

© Коллектив авторов, 2024

УДК 616-008

Степанова О.И.¹, Алчинова И.Б.², Черепов А.Б.², Метёлкин А.А.², Карганов М.Ю.²,
Никольская А.О.³, Клёсов Р.А.¹, Семёнов Х.Х.¹, Онищенко Н.А.³, Басок Ю.Б.³

Динамика состояния клеток крови и костного мозга у мышей при прогрессирующем развитии сахарного диабета 2 типа

¹ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, 143442, МО, Красногорский район, Россия, п. Светлые горы, д. 1;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; 125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России, 123182, Москва, Россия, ул. Щукинская, д. 1

Цель работы: изучить динамику состояния клеток крови и костного мозга при прогрессирующем развитии сахарного диабета 2 типа (СД2) в зависимости от степени тяжести нарушений окислительно-восстановительных процессов (ОВП) в тканях организма.

Методика. Использована генетическая модель СД2 у мутантных мышей – *db/db* (опытная группа $n=30$). Контролем служили здоровые мыши той же линии – *db/+m* ($n=10$) и линии *B10* ($n=5$). В течение 6–6,5 мес контролировали: динамику клинических показателей (глюкоза крови, гликозилированный гемоглобин, масса тела) и состояние ОВП в тканях организма по уровню активности НАДН, ФАД и показателю окислительного метаболизма (ПОМ) с помощью аппарата «Лазма-СТ». В течение того же срока исследовали состояние клеток крови (эритроциты, лейкоциты, тромбоциты) и костного мозга. Статистическую обработку результатов проводили с предварительным использованием теста Шапиро–Уилкса; достоверность различий с контролем оценивали с помощью параметрического t – критерия Стьюдента, при $p<0,05$.

Результаты. В развитии СД2 выявлено 3 стадии прогрессирующего нарушения метаболизма и ОВП: I – стадия адаптации (1,0–2,0 мес); II – стадия прогрессирующей дисадаптации (2,5–4,5 мес); III – стадия декомпенсации (5,0–6,5 мес). Установлено, что уже в I стадии у мышей *db/db* снижалось содержание эритроцитов, Hb г/л и лейкоцитов. Во II и особенно в III стадиях происходило повышение тромбоцитов, нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов, снижение лимфоцитов. В костном мозге у мышей *db/db* уже в I, но особенно в III стадии определялось снижение доли живых и повышение количества поврежденных клеток, преимущественно за счёт апонекротических клеток.

Заключение. По мере прогрессирования СД2 и выраженного снижения эффективности ОВП, особенно на III стадии – в организме тормозятся процессы кроветворения и усиливаются нарушения в соотношении клеточных популяций нейтрофилы/лимфоциты, что свидетельствует о развитии тяжёлой гипоксии, активации системной воспалительной реакции и торможении репаративных процессов, создающих условия для развития опасных осложнений.

Ключевые слова: сахарный диабет; окислительно-восстановительные процессы; клетки крови и костного мозга

Для цитирования: Степанова О.И., Алчинова И.Б., Черепов А.Б., Метёлкин А.А., Карганов М.Ю., Никольская А.О., Клёсов Р.А., Семёнов Х.Х., Онищенко Н.А., Басок Ю.Б. Динамика состояния клеток крови и костного мозга у мышей при прогрессирующем развитии сахарного диабета 2 типа. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2024; 68(1): 98–108.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.98-108

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Онищенко Н.А., Карганов М.Ю.; сбор материала – Степанова О.И., Клёсов Р.А., Никольская А.О.; техническая подготовка материала – Алчинова И.Б., Черепов А.Б., Метёлкин А.А., Степанова О.И., Клёсов Р.А., Никольская А.О., Семёнов Х.Х.; подготовка иллюстративного материала к публикации – Алчинова И.Б., Черепов А.Б., Метёлкин А.А., Степанова О.И., Никольская А.О.; написание текста – Онищенко Н.А.; редактирование – Карганов М.Ю., Басок Ю.Б. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Степанова Ольга Ивановна, e-mail: olgsima50@mail.ru

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.01.2024

Принята к печати 25.01.2024

Опубликована 28.03.2024

Stepanova O.I.¹, Alchinova I.B.², Cherepov A.B.², Metelkin A.A.², Karganov M.Yu.², Nikolskaya A.O.³, Klesov R.A.¹, Semenov Kh.Kh.¹, Onishchenko N.A.³, Basok Yu.B.³

The dynamics of changes in blood cells and bone marrow of mice with progressive type 2 diabetes mellitus

¹Scientific Center of Biomedical Technologies FMBA of Russia, Svetlye Gory village 1, Moscow Region, 143442, Krasnogorsk district, Russian Federation;

²Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8 Baltiyskaya st., Moscow, 125315, Russian Federation;

³Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, 1 st. Shchukinskaya, Moscow, 123182, Russian Federation

Aim: to study the dynamics of changes in the blood and bone marrow cells during the progression of type 2 diabetes mellitus (DM2) depending on the severity of redox (RO) disorders in tissues.

Methods. A genetic model of DM2 in mutant db/db mice (experimental group, $n=30$) was used. The control group consisted of the same mouse strain, db/+m ($n=10$), and the B10 strain ($n=5$). Time-related changes in clinical variables (blood glucose, HbA1c, body weight) and the tissue RO status were monitored for 6-6.5 months. The RO status was evaluated by the NADH concentration, FAD activity, and the indicator of oxidative metabolism (IOM) using a Lasma-ST apparatus. During the same period, the condition of blood cells (erythrocytes, leukocytes, platelets) and bone marrow cells was examined. Statistical analysis was performed with a preliminary *Shapiro-Wilks* normality test followed by the parametric Student's *t*-test. Differences from the control were considered significant at $p<0.05$.

Results. During the development of DM2, three stages of progressive metabolic and RO disorders were identified: I: stage of adaptation (1.0-2.0 months); II, stage of progressive maladaptation (2.5-4.5 months); III, stage of decompensation (5.0-6.5 months). In db/db mice already at stage I, erythrocytes, Hb and leukocytes were decreased. At stages II and especially III, platelets, neutrophils, monocytes, and eosinophils were increased whereas lymphocytes were reduced. In the bone marrow of db/db mice, already in stage I, but even more in stage III, the proportion of living cells was decreased and the proportion of damaged cells was increased, primarily due to the contribution of aponecrotic cells.

Conclusion. With the progression of DM2 and a pronounced decrease in the effectiveness of RO processes, especially at stage III, the hematopoietic processes were inhibited and the disorders in the neutrophil/lymphocyte cell population ratio intensified. This indicates the development of severe hypoxia, activation of a systemic inflammatory response, and inhibition of reparative processes that create conditions for development of dangerous complications.

Keywords: diabetes mellitus; redox processes; blood and bone marrow cells

For citation: Stepanova O.I., Alchinova I.B., Cherepov A.B., Metelkin A.A., Karganov M.Yu., Nikolskaya A.O., Klesov R.A., Semenov Kh.Kh., Onishchenko N.A., Basok Yu.B. Dynamics of the state of blood cells and bone marrow in mice with the progressive. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(1): 98-108. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.98-108

Author's contribution: concept and design of the study – Onishchenko N.A., Karganov M.Yu.; collection of material – Stepanova O.I., Klesov R.A., Nikolskaya A.O.; technical preparation of the material Alchinova I.B., Cherepov A.B., Metelkin A.A., Stepanova O.I., Klesov R.A., Nikolskaya A.O., Semenov Kh.Kh.; preparation of illustrative material for publication – Alchinova I.B., Cherepov A.B., Metelkin A.A., Stepanova O.I., Nikolskaya A.O.; writing the text – Onishchenko N.A.; editing the text – Karganov M.Yu., Basok Yu.B. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Olga I. Stepanova*, e-mail: olgsima50@mail.ru

Information about the authors:

Stepanova O.I., <https://orcid.org/0009-0005-6511-3975>

Alchinova I.B., <https://orcid.org/0000-0001-5294-7317>

Cherepov A.B., <https://orcid.org/0000-0002-3757-5292>

Metelkin A.A., <https://orcid.org/0000-0001-8018-4978>

Karganov M.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-5862-8090>

Nikolskaya A.O., <https://orcid.org/0000-0001-7410-6500>

Klesov R.A., <https://orcid.org/0000-0001-8029-6486>

Onishchenko N.A., <https://orcid.org/0000-0002-0889-8674>

Basok Yu.B., <https://orcid.org/0000-0003-4807-3164>

Financing. The work was partially carried out within the framework of the state assignment on the topic: «Assessment of the body's adaptive reactions to the action of physicochemical and environmental factors» (No. FGFU-2022-0010).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 15.01.2024

Accepted 25.01.2024

Published 28.03.2024

Введение

По современным воззрениям сахарный диабет 2 типа (СД2) представляет собой хроническое мультифакторное заболевание [1, 2], ранним клиническим проявлением которого является постепенно прогрессирующая гипергликемия, обусловленная развитием резистентности тканей к инсулину, создающей благоприятные условия для возникновения и прогрессирования опасных для жизни осложнений [3–5]. Исследованиями последних лет показано [6], что гипергликемия уже сама по себе оказывает повреждающее воздействие на различные ткани организма за счёт токсичности гликированных белков и липопротеидов, накапливающихся в эритроцитах и других клетках. Так, костный мозг, в ежедневном режиме продуцирующий различные типы клеток крови (эритроциты, лейкоциты, тромбоциты), оказался одним из наиболее чувствительных органов к повреждающему воздействию гликолизированных белков, накапливающихся в эритроцитах [7]. В результате эритроциты, которые изменяют свои свойства, вместе с тромбоцитами и лейкоцитами становятся активными участниками развития микро – и макрососудистых осложнений при СД2 [8]. Работы последних лет убеждают в том, что развитие нарушений в состоянии клеток крови и костного мозга при СД2 зависит не столько от тяжести повреждения секреторной функции островковых клеток поджелудочной железы, сколько от выраженности действия комплекса факторов, подавляющих функцию ещё жизнеспособных β -клеток. В роли таких факторов выступают: воспаление, глюко-токсичность, липотоксичность, оксидативный стресс, стресс эндоплазматического ретикулума, а также изменения кишечной микрофлоры и барьерных свойств слизистой кишечника [3, 9–11]. Эти факторы способствуют нарушению метаболизма путём торможения окислительно – восстановительных процессов (ОВП) в клетках всех органов и тканей организма, в том числе в клетках крови и костного мозга. Между тем, работ, устанавливающих взаимосвязь степени выраженности нарушений в состоянии клеток крови и костного мозга от степени выраженности угнетения ОВП в тканях организма при прогрессирующем развитии СД2 мы в доступной литературе не обнаружили.

Цель работы: на генетической модели СД2 у мышей изучить динамику состояния клеток крови (эритроциты, лейкоциты, тромбоциты) и костного мозга на фоне нарастающей гипергликемии и нарушений окислительно – восстановительных процессов в тканях организма в зависимости от степени тяжести нарушений ОВП при прогрессирующем развитии СД2.

Методика

Динамику нарушений метаболизма, а также изменений в состоянии клеток крови и костного мозга при СД2 изучали на мутантных (гомозиготных) мышах C57BL/KsJYLeprdb/+(B/Ks-Leprdb/+) – (*db/db*), которые несут рецессивный ген – *leptin receptor – Leprdb* – (*db*) (8 группа сцепления, 4 хромосома). Ген *db* в гомозиготном состоянии вызывает прогрессирующее развитие СД, что обусловлено снижением рецептор – опосредованной чувствительности клеток организма к эндогенному инсулину. Развивающийся СД сходен с СД2 и характеризуется деграцией β -клеток в островках поджелудочной железы, но без дефицита выработки инсулина на ранних сроках. Общее количество мутантных мышей – диабетиков линии B/Ks-Leprdb/Leprdb (*db/db*) обоих полов, использованных в эксперименте, составило 30 голов ($n=30$). Контролем служили фенотипически здоровые гетерозиготные мыши той же линии – B/Ks-Leprdb/+ – (*db/+m*) ($n=10$) и мыши линии C57BL/10 – (B10) ($n=5$). Общее количество мышей, использованных в эксперименте, составило 45 голов.

У этих мышей в течение 6 – 6,5 мес в динамике изучали изменения ряда функциональных показателей, развивающихся при СД2, которые отражают степень тяжести клинического состояния животного. Измеряли содержание глюкозы в крови, гликолизированного гемоглобина в эритроцитах и массу тела, а также проводилась оценка состояния ОВП в тканях организма. Содержание глюкозы определяли в свежей венозной (капиллярной) крови фотометрическим методом на приборе Ассу-Чек (Швейцария), а % содержание гликолизированного гемоглобина (HbA1c,%) – на приборе Nycocard REDER (Норвегия), который предназначен для быстрого определения *in vitro* HbA1c методом боратного аффинного анализа. Вес животных определяли с помощью весов Mettler BD202 (Швейцария). Динамическая оценка состояния ОВП производилась неинвазивно с помощью аппарата лазерной доплеровской флоуметрии – «Лазма – СТ» [12]. Этот аппарат позволяет измерять микроциркуляцию крови и лимфы в тканях хвоста, определять в этих тканях уровень активности митохондриальных коферментов – НАДН, ФАД и на основании полученных результатов автоматически рассчитывать показатель окислительного метаболизма (ПОМ) [12]. Определение в динамике в процессе жизни животных тканевого уровня микроциркуляции, активности митохондриальных коферментов, показателя окислительного метаболизма, а также содержания глюкозы в крови позволило выя-

вить 3 стадии развивающихся нарушений метаболизма в организме мутантных мышей с СД2: 1.0 – 2.0 мес после рождения – стадия адаптивных изменений – (1), 2,5 – 4,5 мес – стадия прогрессирующей дисадаптации – (2) и 5.0 – 6,5 мес – стадия декомпенсации метаболизма – (3) (см. раздел «Результаты»). Именно на этих сроках у мышей с СД2 нами было проведено исследование динамики изменения состояния клеток крови и костного мозга.

Для исследования клеток крови динамике развития CD2 смешанную кровь забирали в пробирки с K_3 ЭДТА. Оценку гематологических показателей – (RBC $10^{12}/л$ – эритроциты, HGB, г/л – гемоглобин, HCT, % – гематокрит, MCV, фемтолитр – средний объём эритроцита, MCH, пикограмм – среднее содержание гемоглобина в эритроците, MCHC, г/л – средняя концентрация гемоглобина в эритроците, RDW-CV, % – ширина распределения эритроцитов, RDW-SD, % – ширина распределения эритроцитов (стандартное отклонение); PLT $10^9/л$ – тромбоциты, PDW, % – относительная ширина распределения тромбоцитов по объёму, PCT, % – тромбокрит, MPV, фемтолитр – средний объём тромбоцита; WBC $10^9/л$ – лейкоциты, Neu, % – нейтрофилы, Lymph, % – лимфоциты, Mono, % – моноциты, Eosi, % – эозинофилы, Basis, % – базофилы) проводили на автоматическом гематологическом анализаторе DYMIND VET DF50 (Китай) в соответствии с рекомендациями производителя. Данные представляли как средний результат из трёх замеров.

Клетки костного мозга выделяли из бедренной и большой берцовой костей мышей с использованием стандартного протокола [13]. Целые кости (бедренную и большую берцовую) выделяли из задних конечностей мышей и тщательно очищали от мышц и связок, после чего отсекали эпифизы и кости помещали в 0,5 мл стандартные пластиковые центрифужные пробирки с заранее проколотым с помощью иглы (G18-21) дном. Эти пробирки помещали внутрь пластиковых центрифужных пробирок объемом 1,5 мл и центрифугировали 15 с при 10 000 g. Комок клеток костного мозга, очищенный от костных тканей, оказывался в большой центрифужной пробирке.

Для оценки выраженности апоптоза клеток костного мозга использовали детекцию фосфатидилсерина на внешней мембране клеток с помощью меченого аннексина V. Количество аннексин-положительных (аннексин+) клеток оценивали, используя набор для определения апоптотических клеток с помощью аннексина V-AF 488 (Lumiprobe, Россия) по стандартному протоколу с последующей проточной цитометрией [14].

Полученные клетки костного мозга были суспендированы пипетированием в 100 мкл буфера для связывания из набора для определения аннексина V при комнатной температуре. Из этой суспензии отбирали такое количество клеток, чтобы их концентрация в реакционном объеме (100 мкл) составляла $1 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^6$ клеток/мл. Добавляли аннексин V-AF488 до концентрации 3 мкг/мл и инкубировали 15 минут при комнатной температуре. Затем добавляли 400 мкл охлажденного буфера для связывания. Для определения целостности клеточной мембраны использовали йодистый пропидий. Его добавляли в пробы перед измерением на проточном цитометре до концентрации 0,5-1 мкг/мл.

Свежеприготовленные образцы анализировали на проточном цитометре BD FACSCalibur (Becton Dickinson, США), оснащенный аргонным лазером (488 нм). Эмиссию флуоресценции (AF488, FITS) регистрировали в канале FL1 (515-545 нм) и в диапазоне йодистого пропидия FL2 (620 нм). Для каждого образца накапливалось от 15 000 до 25 000 событий. Сбор данных проводили с помощью программы CELLQuest (Becton Dickinson, США). Данные, полученные в пилотном исследовании, обрабатывали в программе FlowJo. Анализ результатов проводили с учетом рекомендаций, изложенных Crowley LC с соавторами [14], но без установки таргетного гейта.

Численные значения показателей окислительного метаболизма, глюкозы, гликолизированного гемоглобина и массы тела подвергали статистической обработке на персональном компьютере с предварительным использованием теста Шапиро–Уилкса на небольшом количестве выборок ($n > 5$) для доказательства нормального распределения данных, характеризующих метаболизм в отдельные периоды. Достоверность различия сравниваемых показателей оценивали с помощью t – критерия Стьюдента (стандартный программный пакет Microsoft Excel 2007), при $p < 0,05$.

Результаты

Динамическое исследование глюкозы у мышей опытной группы – *db/db* (модель СД2) показало, что уже на 3-4 неделе их жизни – уровень глюкозы в крови повышался с 4,3 – 6,0 ммоль/л (исходный уровень сразу после рождения) до 9 – 13 ммоль/л и в среднем составил $10,3 \pm 2,4$ ммоль/л. Содержание гликолизированного гемоглобина также повышалось с 3,0 – 3,5% до $4,9 \pm 1,0\%$, а уже к 6 – 7 неделе превышало 5,2 – 6,1%. Дальнейшее измерение содержания глюкозы и HbA1c в крови мышей опытной и контрольной групп (здоровые гетерозиготные мыши) на 2, 4 и 6 мес после рождения позволило установить, что в опытной груп-

пе нарушение углеводного обмена продолжает прогрессировать и достоверно отличается от аналогичных измеряемых показателей в контрольных здоровых группах – гетерозиготных мышей *db/+m* и мышей *B10* (см. табл. 1)

При сравнении возрастных изменений массы тела мышей линии *db/db* с контрольными группами было отмечено достоверное превышение их массы тела по сравнению с контролями на сроках 1, 2 и 4 мес, что свидетельствует о развитии у них ожирения, типичного для СД2. Однако, начиная с 4, 5 и до 6 мес у мышей *db/db* наступала быстрая потеря веса.

Масса тела этих мышей становилась достоверно ниже контролей, животные выглядели истощенными, причём уровень глюкозы и *HbA1c* в крови продолжал увеличиваться, хотя и в более замедленном темпе. Для мышей *db/db* были характерны и другие клинические признаки СД2, такие как полидипсия, полифагия и полиурия, которые становились отчётливо выраженными со 2 мес после рождения. В среднем за сутки эти мыши выпивали до 25-30 мл (25,74±1,18) воды,

тогда как животные контрольных групп в среднем 4-5 мл (4,69±0,35; *p*<0,05). Мыши *db/db* съедали больше кормов (в граммах) за сутки (8,90±0,29; *p*<0,05), чем в контрольных группах (3,74±0,096; *p*<0,05) (контроль проводился по брикетированному корму). При динамическом измерении микроциркуляторно – тканевых показателей, характеризующих состояние ОВП у мышей *db/db* и здоровых мышей *db/+m*, было установлено (рис. 1), что на сроке жизни 1,5 мес на фоне нарастающей гипергликемии (табл. 1) амплитуда концентрации НАДН составила 0,77±0,21 (норма 0,54±0,15), амплитуда концентрации ФАД – 1,27±0,45 (норма 0,77±0,13) и ПОМ – 9,42±3,15 (норма 13,95±4,98). Однако выявленные различия показателей состояния ОВП при сравнении с контролями были недостоверны. Эта I стадия развития СД2 была названа нами периодом адаптации. Формирование у диабетических мышей *db/db* первых клинических признаков дисадаптации обнаруживается в возрасте 2,0 – 2,5 мес, когда у 14% мышей этой возрастной группы констатируется значительное повышение веса, уровня гликемии (до 18,70±3,83) и появле-

Таблица 1/Table 1

Возрастная динамика изменений содержания глюкозы, *HbA1c*, % и массы тела у мышей линий *db/db*, *db/+m* и *B10*

Age dynamics of glucose content, *HbA1c*, % and body weight in *db/db*, *db/+m* and *B10* mice

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

Примечание. * – *p*<0,05 по сравнению с контрольными группами ± стандартное отклонение.

Note. * – *p*<0,05 compared to control groups. ± standard deviation.

ние полиурии. На этом сроке показатели микроциркуляции снижаются, а амплитуды коферментов достоверно повышаются (НАДН=1,16±0,47; ФАД=1,51±0,44) и достоверно понижается ПОМ (ПОМ=6,26±2,36), что указывает на снижение ОВП в организме и развитие тканевой гипоксии на этом сроке (рис. 1).

С увеличением возраста у животных (2-4,5 мес) продолжает повышаться уровень гипергликемии и HbA1c (глюкозотоксичность), нарастают полиурия и полифагия, прогрессирует тяжесть нарушения физиологических функций и ОВП в организме, но еще не проявляются осложнения. Эта II стадия была названа стадией прогрессирующей дисадаптации.

В возрасте 5,0- 6,5 мес у мышей *db/db* гипергликемия достигает 27,40±2,09 ммоль/л (норма 5,70±0,65 ммоль/л; $p<0,05$), HbA1c – 8,9±1,25% (норма 3,9±0,57%; $p<0,05$); отмечаются высокие уровни коферментов: НАДН=1,42±0,75 (норма 0,65±0,01, $p<0,05$), ФАД=1,51±0,33 (норма 0,97±0,02, $p<0,05$) и крайне низкий уровень ПОМ=3,97±1,39 (норма 10,91±2,04, $p<0,05$) (рис. 1).

На этом же сроке у 30% животных в состоянии крайней степени тяжести возникала мацерация кожи, (чаще всего в области холки), которая становилась обширной незаживающей раной и оставалась у животного вплоть до его гибели. Выявление указанных признаков позволило нам считать такое состояние – III стадией развития СД2 – стадией декомпенсации адаптационных механизмов в организме, сопровождающейся возникновением тяжёлых осложнений, а также развитием тканевой гипоксии, клеточного апоптоза и некроза [8].

Выявив 3 стадии в прогрессировании метаболических нарушений при СД2, мы приступили к изучению состояния клеток крови и костного мозга в эти периоды, т.к. именно состояние и функциональные свойства этих клеток в значительной степени определяют адекватность течения ОВП в тканях организма. Нами было изучено влияние степени тяжести нарушения ОВП на показатели эритроцитов, тромбоцитов и разных типов лейкоцитов, а также клеток костного мозга, осуществляющих их продукцию.

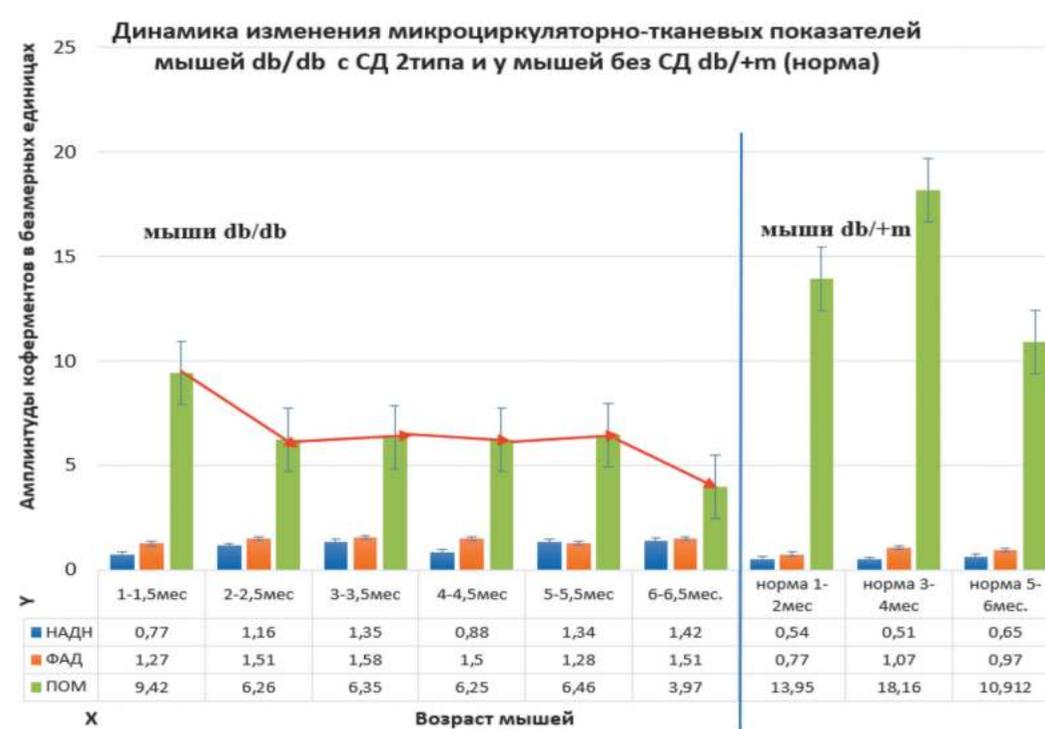


Рис. 1. Динамика изменения микроциркуляторно-тканевых показателей у мышей *db/db* с СД и у мышей без СД *db/+m* (норма) в разном возрасте (возраст мышей указан под амплитудами и измеряемых показатели: НАДН, ФАД и ПОМ). По оси координат: X – возраст мышей (месяцы); Y – амплитуды коферментов в безмерных единицах.

Fig. 1. Dynamics of changes in microcirculatory and tissue parameters in *db/db* mice with DM and in mice without DM *db/+m* (norm) at different ages (the age of mice is indicated under the amplitudes and measured indicators: NADH, FAD and POM). On the coordinate axis: X – is the age of mice (months); Y – is the amplitudes of coenzymes in immeasurable units.

В **таблице 2** представлены результаты пилотного исследования состояния эритроцитов и тромбоцитов у здоровых мышей – *db/+m* (контроль) и у мышей *db/db* (модель СД2) на разных стадиях прогрессирования СД2 (аббревиатура используемых показателей приведена в разделе «Материалы и методы»). Из **таблицы 2** видно, что уже на ранних сроках жизни мышей *db/db* (1,5 – 2,0 мес – стадия адаптации) в их крови отмечается более низкое содержание эритроцитов и сниженное содержание в эритроцитах гемоглобина по сравнению с контролем (мыши *db/+m*). Повышение RBC на стадии декомпенсации, по-видимому, является следствием сгущения крови на фоне развившейся полиурии. Кроме того, уже на раннем сроке жизни мышей *db/db* наметилась тенденция к повышению MCV, RDW-SD и тромбоцитов, а также к снижению MCHC. На этапе прогрессирующей дисадаптации, а также на этапе глубокой декомпенсации сохранялась та же тенденция к повышению или снижению отдельных характеристик эритроцитов, что по-видимому свидетельствует о развивающихся структурных изменениях эритроцитов. При исследовании тромбоцитов (PLT) отчётливо выявлено резкое увеличение количества этих клеток

в крови на этапе декомпенсации ОВП и метаболизма у мышей *db/db* (**табл. 2**).

При пилотном исследовании содержания лейкоцитов в крови (**табл. 3**) нами также было выявлено более низкое содержание общего количества лейкоцитов уже на ранних сроках жизни мышей *db/db* (1,5 – 2,0 мес) по сравнению с контролем – $5,22 \cdot 10^9/\text{л}$ против $9,92 \cdot 10^9/\text{л}$. По мере увеличения срока жизни мышей *db/db* снижение клеток белой крови прогрессировало. Кроме того, на ранних сроках жизни мышей *db/db* отмечено начинающееся повышение процентного содержания нейтрофилов, моноцитов и эозинофилов, а также снижение количества лимфоцитов. Эти изменения усиливались и становились отчётливо выраженными на этапах прогрессирующей дисадаптации и особенно при декомпенсации в состоянии окислительного метаболизма (**табл. 3**). Неуклонное повышение содержания тромбоцитов, нейтрофилов, моноцитов и эозинофилов на фоне прогрессирующего снижения содержания лимфоцитов, а также резкое повышение относительного содержания нейтрофилов к лимфоцитам свидетельствуют об усиливающейся активации при СД2 системной воспалительной реакции и тормо-

Таблица 2/Table 2

Результаты динамического исследования состояния клеток крови (эритроцитов и тромбоцитов) у мышей линий *db/+m* (гетерозиготы, контроль) и *db/db* (гомозиготы, модель СД2)

Results of a dynamic study of the state of blood cells (erythrocytes and platelets) in *db/+m* mice (heterozygotes, control) and *db/db* (homozygotes, model of DM2)

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

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

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

жении репаративных процессов, создающих условия для развития микро- и макрососудистых осложнений.

Выявленное снижение в крови содержания эритроцитов и лейкоцитов уже на ранних сроках жизни мышей с СД2 по сравнению с контролем побудило нас изучить у этих мышей состояние костного мозга, осуществляющего процессы кроветворения в организме. Цитометрическое исследование состояния клеток костного мозга

показало (рис. 2), что у здоровых мышей *db/+m* (контроль) на сроке жизни 2 мес содержание живых клеток составило около 71,35%, а клетки в состоянии некроза, некроптоза/апоптоза и апоптоза – составили 28,65%; у мышей *db/db* на этом же сроке жизни (период адаптации) содержание живых клеток составило – 68,95%, а клетки в состоянии некроза, некроптоза/апоптоза и апоптоза суммарно составили – 31,05%. На четвер-

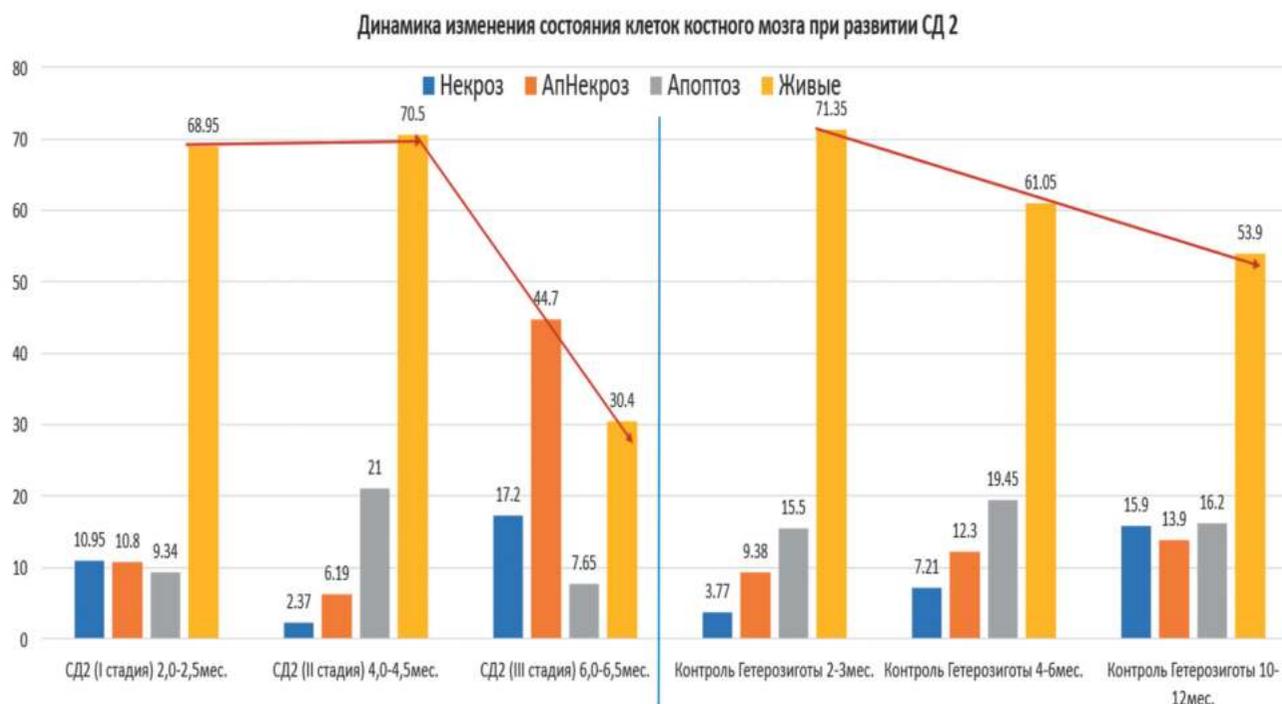


Рис. 2. Динамика изменения состояния клеток костного мозга при развитии СД 2 типа (%).

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

Таблица 3/ Table 3

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

Results of a dynamic study of the state of blood cells (leukocytes) in *db/+m* mice (heterozygotes, control) and *db/db* (homozygotes, model of DM2)

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

том месяце жизни (период развивающейся дисадаптации) по мере прогрессирования СД2 содержание живых клеток практически не изменилось и составило – 70,5%, а среди повреждённых клеток, которые суммарно составили – 29,5%, наибольший % составили клетки в состоянии апоптоза (21%); в период тяжёлой декомпенсации (мацерация кожи) доля живых клеток в костном мозге мышцей СД2 составила уже только 30,4%; клетки в состоянии некроза, некроптоза/апонекроза и апоптоза составили суммарно – 69,6%, причём наибольший процент повреждённых составили клетки в состоянии некроптоза/апонекроза (44,7%). Таким образом, при СД2 по мере прогрессирования метаболических нарушений и снижения эффективности ОВП в костном мозге также неуклонно нарастает угнетение процессов кроветворения, постепенно формирующих в организме различные осложнения и состояние необратимости.

Обсуждение

Проблема взаимовлияния при СД2 гипергликемии, сосудистых осложнений и состояния клеток крови и костного мозга остается недостаточно изученной. В связи с этим нами была поставлена задача – изучить в эксперименте влияние прогрессирующей тяжести нарушений тканевого метаболизма на динамику изменений в состоянии клеток крови и костного мозга, полагая, что ведущими факторами развития метаболических нарушений, в том числе при СД2, являются нарушения окислительно-восстановительных процессов (ОВП). Для изучения этой проблемы нами была использована генетическая модель СД2 на мутантных мышцах *db/db* ($n=30$). Контролем служили здоровые мыши той же линии (*db/+m*) ($n=10$) и мыши линии В 10 ($n=5$). У этих мышцей в течение 6,5 мес от момента рождения контролировали в динамике состояние клинических показателей (глюкоза в крови, содержание HbA1c% и масса тела), а также состояние ОВП (по уровню микроциркуляции в тканях, амплитудам активности НАДН, ФАД и значениям ПОМ – показатель окислительного метаболизма) неинвазивно с помощью аппарата «Лазма СТ» [12]. Развитие СД2 характеризовалось прогрессирующим развитием гипергликемии, повышением HbA1c до конца срока наблюдения (см. табл. 1). Однако в динамике изменения массы тела было выявлено 2 фазы: избыточное нарастание массы тела в течение 4 мес и последующее резкое снижение ее к 5,0 – 6,5 мес на фоне сохраняющейся гипергликемии и высокого уровня HbA1c. Этот факт указывал на развитие глубоких нарушений метаболизма и необходимость осуществления их динамического контроля. Контролируя состояние ОВП в тканях мышцей *db/db* было выявлено 3 стадии при про-

грессирующем развитии СД2 (рис. 1), которые характеризовались нарастанием во времени тяжести нарушения исследуемых показателей: I – стадия адаптации (до 2-х мес); II – стадия прогрессирующей дисадаптации (2,5 – 4,5 мес) и III – стадия декомпенсации (5 – 6,5 мес), на которой проявлялись сосудистые осложнения (30% мышцей с мацерацией кожи). Далее для решения поставленной задачи на 3-х указанных стадиях нами было выполнено пилотное исследование состояния клеток крови и костного мозга. Было установлено, что на I стадии на фоне гипергликемии и повышения HbA1c количество эритроцитов, гемоглобина и лейкоцитов было отчетливо сниженным и сохранялось до конца наблюдения (табл. 2). Этот факт можно объяснить тем, что гликирование белковых мембран эритроцитов и других клеток крови ведёт к снижению их отрицательного мембранного потенциала, вследствие чего развивается их ускоренное старение и сокращение срока жизни клеток крови [15]. Кроме того, снижение мембранного потенциала клеток крови при гипергликемии способствует повышению микровязкости, агрегации или адгезии этих клеток и снижает продукцию этих клеток в костном мозге [16]. В клинике снижение эритроцитов в крови у больных с СД2 отмечают при длительных сроках гипергликемии [17] и уже при наличии микрососудистых осложнений [18]. Полагают также, что снижение уровня эритроцитов м.б. следствием дефицита выработки эритропоэтина у больных с диабетической нефропатией или результатом резистентности к этому гормону, а также следствием деструкции эритроцитов, развивающейся при макро- и микроангиопатиях на длительных сроках течения СД2 [19]. Мы, однако, полагаем, что снижение количества эритроцитов и лейкоцитов в крови уже на I стадии развития генетической модели СД2 может быть связано со снижением мембранного потенциала клеток в результате раннего и ускоренного гликирования мембранных белков этих клеток, обусловленного измененной генетикой этих животных. На II стадии развития СД2 сохраняющееся снижение клеток крови может быть обусловлено всеми вышеуказанными факторами, а также происходящим повышением массы тела. Развитие тучности, как известно, сопровождается состоянием хронического воспаления и высоким уровнем циркулирующих провоспалительных цитокинов, которые, воздействуя на гемопоэтическую систему и ниши костного мозга, угнетают процессы кроветворения в них [7]. Справедливость такого мнения подтверждается нашими данными о процентном повышении содержания нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов и снижении лимфоцитов в крови (табл. 3). Повышение отношения нейтрофилов/лимфо-

цитов свидетельствует об активации системной воспалительной реакции в организме [20, 21] и даже служит в клинике предиктором ухудшения прогноза при развитии диабетической нефропатии [22, 23] и диабетических язв на ногах [24]. Полагают также, что отношение моноцитов/тромбоцитов может служить прогностическим маркером опасности развития сосудистых осложнений на II, но особенно на III стадии СД2 [25]. Наши данные по состоянию клеток костного мозга при СД2 подтверждают, что по мере прогрессирования СД2 на II стадии нарастает количество клеток в состоянии апоптоза (21%), а на III стадии среди клеток пунктата содержание живых клеток снижается до 30,4% и повышается содержание повреждённых клеток (в состоянии некроза, некроптоза/ апонекроза и апоптоза до 69,6%, причём наибольший процент приходится на клетки в состоянии некроптоза/ апонекроза – 44,7%) (рис. 2). Исследование других гематологических показателей, указанных в таблице 2, не выявило каких – либо заметных сдвигов при СД2. Однако, некоторые авторы полагают [6], что даже лёгкие отклонения их значений, могут проявить свою патологическую роль при возникновении ангиопатий, а также повлиять на функционирование гемопоэтической системы в организме при СД2.

Выводы:

1. При прогрессирующем развитии СД2 у мышей линии *db/db* выявляется 3 стадии, которые различаются по степени повышения тяжести нарушения ОВП и метаболических показателей: I – на сроке жизни 1-2 мес – стадия адаптации; II – на сроке 2,5-4,5 мес – стадия прогрессирующей дисадаптации; III – на сроке 5-6,5 мес стадия декомпенсации.

2. Прогрессирующее развитие СД2 происходит на фоне усиливающейся гликемии, увеличения содержания гликолизированного гемоглобина в эритроцитах, повышения массы тела на I и II стадии и снижения массы тела на III стадии. Эти изменения клинических показателей происходят на фоне постепенного снижения эффективности показателей ОВП (повышение амплитуд коферментов НАДН, ФАД и снижение ПОМ), особенно выраженном на III стадии.

3. При пилотном исследовании состояния клеток крови у мышей с СД2 уже на I стадии отмечается снижение содержания эритроцитов, гемоглобина и лейкоцитов, которое сохраняется на II и III стадии. На II и особенно на III стадии наступает резкое повышение количества тромбоцитов и процентного содержания нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов, снижение лимфоцитов, а также повышение отношения нейтрофилы/лимфоциты, которое сви-

детельствуют о развитии системной воспалительной реакции.

4. В образцах костного мозга мышей *db/db* на I и II стадии сохраняется тенденция к поддержанию исходных значений живых и поврежденных клеток; на III стадии – отмечается снижение живых клеток до 30,4% и повышение поврежденных до 69,6%, преимущественно за счет клеток в состоянии апонекроза 44,7%.

5. По мере развития СД2 усиления глюкозотоксичности и снижения эффективности ОВП в организме возникает, усиливается и достигает критических значений – торможение процессов кроветворения, которое является следствием нарастающей гипоксии, прогрессирующего развития системной воспалительной реакции и свидетельствует о появлении в организме условий для возникновения макро- и микрососудистых осложнений, ускоряющих развитие состояния необратимости.

Литература

(п.п. 1–11; 13–25 см. References)

12. Степанова О.И., Клёсов Р.А., Семёнов Х.Х., Помыткин И.А., Онищенко Н.А., Каркищенко В.Н. Способ неинвазивного изучения тканевых нарушений при сахарном диабете 2 типа у мышей *db/db* с помощью лазерной доплеровской флуориметрии. *Патологическая физиология экспериментальная терапия*. 2023; 67(2): 118–29. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2023.02.118-129>

References

1. Artasensi A., Pedretti A., Vistoli G., Fumagalli L. Type 2 diabetes mellitus: A review of multi – target drugs. <https://doi.org/10.3390/molecules25081987>
2. Hossain T., Kundu S., Alam S.S., Nagarajan S. Epigenetic modifications associated with the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Endocr. metab. immune disord. drug targets*. 2019; 19(6): 775–86. <https://doi.org/10.2174/1871530319666190301145545>
3. Henning R.J. *Type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease Future Cardiol*. 2018 Nov; 14(6): 491–509. <https://doi.org/10.2217/fca-2018-0045>. Epub 2018 Nov 9
4. Hosseini M.S., Rostami Z., Saadat A., Saadatmand SM., Naemi E. Anemia and microvascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nephrourol Mon* 2014; 6: e19976.
5. Malandrino N., Wu W.C., Taveira T.H., Whitlatch H.B., Smith R.J. Association between red blood cell distribution width and macrovascular and microvascular complications in diabetes. *Diabetologia*. 2012; 55: 226–35.
6. Alamri B.N., Bahabri A., Alderehim A.A., Alabdujjabbar M., Alsubaie M.M., Alnaqeb D., et al. Hyperglycemia effect on red cells indices. *Eur. Rev. Med Pharmacol Sci*. 2019; 23: 2139–50. https://doi.org/10.26355/eurrev_201903_17259
7. Benites B.D., Gilli S.C., Saad S.T. Obesity and inflammation and the effect on the hematopoietic system. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2014; 36: 147–51.

8. Kojima H., Kim J., Chan L. Emerging roles of hematopoietic cells in the pathobiology of diabetic complications. *Trends Endocrinol Metab.* 2014; 25: 178-87.
9. Xie D., Zhao X., Chen M. Prevention and treatment strategies for type 2 diabetes based on regulating intestinal flora. *Biosci Trends*, 2021; 15(5): 313-20. <https://doi.org/10.5582/bst.2021.01275>. Epub 2021 Sep 26
10. Wu J., Yang K., Fan H., Wei M., Xiong Q. Targeting the gut microbiota and its metabolites for type 2 diabetes mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023; 14: 1114424. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1114424>. eCollection 2023
11. Ruze R., Liu T., Zou X., Chen J. S. Y., Xu R., Yin X., et al. Obesity and type 2 diabetes mellitus: connections in epidemiology, pathogenesis and treatments. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023; 14: 1161521. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1161521>. eCollection 2023
12. Stepanova O.I., Klesov R.A., Semenov Kh.Kh., Pomytkin I.A., Onishchenko N.A., Karkischenko V.N. A method for noninvasive studying tissue disorders in type 2 diabetes mellitus in db/db mice using laser Doppler flowmetry. *Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian journal.* 2023; 67(2): 118-29. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2023.02.118-129>
13. Amend S.R., Valkenburg K.C., Pienta K.J. Murine hind limb long bone dissection and bone marrow isolation. *J Vis Exp.* 2016; (110): 53936. <https://doi.org/10.3791/53936>. PMID: 27168390; PMCID: PMC4941920
14. Crowley L.C., Marfell B.J., Scott A.P., Waterhouse N.J. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016 Nov 1;2016(11). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087288>
15. Mazzanti L., Faloia E., Rabini R.A., Staffolani R., Kantar A., Fiorini R., et al. Diabetes mellitus induces red blood cell plasma membrane alterations possibly affecting the aging process. *Clin Biochem.* 1992; 25: 41-6.
16. Nada A.M. Red cell distribution width in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 2015; 8: 525-33.
17. Verma M., Paneri S., Badi P., Raman P.G. Effect of increasing duration of diabetes mellitus type 2 on glycated hemoglobin sensitivity. *Indian J. Clin. Biochem.* 2006; 21: 142-6.
18. Wang Z.S., Song Z.C., Bai J.H., Li F., Wu T., Qi J., Hu J. Red blood cell count as an indicator of microvascular complications in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus. *Vasc. Health Risk Manag.* 2013; 9: 237-43.
19. Kimura T., Kaneto H., Kanda-Kimura Y., Shimoda M., Kamei S., Anno T., et al. Seven-year observational study on the association between glycemic control and the new onset of macroangiopathy in Japanese subjects with type 2 diabetes. *Intern. J. Med.* 2016; 55: 1419-24. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.55.4952>
20. Sharif-Askari F.S., Sharif-Askari N.S., Guella A., Alabdullah A., Al Sheleh H.B., AlRawi A.M.H., et al. Blood Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Urine IL-8 Levels Predict the Type of Bacterial Urinary Tract Infection in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Infect Drug Resist.* 2020; 13: 1961-70. <https://doi.org/10.2147/IDR.S251966>. eCollection 2020
21. He J., Bian X., Song C., Zhang R., Yuan S., Yin D., Dou K. High neutrophil to lymphocyte ratio with type 2 diabetes mellitus predicts poor prognosis in patients undergoing percutaneous coronary intervention: a large-scale cohort study. *Cardiovasc Diabetol.* 2022; 21(1): 156. <https://doi.org/10.1186/s12933-022-01583-9>
22. He X., Qi S., Zhang X., Pan J. The relationship between the neutrophil-to-lymphocyte ratio and diabetic retinopathy in adults from the United States: results from the National Health and nutrition examination survey. *BMC Ophthalmol.* 2022; 22(1): 346. <https://doi.org/10.1186/s12886-022-02571-z>
23. Darwish N.M., Elnahas Y.M., Al Qahtany F.S. Diabetes induced renal complications by leukocyte activation of nuclear factor κ -B and its regulated genes expression. *Saudi J Biol Sci.* 2021; 28(1): 541-9. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.039>. Epub 2020 Oct 29
24. Arıcan G., Kahraman H.Ç., Özmeriç A., İltar S., Alemdaroğlu K.B. Monitoring the prognosis of diabetic foot ulcers: predictive value of neutrophil-to-lymphocyte ratio and red blood cell distribution width int. *J Low Extrem Wounds.* 2020; 19(4): 369-76. <https://doi.org/10.1177/1534734620904819>. Epub 2020 Feb 10
25. Tay H.M., Yeap W.H., Dalan R., Wong S.C., Hou H.W. Multiplexed label-free fractionation of peripheral blood mononuclear cells for identification of monocyte-platelet aggregates. *Anal Chem.* 2018; 90(24): 14535-42. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04415>

Сведения об авторах:

Степанова Ольга Ивановна, канд. биол. наук, зав. лаб. № 5, ФГБУН «НЦ биомедицинских технологий» ФМБА России, e-mail: olgsima50@mail.ru;

Клёсов Роман Алексеевич, науч. сотр., лаб. № 5, ФГБУН «НЦ биомедицинских технологий» ФМБА России, e-mail: klesrom@mail.ru;

Семёнов Хызыр Хысаевич, канд. биол. наук, зав. лаб. № 10, ФГБУН «НЦ биомедицинских технологий» ФМБА России;

Алчинова Ирина Борисовна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. физико-химической и экологической патофизиологии, ФГБНУ НИИОПП;

Черепов Антон Борисович, науч. сотр., лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

Метёлкин Аркадий Андреевич, мл. науч. сотр. отдела молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

Карганов Михаил Юрьевич, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр., лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

Онищенко Нина Андреевна, доктор мед. наук, проф., гл. специалист отд-ния подготовки научных и медицинских кадров ФГБУ «НМИЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России;

Никольская Алла Олеговна, канд. биол. наук, лаборант-исследователь, отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии, ФГБУ «НМИЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России;

Басок Юлия Борисовна, доктор мед. наук, зав. отделом биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «НМИЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России.