда животные уже пребывали в состоянии прогрессирующего развития болезни (стадия дезадаптации). В 4-й группе МККМ вводили на 7-м мес. после рождения, когда в организме мышей появлялись клинические признаки нарастания тяжести заболевания и развитие сосудистых осложнений (у части мышей на этом сроке на коже появлялись мокнувшие язвы). В каждой из групп с введением МККМ было выделено 2 подгруппы, в одной из них были использованы интактные (свежевыделенные) МККМ (иМККМ), а в другой – апоптотические МККМ (аМККМ). Распределение мутантных мышей с СД2 по экспериментальным группам представлено в таблице.

иМККМ получали из костного мозга здоровых гетерозиготных мышей (db/+m) (n = 20) по общепринятой методике [29]; аМККМ получали путем инкубации иМККМ в консервирующем ионсбалансированном растворе Кустодиол (раствор НТК-Бредшнейдера) при t = 4–6 °С в течение 48 часов, так как, согласно нашим исследованиям, при указанных режимах хранения содержание аМККМ в состоянии раннего обратимого апоптоза становилось достоверно выраженным и достигало 44,8%, а содержание аМККМ в состоянии позднего необратимого апоптоза в составе клеточного пула не превышало 2–8% (p < 0,02). Всего в работе было использовано 72 животных. В процессе эксперимента на протяжении 6–7 мес. проводилось динамическое исследование состояния животных с генетической моделью СД2. С помощью аппарата лазерной доплеровской флоуметрии «Лазма СТ» по разработанной нами методике [30], неинвазивно изучали состояние микроциркуляции в тканях (для исследований использовали хвост мышей), а также определяли в тканях уровень активности митохондриальных окислительных коферментов – НАДН, ФАД – и автоматически рассчитывали показатель окислительного метаболиз-

ма – ПОМ по формуле: $ПОМ = M_{\text{нутр}} / (A_{\text{надн}} / A_{\text{фад}})$, где $M_{\text{нутр}}$ – среднее значение нутритивного кровотока, поддерживающего трофику тканей и одновременно учитывающего колебания кровотока, обусловленного миогенными, нейрогенными механизмами и амплитудами сердечных сокращений [30]; $A_{\text{надн}}$ и $A_{\text{фад}}$ – активность коферментов в безмерных единицах. Кроме того, в динамике измеряли уровень глюкозы фотометрическим методом на приборе Ассу-Счек (Швейцария), измеряли в динамике вес животных. Часть животных в группе 2 после введения МККМ выводили из эксперимента через 4 мес. наблюдения и проводили морфологическое исследование печени, исследуя гистологические препараты, окрашенные гематоксилином и эозином. Численные значения результатов проведенных исследований подвергали статистической обработке на персональном компьютере с предварительным использованием теста Шапиро–Уилка на небольшом количестве выборок (n > 5) для доказательства нормальности распределения экспериментальных данных. Достоверность различий определялась с помощью t-критерия Стьюдента (стандартный программный пакет – Microsoft Excel, 2007). Различия считались достоверными при p < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 представлены результаты динамического исследования изменений содержания глюкозы в крови и массы тела у мышей с СД2 в 1-й, контрольной, группе и во 2-й группе после однократного введения мышам на 1-м мес. жизни иМККМ и аМККМ в одинаковых дозах.

В контроле в течение 7 мес. наблюдения по мере развития заболевания происходит неуклонное повышение содержания глюкозы в крови с $18,5 \pm 2,4$ до значений 35 ммоль/л и выше. Введение иМККМ также не препятствовало повышению содержания глюкозы в крови, но уровень глюкозы в крови начиная с 3 мес. наблюдения становился достоверно ниже по сравнению с контролем на всех сроках наблюдения. При введении аМККМ в той же дозе уже через

Таблица

Распределение мутантных мышей с СД2 по экспериментальным группам
Distribution of mutant mice with T2D across experimental groups

№ группы	Характеристика группы	Количество мышей	Характеристика МККМ
1	Контроль	10	Физиологический раствор
2	Применение МККМ на 1-м мес. жизни	14	Интактные (n = 7)
			Апоптотические (n = 7)
3	Применение МККМ на 3-м мес. жизни	14	Интактные (n = 7)
			Апоптотические (n = 7)
4	Применение МККМ на 7-м мес. жизни	14	Интактные (n = 7)
			Апоптотические (n = 7)
Всего		52	

1 мес. происходило не повышение, а выраженное и достоверное снижение глюкозы в крови, которое к концу наблюдения (6–7 мес.) достигало субнормальных значений – 6,5–6,7 ммоль/л. Исследование динамики изменений массы тела показало, что в контроле она характеризовалась повышением с 35,4 ± 4,2 г в исходе до 43,2–46,7 г к 2–3 мес. и сохранялась на этом уровне с небольшими колебаниями к 6–7 мес. наблюдения. При использовании иМККМ и аМККМ динамика изменения массы тела мышей в этой группе была практически одинаковой и характеризовалась постепенным снижением массы тела к 4 мес. наблюдения по сравнению с контролем, а затем стабилизацией значений массы тела, которые составляли 27,5 ± 2,7 и 28,2 ± 3,1 г к 7 мес. наблюдения при однократном использовании иМККМ и аМККМ. Таким образом, при использовании иМККМ и аМККМ на раннем этапе развития СД2 (на сроке 1 мес. жизни

мышей) корригирующий эффект на показатели веса и содержания глюкозы в крови оказывали оба типа клеток, однако эффект от применения аМККМ был достоверно наиболее отчетливо выражен и характеризовался стабильностью.

Результаты однократного применения иМККМ и аМККМ на этапе прогрессирующей дезадаптации при развитии СД2 (2,5–3,5 мес. жизни мышей) – на сроке 3 мес. представлены на рис. 2.

Корригирующее воздействие МККМ, примененных на 3-м месяце жизни мышей, было менее эффективно как при использовании иМККМ, так и при использовании аМККМ. Уровень глюкозы в крови в контроле к 3 мес. наблюдения (6 мес. жизни мышей с СД2) достигал максимума 35 ммоль/л, а затем происходило некоторое снижение значений глюкозы в крови, которые, однако, оставались на высоком уровне и составляли 32,1 ± 3,2 ммоль/л к 7 мес. наблюдения.

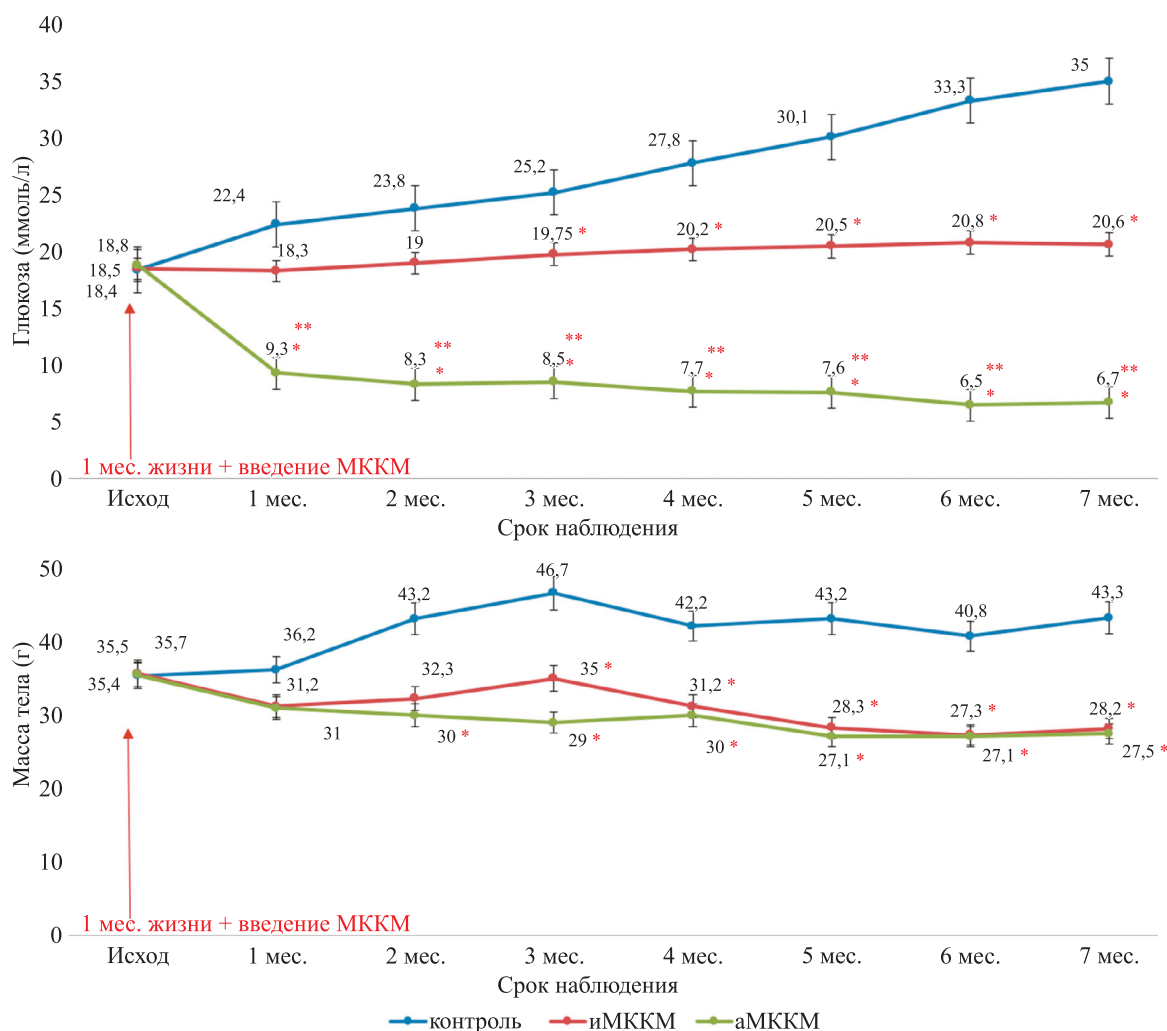


Рис. 1. Динамика изменения содержания глюкозы в крови и массы тела у мутантных мышей db/db с прогрессирующим развитием СД2 после однократного введения МККМ (иМККМ и аМККМ) на стадии адаптации (на сроке жизни мышей 1 мес.); * – p < 0,05 по сравнению с контролем; ** – p < 0,05 по сравнению с иМККМ

Fig. 1. Changes in blood glucose levels and body weight in mutant db/db mice with progressive T2D following a single administration of BMCCs (intact and apoptotic) during the adaptation phase (at 1 month of age); * – p < 0.05 vs control; ** – p < 0.05 vs iBMCCs

При использовании иМККМ значения содержания глюкозы в крови на протяжении всего срока наблюдения сохранялись на незначительно меняющемся высоком уровне, который, однако, и на ранних, и на отдаленных сроках наблюдения в этой 3-й группе был ниже, чем в контроле. При введении аМККМ на 3-м месяце жизни мышей снижение содержания глюкозы в крови отмечалось уже в течение 1 мес. наблюдения, и это снижение было достоверным по сравнению с контролем: уровень глюкозы в крови к этому сроку достигал $17,5 \pm 2,1$ ммоль/л и оставался на этом уровне практически до конца наблюдения, достигая к 7 мес. наблюдения (10 мес. жизни) значений $15,7 \pm 2,4$ ммоль/л. Динамика изменения массы тела в контроле характеризовалась постепенным снижением – с $43,2 \pm 1,8$ г в исходе до $20,5 \pm 3,7$ г к 7 мес.

наблюдения. При использовании иМККМ масса тела к 1 мес. наблюдения повышалась до $46,5 \pm 2,7$ г, а затем снижалась до $30,1 \pm 1,8$ г к 7 мес. наблюдения. При использовании аМККМ масса тела мышей снижалась до 27–28 г, т. е. снижение веса мышей с СД2 к концу наблюдения при введении иМККМ и аМККМ было менее выраженным, чем в контроле. Результаты, полученные в этой серии опытов, показывают, что применение МККМ – и интактных, и апоптотических – у мышей с СД2 на стадии прогрессирующей дезадаптации (3 мес. жизни) оказывает регуляторное воздействие на исследуемые показатели (стабилизируются значения массы тела, снижается уровень глюкозы в крови), но выраженность корректирующего эффекта иМККМ и аМККМ, примененных на этой стадии, существенно снижена по сравнению с введе-

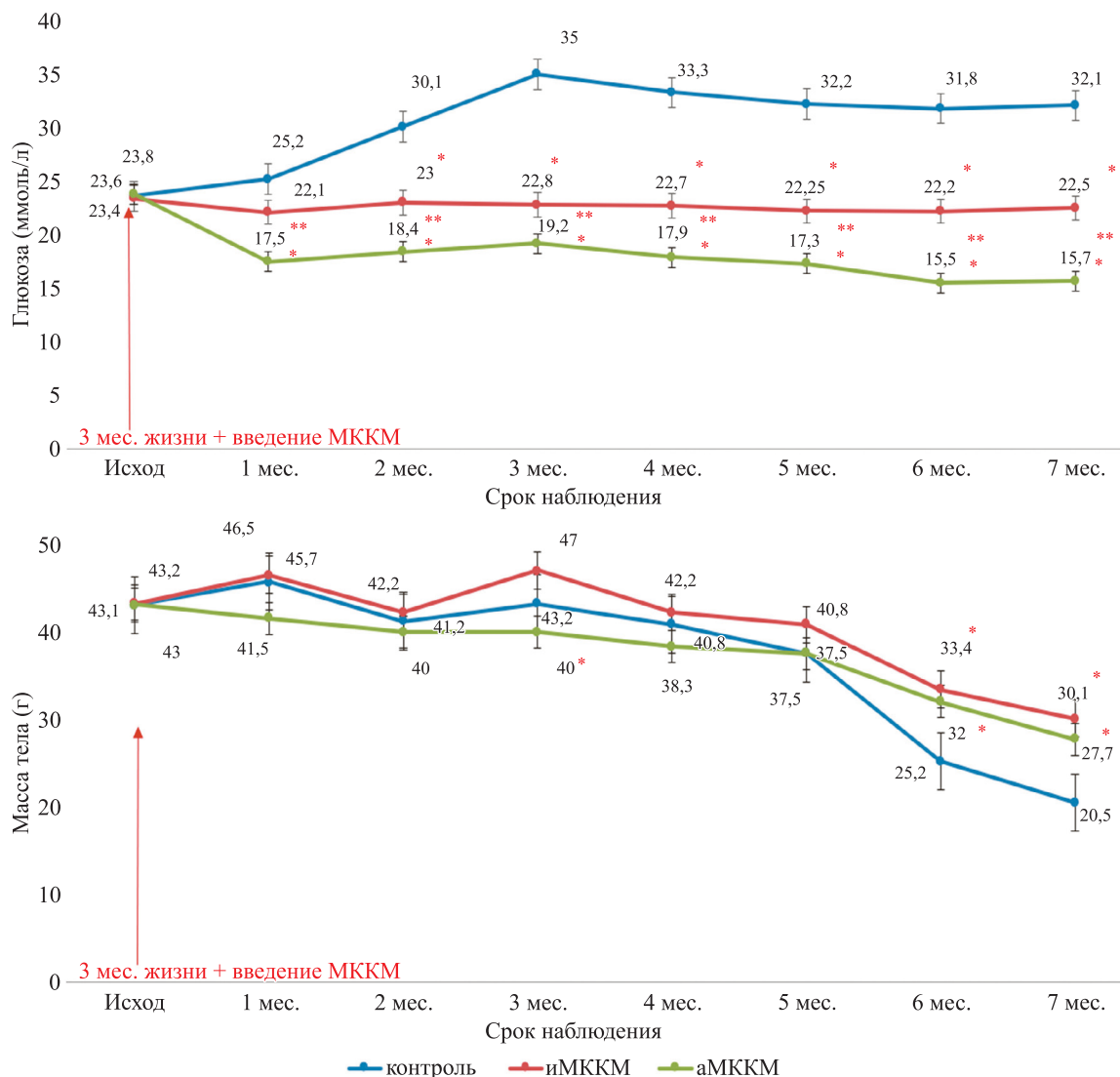


Рис. 2. Динамика изменения содержания глюкозы в крови и массы тела у мутантных мышей db/db с прогрессирующим развитием СД2 после однократного введения МККМ (иМККМ и аМККМ) на стадии прогрессирующей дезадаптации (на сроке жизни мышей 3 мес.); * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ** – $p < 0,05$ по сравнению с иМККМ

Fig. 2. Changes in blood glucose levels and body weight in db/db mutant mice with progressive T2D following a single administration of BMMCs (intact and apoptotic BMMCs) during the stage of progressive maladaptation (at 3 months of age); * – $p < 0.05$ compared to control; ** – $p < 0.05$ compared to intact BMMCs

нием тех же клеток на более раннем сроке развития СД2 (в стадии адаптации).

Особенности динамики изменения содержания глюкозы в крови и массы тела мышей с СД2 после введения им МККМ (иМККМ и аМККМ) на 7-м мес. жизни, т. е. на позднем этапе прогрессирующего развития СД2 (стадия декомпенсации), которая развивается с 5–6 мес. жизни до гибели животных, представлена на рис. 3.

На этапе декомпенсации даже в контроле происходило постепенное и спонтанное снижение содержания глюкозы в крови с $33,2 \pm 2,2$ до $22,1 \pm 1,7$ ммоль/л к 5 мес. наблюдения (12 мес. жизни), и это свидетельствовало о развитии глубоких необратимых на-

рушений углеводного обмена в организме. В опытах с введением иМККМ и аМККМ наступало еще более резкое падение содержания глюкозы в крови, причем особенно выраженное снижение происходило в группе с применением аМККМ: к 5 мес. наблюдения под влиянием иМККМ содержание глюкозы в крови снизилось до $15,5 \pm 1,4$ ммоль/л, а при использовании аМККМ – до $7,4 \pm 1,9$ ммоль/л, причем к этому сроку в обеих группах погибло более 60% животных (9 мышей из 14), а в контроле – менее 30% (3 мыши из 10).

О развитии более тяжелых нарушений метаболизма у животных, получавших терапию МККМ на этапе декомпенсированного состояния организма, свидетельствуют также результаты измерения массы

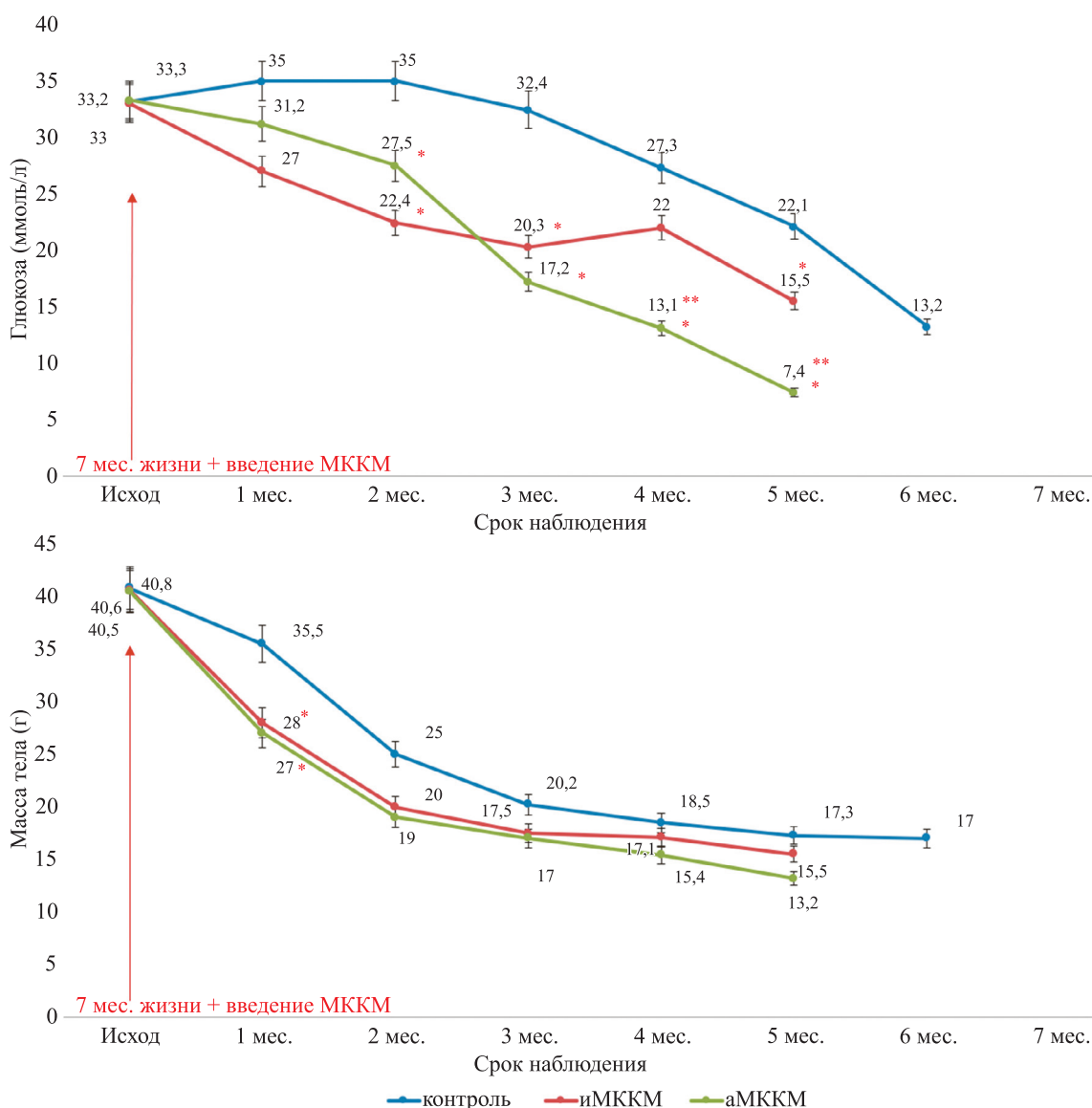


Рис. 3. Динамика изменения содержания глюкозы в крови и массы тела у мутантных мышей db/db с прогрессирующим развитием СД2 после однократного введения МККМ (иМККМ и аМККМ) на стадии декомпенсации (на сроке жизни мышей 7 мес.); * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ** – $p < 0,05$ по сравнению с иМККМ

Fig. 3. Changes in blood glucose levels and body weight in mutant db/db mice with progressive T2D following a single administration of BMCCs (iBMCCs and aBMCCs) at the decompensation stage (at 7 months of age); * – $p < 0.05$ vs control; ** – $p < 0.05$ vs iBMCCs

тела этих животных: в контроле критических значений масса тела (17–17,5 г) достигала к 5–6 мес. наблюдения (т. е. к 12 мес. жизни), тогда как при использовании МККМ (иМККМ и аМККМ) – к 3–4 мес. наблюдения (т. е. к 10–11 мес. жизни).

Для выяснения причин снижения эффективности корректирующего воздействия МККМ (иМККМ и аМККМ) по мере прогрессирования СД2 нами была изучена динамика изменения окислительного метаболизма в тканях мышечной ткани в течение 11 мес. эксперимента в контроле и в группах с введением аМККМ на разных стадиях прогрессирования СД2, эффект от применения которых был наиболее выражен. При этом мы полагали, что результат терапевтического корректирующего воздействия аМККМ, как и любых других медикаментозных препаратов, определяется степенью поддержания адекватности состояния окислительно-восстановительных процессов в тканях организма и что стадии прогрессирующей дезадаптации и декомпенсации, развивающиеся при СД2, являются следствием глубокой тканевой гипоксии и развивающегося в них энергодефицита [28]. Результаты динамического изучения обобщенного показателя окислительного метаболизма (ПОМ) в контроле и в группах с применением аМККМ на разных сроках прогрессирующего развития СД2 (на 1, 3 и 7-м мес. жизни) представлены на рис. 4. В контрольной группе мышечной ткани с СД2 на протяжении 11 мес. исследования происходит постепенное снижение ПОМ: с 9,74 в исход (1 мес. жизни) до 3,2 к 11 мес. жизни, т. е. по мере прогрессирования СД2 в тканях организма постепенно нарастает гипоксия. На всех сроках введе-

ния аМККМ доставка их в организм сопровождается резким снижением и последующим повышением уровня ПОМ в тканях. Мы отметили также, что по мере прогрессирования СД2 двухфазная динамика отклонения амплитуд ПОМ (снижение–повышение) становится менее выраженной, и это указывает на постепенное истощение в клетках организма регуляторных и восстановительных резервов. При введении аМККМ на 1-м мес. жизни, когда резервы клеточной регуляции не истощены, ПОМ в тканях на протяжении всего срока наблюдения остаются на более высоком уровне, чем в контроле; введение аМККМ на 3-м мес. жизни также поддерживало ПОМ на уровне выше контрольного.

Между тем динамика ПОМ при введении аМККМ на 7-м мес. жизни на всем сроке наблюдения оставалась на уровне ниже контрольного, что свидетельствовало о прогрессирующем, глубоком и необратимом угнетении окислительных процессов в организме и их декомпенсации. Результаты проведенных исследований убеждают в том, что наиболее благоприятный и пролонгированный корректирующий эффект на метаболизм в тканях организма при СД2 оказывают аМККМ, введенные на ранних этапах развития СД2 на стадии адаптации и прогрессирующей дезадаптации. Для доказательства сохраняющегося корректирующего воздействия иМККМ и особенно аМККМ на этапе прогрессирующей дезадаптации и целесообразности использования клеточной терапии на этом этапе приводим результаты гистологического исследования печени, которая, как известно,

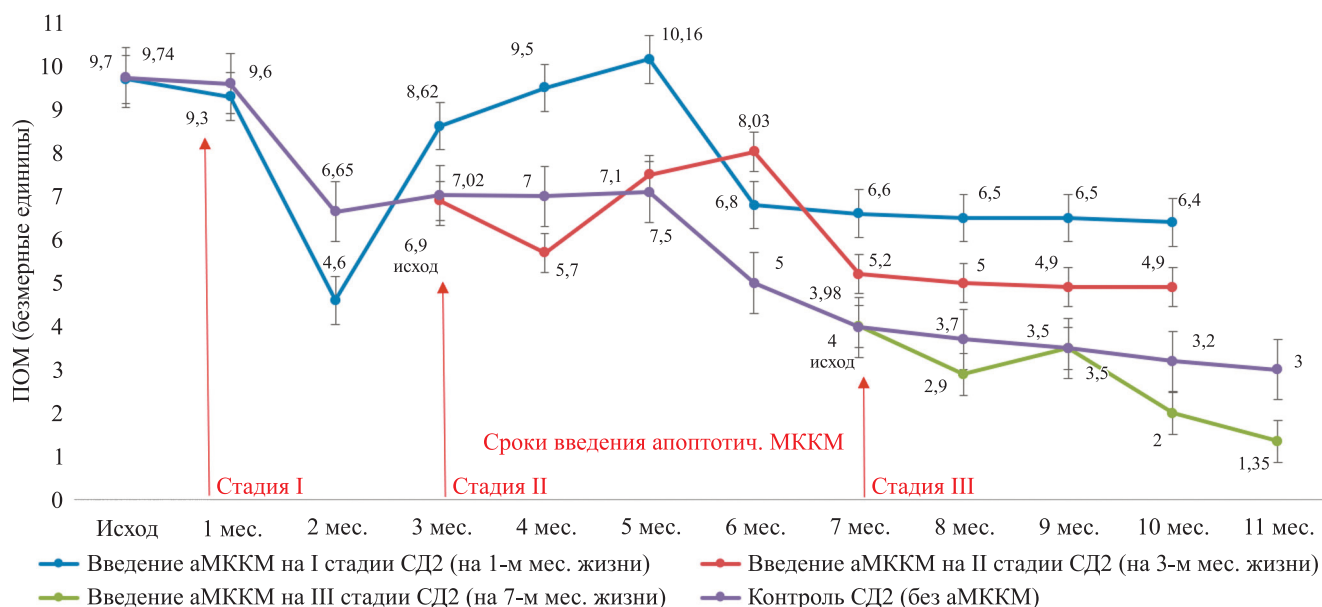


Рис. 4. Динамика изменения показателя окислительного метаболизма (ПОМ) в тканях организма при развитии СД2 без и на фоне введения аМККМ на разных стадиях прогрессирования заболевания

Fig. 4. Changes in the oxidative metabolism index (OMI) in tissues during the progression of T2D, with and without administration of apoptotic BMMCs at different stages of disease progression

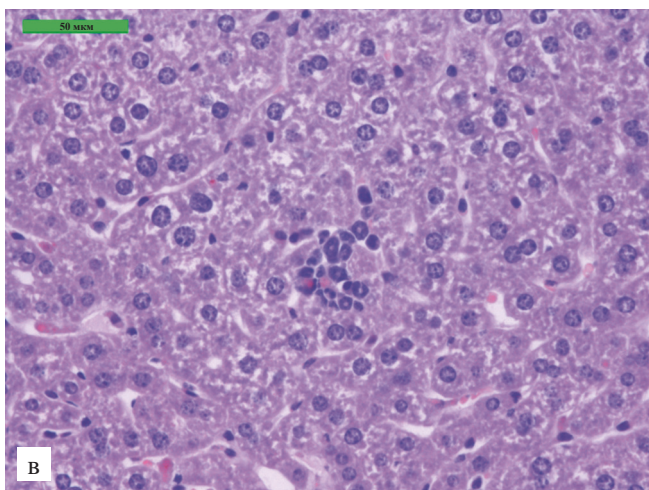
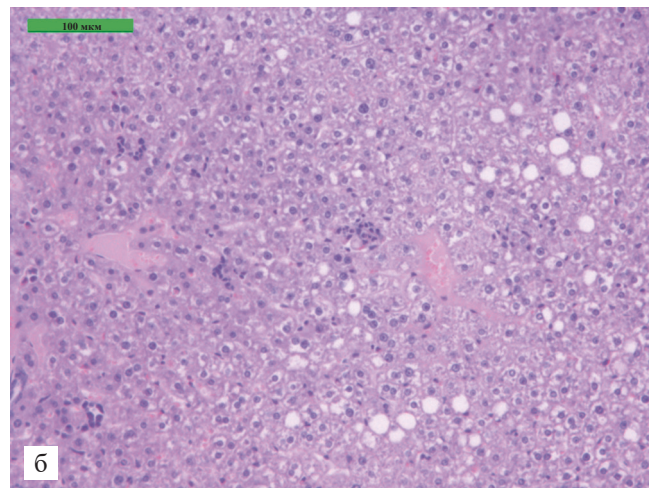
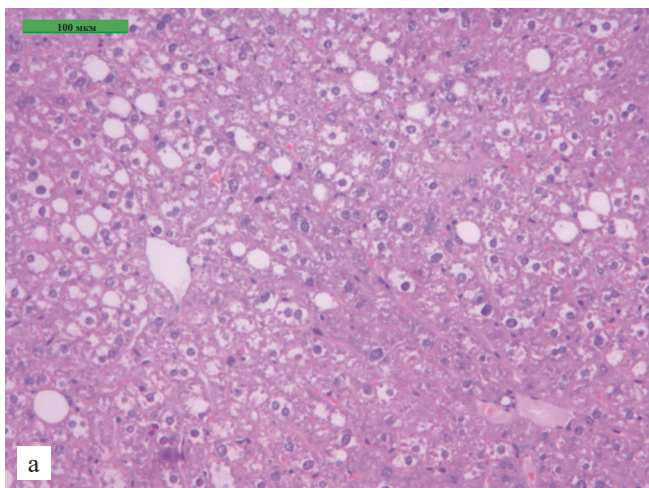


Рис. 5. Гистологическая структура печени мышей с СД2 в контроле и после применения иМККМ и аМККМ на этапе прогрессирующего развития СД2 (на 3-м месяце жизни): а – контроль СД2 (исходное состояние), $\times 20$; б – СД2 + иМККМ (через 4 месяца после введения иМККМ), $\times 20$; в – СД2 + аМККМ (через 4 месяца после введения аМККМ), $\times 40$. Окраска гематоксилином и эозином

Fig. 5. Histological structure of the liver in mice with T2D in the control group and following administration of intact and apoptotic BMBCs during the progressive stage (3 months of age): а – T2D control (baseline), $\times 20$; б – T2D + iBMBCs (4 months after administration), $\times 20$; в – T2D + aBMBCs (4 months after administration), $\times 40$. H&E stain

играет важную патогенетическую роль в развитии СД2 (рис. 5).

В гистологических препаратах печени гепатоциты подвергнуты выраженной, преимущественно крупнокапельной, жировой дистрофии; наряду с жировыми каплями среди гепатоцитов выявляется некоторое количество двуядерных клеток, являющихся, как известно, признаком сохраняющихся в тканях репарационных процессов. На срезах выявляются также участки с гибелью большого количества печеночных клеток и замещением возникающих пустот каплями жира (рис. 5, а). Применение МККМ существенно снижает в печени содержание гепатоцитов с признаками жировой дистрофии, а также снижается площадь зон с гибелью печеночных клеток и замещением их каплями жира. При исследовании нескольких полей зрения было установлено, что при использовании иМККМ количество клеток печени с включением жировых капель снижается практически наполовину, а при использовании аМККМ гепатоциты, содержащие жировые капли, вообще отсутствовали (рис. 5, б, в).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований позволяют прийти к заключению, что аМККМ на всех этапах прогрессирующего развития СД2 оказывают более мощное регуляторное воздействие на организм по сравнению с иМККМ, причем выраженность их регуляторной активности находится в прямой зависимости от значений ПОМ, отражающих степень сохранности тканевых адаптационных резервов. На ранних этапах развития СД2 (на стадии адаптации и на стадии прогрессирующей дезадаптации), когда значения ПОМ находятся в тканях на достаточно высоком уровне, иМККМ и особенно аМККМ оказывают выраженный корригирующий эффект на исследуемые показатели. На поздней стадии развития СД2 на стадии декомпенсации метаболизма, когда значения ПОМ в тканях организма снижаются ниже критического уровня, МККМ, и особенно аМККМ, усугубляют тяжесть тканевого повреждения метаболизма и ускоряют гибель животных. Проведенное исследование показало, что применение МККМ на ранних стадиях развития СД2 может оказаться полезным в качестве средства вспомогательной поддерживающей терапии. На поздних стадиях развития СД2 применение иМККМ и аМККМ бесперспективно и

даже опасно, что указывает на необходимость применения заместительных трансплантационных методов лечения, таких как пересадка донорских островковых клеток или поджелудочной железы.

ВЫВОДЫ

1. Прогрессирующее развитие СД2 сопровождается постепенным снижением показателя окислительного метаболизма (ПОМ) в тканях, степень выраженности которого предопределяет снижение эффективности применения МККМ.
2. иМККМ и аМККМ здорового донора при введении в организм мышей с СД2 реализуют свое регуляторное воздействие путем стресс-адаптивной перестройки метаболизма, что сопровождается краткосрочным снижением ПОМ в тканях.
3. На ранней стадии развития СД2 (1–1,5 мес. – стадия адаптации), когда в клетках организма еще сохранены регуляторные резервы (ПОМ в тканях имеет высокие значения), однократное применение иМККМ и аМККМ в дозе $40\text{--}45 \times 10^6$ клеток на животное (на сроке 1 месяц жизни) оказывает наиболее выраженное корректирующее воздействие на клинические и лабораторные показатели: пролонгированно снижается уровень глюкозы в крови и стабилизируется масса тела. Однако эффективность от применения аМККМ была более выражена.
4. На стадии развернутого течения СД2 (с 2 до 4 мес. – стадия прогрессирующей дезадаптации) применение иМККМ и аМККМ в той же дозе на сроке жизни 3 мес. оказывает менее выраженное (чем на сроке 1 мес. жизни) корректирующее воздействие на уровень глюкозы в крови и массу тела, причем регуляторное воздействие начинает отчетливо проявляться на отдаленных сроках наблюдения. Эффект от применения аМККМ был также более выражен.
5. На поздней стадии развития СД2 (с 6 мес. до гибели животных, стадия декомпенсации) однократное применение иМККМ и аМККМ в той же дозе на сроке 7 мес. жизни приводит к ускоренному снижению гликемии, прогрессирующему снижению веса и ускоренной гибели животных, причем указанные эффекты от применения аМККМ были более выражены.
6. МККМ интактные и апоптотические, однократно примененные в терапевтической дозе при СД2 в период прогрессирующей дезадаптации, оказывают регуляторное воздействие на восстановительные процессы в печени. Это выражается на отдаленных сроках наблюдения в снижении более чем в 2 раза по сравнению с контролем количества гепатоцитов с признаками жировой дистрофии при использовании иМККМ и в полном устранении признаков жировой дистрофии в ткани печени при использовании аМККМ.

7. Применение МККМ при СД2 в качестве мощного естественного адаптогена является полезным на ранних стадиях развития болезни в качестве средства вспомогательной поддерживающей терапии. На поздних стадиях развития СД2 из-за истощения энергетических и регуляторных резервов в тканях организма МККМ усугубляют тяжесть заболевания и не должны применяться.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Ramírez-Alarcón K, Victoriano M, Mardones L, Villagran M, Al-Harrasi A, Al-Rawahi A et al. Phytochemicals as Potential Epidrugs in Type 2 Diabetes Mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Jun 1; 12: 656978. doi: 10.3389/fendo.2021.656978.
2. Artasensi A, Pedretti A, Vistoli G, Fumagalli L. Type 2 diabetes mellitus: A review of multi-target drugs. *Molecules*. 2020 Apr 23; 25 (8): 1987. doi: 10.3390/molecules25081987.
3. Hossain T, Kundu S, Alam SS, Nagarajan S. Epigenetic Modifications Associated with the Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2019; 19 (6): 775–786. doi: 10.2174/1871530319666190301145545.
4. Taylor R, Ramachandran A, Yancy WS Jr, Forouhi NG. Nutritional basis of type 2 diabetes remission. *BMJ*. 2021 Jul 7; 374: n1449. doi: 10.1136/bmj.n1449.
5. Nishikawa H, Fukunishi S, Asai A, Yokohama K, Ohta H, Nishiguchi S, Higuchi K. Sarcopenia, frailty and type 2 diabetes mellitus (Review). *Mol Med Rep*. 2021 Dec; 24 (6): 854. doi: 10.3892/mmr.2021.12494.
6. Ma Q, Li Y, Li P, Wang M, Wang J, Tang Z et al. Research progress in the relationship between type 2 diabetes mellitus and intestinal flora. *Biomed Pharmacother*. 2019 Sep; 117: 109138. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109138.
7. Zhou Z, Sun B, Yu D, Zhu C. Gut Microbiota: An Important Player in Type 2 Diabetes Mellitus. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Feb 15; 12: 834485. doi: 10.3389/fcimb.2022.834485.
8. Bielka W, Przeszak A, Pawlik A. The Role of the Gut Microbiota in the Pathogenesis of Diabetes. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 1; 23 (1): 480. doi: 10.3390/ijms23010480.
9. Zhai L, Wu J, Lam YY, Kwan HY, Bian ZX, Wong HLX. Gut-Microbial Metabolites, Probiotics and Their Roles in Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 27; 22 (23): 12846. doi: 10.3390/ijms222312846.
10. 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.
11. 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.
12. Ahmed SAH, Ansari SA, Mensah-Brown EPK, Emerald BS. The role of DNA methylation in the pathogene-

- sis of type 2 diabetes mellitus. *Clin Epigenetics*. 2020 Jul 11; 12 (1): 104. doi: 10.1186/s13148-020-00896-4.
13. Ibrahim HIM. Epigenetic Regulation of Obesity-Associated Type 2 Diabetes. *Medicina (Kaunas)*. 2022 Sep 28; 58 (10): 1366. doi: 10.3390/medicina58101366.
 14. Raciti GA, Desiderio A, Longo M, Leone A, Zatterale F, Prevezano I et al. DNA Methylation and Type 2 Diabetes: Novel Biomarkers for Risk Assessment? *Int J Mol Sci*. 2021 Oct 28; 22 (21): 11652. doi: 10.3390/ijms222111652.
 15. Borse SP, Chhipa AS, Sharma V, Singh DP, Nivsarkar M. Management of Type 2 Diabetes: current strategies, unfocussed aspects, challenges and alternatives. *Med Princ Prat*. 2021; 30 (2): 109–121. doi: 10.1159/000511002.
 16. Саланс С. Инсулиннезависимый сахарный диабет: диагностика и лечение. *Эндокринология / Под ред. М. Лавина. М.: Практика, 1999: 925–941. Salans S. Insulinnezavisimyy sakharnyy diabet: diagnostika i lecheniye. Endokrinologiya / Pod red. M. Lavina. M.: Praktika, 1999: 925–941.*
 17. Henning RJ. Type-2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Future Cardiol*. 2018 Nov; 14 (6): 491–509. doi: 10.2217/fca-2018-0045.
 18. Malone JJ, Hansen BC. Does obesity cause type 2 diabetes mellitus (T2DM)? Or is it the opposite? *Pediatr Diabetes*. 2019 Feb; 20 (1): 5–9. doi: 10.1111/pedi.12787.
 19. Ruze R, Liu T, Zou X, Song J, Chen Y, Xu R et al. 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.
 20. Tanase DM, Gosav EM, Costea CF, Ciocoiu M, Lacatusu CM, Maranduca MA et al. The Intricate Relationship between Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM), Insulin Resistance (IR), and Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *J Diabetes Res*. 2020 Jul 31; 2020: 3920196. doi: 10.1155/2020/3920196.
 21. De Lourdes Ochoa-González F, González-Curiel IE, Cervantes-Villagrana AR, Fernández-Ruiz JC, Castañeda-Delgado JE. Innate Immunity Alterations in Type 2 Diabetes Mellitus: Understanding Infection Susceptibility. *Curr Mol Med*. 2021; 21 (4): 318–331. doi: 10.2174/1566524020999200831124534.
 22. Golden TN, Simmons RA. Immune dysfunction in developmental programming of type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2021 Apr; 17 (4): 235–245. doi: 10.1038/s41574-020-00464-z.
 23. Бабаева АГ, Геворкян НМ, Зотиков ЕА. Передача регенерационной информации как частный случай проявления морфогенетической функции лимфоцитов (глава 2, с. 30–50). *Роль лимфоцитов в оперативном изменении программы развития тканей*. М.: Изд. РАМН, 2009; 107. Babayeva AG, Gevorkyan NM, Zotikov YeA. Peredacha regeneratsionnoy informatsii kak chastnyy sluchay proyavleniya morfogeneticheskoy funktsii limfotsitov (glava 2, s. 30–50). *Rol' limfotsitov v operativnom izmenenii programmy razvitiya tkaney*. Moskva: Izd. RAMN, 2009; 107.
 24. Степанова ОИ, Онищенко НА, Каркищенко НН, Баранова ОВ, Галахова ТВ. Использование клеток разных фракций аллогенного костного мозга для тера-
 - пии сахарного диабета 2-го типа на генетической модели. *Биомедицина*. 2008; 2: 78–81. Stepanova OI, Onishchenko NA, Karkishchenko NN, Baranova OV, Galakhova TV. Ispol'zovaniye kletok raznykh fraktsiy allogennogo kostnogo mozga dlya terapii sakharnogo diabeta 2-go tipa na geneticheskoy modeli. *Biomeditsina*. 2008; 2: 78–81.
 25. Pires IGS, Silva E Souza JA, de Melo Bisneto AV, Passos XS, Carneiro CC. Clinical efficacy of stem cell therapy on diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Transpl Immunol*. 2022 Dec; 75: 101740. doi: 10.1000016/j.trim.22022.101740.
 26. Beer L, Mildner M, Gyongyosi M, Ankersmit HJ. Peripheral blood mononuclear cell secretome for tissue repair. *Apoptosis*. 2016; 21: 1336–1353. doi: 10.1007/s10495-016-1292-8.
 27. Beer L, Zimmermann M, Mitterbauer A, Ellinger A, Gruber F, Narzt MS et al. Analysis of the secretome of apoptotic peripheral blood mononuclear cells: impact of released proteins and exosomes for tissue regeneration. *Sci Rep*. 2015; 5: 16662. doi: 10.1038/srep16662.
 28. Степанова ОИ, Алчинова ИБ, Черепов АБ, Метелкин АА, Карганов МЮ, Никольская АО и др. Динамика состояния клеток крови и костного мозга у мышей при прогрессирующем развитии сахарного диабета 2-го типа. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2024; 68 (1): 98–108. Stepanova OI, Alchinova IB, Cherepov AB, Metelkin AA, Karganov MYu, Nikolskaya AO et al. Dynamics of the state of blood cells and bone marrow in mice with the progressive development of type 2 diabetes mellitus. *Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian journal*. 2024; 68 (1): 98–108. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2024.01.98-108>.
 29. Онищенко НА, Никольская АО, Гоникова ЗЗ, Кирсанова ЛА, Шагидулин МЮ, Севастьянов ВИ. Роль апоптотических клеток костного мозга при активации регенерационных процессов в печени. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2021; 23 (4): 110–118. Onishchenko NA, Nikolskaya AO, Gonikova ZZ, Kirsanova LA, Shagidulin MYu, Sevastianov VI. The role of apoptotic bone marrow cells in activation of liver regeneration. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2021; 23 (4): 110–118. <https://doi.org/10.15825/25/1995-1191-2021-4-110-118>.
 30. 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, Karkishchenko 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. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2023.02.118-129>.

Статья поступила в редакцию 3.12.2025 г.
The article was submitted to the journal on 3.12.2025