

## КЛЕТочная ТЕРАПИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА I ТИПА

© И. Б. Соколова

ООО «Транс-Технологии», Санкт-Петербург;  
электронный адрес: sokolova@alkorbio.ru

Клеточная терапия — современное, перспективное направление лечения сахарного диабета I типа. В настоящее время в экспериментальных работах и клинических исследованиях для трансплантации используют аллогенные и ксеногенные клетки островков Лангерганса, нефракционированные клетки костного мозга, гематопозитические стволовые клетки, мезенхимные стволовые клетки и моноклеарную фракцию пуповинной крови. Применение любого клеточного материала в той или иной степени корректирует состояние больных сахарным диабетом, но полного излечения посредством клеточной терапии добиться пока не удалось.

Ключевые слова: сахарный диабет I типа,  $\beta$ -клетки, костный мозг, гематопозитические стволовые клетки, мезенхимные стволовые клетки, пуповинная кровь.

Принятые обозначения: ГСК — гематопозитические стволовые клетки, КМ — костный мозг, МСК — мезенхимные стволовые клетки.

Сахарный диабет I типа — системное аутоиммунное заболевание, при котором вследствие прогрессирующей гибели  $\beta$ -клеток поджелудочной железы развивается инсулиновая недостаточность. У больных нарушается обмен веществ, проявляются такие осложнения, как гипергликемия, гликозурия, полиурия, ангиопатия, поражение периферических нервов. Для излечения сахарного диабета I типа необходимо устранить аутоиммунную основу заболевания, желательнее на ранних стадиях его развития. Однако на практике главными задачами терапии являются поддержание в крови необходимого уровня инсулина, нормализация метаболизма глюкозы и предотвращение развития диабетических осложнений.

В настоящее время основным методом терапии сахарного диабета I типа остается постоянное использование инсулина. Несмотря на все современные разработки в этом направлении (генно-инженерный инсулин человека и его аналоги, шприц — ручки и инсулиновые помпы, инвазивные глюкометры и др.), постоянная строгая диета, контроль уровня глюкозы в крови, ежедневные инъекции инсулина вносят значительные ограничения в жизнь человека. Инсулинотерапия чревата развитием инсулинорезистенции, появлением аллергических реакций и липидострофией. Кроме того, экзогенное введение инсулина не в состоянии предотвратить прогрессирование осложнений сахарного диабета.

Трансплантация поджелудочной железы позволяет стойко стабилизировать уровень глюкозы у больных инсулинзависимым сахарным диабетом. Первая трансплантация поджелудочной железы была проведена Келли и Аиллахай в 1966 г. в Миннесоте (США). В настоящее время в мире проводится около 1500 подобных операций ежегодно. Более 50 % пациентов через 5 лет после пересадки не имеют сахарного диабета (Van Gelder et al., 2009).

Основная проблема пересадки поджелудочной железы обусловлена ее отторжением и как следствие — пожизненным приемом пациентами значительных доз иммуносупрессивных средств. Это делает трансплантацию поджелудочной железы (саму по себе сложную и дорогостоящую) еще более затратной операцией. Следует также учитывать, что в последние годы более перспективным направлением считают пересадку одновременно поджелудочной железы и почки (Heilman et al., 2009). Это связано с тем, что пересадку поджелудочной железы рекомендуют проводить больным с выраженной почечной недостаточностью. Такие осложнения, как ретинопатия и нейропатия (даже в тяжелой форме), не оправдывают риска проведения трансплантации и последующей иммуносупрессивной терапии. Пересадка одновременно двух органов не только усложняет операционное вмешательство, но и повышает ее стоимость. В связи с этим проводятся постоянные исследования других путей коррекции метаболизма инсулина и глюкозы у больных сахарным диабетом I типа (Vrochides et al., 2009).

Клеточная терапия — далеко не новый метод для лечения сахарного диабета. Более 30 лет назад начались экспериментальные работы по трансплантации  $\beta$ -клеток островков Лангерганса (Kemp et al., 1973; Reckard, Barket, 1973), и более 20 лет этот клеточный материал используют в клинике (Шумаков и др., 1984; Беникова и др., 1987). В последние годы для лечения сахарного диабета применяют нефракционированные клетки костного мозга (КМ), гематопозитические стволовые клетки (ГСК), мезенхимные стволовые клетки (МСК), продуцирующие инсулин клетки, полученные путем дифференцировки или генетической модификации из КМ и МСК, моноклеарную фракцию пуповинной крови (Beilhack et al., 2003; Ende et al., 2004; Karnieli et al., 2007; Li et al., 2007a; Ezquer et al.,

2008). Использование стволовых клеток в качестве терапевтического агента стало возможным с развитием клеточной биологии: отработаны и апробированы протоколы выделения и типирования популяций стволовых клеток, их культивирования и дифференцировки *in vitro*.

$\beta$ -клетки. Предпосылки для трансплантации больным сахарным диабетом I типа аллогенных продуцирующих инсулинклеток вполне понятны: необходимо восстановить количество  $\beta$ -клеток, которые постоянно разрушаются. После трансплантации аллогенных клеток островков Лангерганса были получены положительные результаты по коррекции сахарного диабета как в экспериментах на животных (Kemp et al., 1973; Reckard, Barket, 1973), так и в клинических исследованиях (Sharp et al., 1991; Warnock et al., 1991). Удалось добиться того, что у 80—90 % экспериментальных животных в течение 1-го мес после имплантации  $\beta$ -клеток нормализовался уровень глюкозы в крови (Pericin et al., 2002). Однако было показано, что после введения в организм реципиента аллогенных островков Лангерганса развивается иммунный ответ, приводящий к гибели трансплантата (Kaufman et al., 1990; Stevens et al., 1994; Pericin et al., 2002). Приведены данные о том, что около 60 % пересаженных островковых клеток погибают в течение 3 сут в результате некроза и апоптоза (Biarnes et al., 2000), что требует повторной трансплантации. Однако заметное улучшение качества жизни и возможность сократить или совсем отказаться хотя бы на время от инъекций инсулина позволили внедрить трансплантацию аллогенных продуцирующих инсулин клеток в практику лечения сахарного диабета у людей.

В клинических испытаниях после трансплантации аллогенных клеток островков Лангерганса около 60 % пациентов смогли обходиться без инъекций инсулина около 1 года (Скалецкий, Шумаков, 1996; Скалецкий, 2005). Для получения положительного результата пациентом требуется трансплантировать большое количество  $\beta$ -клеток — от 2—4 доноров. Донорский материал, будь то поджелудочная железа целиком или только островки Лангерганса, остается дефицитным и дорогостоящим во всем мире. Кроме того, использование аллогенного материала всегда связано с условиями гистосовместимости и риском инфицирования реципиента, прежде всего ВИЧ и гепатитами В и С.

Дефицит донорского материала заставил ученых трансплантировать ксеногенные  $\beta$ -клетки. В эксперименте  $\beta$ -клетки поросят имплантировали обезьянам, у которых сахарный диабет был смоделирован посредством инъекции 50 мг/кг стрептозотоцина (Dufrane et al., 2006; Hering et al., 2006; Casu et al., 2008). У реципиентов после имплантации отмечали понижение уровня глюкозы в крови. Но уже через 7 сут функция ксеногенных клеток ослабевала, что связывали с их деструкцией. Более удачными были опыты по трансплантации предварительно культивированных островковых клеток поджелудочной железы плодов человека крысам (Блюмкин и др., 1983). Длительная ремиссия диабетического статуса (до 1 года) была достигнута без иммуносупрессии.

Параллельно с экспериментальными работами проводились клинические исследования по имплантации человеку островков Лангерганса новорожденных поросят (Шумаков и др., 1984; Скалецкий и др., 2002; Trusso et al., 2007) и клеток фетальной поджелудочной железы кроликов (Скалецкий и др., 2002). Продолжительность положительного терапевтического эффекта от ксенотранспланта-

ции составляла в среднем 6—10 мес. Внутримышечное введение больным детям культуры островковых клеток новорожденных поросят привело к увеличению числа пациентов, находящихся в состоянии компенсации, на 30 %. При этом снизилось количество инъекций инсулина в сутки, необходимое для поддержания стабильного состояния (Беникова и др., 1987). Однако уменьшить суточную дозу инсулина удалось только у 12 детей из 34 и только на 6—30 ЕД.

Основные проблемы при использовании аллогенного и ксеногенного материалов — деструкция и отторжение трансплантата. Преодолеть их пытаются применением иммуносупрессивных препаратов или иммуноизоляцией донорских клеток. Во втором случае в капсулу из полупроницаемой мембраны помещают отдельные островки (микрокапсуляция) или поджелудочную железу целиком (макрокапсуляция). Капсулы предлагают изготавливать из альгинатов (полимеров, состоящих из остатков D-маннуроновой и L-гулуруновой кислот в разных пропорциях) и полисульфонов (гетероцепных полимеров, содержащих в основной цепи группу  $SO_2$ ). Кроме того, применяют ряд полимеров для комбинирования с альгинатом с целью повысить выживаемость инкапсулируемых клеток (полиэтиленгликоль), ослабления адсорбции белков на мембране (поли — L-лизин) и др. (Beck et al., 2007). Мембрана не препятствует диффузному поступлению питательных веществ к клеточному материалу (сохраняются метаболизм и жизнеспособность) и выходу из капсулы секретируемых клетками веществ, в том числе инсулина. В то же время полупроницаемая мембрана препятствует контакту трансплантированного материала с иммунокомпетентными клетками реципиента (Gray, 1997). Но как применение иммуносупрессивных препаратов, так и трансплантация инкапсулированного материала имеют свои отрицательные стороны и не могут обеспечить полную приживаемость и длительное функционирование аллогенных или ксеногенных клеток островков Лангерганса. Капсулы воспринимаются организмом реципиента как инородные тела, вокруг которых формируются соединительнотканые оболочки, что нарушает трофику трансплантируемых клеток. Возможно, дальнейшая разработка мембранных материалов, например на основе гидрогелей, повысит выживаемость и приживаемость аллогенной или ксеногенной ткани поджелудочной железы.

Костный мозг (КМ). Попытки использовать нефракционированные клетки КМ как наиболее доступный клеточный материал для лечения сахарного диабета проводятся достаточно давно. Еще в середине 80-х годов прошлого века было показано, что трансплантация КМ от молодых здоровых мышей NOD-мышам (non-obese diabetic mice) после развития у последних сахарного диабета I типа понижала активность T-клеток и нормализовала уровень глюкозы в крови (Ikehara et al., 1985).

В работах *in vitro* из клеток КМ путем дифференцировки были получены кластеры продуцирующих инсулин клеток (Tang et al., 2004; Tayaramma et al., 2006). После дифференцировки полученные клетки экспрессировали гены, характерные для развивающихся и функционирующих  $\beta$ -клеток (*инсулин I и II, нестин, островковый амилонопептид, Glut2, pdx-1* и *Pax6*), и синтезировали инсулин. Однако было отмечено, что в дифференцировке принимали участие только клетки, адгезивные к лабораторному пластику. Для этих клеток определили фенотип: CD45<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, C-kit<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup>. Кроме того, эти клетки *in vitro* под воздействием соответствующих факторов дифферен-

цировались в нейрональном и эндотелиальном направлениях, но попытки дифференцировать их в гепатоциты оказались безуспешными. Из этих данных авторы делают вывод о том, что среди клеток КМ в продуцирующие инсулин клетки могут дифференцироваться МСК, но не ГСК. Однако другие исследователи продемонстрировали, что развитие гипергликемии у мышей с поврежденной поджелудочной железой было предотвращено введением клеток КМ, экспрессирующих специфический рецептор C-kit (Hess et al., 2003), характерный для ГСК мыши.

Возможность дифференцировки клеток мононуклеарной фракции КМ в  $\beta$ -клетки *in vivo* была показана на мышах, прошедших курс облучения (1.050—1.100 сГр). Через 4—6 нед после трансплантации КМ из поджелудочной железы реципиентов были выделены клетки, несущие донорскую метку и экспрессирующие не только ген инсулина, но и транскрипционные факторы, характерные для  $\beta$ -клеток (IPF-1) и клеток эндодермы (HNF3 $\beta$ ) (Janus et al., 2003; Ikebukuro et al., 2006). Однако и сами авторы приведенных выше работ, и другие исследователи (Lenchner et al., 2004) ставят под сомнение предположение о том, что *in vivo* проходила именно дифференцировка клеток КМ в  $\beta$ -клетки. Авторы допускают, что могло произойти слияние донорских клеток с  $\beta$ -клетками больных животных.

Вообще, в литературе имеются диаметрально противоположные оценки эффективности применения КМ при сахарном диабете. Так, в одной из работ на NOD-мышях трансплантация нефракционированных клеток КМ привела к неоднозначному результату: все подопытные животные остались живы в течение 1 года, но только у 1 из 50 нормализовался уровень глюкозы в крови. В островковых клетках поджелудочной железы реципиентов не было выявлено метки донорских клеток (Kang et al., 2005). В исследовании других авторов положительный терапевтический эффект от трансплантации КМ (регенерация островковых клеток поджелудочной железы, стабилизация уровня глюкозы и инсулина в крови) был получен только у мышей, которых после моделирования сахарного диабета с помощью стрептозотоцина подвергли облучению (10 Гр). Введение КМ необлученным диабетическим мышам не произвело положительного воздействия (Hasagawa et al., 2007). В одной из работ нормализацию уровня глюкозы в крови зарегистрировали через 5 сут после трансплантации КМ на срок более 45 сут (Li et al., 2007a), тогда как другие исследователи не добились положительного результата (Akashi et al., 2008; Urban et al., 2008). Последние авторы не выявили понижения уровня глюкозы в крови диабетических животных, подвергшихся разным дозам облучения (250—450 сГр) после внутривенной трансплантации КМ.

Применение нефракционированных клеток КМ не позволяет дать характеристику используемого материала по поверхностным маркерам. Возникает вопрос: какие именно клетки дают положительный терапевтический эффект при сахарном диабете I типа? Для дальнейших исследований возможностей клеточной терапии были предприняты попытки трансплантации животным не КМ, а отдельно ГСК или МСК.

Гематopoэтические стволовые клетки (ГСК) с успехом применяют при лечении аутоиммунных заболеваний (El-Badri et al., 2000; Rosa et al., 2007; Smith-Berdan et al., 2007; Burt et al., 2008; Deane et al., 2008; Hugl, Laar, 2008). В нескольких работах было показано, что внутривенная трансплантация ГСК облученным (950 сГр) NOD-мышам в возрасте 2—3 мес, у кото-

рых спонтанный аутоиммунный диабет проявляется к 4—5 мес, предотвращала развитие гипергликемии (Beilhack et al., 2003; Steptoe et al., 2003). Также имеется сообщение об удачном применении ГСК у людей (Voltarelli et al., 2007). 14 пациентов обоего пола в возрасте 12—35 лет смогли обходиться без инъекций инсулина в течение 5—36 мес после внутривенной трансплантации аутологичных ГСК. ГСК были выделены посредством цитофереза из периферической крови после применения циклофосфамида и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора. Больным вводили не менее  $3.0 \cdot 10^6$  клеток/кг. Однако в данном исследовании клеточная терапия сопровождалась высокими дозами иммуносупрессоров, а именно этого хочется избежать при трансплантации клеток.

Данных о дифференцировке ГСК в продуцирующие инсулин клетки в литературе обнаружить не удалось.

Мезенхимные стволовые клетки (МСК). Основания для использования МСК в качестве агентов клеточной терапии сахарного диабета I типа гораздо более весомые, чем у всех перечисленных выше клеток. МСК — это мультипотентные стволовые клетки. К настоящему времени для них разработаны четкие методики выделения, фенотипирования, культивирования *in vitro* и дифференцировки в различных направлениях, в том числе и в продуцирующие инсулин клетки (Chen et al., 2004; Tayaramma et al., 2006; Sun et al., 2007). МСК могут быть эксплантированы из КМ самого пациента, что снимает вопрос об иммуносовместимости трансплантата и хозяина. Потенциал МСК предлагает несколько направлений использования МСК в терапии сахарного диабета I типа.

К настоящему времени экспериментально доказаны иммуномодулирующие свойства МСК, что делает целесообразным их применение при лечении аутоиммунных заболеваний (Aggarwal, Pittenger, 2005; Uccelli et al., 2006). *In vitro* было показано, что МСК ингибируют пролиферацию CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> T-клеток (Bartholomew et al., 2002; Nicola et al., 2002; Zappia et al., 2005). Механизм регуляции иммунного ответа с помощью МСК сложен. При сокультивировании МСК и T-клеток не провоцировался апоптоз последних. На пролиферацию T-клеток влияли непосредственный контакт клетка—клетка и ряд факторов, секретируемых МСК: TGF $\beta$ -1, HGF, простагландин E2, интерлейкин 10. Рассматривается еще ряд опосредованных влияний МСК на активность T-клеток (Abdi et al., 2008). Иммуномодулирующие свойства МСК были подтверждены в ряде экспериментов на моделях различных аутоиммунных заболеваний (Bartholomew et al., 2002; Zappia et al., 2005; Itakura et al., 2007) и в клинических исследованиях (Ringden et al., 2006; Karlsson et al., 2008).

Из МСК путем дифференцировки *in vitro* можно получить аутологичные продуцирующие инсулин клетки (Chen et al., 2004; Tayaramma et al., 2006; Sun et al., 2007), которые могут быть введены больному. Трансплантация островковоподобных клеток, полученных из МСК в эксперименте, дала хорошие результаты: у крыс и мышей со стрептозотоциновой моделью диабета по крайней мере в 2 раза понизился уровень глюкозы в крови, увеличилась выработка инсулина (Chao et al., 2008; Hisanaga et al., 2008). Однако в одной из работ уровень глюкозы в крови экспериментальных животных (крыс) после трансплантации дифференцированных МСК снижался на 2—16-е сут, а к 28-м сут опять поднимался до уровня гипергликемии (30 мМ/л) (Wu et al., 2007).

Получить островковоподобные клетки из МСК можно и путем генной модификации. Так, например, *in vitro* у

МСК встраивали ретровирус, экспрессирующий ген *PDX-1* (*the pancreatic duodenal homeobox 1*). Как известно, *PDX-1* принимает участие в развитии поджелудочной железы: у мутантных мышей с нулевой аллелью транскрипционного фактора *PDX-1* не развивалась поджелудочная железа. Полагают, что у взрослых особей ген *PDX-1* необходим для нормальной экспрессии нескольких генов: *инсулина*, *амилина*, *глюкокиназы* и *Glut2*. После генной модификации МСК секретировали инсулин. Продукция инсулина усиливалась при добавлении в культуральную среду глюкозы в концентрациях более 15 мМ/л. Трансплантация генномодифицированных МСК диабетическим мышам привела к нормализации уровня глюкозы в крови животных (Karnieli et al., 2007; Li et al., 2007b). Однако имеются и противоположные данные: после генной модификации МСК *in vitro* экспрессировали маркеры, характерные для островковых клеток, и продуцировали инсулин, но трансплантация этих клеток диабетическим мышам не вызывала понижения количества глюкозы в крови (Zhao et al., 2008).

Были проведены попытки коррекции сахарного диабета путем введения животным сингенных или аллогенных недифференцированных МСК. И в этих случаях разными авторами получены противоположные результаты. В некоторых работах трансплантация МСК не принесла положительных изменений в диабетический статус (Karnieli et al., 2007; Wu et al., 2007; Urban et al., 2008). Но гораздо больше исследований, в которых введение МСК повышало выработку инсулина и понижало уровень глюкозы в 1.5—2 раза (Lee et al., 2006; Dong et al., 2008; Ezquer et al., 2008). В этих же исследованиях, а также после трансплантации МСК непосредственно в поджелудочную железу (после чего не было выявлено значимого понижения уровня глюкозы в крови животных) отмечали увеличение количества островков Лангерганса в 2—7 раз по сравнению с контрольной группой (Chang et al., 2008). В некоторых из них, правда, в очень незначительном количестве, была обнаружена донорская метка.

Большинство авторов предполагают одни и те же механизмы регенерации продуцирующих инсулин клеток после применения МСК. Существует возможность дифференцировки экзогенных МСК в клетки островков Лангерганса *in vivo*, хотя и очень высока вероятность слияния трансплантированных МСК с клетками поджелудочной железы.

Кроме того, как уже было показано на моделях инфаркта миокарда (Кругляков и др., 2004) и ишемического инсульта (Chen et al., 2003; Pavlichenko et al., 2008), внутривенная трансплантация МСК активирует ангиогенез в ишемизированной ткани и предотвращает развитие фиброза (Caplan, Dennis, 2006). Такое влияние МСК также может способствовать сохранению структуры островков Лангерганса во время воспаления, вызванного гибелью  $\beta$ -клеток.

Еще один аспект использования МСК для лечения сахарного диабета I типа — борьба с развитием таких тяжелых осложнений, как ретинопатия, нейропатия, нефропатия, диабетическая стопа, ишемическая болезнь сердца и др., которые чаще всего и являются причинами инвалидизации пациентов. В основе всех перечисленных осложнений лежит ангиопатия — изменение строения сосудистой стенки и нарушение микроциркуляции. Ангиопатия при диабете может затрагивать как капилляры, артериолы и венулы, так и крупные артерии и вены. Ангиопатии характеризуются утолщением базальной мембраны сосудов,

пролиферацией эндотелия, отложением избыточного количества гликопротеидных PAS-положительных веществ, повышением проницаемости сосудистой стенки, повышенной вазоконстрикцией. При диабете изменяются реологические свойства крови: повышаются тромбообразование и вязкость, что также способствует нарушению микроциркуляции в тканях (Великов, 1989; Guzik et al., 2002; Creager et al., 2003). В экспериментальных работах показано, что МСК могут с успехом применяться для лечения ишемии миокарда (Кругляков и др., 2004; Nagaya et al., 2004; Abdel Aziz et al., 2008), полинейропатии конечностей (Shibata et al., 2008) и нефропатии (Ezquer et al., 2008; Zhang et al., 2008). В сердечной мышце и мышце задней лапы крыс после трансплантации МСК наблюдали увеличение плотности микрососудистой сети. При нефропатии введение МСК предотвращало гиалиноз почечных клубочков. К настоящему времени хорошо известно, что МСК активируют ангиогенез в поврежденной ткани. Полагают, что стимуляция роста новых сосудов связана с тем, что МСК секретируют фактор роста эндотелия сосудов, VEGF (Chen et al., 2003). Образование нормальных функциональных сосудов в ткани, пораженной диабетической ангиопатией, — оптимальный путь борьбы с этим тяжелейшим осложнением.

Пуповинная кровь. В последние годы пуповинную кровь рассматривают как еще один клеточный материал, применение которого возможно в терапии сахарного диабета. Трансплантация фракции мононуклеарных клеток из пуповинной крови человека в дозе 200 млн привела к увеличению продолжительности жизни животных (мышей) и понижению уровня глюкозы в крови (Ende et al., 2004). Было показано, что после внутривенного введения человеческой пуповинной крови диабетическим мышам в поджелудочной железе некоторое количество продуцирующих инсулин клеток имели и человеческую, и мышиную хромосомы (Koblas et al., 2005). Имеется также сообщение о проведении клинического исследования по инфузии аутологичной пуповинной крови 8 детям в возрасте 2.4—7.3 года с диабетом I типа (длительность заболевания составляла в среднем около 1 года) (Haller et al., 2008). Было отмечено, что у детей замедлилось падение выработки инсулина. Авторы предполагают несколько механизмов регуляции диабета I типа: клетки пуповинной крови могли мигрировать в поджелудочную железу и дифференцироваться в продуцирующие инсулин клетки, стимулировать пролиферацию новых островковых клеток, подавлять активность Т-клеток.

Итак, в современной литературе не представлено убедительных экспериментальных доказательств того, что посредством клеточной терапии возможно полное излечение от сахарного диабета I типа. Нельзя признать применение какого-либо клеточного материала самостоятельным методом лечения данного заболевания. Однако перспективы у клеточной терапии сахарного диабета, безусловно, есть. Во-первых, продуцирующие инсулин клетки, полученные *in vitro* из МСК, могут стать альтернативным материалом аллогенных или ксеногенных островков Лангерганса для трансплантации больным сахарным диабетом. Во-вторых, применение ГСК или МСК может помочь в лечении аутоиммунной основы сахарного диабета I типа. В-третьих, возможно, для нормализации метаболизма глюкозы и инсулина перспективным окажется котрансплантация разных видов клеток — мононуклеарной фракции КМ или ГСК и МСК. В работе Урбан с коллегами (Urban et al., 2008) показано, что сниже-

ние уровня глюкозы в крови до исходного состояния произошло у мышей со стрептозотоциновым диабетом через 4 нед после внутривенной трансплантации  $10^6$  ядерных клеток КМ и  $10^5$  или  $5 \cdot 10^4$  МСК. В течение всего времени наблюдения (16 нед) уровень глюкозы в крови животных не повышался. У диабетических животных наблюдали гипергликемию после трансплантации только моноклеарной фракции КМ или только МСК в тех же количествах. Введение  $2.5 \cdot 10^4$  МСК с тем же количеством клеток КМ не привело к снижению уровня глюкозы в крови мышей. В этой работе выявлены два интересных факта: терапевтическое воздействие оказывает котрансплантация 2 видов клеток; эффективность клеточной терапии зависит от количества введенных МСК. По одной работе нельзя делать окончательные выводы. Безусловно, методы применения клеточной терапии при сахарном диабете I типа требуют дальнейшей разработки.

### Список литературы

- Беникова Е., Турчин И., Белякова Л., Боярская О., Демченко В. 1987. Опыт лечения детей, страдающих сахарным диабетом, при помощи алло- и ксенотрансплантации культуры островковых клеток поджелудочной железы. Проблемы эндокринологии. 2 : 19—22.
- Блюмкин С., Скалецкий Н., Попов В., Шальнев Б., Данилов М. 1983. Внеселезеночная трансплантация культур островковых клеток поджелудочной железы плодов человека крысам с экспериментальным сахарным диабетом. Бюлл. эксперим. биол. и мед. 85 (5) : 89—91.
- Великов В. 1989. Хроническое внутрисосудистое микросвертывание крови и диабетическая микроангиопатия. Терапевтический архив. 5 : 26—32.
- Кругляков П., Соколова И., Аминева Х., Некрасова Н., Вийде С., Чередииченко Н., Зарицкий А., Семернин Е., Кислякова Т., Полинцев Д. 2004. Терапия экспериментального инфаркта миокарда у крыс с помощью трансплантации сингенных мезенхимных стволовых клеток. Цитология. 46 (12) : 1043—1054.
- Скалецкий Н. 2005. Трансплантация островковых клеток в лечение сахарного диабета: современное состояние и перспективы. Вестн. трансплантологии и искусственных органов. 3 : 17—18.
- Скалецкий Н., Гончарова Т., Засорина Л., Кирсанова Л., Скалецкая Г., Новиков В. 2002. Ксенотрансплантация культур островковых клеток на пути достижения длительной инсулиннезависимости у больных сахарным диабетом I типа. Вестн. трансплантологии и искусственных органов. 3 : 85—86.
- Скалецкий Н., Кирсанов Л., Баранова Н., Бубенцова Г., Петрова И., Пушкова И., Северин А., Скалецкая Г. 2002. Получение культур островковых клеток для трансплантации: новые подходы и новое качество. Вестн. трансплантологии и искусственных органов. 3 : 86.
- Скалецкий Н., Шумаков В. 1996. Лечение инсулинзависимого сахарного диабета методом трансплантации островковых клеток поджелудочной железы плодов и новорожденных. Бюлл. эксперим. биол. и мед. Трансплантация фетальных тканей и клеток. 126 : 33—40.
- Шумаков В., Игнатенко С., Блюмкин В., Скалецкий Н. 1984. Клинические результаты аллогенной и ксеногенной трансплантации культур островковых клеток поджелудочной железы больным сахарным диабетом. Бюлл. эксперим. биол. и мед. Трансплантация фетальных тканей и клеток. 126 : 19—21.
- Abdel Aziz M., El-Asmar M., Haidara M., Atta H., Roshdy N., Rashed L., Sabry D., Youssef M., Abder Aziz A., Moustafa M. 2008. Effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on cardiovascular complications in diabetic rats. Med. Sci. Monit. 14 : BR249—255.
- Abdi R., Fiorina P., Adra C., Atkinson M., Sayegh M. 2008. Immunomodulation by mesenchymal stem cells. A potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. Diabetes. 57 : 1759—1767.
- Aggarwal S., Pittenger M. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood. 105 : 1815—1822.
- Akashi T., Shigematsu H., Hamamoto Y., Iwasaki H., Yatoh S., Bonner-Weir S., Akashi K., Weir G. 2008. Bone marrow or foetal liver cells fail to induce islet regeneration in diabetic Akita mice. Diabetes Metab. Res. Rev. 24 : 585—590.
- Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M., Ferrer K., McIntosh K., Patil S., Hardy W., Devine S., Ucker D., Deans R., Moseley A., Hoffman R. 2002. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and prolong skin graft survival *in vivo*. Exp. Hematol. 30 : 42—48.
- Beck J., Angus R., Madsen B., Britt D., Vernon B., Nguyen K. 2007. Islet encapsulation: strategies to enhance islet cell functions. Tissue Engineering. 13 : 589—599.
- Beilhack G., Scheffold C., Weissman I., Taylor C., Jerabek L., Burge M., Masek M., Shizuru J. 2003. Purified allogeneic hematopoietic stem cell transplantation blocks diabetes pathogenesis in NOD mice. Diabetes. 52 : 59—68.
- Biarnes M., Montolio M., Nacher V., Raurell M., Soler J., Montanya E. 2000. Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia. Diabetes. 51 : 66—72.
- Burt R., Loh Y., Pearce W., Beohar N., Barr W., Craig R., Wen Y., Rapp J., Kressler J. 2008. Clinical applications of blood-derived and marrow-derived stem cells for nonmalignant diseases. J. Amer. Med. Ass. 299 : 925—936.
- Caplan A., Dennis J. 2006. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. J. Cell. Biochem. 98 : 1076—1084.
- Casu A., Bottino R., Balamurugan A., Hara H., Windt D., Campanile N., Smetanka C., Cooper D., Trucco M. 2008. Metabolic aspects of pig-to-monkey (*Macaca fascicularis*) islet transplantation: implications for translation into clinical practice. Diabetologia. 51 : 120—129.
- Chang C., Niu D., Zhou H., Zhang Y., Li F., Gong F. 2008. Mesenchymal stromal cells improve hyperglycemia and insulin deficiency in the diabetic porcine pancreatic microenvironment. Cytotherapy. 10 : 796—805.
- Chao K., Chao K., Fu Y., Liu S. 2008. Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. Plos one. 1 : 1—9.
- Chen J., Zhang G., Li Y., Wang L., Xu Y., Gautam S., Lu M., Zhu Z., Chopp M. 2003. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. Circ. Res. 92 : 692—699.
- Chen L., Jiang X., Yang L. 2004. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. World J. Gastroenterol. 10 : 3016—3020.
- Creager M., Luscher T., Cosentino F., Beckman J. 2003. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy. Circulation. 108 : 1527—1532.
- Deane S., Meyers F., Gershwin M. 2008. On reversing the persistence of memory: hematopoietic stem cell transplant for autoimmune disease in the first ten years. J. Autoimmun. 30 : 180—196.
- Dong Q., Chen L., Gao G., Wang L., Song J., Chen B., Xu Y., Sun L. 2008. Allogeneic diabetic mesenchymal stem cells transplantation in streptozotocin-induced diabetic rat. Clin. Invest. Med. 31 : 618—629.
- Dufrene D., D'hoore W., Goebbels R., Goebbels R., Saliez A., Guiot Y., Gianello P. 2006. Parameters favouring successful adult pig islet isolations for xenotransplantation in pig-to-primate models. Xenotransplantation. 13 : 204—214.
- El-Badri N., Wang B., Steele A., Cherry A., Marikar Y., Mizobe K., Good R. 2000. Successful prevention of autoimmune disease by transplantation of adequate number of fully allogeneic hematopoietic stem cells. Transplantation. 70 : 870—877.

- Ende N., Chen R., Reddi A. 2004. Effect of human umbilical cord blood cells on glycemia and insulinitis in type 1 diabetic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325 : 665—669.
- Ezquer F., Ezquer M., Parrau D., Carpio D., Yanez A., Conget P. 2008. Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 14 : 631—640.
- Gray D. 1997. Encapsulated islet cells: the role of direct and indirect presentation and the relevance to xenotransplantation and autoimmune recurrence. *Br. Bull.* 53 : 777—788.
- Guzik T., Mussa S., Gastaldi D., Sadowski J., Ratnatunga C., Pillai R., Channon K. 2002. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 105 : 1656—1662.
- Haller M., Viener H., Wasserfall C., Brusko T., Atkinson M., Schatz D. 2008. Autologous umbilical cord blood infusion for type 1 diabetes. *Exp. Hematol.* 36 : 710—715.
- Hasagawa Y., Ogihara T., Yamada T., Ishigaki Y., Imai J., Uno K., Gao J., Kaneko K., Ishihara H., Sasano H., Nakauchi H., Oka Y., Katagiri H. 2007. Bone marrow (BM) transplantation promotes  $\beta$ -cell regeneration after acute injury through BM cell mobilization. *Endocrinology.* 148 : 2006—2015.
- Heilman R., Chakker A., Mazur M., Petrides S., Moss A., Mekeel K., Mulligan D., Reddy K. 2009. Outcomes of simultaneous kidney-pancreas transplantation with positive cross-match. *Transplant. Proc.* 41 : 303—306.
- Hering B., Wijkstrom M., Graham M., Hardstedt M., Aasheim T., Jie T., Ansite J., Nakano M., Cheng J., Li W., Moran K., Christians U., Finnegan C., Mills C., Sutherland D., Bansal-Pakala P., Murtaugh M., Kirchoff N., Schuurman H. 2006. Prolonged diabetes reversal after intraportal xenotransplantation of wild-type porcine islets in immunosuppressed nonhuman primates. *Natura medicine.* 12 : 301—303.
- Hess D., Li L., Martin M., Sakano S., Hill D., Strutt B., Thyssen S., Gray D., Bhatia M. 2003. Bone marrow derived stem cells initiate endogenous pancreatic regeneration. *Nat. Biotechnol.* 21 : 263—270.
- Hisanaga E., Park K., Yamada S., Hashimoto H., Takeuchi T., Mori M., Seno M., Umezawa K., Takei I., Kojima I. 2008. A simple method to induce differentiation of murine bone marrow mesenchymal cells to insulin-producing cells using conophylline and betacellulin- $\delta$ 4. *Endocrine J.* 55 : 535—543.
- Hugl T., Laar J. 2008. Stem cell transplantation for rheumatic autoimmune diseases. *Arthritis Res. Ther.* 10 : 217—223.
- Ianus A., Holz G., Theise N., Mehboob A. 2003. *In vivo* derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J. Clin. Invest.* 111 : 843—850.
- Ikebukuro K., Adachi Y., Suzuki Y., Iwasaki M., Nakano K., Koike Y., Mukaide H., Yamada Y., Fujimoto S., Seino Y., Oyaizu H., Shigematsu A., Kiriyama N., Hamada Y., Kamiyama Y., Ikehara S. 2006. Synergistic effects of injection of bone marrow cells into both portal vein and bone marrow on tolerance induction in transplantation of allogeneic pancreatic islets. *Bone Marrow Transplant.* 38 : 657—664.
- Ikehara S., Ohtsuki H., Good R., Asamoto H., Nakamura T., Sekita K., Muso E., Tochino Y., Ida T., Kuzuya H. 1985. Prevention of type I diabetes in nonobese diabetic mice by allogeneic bone marrow transplantation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 82 : 7743—7747.
- Itakura S., Asari S., Rawson J., Ito T., Todorov I., Liu C., Sasaki N., Kandeel F., Mullen Y. 2007. Mesenchymal stem cells facilitate the induction of mixed hematopoietic chimerism and islet allograft tolerance without GVHD in the rat. *Amer. J. Transplant.* 7 : 336—346.
- Kang E., Zickler P., Burns S., Langemeijer S., Brenner S., Phang O., Patterson N., Harlan D., Tisdale J. 2005. Hematopoietic stem cell transplantation prevents diabetes in NOD mice but does not contribute to significant islet cell regeneration once disease is established. *Exp. Hematol.* 33 : 699—705.
- Karlsson H., Samarasinghe S., Ball L., Sundberg B., Lankester A., Dazzi F., Uzunel M., Rao K., Veys P., Le Blanc K., Ringden O., Amrolia P. 2008. Mesenchymal stem cells exert differential effects on alloantigen and virus-specific T-cell responses. *Blood.* 112 : 532—541.
- Karnieli O., Izhar-Prato Y., Bulvik S., Efrat S. 2007. Generation of insulin-producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation. *Stem Cells.* 25 : 2837—2844.
- Kaufman J., Platt J., Rade F., Dunn D., Bach F., Sutherland D. 1990. Differential roles of Mac-1+ cells and CD4+ and CD8+ T lymphocytes in primary nonfunction and classic rejection of islet allografts. *J. Exp. Med.* 172 : 291—302.
- Kemp C., Knight M., Scharp D., Ballinger W., Lacy P. 1973. Effect of transplantation site on the results of pancreatic islet isografts in diabetic rats. *Diabetologia.* 9 : 486—491.
- Koblas T., Harman S., Saudek F. 2005. The application of umbilical cord blood cells in the treatment of diabetes mellitus. *Rev. Diabetic Stud.* 2 : 228—234.
- Lee R., Seo M., Reger R., Spees J., Pulin A., Olson S., Prockop D. 2006. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *PNAS.* 103 : 17 438—17 443.
- Lenchner A., Yang Y., Blacken R., Wang L., Nolan A., Habener J. 2004. No evidence for significant transdifferentiation of bone marrow into pancreatic  $\beta$ -cells *in vivo*. *Diabetes.* 53 : 616—623.
- Li M., Inaba M., Guo K., Hisha H., Abraham N., Ikehara S. 2007a. Treatment of streptozotocin-induced diabetes mellitus in mice by intra-bone marrow transplantation plus portal vein injection of beta cells induced from bone marrow cells. *Int. J. Hematol.* 86 : 438—445.
- Li Y., Zhang R., Qiao H., Zhang H., Wang Y., Yuan H., Liu Q., Liu D., Chen L., Pei X. 2007b. Generation of insulin-producing cells from PDX-1 gene-modified human mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.* 211 : 36—44.
- Nagaya N., Fujii T., Iwase T., Ohgushi H., Itoh T., Uematsu M., Yamagishi M., Mori H., Kangawa K., Kitamura S. 2004. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287 : H2670—H2676.
- Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M., Milanese M., Longoni P., Matteucci P., Grisanti S., Gianni A. 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 99 : 3838—3843.
- Pavlichenko N., Sokolova I., Vijde S., Shvedova E., Alexandrov G., Krouglyakov P., Fedotova O., Gilerovich E., Polyntsev D., Otellin V. 2008. Mesenchymal stem cells transplantation could be beneficial for treatment of experimental ischemic stroke in rats. *Brain Res.* 1233 : 203—213.
- Pericin M., Althage A., Freigang S., Hengartner H., Roland E., Dupraz P., Thorens B., Aebischer P., Zinkernagel R. 2002. Allogeneic  $\beta$ -islet cells correct diabetes and resist immune rejection. *PNAS.* 99 : 8203—8206.
- Reckard C., Barket C. 1973. Transplantation of isolated pancreatic islets across strong and weak histocompatibility barriers. *Transplant. Proc.* 5 : 761—763.
- Ringden O., Uzunel M., Rasmuson I., Remberger M., Sundberg B., Lönnies H., Marschall H., Dlugosz A., Szakos A., Has-san Z., Omazic B., Aschan J., Barkholt L., Le Blanc K. 2006. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation.* 81 : 1390—1397.
- Rosa S., Voltarelli J., Chies J., Pranke P. 2007. The use of stem cells for the treatment of autoimmune diseases. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40 : 1579—1597.
- Scharp D., Lacy P., Santiago J., McCullough C., Weide L., Boyle P., Falqui L., Marchetti P., Ricordi C., Gingerich R. 1991. Results of our first nine intraportal islet allografts in type 1, insulin-dependent diabetic patients. *Transplantation.* 51 : 76—85.
- Shibata T., Naruse K., Kamiya H., Kozakae M., Kondo M., Yasuda Y., Nakamura N., Ota K., Tosaki T., Matsuki T., Nakashima E., Hamada Y., Oiso Y., Nakamura J. 2008. Transplantation of

bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves diabetic polyneuropathy in rats. *Diabetes*. 57 : 3099—3107.

Smith-Berdan S., Gille D., Weissman I., Christensen J. 2007. Reversal of autoimmune disease in lupus-prone New Zealand black/New Zealand white mice by nonmyeloablative transplantation of purified allogeneic hematopoietic stem cells. *Blood*. 110 : 1370—1378.

Steptoe R., Ritchie J., Harrison L. 2003. Transfer of hematopoietic stem cells encoding autoantigen prevents autoimmune diabetes. *J. Clin. Invest.* 111 : 1357—1363.

Stevens R., Lokeh A., Ansie J., Field M., Gores P., Sutherland D. 1994. Role of nitric oxide in the pathogenesis of early pancreatic islet dysfunction during rat and human intraportal islet transplantation. *Trans. Proc.* 26 : 692—697.

Sun Y., Chen L., Hou X., Hou W., Dong J., Sun L., Tang K., Wang B., Song J., Li H., Wang K. 2007. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from diabetic patients into insulin-producing cells *in vitro*. *Chinese Med. J.* 120 : 771—776.

Tang D., Cao L., Burkhardt B., Xia C., Litherland S., Atkinson M., Yang L. 2004. *In vivo* and *in vitro* characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. *Diabetes*. 53 : 1721—1732.

Tayaramma T., Ma B., Ronde M., Mayer H. 2006. Chromatin-remodeling factors allow differentiation of bone marrow cells into insulin-producing cells. *Stem Cells*. 24 : 2858—2867.

Trucco M., Casu A., Bottino R. 2007. The pig as the donor of pancreatic islets for men. *Vet. Res. Commun.* 31 : 27—33.

Uccelli A., Moretta L., Pistoia V. 2006. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur. J. Immunol.* 36 : 2566—2573.

Urban V., Kiss J., Kovacs J., Gocza E., Vas V., Monostori E., Uher F. 2008. Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells*. 26 : 244—253.

Van Gelder F., Delbouille M., Vandervenner M., Van Becumen G., Van Deynse D., Angenon E., Amerijckx B., Donckier V. 2009. An 11-year overview of the Belgian donor and transplant sta-

tistics based on a consecutive yearly data follow-up and comparing two periods: 1997 to 2005 versus 2006 to 2007. *Transplant. Proc.* 41 : 569—571.

Voltarelli J., Couri C., Stracieri A., Oliveira M., Moraes D., Pieroni F., Barros G., Madeira M., Malmegrim K., Foss-Freitas M., Simoes B., Foss M., Squiers E., Burt R. 2007. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *J. Amer. Med. Assoc.* 297 : 1568—1576.

Vrochides D., Paraskevas S., Papanikolaou V. 2009. Transplantation for type 1 diabetes mellitus. Whole organ or islets? *Hypokratia*. 13 : 6—8.

Warnock G., Kneteman N., Ryan E., Evans M., Seelis R., Haloran P., Rabinovitch A., Rajotte R. 1991. Normoglycaemia after transplantation of freshly isolated and cryopreserved pancreatic islets in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 34 : 55—58.

Wu X., Liu C., Xu K., Mao X., Zhu J., Jiang J., Cui D., Zhang M., Xu Y., Liu C. 2007. Reversal of hyperglycemia in diabetic rats by portal vein transplantation of islet-like cells generated from bone marrow mesenchymal stem cells. *World J. Gastroenterol.* 13 : 3342—3349.

Zappia E., Casazza S., Pedemonte E., Benvenuto F., Bonanni I., Gerdoni E., Giunti D., Ceravolo A., Cazzanti F., Frassoni F., Mancardi G., Uccelli A. 2005. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*. 106 : 1755—1761.

Zhang N., Li J., Luo R., Jiang J., Wang J. 2008. Bone marrow mesenchymal stem cells induce angiogenesis and attenuate the remodeling of diabetic cardiomyopathy. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*. 116 : 104—111.

Zhao M., Amiel S., Ajami S., Jiang J., Rela M., Heaton N., Huang G. 2008. Amelioration of streptozotocin-induced diabetes in mice with cells derived from human marrow stromal cells. *Plos one*. 3 : 1—9.

Поступила 19 V 2009

## CELL THERAPY FOR TYPE I DIABETE

I. B. Sokolova

Trans-Technologies Ltd., St. Petersburg;  
e-mail: sokolova@alkorbio.ru

Cell therapy is a modern and promising approach to type I diabetes mellitus treatment. Nowadays a wide range of cells is used in laboratory experiments and clinical studies, including allogeneic and xenogeneic cells of Langerhans islets, bone marrow cells, haematopoietic stem cells, mesenchymal stem cells, and cord blood stem cells. Any type of the cells named could correct the status of the patients to a certain extent. However, full recovery after cell therapy has not been achieved yet.

Key words: type I diabetes,  $\beta$ -islet cells, bone marrow, hematopoietic stem cells, marrow mesenchymal stem cells, umbilical cord blood.