

**Министерство здравоохранения Российской Федерации
(Минздрав России)
Федеральное медико-биологическое агентство
(ФМБА России)**

Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации
Группа 21 Нормы и правила научных исследований в здравоохранении

**Проведение доклинических исследований коррекции
сахарного диабета 1 типа клетками костного мозга
Методические рекомендации**

ФМБА России МР.21. 41 - 2017

Москва 2017

Предисловие

1. Настоящие рекомендации разработаны в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН НЦБМТ ФМБА России) под редакцией д.м.н., профессора Н.Н. Каркищенко.

Директор – д.м.н., профессор В.Н. Каркищенко.

Заместитель директора по науке – д.м.н., профессор Е.Б. Шустов.

2. Исполнители:

научный руководитель – доктор медицинских наук, профессор	Н.Н. Каркищенко
директор – доктор медицинских наук, профессор	В.Н. Каркищенко
заместитель директора по научной работе – доктор медицинских наук, профессор	Е.Б. Шустов
начальник научно-организационного отдела – доктор биологических наук	Г.Д. Капанадзе
заведующая лабораторией – кандидат биологических наук	О.И. Степанова
ученый секретарь – кандидат экономических наук	Е.Л. Матвеев
научный сотрудник	Р.А. Клесов

3. Рецензенты:

Хаитов М.Р., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, и.о. директора института иммунологии ФМБА России, 115478, Москва, Каширское ш., 24, тел. 8 (499) 616-49-25, <http://www.nrcii.ru/>;

Оковитый С.В., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии Санкт-Петербургской химико-фармацевтической академии МЗ РФ, 197022, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова д.4/6, тел. (812) 234-13-29, pharmacology.dept@pharminnotech.com, <http://pharm-spb.ru/>.

4. В настоящем документе реализованы требования Федерального закона от 23 июня 2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах».

5. Введение в действие – с момента утверждения.

6. Введены впервые.

Содержание

Предисловие.....	1
Введение.....	5
1. Область применения	10
2. Аннотация	11
3. Нормативные документы.....	12
4. Обозначения и сокращения	13
5. Требования нормативных документов.....	14
5.1. По работе с животными.....	14
5.2. По работе с клетками костного мозга	15
5.3. По утилизации биологических отходов (биоматериалов).....	15
6. Материально-техническое обеспечение	16
6.1. Животные	16
6.2. Оборудование	16
6.3. Реагентика, культуральные среды и расходные материалы.....	16
7. Методика получения животных – биомоделей СД1	18
8. Методика выделения, обработки и культивирования клеток костного мозга.....	20
8.1. Гемопоэтическая фракция стволовых клеток	20
8.2. Получение и ведение культур мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга	21
9. Методика трансплантации клеток животным-биомоделям.....	22
9.1. Подготовка клеточного материала для трансплантации	22
9.1.1. Подготовка гемопоэтических ККМ.	22
9.1.2. Подготовка ММСК КМ.	22
9.1.3. Определение жизнеспособности клеток в культуре.	22

9.2. Методы идентификации трансплантированных ККМ в культуре и в органах реципиента	23
10. Методика оценки динамики патологического процесса (клинические, лабораторные, морфологические)	24
10.1. Биохимическое исследование крови	24
10.2. Морфологическое исследование органов	24
11. Собственные экспериментальные исследования, легшие в основу технологии применения клеток костного мозга для лечения СД1	26
12. Биомедицинская клеточная технология лечения сахарного диабета 1 типа	30
12.1. Описание	30
12.2. Возможные осложнения при проведении технологии и способы их устранения.....	32
12.2.1. Осложнения при моделировании СД 1 типа.	32
12.2.2. Осложнения при выделении, обработке и культивировании клеток костного мозга.	32
12.3. Критерии оценки эффективности технологии	32
12.4. Результаты апробации технологии (морфологические критерии)	33
Заключение.....	36
Библиография.....	37

Введение

Сахарный диабет – группа заболеваний, проявляющихся повышенным уровнем сахара в крови, обусловленным нарушением способности поджелудочной железы вырабатывать инсулин в количестве, необходимом для удовлетворения метаболической потребностей организма, или эффективности его действия. Он сопряжен с опасностью диабетического кетоацидоза, гипергликемической комы, а также поздних осложнений (ангиопатии, ретинопатии, нефропатии, периферической и вегетативной полинейропатии, атеросклероза коронарных и периферических артерий, частых или генерализованных гнойно-воспалительные процессы). Подразделяется на отдельные типы по принципу специфики патогенеза и потребности в инсулине. Основными являются инсулинзависимый сахарный диабет (тип 1), инсулиннезависимый сахарный диабет (тип 2) и вторичный сахарный диабет (например, сахарный диабет гестационный).

По современным представлениям, СД 1 типа – это хроническое аутоиммунное воспаление островков Лангерганса (ОЛ), при котором происходит постепенная деструкция и гибель инсулинпродуцирующих β -клеток (преимущественно путем апоптоза с развитием абсолютной инсулиновой недостаточности и стойкой гипергликемии), что сопровождается ранним возникновением и прогрессирующим течением структурных изменений в микроциркуляторном русле организма с развитием повреждения внутренних органов [8]. В условиях наблюдаемого иммунного дисбаланса возникает нарушение информационного межклеточного взаимодействия и угнетение воспринимающей, индукционной и пролиферативной активности прогениторных и стволовых клеток поджелудочной железы (ПЖ), что проявляется торможением их миграционной активности и нарушением запуска процессов восстановительной регенерации β -клеток ОЛ.

С этой точки зрения, использование ККМ для коррекции СД 1 типа и его осложнений является перспективным и обоснованным методом, тем более, что в отношении коррекции СД тип 2 стволовыми клетками костного мозга (ККМ) такая возможность была ранее показана [4-6].

Обоснованием выбора клеточной технологии для лечения СД явились отдельные научные публикации, показавшие потенциальную возможность стволовых клеток восстанавливать полноценную клеточную популяцию ОЛ. Ianus et al. [13] на модели аутоиммунного СД показали, что трансплантация моноклеарной фракции мезенхимальных стволовых/прогениторных ККМ, полученных от мышей-доноров линии, экспрессирующей GFP (green fluorescent protein) восстанавливает клеточную популяцию ОЛ только при условии активации в них транскрипции гена инсулина. Через 4-6 недель после трансплантации авторы обнаружили в островковых клетках мышей-реципиентов GFP⁺-клетки, которые составляли 1.7-3% от общего числа эндокринных клеток ПЖ. Кроме того, оказалось, что эти GFP⁺-клетки экспрессировали инсулин, GLUT-2 и ряд других генетических маркеров β -клеток поджелудочной железы. Полученные результаты авторы интерпретировали, как доказанную ими способность мезенхимальных стволовых/прогениторных ККМ к возможной трансдифференцировке в β -клетки.

Аналогичные результаты были получены Chen et al. [10], которые показали, что культура ММСК КМ обладала глюкозозависимой секрецией инсулина в опытах *in vitro*, а при ее трансплантации крысам со стрептозотоциновым СД 1 типа происходило снижение гипергликемии.

ММСК с пластик-адгезивными свойствами, выделенные из КМ или жировой ткани, обладают пластичностью или способностью к трансдифференцировке в β -подобные инсулин-продуцирующие клетки, но при культивировании в особо созданных условиях, в частности при трансфекции этих клеток генами Foxa2, Nf9 и Pdx1 – ранними транскрипционными факторами β -клеток, с помощью ретровирусного вектора и ко-культивации их с ОК. Такая процедура, как было установлено, способствовала дифференцировке ММСК КМ в β -подобные инсулин-продуцирующие клетки [20.].

Известно, что стволовые/прогениторные ККМ, будучи клетками иммунной системы, секретируют *in vitro* обширный спектр регуляторных пептидов – цитомединов, цитокинов, хемокинов и факторов роста, с помощью которых

регулируется репаративный и физиологический морфогенез органов и тканей [15]. Так Izumida et al. [14] показали, что при трансплантации ККМ происходит активация c-met/HGF сигнального пути, что может приводить к регенерации β -клеток в поджелудочной железе. Было показано, что все новообразованные β -клетки локализовались в области экзокринных протоков поджелудочной железы. Авторы предположили, что ККМ могут играть роль в синтезе эндогенного HGF в организме, который способен стимулировать дифференцировку c-met⁺- эпителиальных клеток протоков поджелудочной железы в инсулин-продуцирующие клетки.

В работе Banerjee et al. [9] была показана прямая зависимость между эффектом клеточной терапии и кратностью введения ККМ. Изотрансплантацию клеток свежесывающего нефракционированного КМ проводили облученным мышам линии Swiss albino с моделью стрептозотоцинового СД 1 типа путем однократного или многократного (минимум 3-хкратно) внутрибрюшинного введения в хвостовую вену с регулярным интервалом в 6 дней. Было установлено, что на фоне многократного введения ККМ в течение одного месяца происходило постепенное и достоверное снижение показателей высокого уровня глюкозы в крови до нормогликемии, которая сохранялась в течение всего эксперимента (длительностью до 1 месяца), в отличие от группы животных с однократным введением ККМ, где отмечалось незначительное снижение гипергликемии. Нормализация показателей гликемии у диабетических мышей с многократным введением ККМ была подтверждена положительными результатами при проведении глюкозотолерантного теста. На гистологических срезах поджелудочной железы этих мышей, было обнаружено увеличение количества новообразованных островковых клеток с малым диаметром (менее 50 мкм) по сравнению с нормальными островковыми клетками, которые локализовались в области протоков и ацинусов поджелудочной железы. Аналогичные результаты были получены группой Lee et al. [17]. Прокультивированные в течение 7-9 дней до 70% монослоя человеческие ММСК КМ вводились двукратно с интервалом 7 дней в полость левого желудочка

иммунодефицитным NOD/scid мышам с моделью стрептозотоцинового СД 1 типа. Начиная с 14 дня от момента первого введения ММСК, в группе диабетических животных с трансплантацией ККМ происходило достоверное снижение гипергликемии и полиурии, а также повышение уровня мышинового инсулина, при этом человеческий инсулин в образцах крови не определялся. Результаты, полученные под контролем RT PCR, позволили заключить, что около 3% введенных ММСК обнаруживаются в ткани поджелудочной железы и 11% в ткани почек диабетических мышей. На срезах ткани поджелудочной железы мышей с трансплантацией ММСК, в отличие от группы диабетического контроля, авторы наблюдали достоверное увеличение количества новообразованных островковых клеток с высокой иммунореактивностью инсулина, которые визуально «отпочковывались» от эпителия протоков поджелудочной железы.

Показано, что клетки моноклеарной фракции КМ могут мигрировать в ткань поджелудочной железы в ответ на ее повреждение и стимулировать неоангиогенез, тем самым запуская процессы регенерации пула β -клеток [12]. Было установлено, что при внутривенном введении c-kit (CD117) фракции моноклеарных ККМ от GFP-трансгенных мышей, иммунодефицитным NOD/scid мышам с моделью стрептозотоцинового СД 1 типа, происходило снижение гипергликемии и повышение уровня инсулина в крови. На гистологических срезах ткани поджелудочной железы мышей-реципиентов, авторы наблюдали пролиферацию и неогенез β -клеток в области протоков и островковых клеток, где также были найдены GFP⁺-ККМ мышей-доноров, причем 2,5% этих клеток позитивно окрашивались антителами к инсулину, однако не экспрессировали Pdx-1 – маркер β -клеток, что отрицало возможность их трансдифференцировки в инсулин-продуцирующие клетки. Авторами было высказано предположение, что ККМ способны мигрировать в область поврежденных ОК поджелудочной железы, где они и дифференцируются в ЭК. В свою очередь новообразованные ЭК костно-мозгового происхождения начинают стимулировать пролиферацию локальных стволовых и прогениторных клеток поджелудочной железы посредством выделения ими

трофических факторов или благодаря какому-то другому механизму, индуцирующему дифференцировку в β -клетки ОЛ. Сходный механизм эндотелиально-стимулированной дифференцировки β -клеток выявляется в период эмбрионального развития поджелудочной железы [16].

Системная [7], а также региональная доставка (артериальным катетером в чревный ствол) [11] свежеработанной мононуклеарной фракции аутологичных ККМ приводит к улучшению функции поджелудочной железы, коррекции метаболических нарушений, снижению суточных доз экзогенного инсулина, снижению титра аутоантител к антигенам β -клеток, антител к инсулину, аутоантител к глутаматдекарбоксилазе, повышению резистентности к сахарной нагрузке, а также увеличению синтеза С-пептида, что косвенно указывает на активацию процессов регенерации β -клеток в ПЖ у больных СД 1 типа.

Для лечения СД 1 типа наиболее перспективным может оказаться использование, как стромальной, так и мононуклеарной (гемопозитической) фракций ККМ, которые содержат значительное количество стволовых и прогениторных клеток и поэтому способны индуцировать в паренхиме поврежденных органов процессы репаративной регенерации, выделяя в процессе своей жизнедеятельности регуляторные пептиды, которые восполняют дефицит адекватных информационных и адаптационных сигналов регенерации [3, 14].

Целью методических рекомендаций является формирование стандартизированного протокола проведения доклинических исследований эффективности применения клеточных технологий в лечении сахарного диабета.

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель руководителя Федерального
медико-биологического агентства

« 19 » 06 2017 г. А. П. Серeda



Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации
Группа 21 Нормы и правила научных исследований в здравоохранении

**Проведение доклинических исследований коррекции
сахарного диабета 1 типа клетками костного мозга**
Методические рекомендации

ФМБА России МР.21. 41 -2017

1. Область применения

Настоящие рекомендации распространяются на порядок выполнения доклинических исследований в области клеточных технологий лечения сахарного диабета 1 типа.

Методические рекомендации предназначены для специалистов в области биомедицинских клеточных технологий и посвящены стандартизации доклинических (биомедицинских) исследований в области клеточных технологий лечения сахарного диабета 1 типа.

Настоящий документ предназначен для применения в учреждениях и предприятиях ФМБА России, осуществляющих деятельность в области разработки новых медицинских технологий.

2. Аннотация

Методические рекомендации предназначены для специалистов в области биомедицинских клеточных технологий и посвящены стандартизации доклинических (биомедицинских) исследований в области клеточных технологий лечения сахарного диабета 1 типа.

Рекомендации содержат описание алгоритма исследований, создание модели исследования, требования к животным и работе с ними, технологию получения стволовых клеток, их обработки, культивирования и введения, методики динамической оценки проявлений патологического процесса в ходе клеточной терапии, критерии эффективности технологии, перечень нормативных документов, основную научно-методическую библиографию.

3. Нормативные документы

Ветеринарно-санитарные правила сбора, утилизации и уничтожения биологических отходов, (в ред. Приказа Минсельхоза России от 16.08.2007 № 400).

Временная инструкция о порядке исследований в области клеточных технологий и их использования в учреждениях здравоохранения (МЗСР, утверждена 18.04.2002).

Европейская Конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986).

Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 51849-2001 «Продукция комбикормовая. Информация для потребителя. Общие требования» (Приказ Госстандарта РФ от 25.12.2001 № 582-ст).

Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (Приказ Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 2.12.2009 № 544-ст).

Правила надлежащей лабораторной практики таможенного союза. Решение Комиссии Таможенного союза от 02.03.1999 № 564.

Правила проведения работ с использованием лабораторных животных (приложение к Приказу МЗ СССР от 12.08.1977 № 755).

Приказ Минздрава России от 01.04.2016 №199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики».

Приказ МЗ СССР 06.07.73 г. № 1045-73 об утверждении санитарных правил по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1, Часть 2. М.: Гриф и К, 2012.- 944 с.

СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию, и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)». Утверждены постановлением Главного Государственного санитарного врача Российской Федерации от 29.08.2014 г. № 51.

4. Обозначения и сокращения

АПК – антиген-презентирующие клетки

АТ – антитела

ГП ККМ – гемопоэтические клетки костного мозга

ККМ – клетки костного мозга

КМ – костный мозг

ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

МНК – моноклеарные клетки

ОК – островковые клетки

ОЛ – островки Лангерганса

ПЖ – поджелудочная железа

СД – сахарный диабет

СК – стволовые клетки

DMEM – Dulbeccos modified of Eagles medium – модифицированная по способу

Дульбекко среда Игла

FGFb – fibroblast growth factor basic – Фактор роста фибробластов основной

GFP – green fluorescent protein – флюоресцирующий зеленый белок

STZ – стрептозотоцин

5. Требования нормативных документов

5.1. По работе с животными

Эксперименты выполняются на лабораторных крысах и мышах. Животные должны поступать из сертифицированных питомников, и сопровождаться ветеринарным сертификатом.

Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляет 14 дней. В течение карантина проводят ежедневный осмотр каждого животного (поведение и общее состояние), дважды в день животных наблюдают в клетках (заболеваемость и смертность). Перед началом исследования животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, распределяют на группы с помощью метода рандомизации. Животные, не соответствующие критериям, исключают из исследования в течение карантина.

Животных содержат в соответствии с требованиями ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)» и Правилами надлежащей лабораторной практики Таможенного Союза.

Животных содержат в вентилируемых клетках типа RairIsoSystem, группами, мыши – по 5 голов в клетке, крысы – по 3 головы в клетке. В качестве подстилки используют стерильные древесные опилки из нехвойных пород деревьев. В качестве корма – стандартный комбикорм, гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001. Кормление животных осуществляется по нормативам в соответствии с видом животных. Водопроводная очищенная вода всем животным дается *ad libitum* в стандартных поилках. Животные содержатся в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 22-24°C и относительная влажность 60-70%. Освещение в помещениях – естественно-искусственное. В комнатах содержания животных поддерживается 12 часовой цикл освещения (СП 2.2.1.3218-14).

В течение исследования каждое животное осматривается ежедневно. Осмотр включает в себя оценку общего поведения и общего состояния животных.

Все работы с животными осуществляются в соответствии с утвержденным Протоколом, одобренным биоэтической комиссией учреждения. Протокол

исследования должен учитывать требования Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей, и Правил проведения работ с использованием лабораторных животных (1977).

5.2. По работе с клетками костного мозга

Все работы по выделению клеток КМ и их культивированию проводятся в соответствии с общими принципами культуральных исследований на живых и трупных донорах (при сроке гибели животных не более 30-40 минут). Исследуются жизнеспособность клеток гемопоэтической и стромальной фракций ККМ по окраске трипановым синим, а также пролиферативная активность в культуре стромальных ККМ по скорости образования монослоя.

Так как нормативно-правовой базы, регламентирующей проведение биомедицинских исследований с клеточными культурами костного мозга и селезенки в Российской Федерации до настоящего времени нет, при выполнении исследований следует ориентироваться на разрешенные Росздравнадзором близкие по своему направлению медицинские технологии (Способ получения и хранения культуры мультипотентных стволовых клеток костного мозга человека. ФС 2010/288 от 05.08.2010; Забор, транспортировка, выделение, культивирование, криоконсервирование, хранение и использование аутологичных фибробластов для коррекции возрастных и рубцовых дефектов кожи. ФС 2009/398 от 21.07.2009; Использование системной трансплантации адгезивных кардиомиобластов, полученных из мезенхимальных стромальных клеток аутологичного костного мозга при комплексной терапии пациентов с заболеваниями, вызванными поражением сердечной мышцы различного генеза. ФС 2010/255 от 01.07.2010) и Временной инструкции о порядке исследований в области клеточных технологий и их использования в учреждениях здравоохранения (2002).

5.3. По утилизации биологических отходов (биоматериалов)

Утилизация биологических отходов (биоматериалов) осуществляется в соответствии с требованиями Ветеринарно-санитарных правил сбора, утилизации и уничтожения биологических отходов (в ред. Приказа Минсельхоза России от 16.08.2007 № 400).

6. Материально-техническое обеспечение

6.1. Животные

В исследовании используются крысы породы Wistar (самцы массой 250-270 г) и трансгенные мыши линии B10.GFP с геном зеленого белка, прижизненной маркировки.

6.2. Оборудование

СО₂-инкубатор, ламинарный бокс, установка деионизированной воды, низкотемпературный морозильник -70°C, многофункциональная центрифуга с рефрижератором, весы аналитические GR300, РН-метр, магнитная мешалка, качалка, хирургические инструменты, хирургический отсос.

6.3. Реагентика, культуральные среды и расходные материалы

Стрептозоцин.

Неполный адъювант Фрейнда.

Глутамин стерильный.

Натрия бикарбонат (культуральной чистоты).

Альбумин бычий V фракция.

Альбумин обезжиренный 20% стерильный.

Гентамицин 10 мг/мл.

Сыворотка крови эмбриональная телячья.

Трипановый синий.

Гепарин.

Таблетки для приготовления фосфатного солевого буфера рН 7,4.

Среды: DMEM с ала-глиц, DMEM сухая с глиц, DMEM без глиц, HEPES (Пан ЭКО).

Растворы: Диметилсульфоксид (ДМСО) HEPES, Na-соль, 1М стерильный, рН=7,2, Инсулин-Трансферрин-Селенит, бикарбоната Na 7,5%, Версена, Дюльбекко без фенола красного, физиологический раствор, Хенкса без красителя, Хенкса с фенолом красным, Хэнкса 10x без Са и Mg без фенола красного.

Ферменты: Коллагеназа стер. лиофил., раствор трипсина 0,25%, раствор трипсин-ЭДТА.

Факторы роста: KGF.

Шприцы: одноразовые инсулиновые на 2, 5, 10, 20 мл, с иглой на 50 мл.

Мембрана ацетатцеллюлозная 0.22 Мкм.

Планшеты культуральные: 6-луночный дно плоское, 24-луночный дно плоское, 48-луночный дно плоское.

Чашка культуральная 60 мм x 15 мм.

Флаконы культуральные: 75 см² вентилируемые, 25 см² вентилируемые.

Криопробирка 1,2 мл стер внешняя резьба.

Пробирки центрифужные: 5 мл стерильные ПП, 50 мл стер ПП.

Пипетки автоматические: P5000 от 1-5мл, P200 от 50-200 мкм, P1000 от 200-1000 мкм.

Держатель для автоматической пипетки.

Наконечники: D200 ST 200 мкл, D1000 ST 1000 мкл, D200A 200 мкл, D1000A 1000 мкл, D200A 200 мкл, D5000 5 мл.

Фильтры: на шприц диаметр 26 мм 0,2 мкм, на линию 0,22 мкм диаметр 62 мм.

Стеклянные флаконы на 250 мл, 500 мл.

7. Методика получения животных – биомоделей СД1

Моделирование СД 1 типа выполняется на группе крыс – самцов линии Wistar массой 250-270г. Для контроля динамики развития СД 1 типа используются группы здоровых крыс той же линии и возраста.

Для подтверждения сформированности сахарного диабета у лабораторных животных применяется комплекс клинических и биохимических исследований. Проводятся динамические измерения уровня гликемии, уровня гликированного гемоглобина (HbA1c), массы тела, суточного количества выпитой воды.

Двукратно поочередно в течение 2 недель с интервалом 24 часа вводят в первый день неполный адъювант Фрейнда (А.), во второй день навеску стрептозотоцина (Stz.), растворённого в 1 мл воды для инъекций в возрастающих дозах (15, 20 и 25 мг/кг массы животного) [1]. Дозировки и объёмы введения представлены в таблице 1. Введение осуществляют внутрибрюшинно. Стрептозотоцин вводится после 24-часового голодания животных.

Таблица 1 – Схема введения препаратов крысам при моделировании СД1

	1 введение		2 введение		3 введение	
внутрибрюшинно с интервалом в 7 дней						
	1 день	2 день	1 день	2 день	1 день	2 день
Экспериментальная группа	1 мл А.	15 мг/кг Stz.	1 мл А.	20 мг/кг Stz.	1 мл А.	25 мг/кг Stz.

Стрептозотоцин – противоопухолевое средство алкилирующего действия из группы производных нитрозомочевины, вещество, токсичное для β -клеток поджелудочной железы. По структуре достаточно напоминает молекулы сахара, чтобы захватываться и транспортироваться внутрь клеток. Ингибирует митоз, преимущественно G2-фазу. Механизм противоопухолевого действия полностью не изучен, но, вероятно, обусловлен образованием метилкарбониевых ионов, которые вызывают алкилирование или связываются с различными внутриклеточными структурами, включая нуклеиновые кислоты. Образует поперечные сшивки между нитями ДНК, что и приводит к ингибированию её синтеза; на синтез РНК и белка

влияет в незначительной степени. Оказывает выраженный гипергликемический эффект, вызывая необратимое повреждение β -клеток поджелудочной железы.

Неполный адъювант Фрейнда представляет собой водно-жировую эмульсию, содержащую вазелиновое масло, ланолин и эмульгатор. Депонирует антиген и усиливает его захват фагоцитами. Используется для неспецифической активации иммунной системы.

8. Методика выделения, обработки и культивирования клеток костного мозга

8.1. Гемопозитическая фракция стволовых клеток

Гемопозитическую фракцию клеток получают из аспирата костного мозга животных. Для этого под эфирным наркозом из костномозгового канала большеберцовых костей получают клетки костного мозга путем промывания полости этих костей фосфатно-буферным раствором, содержащим 50 ЕД/мл гепарина и 0,25 мг/л гентамицина с помощью иглы 18G, насаженной на шприц. Суспензию клеток КМ центрифугируют при 1500 об/мин 3-5 минут, осадок клеток ресуспендируют в растворе для лизиса эритроцитов (114 мМ NH₄Cl, 7,5 мМ KHCO₃, 100 мкМ EDTA) в течение 5 мин и повторно центрифугируют. Гемолизированный супернатант удаляют отсасыванием, а клеточный осадок ресуспендируют в питательной ростовой среде DMEM («Панэко»), содержащей 25мМ HEPES, 0,58 г/л глутамина, 100мкг/л гентамицина, 10% бычьей эмбриональной сыворотки («HyClone», USA), 5 мкг/л инсулина. Полученные клетки представляют собой преимущественно моноклеарные клетки КМ, которые затем высаживают на чашки Петри в количестве 2,0-2,5 млн. кл/мл и культивируют при 37°С в CO₂-инкубаторе, в атмосфере воздуха с 5% CO₂ и 95% влажности с целью очистки и повышения функциональной и биорегуляторной активности этих клеток.

Через 4 суток культура ККМ содержит до 50% свободно плавающих в суспензии с питательной средой округлых не прикрепившихся моноклеарных клеток на разных сроках дифференцировки (гемопозитические клетки разной стадии зрелости, лимфоциты, моноциты) и до 50% прикрепившихся к пластику распластанных фибробластоподобных клеток ММСК КМ. Не прикрепившиеся к пластику клетки отбирают и затем используют в опытах на животных для трансплантации как очищенную от стромальных (пластикадгезивных) клеток гемопозитическую фракцию клеток костного мозга.

8.2. Получение и ведение культур мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга

Получение аспирата клеток костного мозга, его обработку лизирующим раствором, отмывание, центрифугирование и посев на культуральный пластик в питательной ростовой среде DMEM описано в разделе 4.1. Далее, через 4 суток не прикрепившиеся клетки отбирают, а к оставшимся пластикадгезивным клеткам в ростовую среду добавляют основной фактор роста фибробластов (bFGF) («Sigma», USA) 20 нг/мл для стимуляции пролиферативной активности ММСК КМ. Культивирование ММСК производят в течение 14 суток с постоянной заменой ростовой среды через каждые 3 суток. На 12 сутки культивирования на чашках Петри возникают колонии ММСК с фибробластоподобной морфологией, образующие примерно 80-90% монослой. Данный клеточный материал, представляющий собой прикрепившиеся к пластику распластанные фибробластоподобные клетки (мезенхимальные стромальные клетки), пригоден для трансплантации, так как сохраняет популяционную активность и не содержит погибшие клетки.

9. Методика трансплантации клеток животным-биомоделям

9.1. Подготовка клеточного материала для трансплантации

9.1.1. Подготовка гемопоэтических ККМ.

После завершения этапа культивирования (через 4 суток) культуру ГП ККМ 2-3 раза отмывают от среды с сывороткой раствором Хэнкса без Mg^{2+} и Ca^{2+} путем пипетирования и центрифугирования клеток при 1500 об/мин 5 мин при комнатной температуре $t^{\circ}=(22^{\circ}C)$. Производят подсчет полученных клеток в камере Горяева; подготовленные для трансплантации клетки ресуспендируют в 500-1000 мкл раствора Хэнкса при комнатной температуре $t^{\circ}=(22^{\circ}C)$ и вводят животным внутрибрюшинно. В контрольной группе животным вводят такой же объем физиологического раствора без ККМ.

9.1.2. Подготовка ММСК КМ.

Через 12 суток после завершения этапа культивирования клеточный материал используют для трансплантации. Культуру адгезированных на пластике ММСК КМ дважды отмывают от среды с сывороткой с помощью раствора Хэнкса без Mg^{2+} и Ca^{2+} . Затем для снятия клеток с пластика в культуру вносят раствор Хэнкса без Mg^{2+} и Ca^{2+} , содержащий 0,25% раствор трипсина и инкубируют 3-5 мин. при $37^{\circ}C$ в условиях медленного перемешивания. После пипетирования клетки ресуспендируют в растворе Хэнкса, содержащем 10% фетальную бычью сыворотку, при $4^{\circ}C$, центрифугируют при 1500 об/мин 5 мин и снова ресуспендируют в растворе Хэнкса без сыворотки; затем производят подсчет полученных клеток в камере Горяева. Подготовленные для трансплантации клетки ресуспендируют в 500-1000 мкл раствора Хэнкса при $4^{\circ}C$ и вводят животным внутрибрюшинно. В контрольной группе животным вводят такой же объем физиологического раствора без ККМ.

9.1.3. Определение жизнеспособности клеток в культуре.

Жизнеспособность культивированных ГП и ММСК КМ определяют перед трансплантацией по окраске трипановым синим. Для этого в суспензию клеток добавляют трипановый синий в 0,1% концентрации и через 2-3 мин определяют

живые клетки по отсутствию окрашивания их мембран в фазово-контрастном микроскопе. Жизнеспособность клеток перед трансплантацией должна составлять не менее $95\pm 2\%$.

9.2. Методы идентификации трансплантированных ККМ в культуре и в органах реципиента

Для идентификации трансплантируемых в качестве доноров клеток используют трансгенных мышей линии B10.GFP. В ядрах всех клеток этих доноров содержится ген, продуцирующий белок с зеленой флуоресценцией (GFP-green fluorescent protein), по наличию которого можно идентифицировать клетки, как в культуре, так и после трансплантации во внутренних органах реципиентов, на различных сроках после трансплантации в криопрепаратах с помощью люминесцентной микроскопии. Ксеногенная трансплантация не служит препятствием для динамической идентификации ККМ, так как известно, что ММСК, будучи малодифференцированными клетками, обладают сниженной иммуногенностью и, более того, они способствуют развитию у реципиента иммунологической толерантности к клеткам донора [2, 18].

Криосрезы внутренних органов готовят на криостате (для быстрого замораживания образцов тканей) при температуре $-18-24^{\circ}\text{C}$, толщина срезов составляет 5-6 микрон. Фазово-контрастную и флуоресцентную микроскопию клеточного материала и криосрезы внутренних органов доноров и реципиентов проводят на микроскопе с использованием ультрафиолетового излучения с длиной волны 390 нм. Для фотографирования используют цифровой фотоаппарат.

10. Методика оценки динамики патологического процесса (клинические, лабораторные, морфологические)

10.1. Биохимическое исследование крови

Все биохимические исследования проводят в 45 мкл цельной крови, полученной пункцией из хвостовой вены у крыс после 16-18 часов голодания.

Гликозилированный гемоглобин (HbA1c) в крови (5 мкл) определяют на приборе типа Nycocard REDER II (Норвегия), который предназначен для быстрого определения *in vitro* HbA1c. Данный тест основан на методе боратного аффинного анализа. Диапазон измерения от 3% до 18%.

Содержание глюкозы в крови измеряют на приборе типа Ассу-СНЕК (Швейцария). Принцип работы прибора основан на фотометрическом определении уровня глюкозы в свежей капиллярной (венозной) крови. Каплю крови (2-5 мкл) наносят на тест-полоску. Диапазон измерения составлял от 0,6 ммоль/л до 33,3 ммоль/л.

Стандартизацию и контроль качества лабораторных исследований проводили в соответствии с требованиями Федеральной системы внешней оценки качества клинических лабораторных исследований.

10.2. Морфологическое исследование органов

Изучение структурных нарушений в паренхиме внутренних органов проводят морфологическими методами. Для этого после 12-часового голодания животных декапителируют под эфирным наркозом, извлекают поджелудочную железу, которую затем фиксируют в растворе Буэна. Состояние ОЛ поджелудочной железы и их функциональную активность оценивают на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Тимус, селезёнку и почки каждого животного фиксируют в 10% формалине, затем готовят парафиновые срезы и окрашивают гематоксилином и эозином для последующего выявления и оценки степени тяжести структурных нарушений в органах.

Материал для исследования поджелудочной железы забирается из средней части тела железы. Морфологические исследования проводят с учетом всех

обнаруженных ОЛ в поле зрения (от 0 до 30). Проводят подсчет средней площади ОЛ, среднего количества клеток в островках ОЛ. В селезенке осуществляют измерение средней площади лимфоидных фолликулов. В тимусе рассчитывают процентное соотношение объемной плотности коркового и мозгового слоев. Эти расчеты проводят под микроскопом при увеличении $\times 200$ в микрометрах (mkm^2) на персональном компьютере с использованием специальной программы типа τ -Морфология (автоматизированные комплексные решения «Телемедсистемы», Россия, 2004 г).

11. Собственные экспериментальные исследования, лежащие в основу технологии применения клеток костного мозга для лечения СД1

На предварительном этапе исследования у части животных моделировался СД1. Оценка эффективности последовательно выполненных трансплантаций двух фракций (ГП и ММСК) клеток аутологичного КМ в целях клеточной терапии СД 1 типа была осуществлена в нескольких сериях опытов, различающихся по кратности и срокам введения культур стволовых клеток. Раннее введение стволовых клеток осуществлялось на завершающем этапе формирования СД 1 типа (28-40 дни в зависимости от кратности введения), поздний период подразумевал введение культуры стволовых клеток в период «расцвета» его проявлений – 56-80 дни. Введение гемопозитической фракции КМ производилось сразу после 4 суток их культивирования внутрибрюшинно в количестве $300-400 \cdot 10^6$ клеток. Введение мультипотентной мезенхимальной стромальной фракции КМ производилось после 14 суток их культивирования внутрибрюшино в количестве $500-600 \cdot 10^6$ клеток.

Результаты предварительной оценки эффективности клеточной технологии при разной кратности и сроках введения стволовых клеток представлены в таблице 2.

Исследования показали, что именно многократная трансплантация двух фракций клеток аллогенного ККМ оказывается наиболее эффективной. Подтверждением этого служат гистологические и морфометрические исследования ПЖ. Так, при гистологическом исследовании поджелудочной железы животных с аутоиммунным СД 1 типа после трехкратной трансплантации двух фракций клеток аутологичного КМ была выявлена положительная динамика. Отмечено увеличение площади островков Лангерганса, границы островков при этом были четкими. Среди ацинарных структур были обнаружены группы по 4-6 мелких клеток с базофильной цитоплазмой, соответствующие β -клеткам, что, вероятнее всего, свидетельствовало о формировании «новых» регенераторных островков. При морфометрическом исследовании ПЖ животных с многократной трансплантацией двух фракций клеток аутологичного КМ на ранней стадии развития СД 1 типа через 30 суток после

последнего введения ККМ отмечено достоверное увеличение площади ОЛ и количество в них клеток.

О восстановлении иммунного баланса в организме свидетельствуют и изменения в органах иммуногенеза - тимусе и селезенке. Так в группе с трехкратной трансплантацией двух фракций клеток аллогенного КМ на стадии развития СД 1 типа отмечалось выраженное полнокровие красной пульпы селезенки и гиперплазия лимфоидной ткани, характеризующаяся образованием лимфоидных фолликулов среднего и крупного размера, с относительно четкими границами и большими центрами размножения. При морфометрическом исследовании тимуса было отмечено восстановление в структурных компартментах, что сопровождалось расширением коркового слоя и субкортикальной зоны, увеличением индекса соотношения коркового и мозгового слоя, повышением количества лимфобластов. При морфометрическом исследовании селезенки отмечено достоверное увеличение площади лимфоидных фолликулов.

Исследования показывают, что трехкратная трансплантация двух фракций клеток аутологичного КМ на стадии развития аутоиммунного СД 1 типа может быть эффективным средством коррекции патогенетических нарушений и реверсии аутоиммунного процесса, может стать эффективным средством в профилактике развития осложнений и способствовать улучшению качества и сроков жизни у таких больных.

Таблица 2 – Динамика основных маркеров сахарного диабета у крыс при отработке клеточной технологии

Маркер сахарного диабета	Этап исследования	Интактные	С аутоиммунным СД 1	Кратность введения стволовых клеток и период формирования СД					
				однократное		двукратное		трехкратное	
				ранний	поздний	ранний	поздний	ранний	поздний
Гликемия, ммоль/л	Формирование СД1	4,9 ± 0,3	13,9 ± 0,4	13,9 ± 0,4	21,2 ± 3,4	13,9 ± 0,4	21,2 ± 3,4	13,9 ± 0,4	21,2 ± 3,4
	30 дней	5,2±0,4	25,1±3,8	14,9±4,0 *	21,2±3,4	16,7 ± 2,5	18,7 ± 3,1	10,9±3,1*	12,8±4,1*
	60 дней	5,4±0,3	25,3±4,9	18,8±4,4	23,9±4,2	20,1 ± 2,9	21,9 ± 3,4	11,2 ±3,9*	15,6 ±4,5*
	90 дней	5,6±0,5	27,2±4,7	22,6±4,8	25,0±3,9	21,1 ± 3,2	23,2 ± 2,9	12,3±4,6*	16,1±4,3*
Масса тела, г	Формирование СД1	300 ± 5	287 ± 6	287 ± 6	264 ± 6	272 ± 6	252 ± 7	258 ± 6	244 ± 7
	30 дней	342 ± 4	258 ± 8	290 ± 6	265 ± 7	281 ± 4	260 ± 5	296 ± 5*	264 ± 9
	60 дней	365 ± 5	242 ± 7	288 ± 8	250 ± 5	304 ± 6*	284 ± 6*	338 ± 7*	287 ± 6*
	90 дней	420 ± 8	228 ± 7	265 ± 10	234 ± 8	315 ± 8*	302 ± 6*	350 ± 6*	310 ± 7*
Полидипсия	30 дней	отсутствует	выраженная	умеренная	выраженная	умеренная	умеренная	отсутствует	отсутствует
	60 дней	отсутствует	выраженная	умеренная	выраженная	умеренная	выраженная	отсутствует	отсутствует
	90 дней	отсутствует	выраженная	выраженная	выраженная	умеренная	выраженная	отсутствует	отсутствует

Маркер сахарного диабета	Этап исследования	Интактные	С аутоиммунным СД 1	Кратность введения стволовых клеток и период формирования СД					
				однократное		двукратное		трехкратное	
				ранний	поздний	ранний	поздний	ранний	поздний
Полифагия	30 дней	отсутствует	выраженная	умеренная	выраженная	умеренная	умеренная	умеренная	умеренная
	60 дней	отсутствует	выраженная	выраженная	выраженная	выраженная	выраженная	отсутствует	отсутствует
	90 дней	отсутствует	выраженная	выраженная	выраженная	выраженная	выраженная	отсутствует	отсутствует
Полиурия	30 дней	отсутствует	выраженная	умеренная	выраженная	умеренная	выраженная	умеренная	умеренная
	60 дней	отсутствует	выраженная	выраженная	выраженная	умеренная	умеренная	отсутствует	отсутствует
	90 дней	отсутствует	выраженная	выраженная	выраженная	выраженная	выраженная	отсутствует	отсутствует
Эффективность технологии (баллы) **	30 дней			0,9	0	0,6	0,2	2,8	2,3
	60 дней			0,7	0	0,9	0,8	2,9	2,9
	90 дней		0	0,7	0	0,8	0,8	2,9	2,9

Примечание: * – отличия от группы с аутоиммунным СД1 статистически достоверны ($p < 0.05$)

** – в соответствии с критериями оценки эффективности технологии (раздел 8.3)

12. Биомедицинская клеточная технология лечения сахарного диабета

1 типа

12.1. Описание

Биомедицинская клеточная технология лечения сахарного диабета 1 типа стволовыми клетками костного мозга состоит из трех этапов: предварительного (получение животных-моделей сахарного диабета, получение и культивирование гемопоэтических и стромальных мезенхимальных клеток костного мозга), этапа трансплантации культур стволовых клеток, и этапа оценки эффективности технологии.

На предварительном этапе происходит получение животных из питомника (вивария), их карантин для оценки исходного состояния животных и их адаптации к условиям проведения исследований, рандомизация животных по группам. С животными, отобранными в экспериментальные группы, выполняет методику моделирования СД 1 типа в соответствии с разделом 3 Методических рекомендаций. Остальные животные остаются в качестве интактного контроля или используются для выделения и последующего культивирования стволовых клеток костного мозга. Календарный план исследования строится таким образом, чтобы культивирование стволовых клеток было синхронизировано по срокам с завершением формирования СД 1 типа у экспериментальных животных. В зависимости от целей исследования для его начала выбирается или завершающий этап формирования СД 1 типа (28-30 день моделирования), или этап развернутой картины СД1 (56-60 день моделирования). Для отработки особенностей лечебного применения клеточной технологии используют введение стволовых клеток на этапе развернутой картины СД1. Часть животных со сформированным СД 1 типа (не менее 10 голов) оставляют в качестве экспериментального контроля. Для оценки сформированности сахарного диабета у животных еженедельно осуществляется контроль уровня глюкозы и гликированного гемоглобина (раздел 10.1), проводится определение массы тела, объема выпиваемой воды и потребленного корма, объем суточного диуреза, состояние двигательной активности и кожного покрова.

Этап трансплантации культур ГПСК и ММСК костного мозга состоит в последовательном трехкратном введении животным внутрибрюшинно. Для этого на 1, 7, 14 сутки этапа трансплантации животным вводят по $300-400 \cdot 10^6$ клеток из предварительно полученной культуры гемопоэтических стволовых клеток (5 сутки периода культивирования), а на 5, 12 и 19 сутки – по $500-600 \cdot 10^6$ клеток из культуры мезенхимальных мультипотентных стволовых клеток (15 сутки культивации) костного мозга. Если целями исследования предусмотрена иная кратность введения стволовых клеток, даты введения рассчитываются исходя из аналогичного принципа.

Этап оценки эффективности клеточной технологии лечения СД 1 типа начинается на следующие сутки после завершения этапа трансплантации стволовых клеток, и может продолжаться от 30 до 90 дней в зависимости от конкретных задач исследования. Животных опытной и контрольных групп помещают в метаболические клетки. В ходе этого этапа животные находятся под ежедневным наблюдением динамики картины сахарного диабета (оценивается динамика массы тела, объем потребляемого корма и воды, объем диуреза, особенности двигательной активности, состояние целостности кожных покровов). Еженедельно, начиная с 1 дня этого этапа, определяется уровень гликемии и содержание гликированного гемоглобина в крови.

По завершению планового периода наблюдения животные выводятся из эксперимента. Полученные биоматериал (ткани печени, поджелудочной железы, селезенки и тимуса) подвергаются морфометрической и гистологической оценке.

Полученные в ходе третьего этапа данные сопоставляются в динамике с показателями контрольных групп. Достоверность отличий оценивается методами непараметрической статистики или по F-критерию дисперсионного анализа (ANOVA). Интегральная оценка эффективности исследованной клеточной технологии осуществляется на основе среднегрупповой балльной оценки по критериям, приведенным в разделе 12.3.

12.2. Возможные осложнения при проведении технологии и способы их устранения

12.2.1. Осложнения при моделировании СД 1 типа.

Осложнения	Способы устранения
Неправильное введение препаратов для моделирования	Отработка внутрибрюшинного введения
Инфицирование места введения препаратов	Соблюдение правил асептики и антисептики

12.2.2. Осложнения при выделении, обработке и культивировании клеток костного мозга.

Осложнения	Способы устранения
Отсутствие роста биомассы ККМ	Соблюдение технологии
Наличие патогенных организмов в выращенной биомассе ККМ	Соблюдение правил асептики и антисептики
Инфицирование места введения биомассы ККМ	Соблюдение правил асептики и антисептики

12.3. Критерии оценки эффективности технологии

Для оценки эффективности технологии используется следующий подход: по ключевым признакам сахарного диабета по завершению этапа оценки динамики показателей (30, 60 или 90 дней) оценивается выраженность и стойкость достигнутого эффекта, которые переводятся в баллы в соответствии с таблицей 3. Интегральная оценка осуществляется путем суммирования набранных по отдельным показателям баллов и соотнесения полученной суммы с критериальными значениями, приведенными ниже.

Таблица 3 – Критерии оценки результатов применения технологии

Критерий эффективности	Результат применения технологии и его балльная оценка			
	Практически полная стойкая нормализация	Неполная стойкая нормализация	Частичная кратковременная нормализация	Отсутствие отчетливого эффекта
Снижение уровня глюкозы	1,0	0,7	0,3	0
Снижение уровня гликированного гемоглобина	1,0	0,7	0,3	0
Увеличение массы тела до нормы	1,0	0,7	0,3	0
Отсутствие ран и трофических язв	1,0	0,5	0,3	0
Отсутствие полидипсии	0,5	0,3	0,1	0
Отсутствие полиурии	0,5	0,3	0,1	0
Отсутствие полифагии	0,5	0,3	0,1	0
Восстановление нормальной двигательной активности	0,3	0,2	0,1	0

Клеточная технология считается высокоэффективной, если сумма набранных баллов составляет 5 и более баллов, эффективной – если превышает 4 балла, умеренно эффективной – если превышает 3 балла. В случае, если в исследовании оценивались не все параметры, критериальные точки границ диапазонов эффективности снижаются на величину максимального для не использованного показателя значения. Например, если в исследовании не учитывались особенности двигательной активности животных (максимальное значение 0,3 балла), то границей умеренной эффективности технологии будет суммарный балл, равный 2,7, а высокой эффективности – 4,7.

12.4. Результаты апробации технологии (морфологические критерии)

При гистологическом исследовании поджелудочной железы животных с аутоиммунным СД 1 типа на 30 сутки после завершения трехкратной трансплантации двух фракций клеток аллогенного КМ на стадии заболевания выявляют положительную динамику. Выявленные гистологические изменения в

большей степени касаются островковой части поджелудочной железы и в меньшей степени – ацинарной. Площадь островков Лангерганса и количество клеток в них приближается к значениям в поджелудочной железе интактных животных, границы островков – четкие. Встречаются округлые, овальные и полигональные островки крупного, среднего и небольшого размера без признаков их лимфоидной инфильтрации. Среди ацинарных структур обнаруживались группы по 4-6 мелких клеток с базофильной цитоплазмой, соответствующие β -клеткам, что, вероятнее всего, свидетельствует о формировании «новых» регенераторно-образованных островках. Изменения β -клеток отсутствуют, или представлены слабо выраженными признаками белковой дистрофии, что проявляется отеком и незначительной зернистостью цитоплазмы, явлениями набухания и гидротации некоторых ядер. Признаков лимфоидной инфильтрации островков Лангерганса не отмечается.

При морфологическом исследовании тимуса – одного из центральных органов иммуногенеза, выявляются нарушения в структурных компартментах тимуса при аутоиммунном СД 1 типа, а также восстановление их под влиянием трехкратного введения двух фракций клеток аллогенного ККМ на стадии развития СД 1 типа. Восстановление структуры тимуса сопровождается расширением коркового слоя и субкортикальной зоны, повышением количества лимфобластов, а по срокам эти изменения совпадают со снижением аутоиммунной деструкции β -клеток, активизацией регенераторных процессов в ОЛ ПЖ и снижением показателей уровня глюкозы в крови.

При морфометрическом исследовании селезенки у животных с трансплантацией фракций клеток аллогенного КМ на стадии развития аутоиммунного СД 1 типа отмечена гиперплазия лимфоидных фолликулов. Так площадь лимфоидных фолликулов через 30 суток после последнего введения ККМ в селезенке составляет 108119 ± 20786 мкм² (диабетический контроль без лечения – 31184 ± 1152 мкм²). Эти данные подтверждают, что ККМ стимулируют восстановление иммунного баланса в организме и что это восстановление

проходит через фазу гиперактивации функции центральных органов иммуногенеза

При трансплантации клеток аллогенного КМ на стадии развития аутоиммунного СД 1 типа было отмечают снижение степени выраженности дистрофических изменений эпителия дистальных и проксимальных канальцев почек; исчезновение эозинофильных и PAS-положительных масс в просвете извитых канальцев и собирательных трубочек, в отличие серии диабетического контроля, где имеются выраженные дистрофические изменения канальцев, а также скопления в их просвете эозинофильных белковых и PAS-положительных масс.

Заключение

Многokратная (как минимум – трехкратная) трансплантация двух фракций клеток аллогенного костного мозга (гемопoэтических и мезенхимальных стромальных мультипотентных) оказывает выраженный эффект коррекции патогенетических нарушений, возникающих при аутоиммунном СД 1 типа. При введении достаточно больших биологически активных доз ККМ на стадии развития заболевания происходит реверсия аутоиммунной деструкции β -клеток поджелудочной железы и восстановление иммунного баланса в организме, активация процессов репаративной регенерации в островковой части поджелудочной железы и снижение выраженности вторичных сосудистых нарушений в органах. Уровень гликемии и содержание гликированного гемоглобина, а также основные клинические проявления СД у лабораторных животных при этом закономерно снижаются, и приближаются к нормальным значениям.

Применение описанной методики лечения СД типа 1 на поздних стадиях формирования заболевания может быть оценена как эффективная, хотя и уступающая по скорости развития и степени выраженности полезного эффекта применению клеточной терапии на более ранних стадиях формирования заболевания.

Представленные Методические рекомендации позволяют стандартизировать методики применения клеточных технологий на основе трансплантации модельным животным культур гемопoэтических и мезенхимальных мультипотентных стволовых клеток аллогенного костного мозга в биомедицинских исследованиях по клеточной терапии сахарного диабета и открывают возможность сравнительной оценки эффективности различных методических подходов к решению проблемы профилактики и терапии СД1.

Библиография

1. Клёсов Р.А., Каркищенко В.Н., Степанова О.И., Ревякин А.О. Оптимизация биомодели сахарного диабета 1 типа // Биомедицина, 2014, № 4, с. 25-30.
2. Кругляков П.В., Лохматова Е.А., Климович В.Б., Зарицкий А.Ю. Мезенхимные стволовые клетки и иммунопатологические состояния организма // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2006; 3 (5):36-41.
3. Онищенко Н.А., Цыпин А.Б. Пептидная биорегуляция восстановительных процессов в поврежденных органах // Вестник транспл. и искусственных органов, 2001; 3-4: 87-93.
4. Степанова О.И., Каркищенко Н.Н., Онищенко Н.А., Степанова Е.А. Коррекция патогенетических нарушений при сахарном диабете второго типа методами клеточной трансплантации // Биомедицина, 2005, №1; с. 35-51.
5. Степанова О.И., Онищенко Н.А., Абдрашитова Э.Х., Степанова Е.А., Галахова Т.В. , Бескова Т.Б. Использование моноклеарной фракции клеток аллогенного костного мозга мышей B10.GFP для терапии сахарного диабета типа 2 на мышцах линии C57BL/KsJYdb/+ // Биомедицина, 2006, № 4; с.113-114.
6. Степанова О.И., Онищенко Н.А., Каркищенко Н.Н., Баранова О.В., Галахова Т.В. Использование клеток разных фракций аллогенного костного мозга для терапии сахарного диабета типа 2 на генетической модели // Биомедицина, 2008, № 2; с.78-81.
7. Шахов Н.Л., Артамонов С.Д., Сускова В.С. и др. Первый клинический опыт использования аутологичных гемопоэтических клеток для коррекции нарушений при сахарном диабете первого типа // Вестник транспл. и искусственных органов, 2005; № 3: с. 48.
8. Юшков П.В., Опаленов К.В. Морфогенез микроангиопатий при сахарном диабете // Сахарный диабет, 2001; 1: с. 53-56.
9. Banerjee M., Kumar A., Bhonde R.R. Reversal of experimental diabetes by multiple bone marrow transplantation // Biochem. Biophys. Res. Commun., 2005; 328 (1): с. 318-325.

10. Chen L.B., Jiang X.B., Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells // *World J. Gastroenterol.*, 2004; 10(20): 3016-3020.
11. Fernandez-Viña R., Saslavsky J., Andrin O. et al. Feasibility of implant autologous stem cells with endovascular technique in diabetes mellitus // *Cytotherapy*, 2004; 7(Suppl 1): Abstract #37.
12. Hess D., Li L., Martin M. et al. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration // *Nat. Biotechnol.*, 2003; 21(7): 763-770.
13. Ianus A., Holz G.G., Theise N.D. et al. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion // *J. Clin. Invest.*, 2003; 111(6): 843-850.
14. Izumida Y., Aoki T., Yasuda D. et al. Hepatocyte growth factor is constitutively produced by donor-derived bone marrow cells and promotes regeneration of pancreatic beta-cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 333(1): 273-282.
15. Kinnaird T., Stabile E., Burnett M.S. et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms // *Circ. Res.*, 2004; 94(5): 687-692.
16. Lammert E., Cleaver O., Melton D. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels // *Science*, 2001; 294(5542): 564-567.
17. Lee R.H., Seo M.J., Reger R.L. et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103 (46): 17438-17443.
18. Makkar R.R., Price M.J., Lill M et al. Intramyocardial injection of allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells without immunosuppression preserves cardiac function in a porcine model of myocardial infarction // *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*, 2005; 10(4): 225-233.

19. Mathews V., Hanson P.T., Ford E. et al. Recruitment of bone marrow-derived endothelial cells to sites of pancreatic beta-cell injury // *Diabetes*, 2004; 53(1), 91-98.

20. Moriscot C., De Fraipont F., Richard M.J. et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro // *Stem Cells*, 2005; 23(4): 594-604.