

УДК 616.43

Циркулирующие стволовые и прогениторные клетки как маркеры воспаления, регенерации эндотелия и прогноза развития сосудистых осложнений при метаболическом синдроме и сахарном диабете 1 и 2 типа

Першина О.В.¹, Пахомова А.В.¹, Ермакова Н.Н.¹, Рыбалкина О.Ю.¹, Крупин В.А.¹, Пан Э.С.¹, Ваизова О.Е.², Кравченко А.И.³, Самойлова Ю.Г.², Ротканк М.А.², Дыгай А.М.¹, Скурихин Е.Г.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук. 634028, Томск, пр. Ленина, д. 3

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 634050, Томск, Московский тракт, 2

³ ООО «Открытая лаборатория». 634009, Томск, ул. Карла Маркса, д. 15/1

Цель исследования состояла в выявлении информативных клеточных маркеров сосудистых осложнений, регенерации микрососудистой сети и воспаления в венозной крови здоровых волонтеров, больных с метаболическим синдромом, сахарным диабетом 1 и 2 типа. **Методы.** Обследованы больные с метаболическим синдромом (МС), диабетом 2 типа без осложнений, диабетом 1 типа средней степени тяжести и здоровые волонтеры. Диагноз пациентов подтвержден общеклиническими, биохимическими, коагулометрическими и иммуноферментными методами исследования, для оценки экспрессии антигенов использовался многопараметрический цитометрический анализ. **Результаты.** При анализе экспрессии маркеров показано изменение числа эндотелиальных клеток, мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в крови в зависимости от патологии. Эндотелиальные клетки миелоидного ($CD45^+CD14^+CD34^+CD309^+CD144^+CD31^+$) и немиелоидного ($CD45^+CD14^+CD34^+CD309^+CD144^+CD31^+$) происхождения, $CD309^+$ -эндотелиальные клетки и МСК ($CD44^+CD73^+CD90^+CD105^+$) предлагаются в качестве маркеров повреждения эндотелия при диабетической симптоматике. При этом ГСК ($CD45^+CD34^+$) могут выступать ценным диагностическим и прогностическим маркером воспаления. **Заключение.** Для подтверждения сосудистых повреждений и прогноза развития осложнений при диабете 1 и 2 типа в венозной крови пациентов целесообразно оценивать эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК) не костномозговой локализации ($CD31^+CD309^+CD144^+$) и костномозговой локализации ($CD34^+CD309^+$), и ЭПК с высоким регенеративным потенциалом ($CD45^+CD34^+CD31^+CD144^+$). Циркулирующие ЭПК, формирующие колонии *in vitro* ($CD45^+CD34^+CD31^+$), рекомендуется использовать в качестве дифференциального маркера состояния регенерации эндотелия при диабете 2 типа.

Ключевые слова: эндотелиальные прогениторные клетки, мезенхимальные стволовые клетки, гемопоэтические стволовые клетки, сахарный диабет, метаболический синдром, сосудистые осложнения.

Для цитирования: Першина О.В., Пахомова А.В., Ермакова Н.Н., Рыбалкина О.Ю., Крупин В.А., Пан Э.С., Ваизова О.Е., Кравченко А.И., Самойлова Ю.Г., Ротканк М.А., Дыгай А.М., Скурихин Е.Г. Циркулирующие стволовые и прогениторные клетки как маркеры воспаления, регенерации эндотелия и прогноза развития сосудистых осложнений при метаболическом синдроме и сахарном диабете 1 и 2 типа. Патогенез. 2018; 16(1): 58–67

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.01.58-67

Для корреспонденции: Першина Ольга Викторовна, e-mail: ovpershina@gmail.com

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 12.11.2017

Circulating stem and progenitor cells as markers of inflammation, endothelial regeneration, and prediction of vascular complications in metabolic syndrome and type 1 and 2 diabetes mellitus

Pershina O.V.¹, Pakhomova A.V.¹, Ermakova N.N.¹, Rybalkina O.Yu.¹, Krupin V.A.¹, Pan E.S.¹, Vaizova O.E.², Kravchenko A.I.³, Samoilova J.G.², Rotkang M.A.², Dygai A.M.¹, Skurikhin E.G.¹

¹ E.D. Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences, Prospekt Lenina 3, Tomsk 634028, Russian Federation

² Siberian State Medical University, Moskovskiy Tract 2, Tomsk 634050, Russian Federation

³ Open Laboratory Ltd, Karla Marksa Str. 15/1, Tomsk 634009, Russian Federation

The aim of this study was to identify mesenchymal stem cells (MSC), hematopoietic stem cells (HSC), mature endothelial cells, and endothelial progenitor cells (EPC) in the blood of healthy volunteers, patients with metabolic syndrome, and type 1 and 2 diabetes mellitus as new, informative cellular markers of vascular complications, endothelial regeneration, and inflammation. Methods. The diagnosis was confirmed by general clinical, biochemical, coagulometric and ELISA studies; multi-parameter cytometric assay was used for evaluation of antigen expression. **Results.** Changes in the count of MSC, HSC, mature endothelial cells, and endothelial progenitor cells in blood of patients with metabolic syndrome and type 1 and 2 diabetes depended on the type of pathology. We propose using endothelial cells of myeloid ($CD45^-CD14^+CD34^+CD309^+CD144^+CD31^+$) and non-myeloid origin ($CD45^-CD14^-CD34^+CD309^+CD144^+CD31^+$), $CD309^+$ -endothelial cells, and MSCs with the $CD44^+CD73^+CD90^+CD105^+$ phenotype as nonspecific markers of endothelial damage in presence of diabetic symptoms. Furthermore, HSCs ($CD45^+CD34^+$) can be used as a valuable diagnostic and prognostic marker of inflammation. **Conclusions.** It is relevant to evaluate EPCs of non-bone marrow localization ($CD31^+CD309^+CD144^+$) and bone marrow localization ($CD34^+CD309^+$) and EPCs with a high regenerative potential ($CD45^-CD34^+CD31^+CD144^+$) in the blood of patients with type 1 and 2 diabetes to confirm the presence of vascular damage and predict development of complications. Circulating, *in vitro* colony-forming EPCs ($CD45^-CD34^+CD31^+$) are recommended as a differential marker for inhibition of endothelial regeneration in type 2 diabetes.

Key words. Endothelial progenitor cells, mesenchymal stem cells, hematopoietic stem cells, diabetes, metabolic syndrome, vascular complications.

For citation: Pershina O.V., Pakhomova A.V., Ermakova N.N., Rybalkina O.Yu., Krupin V.A., Pan E.S., Vaizova O.E., Kravchenko A.I., Samoilova J.G., Rotkang M.A., Dygai A.M., Skurikhin E.G. [Circulating stem and progenitor cells as markers of inflammation, endothelial regeneration, and prediction of vascular complications in metabolic syndrome and type 1 and 2 diabetes mellitus]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2018; 16(1): 58–67 (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.01.58-67

For correspondence: Pershina Olga Viktorovna, e-mail: ovpershina@gmail.com

Funding. The study had no sponsorship.

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

Received: 12.11.2017

Введение

В последнее время большое внимание уделяется изучению стволовых и прогениторных клеток в крови в контексте, как здоровья, так и болезней. Обсуждается диагностическое значение определения циркулирующих в крови мезенхимальных стволовых клеток (МСК), гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), эндотелиальных клеток (ЭК) и эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) при различных заболеваниях [1–3]. Если для определения МСК и ГСК научное сообщество пришло к некоторому стандарту набора антигенов, то в типировании предшественников эндотелиальных клеток и зрелых эндотелиальных клеток консенсуса не наблюдается. Большинство авторов признается, что ЭК представляют собой гетерогенную группу. На настоящий момент по иммунофенотипу ЭК разделяют на две субпопуляции: эндотелиальные прогениторные клетки гемопоэтического и не гемопоэтического происхождения. [4]. В работе Мауг и соавторов (2011) обозначены циркулирующие клетки-предшественники, так называемые «side population cells», и циркулирующие зрелые эндотелиальные клетки, которые определяются на поверхности стенок сосудов [5]. Для каждой из популяции характерен специфический поверхностный профиль антигенов и функции. В частности, ЭК гемопоэтического происхождения позитивны по CD34, CD309 и CD133 маркерам, ЭК миелоидного происхождения, помимо известных эндотелиальных маркеров, могут экспрессировать маркер CD14. CD31 известен как молекула адгезии, и в комбинации с другими маркерами идентифицирован не только на циркулирующих ЭК, но и ЭПК. CD144, который также называют сосудистым эндотелиальным кадерином, преимущественно экспрессируется на ЭК, хотя обнаруживается и на так называемых поздних ЭПК [6]. Таким образом, в настоящий

момент нет никаких однозначных выводов относительно маркеров зрелых и не зрелых эндотелиальных клеток.

Сосудистые осложнения у больных с сахарным диабетом (СД) связаны со снижением числа и нарушением функциональных особенностей циркулирующих эндотелиальных клеток [7]. Существует мнение, что некоторые подтипы эндотелиальных прогениторных клеток (такие, как $CD34^+CD31^+CD133^+CD309^+$) могут выступать в качестве маркеров для диагностики нарушения эндотелия и прогнозирования сосудистых осложнений при метаболическом синдроме и диабете [8]. В то же время, методов клинической диагностики, позволяющих оценить выраженность тканевой травмы, дать прогноз развития заболевания и оценку регенеративного потенциала подвергнутых травме специализированных клеток, нет. Потенциальными маркерами патологии могут быть стволовые и прогениторные клетки. Так, известно, что ГСК поддерживают воспаление [9, 10], МСК участвуют в фибропластическом процессе, обладают противовоспалительной активностью [11]. Эндотелиальные прогениторные клетки рассматриваются как потенциальные биомаркеры регенерации эндотелия [11]. Из этических соображений невозможно провести анализ маркеров сосудистых нарушений у пациента с метаболическим синдромом, после чего ожидать формирование диабета и развития осложнений, и вновь оценить экспрессию антигенов. Как правило, пациент обращается к врачу с уже с конкретным заболеванием. В связи с этим мы сформировали группы пациентов таким образом, чтобы в одном исследовании такую картину было возможно смоделировать.

В связи с вышеизложенным, целью исследования было выявление информативных клеточных маркеров сосудистых осложнений, регенерации микрососудистой сети и воспаления в венозной крови больных с метаболическим синдромом, сахарным диабетом 1 и 2 типа.

Материалы и методы исследования

В настоящем клиническом исследовании проанализированы стволовые и прогениторные клетки венозной крови больных с метаболическим синдромом (МС), сахарным диабетом 2 типа (СД2) без осложнений, сахарным диабетом 1 типа (СД1) и здоровых волонтеров. Критериями включения явились: мужчины и женщины 55—75 лет с индексом массы тела выше 25 кг/м^2 для больных с диабетом 2 типа без осложнений, мужчины и женщины 20—25 лет с верифицированным диагнозом диабет 1 типа средней степени тяжести (табл. 1). Критериями исключения являлись: острые инфекционно-воспалительные заболевания, онкологические заболевания в анамнезе в течение последних 5 лет, беременность и лактация. Исследование было поисковым, поэтому включало ограниченное количество лиц.

Всем группам был проведен общепринятый комплекс клинико-лабораторных, биохимических, иммуноферментных методов обследования пациентов для подтверждения диагноза МС, СД 2 и СД 1.

Научно-исследовательская работа проведена в соответствии с Хельсинской декларацией, «Рекомендациями для врачей, занимающихся биомедицинскими исследованиями с участием людей» Всемирной медицинской ассоциации. Протокол исследования одобрен комитетом по биоэтике ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России (протокол №5084/1 от 26.12.2016). До начала исследования обследованные подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование было поисковым, поэтому включало ограниченное количество пациентов.

Фракцию мононуклеаров получали из венозной крови волонтеров и пациентов центрифугированием с использованием набора для выделения клеток Lympholyte-N (Плотность приблизительно $1,077 \text{ г/мл}$, CEDARLANE, Netherlands), далее в градиенте плотности выделяли клеточную фракцию, обогащенную мононуклеарами. Затем полученные клетки отмывали центрифугированием при 1500 об/мин средой 199 («Sigma», США). Надосадочную жидкость заменяли средой RPMI-1640 («Sigma», США), содержащей 5% ЭТС («Sigma», США), производили подсчет общего количества клеток. Далее проводили исследование экспрессии мембранных рецепторов мононуклеаров с использованием проточного цитофлуориметра FACS Canto II с программным обеспечением FACS Diva («BD Biosciences», США).

Для определения ГСК использовали антитела к антигену дифференцировки 45 и антитела к антигену дифференцировки 34 (CD45-FITC/CD34-PE) (Becton Dickinson, США). Для этого полученную фракцию мононуклеаров разделяли на аликвоты по 1×10^6 клеток в 50 мкл среды и

окрашивали антителами к поверхностным маркерам CD45 FITC (изотиоцианат флуоресцеина) и CD34 PE (фикоэритрин) согласно инструкции производителя.

Экспрессия мембранных рецепторов мезенхимальных стволовых клеток венозной крови анализировали с использованием набора для определения МСК производства Becton Dickinson (США). Полученную фракцию мононуклеаров разделяли на аликвоты по 1×10^6 клеток в 100 мкл среды и окрашивали антителами к поверхностным маркерам — коктейль антител, меченых PE: CD34 (клон 581), CD11b (клон ICRF44), CD19 (клон H1B19), CD45 (клон H130), HLA-DR (клон G46-6); CD90, меченый FITC (клон 5E10); CD105, меченый PerCP-Cy5.5 (клон 266); CD73, меченый APC (клон AD2); CD44, меченый PE, согласно инструкции производителя. При проведении анализа формировали следующие контрольные группы изотипов: изотипический контроль коктейля антител mIgG1, к FITC (клон X40), mIgG1, к PerCP-Cy5.5 (клон X40), mIgG1, к APC (клон X40); изотипический контроль IgG2b, меченый PE.

Для идентификации эндотелиальных прогениторных клеток и зрелых эндотелиальных клеток фракцию мононуклеаров разделяли на аликвоты по 1×10^6 клеток в 100 мкл среды и окрашивали антителами к поверхностным маркерам: CD34, меченые фикоэритрином-Сай7 (CD34 PE-Cy7), CD45RA, меченые АФЦ-Аш7 (CD45RA APC-H7), CD309 (VEGFR-2), меченные ФЭ (CD309(PE)), CD144, меченые ПерСП-Сай5.5 (CD144 PerCP-Cy5.5), CD14, меченые АФЦ(CD14 APC), CD31, меченые ФИТЦ (CD31 FITC), согласно инструкции производителя. При этом использовали следующие контрольные группы изотипов: изотипический контроль IgG1 PE Cy7, изотипический контроль IgG2b APC-H7, изотипический контроль IgG2b APC, изотипический контроль IgG1 PERCP-CY5.5, изотипический контроль IgG1 FITC, изотипический контроль IgG2a, PE.

Иммунофенотип зрелых клеток, стволовых и прогениторных клеток, исследованных в венозной крови у здоровых волонтеров и больных СД 1, СД 2, МС представлен в табл. 3.

Полученные данные проверяли на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро—Уилка. По результатам проверки статистическую обработку проводили с использованием непараметрических методов (Манна—Уитни и Вилкоксона) при помощи компьютерной программы Statistica 7.0 (StatSoft). Различия группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Оценка взаимосвязи количественных и порядковых признаков проведена при помощи корреляционного анализа (непараметрический коэффициент корреляции Спирмена).

Таблица 1

Общая характеристика волонтеров и больных, включенных в клиническое исследование

Критерии	Здоровые волонтеры (n = 11)	Больные с СД 1 (n = 10)	Больные с СД 2 (n = 7)	Больные с МС (n = 7)
Возраст, год	24,85 ± 1,39	23,14 ± 2,15	62,43 ± 5,58 *	60,14 ± 3,60*
Рост, м	1,78 ± 0,03	1,70 ± 0,06	1,68 ± 0,02	1,60 ± 0,03
Вес, кг	76,89 ± 4,13	78,90 ± 1,43	97,43 ± 7,20 *	102,86 ± 4,89 *
Индекс массы тела, кг/м ²	24,10 ± 1,02	27,30 ± 2,80	34,19 ± 2,06 *	37,92 ± 2,85 *

Примечание. * достоверность различия с группой волонтеров ($p < 0,05$)

Результаты исследования и обсуждение

Результаты общепринятого комплекса клинико-лабораторных, биохимических, иммуноферментных методов обследования пациентов для подтверждения диагноза СД1, СД2 и МС представлены в табл. 2. У больных СД1, СД2 и МС наблюдался повышенный уровень глюкозы, у больных с СД2 и МС оказался сниженным уровень инсулина в крови.

По природе, экспрессии поверхностных антигенов, свойствам и тканевой принадлежности эндотелиальные клетки представляют собой гетерогенную группу. На первом этапе мы оценили два таких известных маркера эндотелиальных клеток как CD31 (белок межклеточных контактов эндотелиальных клеток) и CD309 (рецептор фактора роста эндотелия сосудов — vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2). Нами не выявлены различия

в содержании CD31⁺-клеток между волонтерами и пациентами с МС, СД1 и СД2 (табл. 3). Между тем, у всех обследованных больных количество CD309⁺-клеток снижалось в несколько раз по сравнению с волонтерами, при этом в группах с СД1 и СД2 выраженность эффекта преобладала над таковой в группе с МС (рис. 1, А, Б, табл. 3).

Таким образом, циркулирующие эндотелиальные клетки позитивные по CD309, но не по CD31, могут являться потенциальным диагностическим маркером сосудистых нарушений. Прослеживается определенная зависимость эффекта от тяжести заболевания, что указывает на перспективность использования маркера сосудистого развития и регуляции сосудистой проницаемости CD309 в качестве предиктора выраженности сосудистых осложнений. Как известно, выраженность сосудистых нарушений при СД1 значительно больше, чем при метаболическом синдроме и диабете 2 типа [12].

Таблица 2

Биохимические показатели в сыворотке крови волонтеров и пациентов, включенных в клиническое исследование

Критерии	Здоровые волонтеры (n = 11)	Больные с СД 1 (n = 10)	Больные с СД 2 (n = 7)	Больные с МС (n = 7)
Глюкоза (ммоль/л)	5,36 ± 0,23	11,06 ± 2,09 *	9,17 ± 0,89 *	6,57 ± 0,19 *
Инсулин (мкМЕ/мл)	14,03 ± 4,97	15,53 ± 1,79	7,81 ± 0,55 *	9,59 ± 1,27 *
Проинсулин (пмоль/л)	4,22 ± 0,28	4,43 ± 0,52	4,77 ± 0,25	3,23 ± 0,27

Примечание. * достоверность различия с группой волонтеров (p < 0,05).

Таблица 3

Содержание стволовых и прогениторных клеток в венозной крови волонтеров и больных с метаболическим синдромом и диабетом (% от меченных мононуклеаров) (M ± m)

Клетки / иммунофенотип	Волонтеры (n = 11)	Пациенты с СД 1 (n = 10)	Пациенты с СД 2 (n = 7)	Пациенты с МС (n = 7)
Популяция циркулирующих эндотелиальных клеток, моноцитов, некоторых популяций лимфоцитов (CD31 ⁺)	72,9 ± 8,36	81,13 ± 4,59	78,78 ± 3,87	78,15 ± 2,68
Преимущественно зрелые эндотелиальные клетки, экспрессирующие сигнал фактора роста эндотелия сосудов VEGFR-2 (CD309 ⁺)	0,59 ± 0,19	0,18 ± 0,03 *	0,15 ± 0,03 *	0,24 ± 0,04 *
Эндотелиальные клетки не костномозговой локализации (CD31 ⁺ CD309 ⁺ CD144 ⁺)	0,39 ± 0,16	0,13 ± 0,04 *	0,17 ± 0,03 *	0,90 ± 0,58
Популяция ГСК и эндотелиальных зрелых и незрелых клеток (CD34 ⁺)	3,33 ± 0,89	16,59 ± 4,31 *	0,95 ± 0,09 *	1,17 ± 0,25 *
Гемопоэтические стволовые клетки (CD45 ⁺ CD34 ⁺)	0,10 ± 0,02	0,30 ± 0,04 *	0,24 ± 0,03 *	0,66 ± 0,09 *
Незрелые и зрелые эндотелиальные клетки костномозговой локализации (CD34 ⁺ CD309 ⁺)	12,13 ± 4,39	1,89 ± 0,89*	6,14 ± 0,97 *	12,37 ± 4,23
Циркулирующие эндотелиальные прогениторные клетки, формирующие колонии <i>in vitro</i> (CD45-CD34 ⁺ CD31 ⁺)	1,22 ± 0,23	1,22 ± 0,40	0,35 ± 0,07 *	1,42 ± 0,38
Циркулирующие эндотелиальные прогениторные клетки с высоким регенеративным потенциалом (CD45-CD34 ⁺ CD31 ⁺ CD144 ⁺)	0,55 ± 0,24	0,06 ± 0,03	0,03 ± 0,01 *	0,31 ± 0,09
Эндотелиальные клетки немиелоидного происхождения / (CD45-CD14-CD34 ⁺ CD309 ⁺ CD144 ⁺ CD31 ⁺)	0,16 ± 0,04	0,01 ± 0,00 *	0,01 ± 0,00 *	0,05 ± 0,01 *
Эндотелиальные клетки миелоидного происхождения (CD45-CD14 ⁺ CD34 ⁺ CD309 ⁺ CD144 ⁺ CD31 ⁺)	0,12 ± 0,03	0,01 ± 0,004 *	0,01 ± 0,005 *	0,03 ± 0,004 *
Мезенхимальные стволовые клетки (CD34,CD11b,CD19,CD45, HLA-DR) ⁺ (CD73,CD90,CD105) ⁺	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Популяция мезенхимальных стволовых и эндотелиальных клеток (CD44 ⁺ CD73 ⁺ CD90 ⁺ CD105 ⁺)	0,16 ± 0,03	0,07 ± 0,01 *	0,05 ± 0,008 *	0,01 ± 0,003 *

Примечание. * достоверность различия с группой волонтеров (p < 0,05).

Помимо эндотелиальных клеток, CD31 экспрессируется на поверхности моноцитов и лимфоцитов. В целях исключения клеток воспаления из общей фракции CD31⁺-клеток в линейку антигенов мы ввели маркер CD144 (альтернативное название VE-Cadherin, Cadherin-5) и CD309. Маркер CD309 экспрессируется не только на поверхности эндотелиальных клеток, но и выступает мембранным антигеном стволовых клеток и прогениторных клеток [13]. Есть мнение, что предложенная для исследования линейка антигенов характеризует ЭПК не костномозговой локализации [13]. По нашим данным, фракция CD31⁺CD309⁺CD144⁺-клеток в крови пациентов с СД1 и СД2 достоверно уменьшалась на 66% и 56% соответственно, у пациентов с МС, напротив, наблюдалось значительное увеличение их числа (в 2,3 раза; $p < 0,05$) (табл. 3). Ранее нами было продемонстрировано накопление CD31⁺-клеток

в травмированных тканях животных при моделировании метаболических нарушений [14]. Не исключено, что у пациентов с МС одновременно с мобилизацией в кровь ЭПК с фенотипом CD31⁺CD309⁺CD144⁺ мигрируют в травмированную ткань и регенерируют эндотелий.

Молекула межклеточной адгезии CD34 представляет собой примитивный маркер гемопоэтических клеток, опосредует связывание стволовых клеток с внеклеточным матриксом костного мозга или напрямую со стромальными клетками. В нашей работе мы выявили накопление CD34⁺-клеток в крови пациентов с СД1 и сокращение их у больных с СД2 и метаболическим синдромом (табл. 3). Выявленное увеличение количества циркулирующих CD34⁺-клеток может быть связано с ГСК. Однако фенотип ГСК не ограничивается одним маркером. Как правило, для оценки ГСК в общей фракции CD34⁺-клеток до-

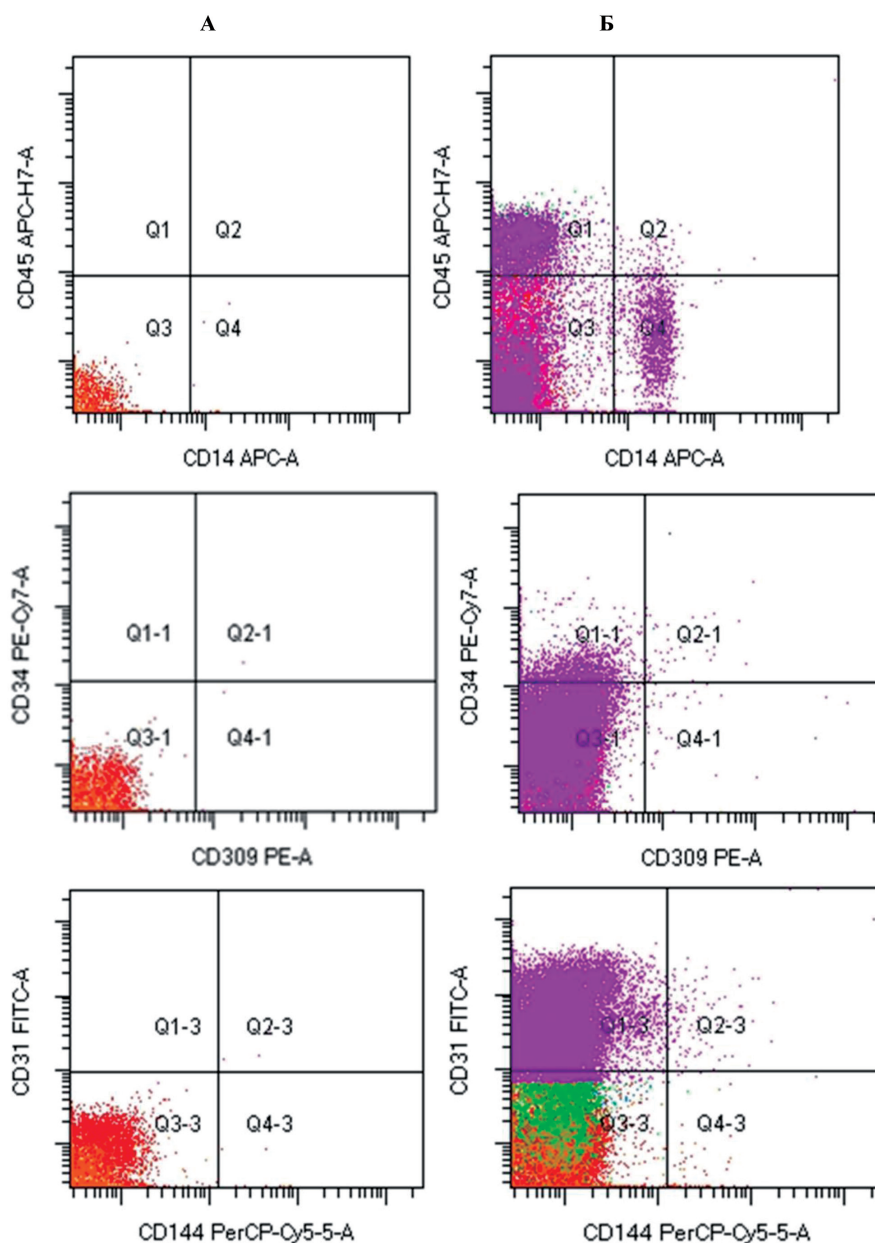


Рис. 1. Данные анализа количественной и качественной экспрессии эндотелиальных прогениторных клеток, полученные с помощью проточной цитометрии, на мононуклеарах, выделенных из венозной крови здорового волонтера.

А — изотипический контроль для эндотелиальных прогениторных клеток;

Б — подтверждение фенотипа и качественный анализ экспрессии CD45/CD14, CD34/CD309 и CD31/CD144 на двумерных диаграммах.

полнительно оценивается экспрессия пан гемопоэтического маркера CD45 [15]. По нашим данным, число циркулирующих CD45⁺CD34⁻ГСК у больных всех нозологий возрастало: в группе пациентов с МС в 6,6 раза, с СД1 в 3 раза, с СД2 — в 2,4 раза (рис. 2, табл. 3). Есть мнение,

что ГСК участвуют в воспалительных процессах, дифференцируясь в клетки миелоидного или лимфоидного ряда в зависимости от характера воспаления и фактора его провоцирующего, с другой стороны, мобилизуясь в кровь мигрируют в травмированный участок ткани, где поддер-

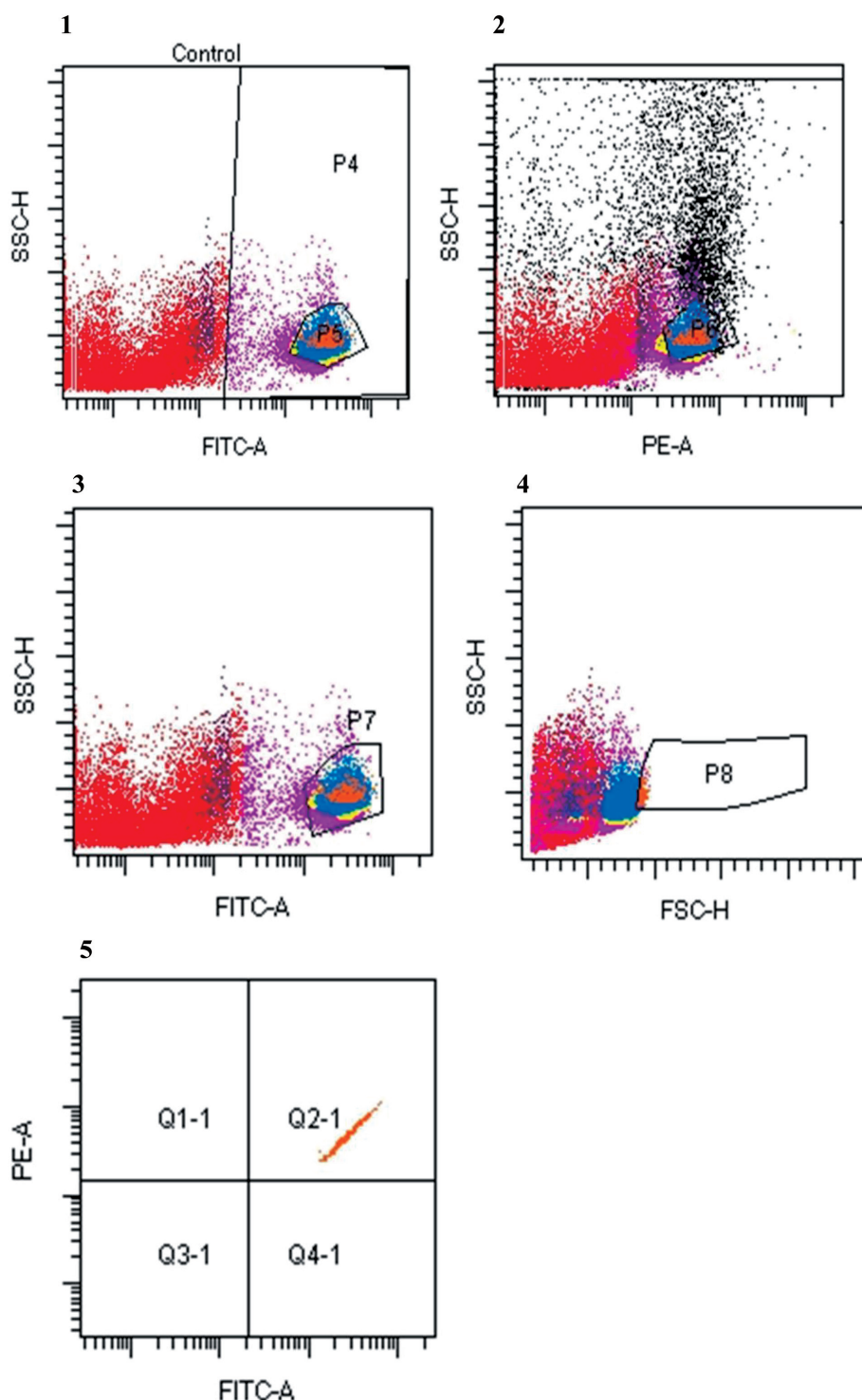


Рис. 2. Данные анализа количественной и качественной экспрессии гемопоэтических стволовых клеток, полученные с помощью проточной цитометрии, на мононуклеарах, выделенных из венозной крови здорового волонтера: дот-плоты количественной и качественной экспрессии и стратегия гейтирования для определения гемопоэтических стволовых клеток с помощью проточной цитометрии.

1 — на двухмерной гистограмме SSC-H/FITC гейт R4 ограничивает лейкоциты CD45⁺, гейт R5 убирает двойные позитивные события;

2 — на двухмерной гистограмме SSC-H/PE гейт R6 ограничивает CD34⁺ события из R5;

3 — на двухмерной гистограмме SSC-H/FITC гейт R7 ограничивает события с высоким уровнем экспрессии CD45⁺ из R6;

4 — обратное гейтирование CD45⁺CD34⁺ на гистограмму FSC/SSC подтверждает их принадлежность к области лимфоцитов, гейт R8, 5). Анализ CD45⁺ против CD34⁺ от всех событий.

живают воспаление паракринно [9, 10]. Исходя из этого, циркулирующие ГСК при диабете и МС, по всей видимости, указывают на воспаление.

Фракция CD34⁺-клеток содержит приблизительно 80% ГСК, около 15% ЭПК и зрелых эндотелиальных клеток, и небольшое количество предшественников других линий [16]. Сочетание маркера стволовости CD34 и эндотелиального CD309 позволило оценить популяцию циркулирующих ЭПК костного мозга и клеток стенок кровеносных сосудов у больных и волонтеров [16]. Так, у пациентов с инсулинозависимым диабетом количество ЭПК с иммунофенотипом CD34⁺CD309⁺ уменьшалось (табл. 3). Подобная реакция, но менее выраженная, наблюдалась при СД2 типа. Между тем, различий в содержании CD34⁺CD309⁺-клеток в венозной крови у больных с МС и волонтеров не обнаружено.

Таким образом, ЭПК с фенотипом CD34⁺CD309⁺, подобно CD31⁺CD309⁺CD144⁺-эндотелиальным прогениторным клеткам, могут выступить маркером нарушений регенерации эндотелия при диабете. Ингибция ЭПК вызвана противовоспалительной активностью ГСК, что подтверждается высокими значениями коэффициентов корреляции между этими двумя популяциями клеток у пациентов с СД1.

В некоторых работах указывают на целесообразность изучения эндотелиальных прогениторных клеток во фракции циркулирующих клеток, не экспрессирующих CD45. Так, CD45⁻CD34⁺CD31⁺-клетки способны формировать колонии *in vitro*, CD45⁻CD34⁺CD31⁺CD144⁺-клетки демонстрируют высокий регенеративный потенциал [17]. Резуль-

таты проведенных цитометрических исследований свидетельствовали о снижении уровня CD34⁺CD31⁺-ЭПК и CD45⁻CD34⁺CD31⁺CD144⁺-ЭПК в крови пациентов с СД2, в группе СД1 было обнаружено избирательное уменьшение числа ЭПК с высоким регенеративным потенциалом (табл. 3). В ряде случаев в дополнение к CD45 и эндотелиальным маркерам анализируют экспрессию антигена гранулоцитов и макрофагов / моноцитов CD14 (LPS-Receptor). Введение в линейку маркеров CD14 позволило нам разделить эндотелиальные клетки по природе: миелоидные (CD45⁻CD14⁺CD34⁺CD309⁺CD144⁺CD31⁺) и немиелоидные (CD45⁻CD14⁻CD34⁺CD309⁺CD144⁺CD31⁺ и CD45⁻CD14⁻CD34⁺CD309⁺) [4]. Так, у пациентов с СД1, СД2 и МС отмечалось уменьшение числа циркулирующих эндотелиальных клеток миелоидного и немиелоидного происхождения по сравнению с волонтерами (табл. 3). Эти данные во многом повторяют уже известные результаты клинических исследований [18] и позволяют судить о сосудистых осложнениях при диабете по результатам оценки ЭПК с фенотипом CD45⁻CD34⁺CD31⁺CD144⁺.

По современным представлениям, МСК улучшают эндотелиальные функции [19] и стимулируют эндогенные прогениторные клетки. Эффекты связаны с паракринной активностью МСК. Ряд исследователей акцентирует внимание на способности МСК дифференцироваться в эндотелиальные клетки [19]. При этом считается, что потенциалом дифференцироваться в эндотелиальные клетки обладают костномозговые МСК [20]. Необходимость оценки МСК в клинической практике дополнительно основывается на обозначенных ранее антифиброзных,

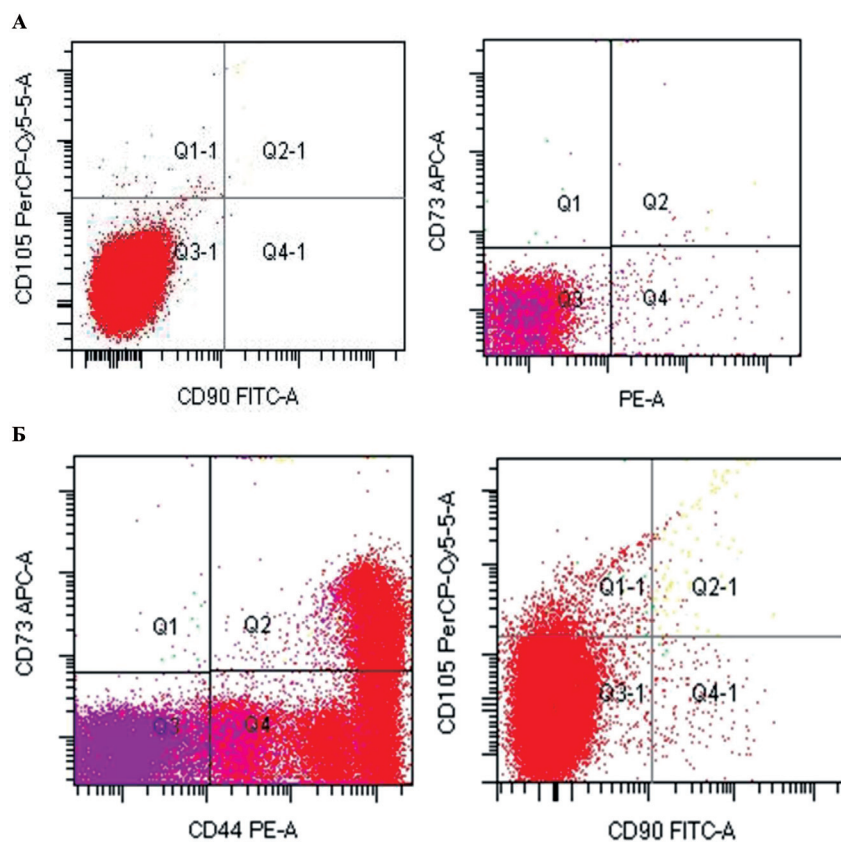


Рис. 3. Данные анализа количественной и качественной экспрессии мезенхимальных стволовых клеток полученные с помощью проточной цитометрии, на мононуклеарах, выделенных из венозной крови здорового волонтера. А — изотипический контроль для мезенхимальных стволовых клеток; Б — подтверждение фенотипа и качественный анализ экспрессии CD44/CD73 и CD90/CD105 на двухмерных диаграммах.

противовоспалительных и проангиогенных свойствах МСК [19, 20]. Изучение антигенов мезенхимальных клеток в настоящем исследовании не выявило достоверных различий в содержании МСК с фенотипом (CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR)⁻ (CD73, CD90, CD105)⁺ у больных всех групп и здоровых волонтеров (табл. 3). В то же время количество МСК с фенотипом CD44⁺CD73⁺CD90⁺CD105⁺ у больных всех групп достоверно снижалось, наиболее выражено в группе с метаболическим синдромом (более чем на 93% относительно группы здоровых волонтеров) (рис. 3, табл. 3).

Итак, изучение поверхностных антигенов мезенхимальных, эндотелиальных и гемопоэтических предшественников позволило нам предложить новые прогностические маркеры, отражающие воспаление, эндотелиальные дисфункции/нарушения эндотелия для больных МС, СД2 и СД1. Так, эндотелиальные клетки немиелоидного (CD45⁻CD14⁻CD34⁺CD309⁺CD144⁺CD31⁺) и миелоидного происхождения (CD45⁺CD14⁺CD34⁺CD309⁺CD144⁺CD31⁺), а также CD309⁺-эндотелиальные клетки возможно использовать в качестве неспецифических маркеров эндотелиального повреждения. При этом для более точного прогноза сосудистых осложнений целесообразно исследовать МСК с фенотипом CD44⁺CD73⁺CD90⁺CD105⁺, так как эти клетки необходимы для регенерации эндотелия [20]. Оценка ГСК (CD45⁺CD34⁺) может выступать ценным диагностическим и прогностическим маркером воспаления. Циркулирующие эндотелиальные прогениторные клетки с такими фенотипами, как CD31⁺CD309⁺CD144⁺ (не костномозговой локализации), CD34⁺CD309⁺ (костномозговой локализации), CD45⁻CD34⁺CD31⁺CD144⁺ (с высоким регенеративным потенциалом) предлагаются нами в качестве дополнительного критерия «закрепления» сосудистых повреждений и прогноза развития осложнений при СД1 и СД2. При этом эндотелиальные прогениторные клетки, формирующие колонии *in vitro*, можно использовать в качестве дифференциального маркера состояния регенерации эндотелия при диабете 2 типа.

Выводы

1. Для оценки риска развития сосудистых осложнений и прогноза течения заболевания у пациентов с метаболическим синдромом, сахарным диабетом 1 и 2 типа с поврежденным эндотелием целесообразно одновременно оценивать ГСК (CD45⁺CD34⁺), МСК (CD44⁺CD73⁺CD90⁺CD105⁺), CD309⁺-эндотелиальные клетки и эндотелиальные клетки немиелоидного происхождения (CD45⁻CD14⁻CD34⁺CD309⁺CD144⁺CD31⁺) и миелоидного происхождения (CD45⁺CD14⁺CD34⁺CD309⁺CD144⁺CD31⁺) в венозной крови.

2. Циркулирующие эндотелиальные прогениторные клетки не костномозговой локализации (CD31⁺CD309⁺CD144⁺) и костномозговой локализации (CD34⁺CD309⁺), с высоким регенеративным потенциалом (CD45⁻CD34⁺CD31⁺CD144⁺) и клональной активностью (CD45⁻CD34⁺CD31⁺) можно рассматривать как возможные маркеры регенерации эндотелия для прогностического анализа течения заболеваний, при снижении их уровня принимать своевременные лечебные меры для стимуляции регенерации эндотелия.

Список литературы

1. Hamou C., Callaghan M.J., Thangarajah H., Chang E., Chang E.I., Grogan R.H., Paterno J., Vial I.N., Jazayeri L., Gurtner G.C. Mesenchymal stem cells can participate in ischemic neovascularization. *Plast. Reconstr. Surg.* 2009; 123(Suppl. 2): 45-55. DOI: 10.1097/PRS.0b013e318191be4a
2. Tepper O.M., Capla J.M., Galiano R.D., Ceradini D.J., Callaghan M.J., Kleinman M.E., Gurtner G.C. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood.* 2005; 105(3): 1068-1077. DOI: 10.1182/blood-2004-03-1051
3. Kucia, M.J., Wysoczynski M., Wu W., Zuba-Surma E.K., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. Evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood. *Stem Cells.* 2008; 26(8): 2083-2092. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0922
4. Asahara T., Kawamoto A., Masuda H. Concise review: circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Stem Cells.* 2011; 29(11): 1650-1655. DOI: 10.1002/stem.745
5. Mayr M., Niederseer D., Niebauer J. From bench to bedside: what physicians need to know about endothelial progenitor cells. *Am. J. Med.* 2011; 124: 489-497. DOI: 10.1016/j.amjmed.2011.01.015
6. Piatkowski A., Grieb G., Simons D., Jurgen B., van der Hulst R.R. Endothelial Progenitor Cells Potential — New Avenues to Improve Neoangiogenesis and Reendothelialization. *International Review of Cell and Molecular Biology.* 2013; 306: 43-81. DOI.org/10.1016/B978-0-12-407694-5.00002-X.
7. Ambasta R.K., Kohli H., Kumar P. Multiple therapeutic effect of endothelial progenitor cell regulated by drugs in diabetes and diabetes related disorder. *J. Transl Med.* 2017; 15(1): 185. DOI: 10.1186/s12967-017-1280-y
8. Blann A.D., Woywodt A., Bertolini F., Bull T.M., Buyon J.P., Clancy R.M., Haubitz M., Heibel R.P., Lip G.Y., Mancuso P., Sampol J., Solovey A., Dignat-George F. Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemost.* 2005; 93: 228-235. DOI: 10.1160/TH04-09-0578
9. Jaiswal S., Jamieson C.H., Pang W.W. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell.* 2009; 138(2): 271-285. DOI: 10.1016/j.cell.2009.05.046
10. Scumpia P.O., Kelly-Scumpia K.M., Delano M.J., Weinstein J.S., Cuenca A.G., Al-Quran S. Cutting edge: bacterial infection induces hematopoietic stem and progenitor cell expansion in the absence of TLR signaling. *J. Immunol.* 2010; 184(5): 2247-2251. DOI: 10.4049/jimmunol.0903652
11. Abebe W., Mozaffari M. Endothelial dysfunction in diabetes: potential application of circulating markers as advanced diagnostic and prognostic tools. *EPMA J.* 2010; 1: 32-45. DOI: 10.1007/s13167-010-0012-7
12. Shibuyaa M., Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Experimental Cell Research.* 2006; 312: 549-560. DOI: 10.1016/j.yexcr.2005.11.012
13. Sandhu K., Mamas M., Butler R. Endothelial progenitor cells: Exploring the pleiotropic effects of statins. *World J. Cardiol.* 2017; 9(1): 1-13. DOI: 10.4330/wjc.v9.i1.1
14. Скурихин Е.Г., Пахомова А.В., Першина О.В., Ермолаева Л.А., Крупин В.А., Ермакова Н.Н., Пан Э.С., Кудряшова А.И., Рыбалкина О.Ю., Павловская Т.Б., Литвяков Н.В., Гольдберг В.Е., Дыгай А.М. Регенераторный потенциал сперматогонных стволовых клеток, эндотелиальных и эпителиальных прекурсоров мышей линии C57Bl/6 с метаболическими нарушениями. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2017; 163(2): 204-210. DOI: 10.1007/s10517-017-3775-1
15. Whitby A., Whitby L., Fletcher M., Reilly JT, Sutherland DR, Keeney M, Barnett D. ISHAGE protocol: Are we doing it correctly? *Cytometry Part B.* 2012; 82: 9-17. DOI: 10.1002/cyto.b.20612
16. Fadini G.P., Losordo D., Dimmeler S. Critical re-evaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ. Res.* 2012; 110(4): 624-637. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243386
17. Van Craenenbroeck E.M., Van Craenenbroeck A.H., van Ierssel S., Bruyndonckx L., Hoymans V.Y., Vrints C.J., Conraads V.M. Quantification of circulating CD34⁺/KDR⁺/CD45dim endothelial progenitor cells: analytical considerations. *Int. J. Cardiol.* 2013; 167: 1688-1695. DOI: 10.1016/j.ijcard.2012.10.047

18. Ye L., Poh K.K. Enhancing endothelial progenitor cell for clinical use. *World J Stem Cells*. 2015; 7(6): 894-898. DOI: 10.4252/wjsc.v7.i6.894

19. Premer C., Blum A., Bellio M.A., Schulman I.H., Hurwitz B.E., Parker M. Dermarkarian CR, DiFede DL, Balkan W, Khan A, Hare JM. Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Restore Endothelial Function in Heart Failure by Stimulating Endothelial Progenitor Cells. *EBioMedicine*. 2015; 2: 467-475 DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.03.020

20. Chen M-Y., Lie P-C., Li Z-H., Wei X. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology*. 2009; 37: 629-640. DOI: 10.1016/j.exphem.2009.02.003

References

1. Hamou C., Callaghan M.J., Thangarajah H., Chang E., Chang E.I., Grogan R.H., Paterno J., Vial I.N., Jazayeri L., Gurtner G.C. Mesenchymal stem cells can participate in ischemic neovascularization. *Plast. Reconstr. Surg*. 2009; 123(Suppl. 2): 45-55. DOI: 10.1097/PRS.0b013e318191be4a

2. Tepper O.M., Capla J.M., Galiano R.D., Ceradini D.J., Callaghan M.J., Kleinman M.E., Gurtner G.C. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood*. 2005; 105(3): 1068-1077. DOI: 10.1182/blood-2004-03-1051

3. Kucia, M.J., Wysoczynski M., Wu W., Zuba-Surma E.K., Rajtaczak J., Ratajczak M.Z. Evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood. *Stem Cells*. 2008; 26(8): 2083-2092. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0922

4. Asahara T., Kawamoto A., Masuda H. Concise review: circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Stem Cells*. 2011; 29 (11): 1650-1655. DOI: 10.1002/stem.745

5. Mayr M., Niederseer D., Niebauer J. From bench to bedside: what physicians need to know about endothelial progenitor cells. *Am. J. Med*. 2011; 124: 489-497. DOI: 10.1016/j.amjmed.2011.01.015

6. Piatkowski A., Grieb G., Simons D., Jurgen B., van der Hulst R.R. Endothelial Progenitor Cells Potential — New Avenues to Improve Neovascularization and Reendothelialization. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2013; 306: 43-81. DOI: 10.1016/B978-0-12-407694-5.00002-X.

7. Ambasta R.K., Kohli H., Kumar P. Multiple therapeutic effect of endothelial progenitor cell regulated by drugs in diabetes and diabetes related disorder. *J. Transl Med*. 2017; 15(1): 185. DOI: 10.1186/s12967-017-1280-y

8. Blann A.D., Woywodt A., Bertolini F., Bull T.M., Buyon J.P., Clancy R.M., Haubitz M., Heibel R.P., Lip G.Y., Mancuso P., Sampol J., Solovey A., Dignat-George F. Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemost*. 2005; 93: 228-235. DOI: 10.1160/TH04-09-0578

9. Jaiswal S., Jamieson C.H., Pang W.W. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell*. 2009; 138(2): 271-285. DOI: 10.1016/j.cell.2009.05.046

10. Scumpia P.O., Kelly-Scumpia K.M., Delano M.J., Weinstein J.S., Cuenca A.G., Al-Quran S. Cutting edge: bacterial infection induces hematopoietic stem and progenitor cell expansion in the absence of TLR signaling. *J. Immunol*. 2010; 184(5): 2247-2251. DOI: 10.4049/jimmunol.0903652

11. Abebe W., Mozaffari M. Endothelial dysfunction in diabetes: potential application of circulating markers as advanced diagnostic and prognostic tools. *EPMA J*. 2010; 1: 32-45. DOI: 10.1007/s13167-010-0012-7

12. Shibuyaa M., Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Experimental Cell Research*. 2006; 312: 549-560. DOI: 10.1016/j.yexcr.2005.11.012

13. Sandhu K., Mamas M., Butler R. Endothelial progenitor cells: Exploring the pleiotropic effects of statins. *World J. Cardiol*. 2017; 9(1): 1-13. DOI: 10.4330/wjc.v9.i1.1

14. Skurikhin EG, Pakhomova AV, Pershina OV, Ermolaeva LA, Krupin VA, Ermakova NN, Pan ES, Kudryashova AI, Rybalkina OY, Pavlovskaya TB, Litvyakov NV, Goldberg VE, Dygai AM. [Regenerative Potential of Spermatogonial Stem Cells, Endothelial Progenitor Cells, and Epithelial Progenitor Cells of C57Bl/6 Male Mice with Metabolic Disorders]. *Byulleten' ehksperimental'noi biologii i mediciny [Bulletin of Experimental Biology and Medicine]*. 2017, 163(2): 239-244. DOI: 10.1007/s10517-017-3775-1 (in Russian)

15. Whitby A. Whitby L, Fletcher M, Reilly JT, Sutherland DR, Keeney M, Barnett D. ISHAGE protocol: Are we doing it correctly? *Cytometry Part B*. 2012; 82: 9-17. DOI: 10.1002/cyto.b.20612

16. Fadini G.P., Losordo D., Dimmeler S. Critical re-evaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ. Res*. 2012; 110(4): 624-637. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243386

17. Van Craenenbroeck E.M., Van Craenenbroeck A.H., van Iersel S., Bruyndonckx L., Hoymans V.Y., Vrints C.J., Conraads V.M. Quantification of circulating CD34+/KDR+/CD45dim endothelial progenitor cells: analytical considerations. *Int. J. Cardiol*. 2013; 167: 1688-1695. DOI: 10.1016/j.ijcard.2012.10.047

18. Ye L., Poh K.K. Enhancing endothelial progenitor cell for clinical use. *World J Stem Cells*. 2015; 7(6): 894-898. DOI: 10.4252/wjsc.v7.i6.894

19. Premer C., Blum A., Bellio M.A., Schulman I.H., Hurwitz B.E., Parker M. Dermarkarian CR, DiFede DL, Balkan W, Khan A, Hare JM. Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Restore Endothelial Function in Heart Failure by Stimulating Endothelial Progenitor Cells. *EBioMedicine*. 2015; 2: 467-475 DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.03.020

20. Chen M-Y., Lie P-C., Li Z-H., Wei X. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology*. 2009; 37: 629-640. DOI: 10.1016/j.exphem.2009.02.003

Сведения об авторах

Першина Ольга Викторовна — доктор медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории регенеративной фармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д.Гольдберга» Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук

Пахомова Ангелина Владимировна — кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории регенеративной фармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д.Гольдберга» Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук

Ермакова Наталия Николаевна — кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории регенеративной фармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д.Гольдберга» Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук

Рыбалкина Ольга Юрьевна — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории онкофармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д.Гольдберга» Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук

Крупин Вячеслав Андреевич — кандидат медицинских наук, лаборант-исследователь лаборатории регенеративной фармакологии.

Пан Эдгар Сергеевич — лаборант-исследователь лаборатории регенеративной фармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д.Гольдберга» Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук

Ваизова Ольга Евгеньевна — доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кравченко Александр Иванович — кандидат медицинских наук, врач клинической лабораторной диагностики, директор ООО «Открытая лаборатория»

Самойлова Юлия Геннадьевна — руководитель Центра клинических исследований, доктор медицинских наук, профессор кафедры эндокринологии и диабетологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ротканк Мария Алексеевна — эксперт центра клинических исследований Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Дыгай Александр Михайлович — доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, научный руководитель Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д.Гольдберга» Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук

Скурихин Евгений Германович — доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией регенеративной фармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д.Гольдберга» Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук