

Влияние поверхности имплантатов для остеосинтеза на секреторную активность многоклеточных систем *in vitro*

И. А. Хлусов^{1,3}, Ю. П. Шаркеев², В. Ф. Пичугин³, Е. В. Легостаева², Н. В. Рязанцева^{1,5},
О. Е. Чечина^{1,5}, Е. В. Сазонова¹, А. К. Биктасова¹, К. В. Зайцев⁴, К. А. Нечаев¹,
М. В. Дворниченко¹

The effect of osteosynthesis implant surface on secretory activity of multicellular systems *in vitro*

I. A. Khlusov, Yu. P. Sharkeyev, V. F. Pichugin, E. V. Legostayeva, N. V. Riazantseva,
O. E. Chechina, E. V. Sazonova, A. K. Biktasova, K. V. Zaitsev, K. A. Nechayev,
M. V. Dvornichenko

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г.Томск;

² Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, г. Томск;

³ НОЦ «Биосовместимые материалы и биоинженерия» при Томском политехническом университете и Сибирском государственном медицинском университете, г. Томск;

⁴ Томский НИИ курортологии и физиотерапии ФМБА России, г. Томск;

⁵ НОЦ молекулярной медицины Сибирского государственного медицинского университета, г. Томск

Изучены секреция цитокинов, апоптоз и продукция активных форм кислорода в клеточных культурах при их контакте *in vitro* с имплантатами, несущими микродуговые, магнетронные или абляционные кальцийфосфатные покрытия. Установлено, что клетками, осуществляющими регуляцию приживления/отторжения имплантатов с разной шероховатостью, являются, в первую очередь, мононуклеарные лейкоциты крови. Имплантаты с «гладкими» кальцийфосфатными покрытиями менее пригодны для репаративной регенерации костной ткани.

Ключевые слова: фибробластоподобные клетки; мононуклеарные лейкоциты крови человека; кальцийфосфатные покрытия; цитокины.

Cytokine secretion, apoptosis and production of active oxygen forms in cell cultures for their *in vitro* contact with implants carrying microarc, magnetron or ablation calcium-phosphate coatings have been studied in the work. Mononuclear blood leukocytes have been established to be first of all cells regulating the acceptance/rejection of implants with different roughness. Implants with "smooth" calcium-phosphate coatings are less suitable for bone tissue reparative regeneration.

Keywords: fibroblast-like cells; human blood mononuclear leukocytes; calcium-phosphate coatings; cytokines.

ВВЕДЕНИЕ

По мнению исследователей в области медицинского материаловедения и биоинженерии тканей, именно на границе раздела искусственного материала (имплантата) и биологических структур развиваются основные события, связанные с гистогенезом и жизнедеятельностью клеток, на основе общебиологических процессов пролиферации, коммитирования, дифференцировки, созревания и гибели [16, 21]. В подобном случае судьба клеточной популяции связана с суммарным воздействием, опосредованным через прямое взаимодействие клеток с искусственной поверхностью и секреторную активность многоклеточной системы [12].

Биологическая реакция на искусственные материалы определяется рядом факторов, включая топографию поверхности, химический состав, скорость деградации, тип продукта растворения и механические свойства имплантата. Поэтому в настоящее время разрабатываются подходы к использованию материалов с технологическими и

биологическими свойствами для конкретных заболеваний и пациентов, что входит в понятие «интеллектуальные имплантаты» [16] и «персонализированная терапия» [23].

В основе негативного влияния материала лежит каскад событий, характерных для воспаления. Показано, что эти события приводят к развитию гранулематозной реакции со стороны окружающих тканей и активации секреции цитокинов и протеолитических ферментов [16], выраженность и длительность выделения которых является определяющей для развития патологического состояния.

Тем не менее до сих пор не выработаны надежные критерии, позволяющие прогнозировать судьбу (приживление/отторжение) имплантата в организме.

В связи с этим цель исследования была связана с изучением секреции цитокинов, процессов апоптоза и продукции активных форм кислорода в клеточных культурах при их контакте *in vitro* с имплантатами, несущими различные кальцийфосфатные покрытия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для культивирования тестируемых клеток применяли подложки из наноструктурного титана ВТ1.0 (диаметр 12 мм, толщина 1 мм), несущие двусторонние кальцийфосфатные (КФ) покрытия. Покрытия наносили на титановую подложку с помощью модификации способа микродугового оксидирования [22], магнетронного напыления [15] либо абляционной плазмы [10].

Шероховатость поверхности искусственных КФ-покрытий оценивали по значениям параметров вертикальных неровностей профиля с помощью измерительной системы Talysurf 5-120 (разрешающая способность 1 нм). Определяли Ra (мкм) как средний результат шероховатости в пределах нескольких длин участков измерений согласно ГОСТ 2789-73.

В качестве тестируемых многоклеточных систем использовали культуру пренатальных фибробластоподобных клеток легкого, как источник стромальных стволовых клеток, а также мононуклеарную фракцию лейкоцитов периферической крови человека. Культуральной посудой служили 24-луночные пластиковые планшеты Costar (площадь лунки 1,77 см²). Биологическое тестирование выполняли *in vitro* при 37 °С в течение 24 часов.

Характеристики популяций мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) из различных тканей очень схожи [17]. Они обнаружены в эмбриональной [13] и легочной тканях [18], в связи с чем использованная нами в экспериментах культура пренатальных фибробластоподобных клеток легкого человека (ООО «Банк стволовых клеток», г. Томск) может служить источником мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК). Препараты представляют собой популяцию фибробластоподобных клеток разной формы и размеров, что характерно для пула ММСК [13], сохраняющую при пассажах стабильный кариотип и онкогенно безопасную. Клетки свободны от посторонних вирусных (ВИЧ, гепатит, герпес и др.) и бактериальных агентов (сифилис, микоплазмы, хламидии и др.). Жизнеспособность клеток, определяемая согласно ISO 10993-5 по исключению окрашивания в тесте с 0,4 % трипановым синим, составила 93 %.

Изучение активности щелочной фосфатазы (ЩФ) и ее костного изофермента в кондиционных средах культуры ММСК выполнялось по общепринятой биохимической технике с применением стандартного колориметрического метода [11].

Взвесь стромальных клеток использовалась в концентрации 9×10⁴ жизнеспособных кариоцитов в 1 мл культуральной среды следующего состава: 15 % инактивированной при 56 °С эмбриональной телячьей сыворотки (НПО «Вектор»), 280 мг/л L-глутамин, DMEM среды до 100 мл. Контролем роста служила культура фибробластоподобных клеток на пластике.

Фракционирование периферической крови взрослого человека для выделения мононуклеарных лейкоцитов проводили центрифугированием на градиенте плотности 1,077 г/см³ Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция) при 500 g в течение 45 мин. Содержание мононуклеаров составило 85 % при жизнеспособности 90 % в тесте с 0,4 % трипановым синим. В каждую лунку добавляли взвесь мононуклеаров в конечной концентрации 106 клеток/мл культуральной среды следующего состава: 10 % инактивированной при 56 °С эмбриональной телячьей сыворотки, 280 мг/л L-глутамин, 90 % среды RPMI-1640.

После культивирования жидкую часть культуры забирали, центрифугировали при 500 g в течение 15 мин. В надосадочной жидкости (супернатантах) определяли уровни фактора некроза опухоли (TNFα) и интерлейкинов (IL-2, IL-4) методом ИФА.

Концентрацию TNFα, IL-2, IL-4 в супернатантах фибробластоподобных и мононуклеарных клеток определяли с помощью наборов для ИФА производства «Протеиновый контур» (г. Санкт-Петербург) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Учет результатов проводили с использованием фотометра для микропланшетов («Multiscan EX», USA). Концентрацию TNFα, IL-2 или IL-4 рассчитывали по калибровочной кривой.

Для оценки апоптоза исследуемые мононуклеары крови в количестве 1×10⁶ переносили в объеме 1 мл в пробирки для проточного цитофлюориметра, ресуспендировали в аннексиновом буфере, содержащем ФИТЦ-меченный аннексин V и пропидий йодид, инкубировали 15 мин. в темноте при комнатной температуре [14]. Анализ образцов клеточных суспензий проводили на проточном цитометре FACSCalibur (BD, США).

Уровень наработки активных форм кислорода (АФК) в клетках определяли методом проточной цитометрии [4] с помощью дихлорфлуоресцеина диацетата (ДФХ-ДА). Анализ образцов клеток проводился на проточном цитометре FACSCalibur (BD, США) с помощью гистограмм FL-1 и соответствующих им окон статистики, содержащих показатели средней геометрической интенсивности свечения меченых клеток.

Для анализа имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (критерий Колмогорова–Смирнова). Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали непараметрический критерий Манна–Уитни (U-тест). С целью выявления связи между исследуемыми показателями определяли коэффициенты ранговой корреляции Спирмена (r). Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Постановка эксперимента позволила оценить секреторную активность фибробластоподобных клеток, в которой костная фракция ЩФ занимала 88 % в общем пуле секретируемого в культуре фермента.

Костная фракция ЩФ считается маркером остеобластов [5], дифференцирующихся в течение 3–4 суток культивирования из ММСК. Другими клетками в культуре, судя по морфологии, были производные

кроветворной стволовой клетки (нейтрофилы, моноциты/макрофаги). Цитохимическая окраска культуры фибробластоподобных клеток на неспецифическую эстеразу [3] подтвердила результаты морфологического исследования. Изменение секреции IL-2 и IL-4 при контакте с искусственными поверхностями (табл. 1) также подтверждало присутствие среди фибробластоподобных стромальных клеток гемопоэтических элементов.

Имплантаты с шероховатым (среднее Ra = 2,947 мкм, n = 3) КФ покрытием, сформированным микродуговым способом, не влияли на секрецию цитокинов в культуре фибробластоподобных клеток (табл. 1). Судьба ММСК в данном случае определяется преимущественно физическими свойствами искусственной поверхности, что и было отмечено ранее [21].

При контакте с «гладкими» КФ-покрытиями жизнедеятельность клеточной культуры может зависеть от выделения TNF α (магнетронный способ нанесения покрытия, Ra = 0,197 мкм, n = 3) или торможения секреции IL-2 и IL-4 (абляционный способ нанесения покрытия, Ra = 0,127 мкм, n=3). При этом эффективность роста костной ткани на подобных покрытиях в тесте эктопического остеогенеза *in vivo* не превышала 30 % в сравнении с 75–80 % для шероховатых микродуговых покрытий [20].

Таким образом, секреторная активность многоклеточной системы в культуре фибробластоподобных клеток при контакте с «гладкими» искусственными покрытиями может быть одним из молекулярных механизмов в регуляции функциональной активности клеток и судьбы имплантатов в организме.

С одной стороны, кооперация макрофагов и Т-хелперов через цитокиновую регуляцию функции остеокластов (TNF α и IL-2) и фибробластов (TNF α) способна запускать воспалительный/остеолитический (склеротический) процесс [16]. Избыток TNF α , недостаток IL-2 и IL-4, выявленные нами для разных изделий (табл. 1), являются проапоптотическими сигналами для лейкоцитов [1], мигрирующих в очаг постимплантационного воспаления. В связи с этим тканевая многоклеточная система при контакте с «гладкими» КФ-покрытиями может вызывать апоптоз иммунокомпетентных клеток крови, опосредованный через цитокины. Внутриклеточные пути реализации подобного варианта клеточной смерти описаны [6–9]. Данные процессы могут затруднять прогноз выживаемости подобных имплантатов в конкретном организме.

Известно, что при использовании медицинских изделий развивается воспалительная реакция, активность и исход которой модулируются не только местными стромальными элементами, но и циркулирующими мононуклеарными иммунокомпетентными клетками [16]. *In vitro* ответ мононуклеаров крови, включая цитокиновый профиль, различается в зависимости от состава искусственных материалов [19].

В наших экспериментах образцы наноструктурного титана с КФ-покрытиями дифференцированно стимулировали *in vitro* секреторную активность мононуклеарных лейкоцитов крови человека (табл. 2). Так, отмечалось увеличение концентрации TNF α (на 93 %) и IL-4 (на 15 %) в культуре клеток при контакте с абляционным и микродуговым покрытиями соответственно.

Таблица 1

Уровни цитокинов в супернатанте при культивировании фибробластоподобных клеток человека с искусственными материалами, X \pm m

№ группы	Исследуемая группа, n = 3	Уровень цитокинов, пг/мл		
		TNF α	IL-2	IL-4
Контроль секреции				
1	Культура фибробластоидных клеток человека на пластике	46,52 \pm 0,67	78,01 \pm 0,44	66,33 \pm 1,28
Культуры клеток на образцах наноструктурного титана с кальцийфосфатным покрытием				
2	Микродуговое покрытие	51,56 \pm 3,93	77,57 \pm 1,07	68,77 \pm 3,61
3	Абляционное покрытие	46,91 \pm 2,79	72,14 \pm 1,16*	49,98 \pm 0,67*
4	Магнетронное покрытие	62,26 \pm 3,47*	77,32 \pm 1,59	65,86 \pm 3,33

Примечание: здесь и в табл. 2–3 n — число наблюдений (образцов) в каждой группе; указаны различия по U-критерию Вилкоксона: (*) — с группой 1 (p < 0,05)

Таблица 2

Уровни цитокинов в супернатанте при культивировании мононуклеаров крови человека с искусственными материалами, X \pm m

№ группы	Исследуемая группа, n = 3	Уровень цитокинов, пг/мл		
		TNF α	IL-2	IL-4
Контроль секреции				
1	Культура мононуклеаров крови человека на пластике	41,74 \pm 0,60	63,74 \pm 0,93	63,91 \pm 0,70
Культуры клеток на образцах наноструктурного титана с кальцийфосфатным покрытием				
2	Микродуговое покрытие	40,98 \pm 1,25	66,88 \pm 1,30	73,36 \pm 1,66*
3	Абляционное покрытие	79,19 \pm 2,08*	61,51 \pm 1,02	61,73 \pm 0,80
4	Магнетронное покрытие	59,74 \pm 15,53	67,27 \pm 1,45	68,35 \pm 3,41

Примечание: здесь и в табл. 2–3 n — число наблюдений (образцов) в каждой группе; указаны различия по U-критерию Вилкоксона: (*) — с группой 1 (p < 0,05)

Тестируемые материалы обладают хорошей биосовместимостью на клеточном уровне, поскольку не вызывают увеличения апоптоза мононуклеаров крови и концентрации внутриклеточных АФК (табл. 3). Тем не менее тест на окрашивание с 0,4 % трипановым синим показал некоторый рост числа окрашенных клеток (с 9 до 14 %) при контакте культуры клеток крови с абляционным КФ-материалом. По-видимому, часть клеток в данной группе погибала путем некроза, индуцированного высокими дозами TNF α (табл. 2), что уменьшало долю апоптотически измененных мононуклеаров (табл. 3).

Использование корреляционного анализа для выявления механизмов описанных феноменов показало, что секреторная активность культуры фибробластоподобных клеток не зависела от шероховатости КФ-покрытий. В то же время выявлены тесные зависимо-

сти Ra покрытий с секрецией мононуклеарами крови TNF α ($r = -0,80$; $p = 0,01$; $n = 9$), IL-2 ($r = 0,69$; $p = 0,04$; $n = 9$) и IL-4 ($r = 0,83$; $p = 0,006$; $n = 9$).

Представленные данные раскрывают взаимосвязь физических свойств поверхности имплантатов и цитокиновых механизмов их различной способности к остеоинтеграции, показанной нами ранее [20].

Исследование выполнено при поддержке федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» (государственный контракт № 02.512.11.2285 от 10.03.2009), «Научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы» (02.740.11.0311 от 07.07.2009), грантов РФФИ №09-04-00287а и №09-04-99105-р_офи.

Таблица 3

Количество апоптотических клеток и уровень внутриклеточных активных форм кислорода при культивировании мононуклеаров крови человека с искусственными материалами, $X \pm m$

№ группы	Исследуемая группа, n = 3	Результат измерений	
		число клеток в апоптозе, %	активные формы кислорода, (у. е.)
1	Культура мононуклеаров крови человека на пластике	13,78 \pm 5,31	0,550 \pm 0,290
Культуры клеток на образцах наноструктурного титана с кальцийфосфатным покрытием			
2	Микродуговое покрытие	11,66 \pm 2,41	0,236 \pm 0,048
3	Абляционное покрытие	7,99 \pm 0,66*	0,190 \pm 0,010*
4	Магнетронное покрытие	13,34 \pm 0,46	0,316 \pm 0,050

ВЫВОДЫ

- Согласно корреляционному анализу клетками, способными через модуляцию секреторной активности регулировать процессы приживления/отторжения имплантатов с разной топографией кальцийфосфатной поверхности, являются, в первую очередь, мононуклеарные лейкоциты крови.
- При средней шероховатости кальцийфосфатных покрытий в диапазоне 0,1–3 мкм, в качестве статистически значимого критерия, позволяющего в мо-

дельных экспериментах *in vitro* на 80 % прогнозировать поведение имплантата в организме, можно рекомендовать определение секреции TNF α мононуклеарами периферической крови.

- Имплантаты с «гладкими» кальцийфосфатными покрытиями менее пригодны для репаративной регенерации костной ткани вследствие высокой вероятности секреции TNF α , по-видимому, как проявление неспецифического адаптационного синдрома клеточных систем [2].

ЛИТЕРАТУРА

- Белушкина Н. Н., Хасан Х. А., Северин С. Е. Молекулярные основы апоптоза // *Вопр. биол., мед. и фармацевт. химии*. 1998. № 4. С. 15–23.
- Браун А. Д., Моженко Т. П. Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы. Л.: Наука, 1987. 232 с.
- Морфофункциональные свойства стромальных стволовых клеток при культивировании *in vitro* в динамических условиях / И. В. Запскалов [и др.] // *Бюл. сиб. медицины*. 2009. № 4. С. 28–32.
- Пинегин Б. В., Ярилин А. А., Симонова А. В. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека: пособие для врачей-лаборантов. М., 2001. 65 с.
- Риггз Б. Л., Мелтон III Л. Дж. Остеопороз: пер. с англ. СПб.: ЗАО «Изд-во БИНОМ», «Невский диалект», 2000. 560 с.
- Роль активных форм кислорода и белков семейства Bcl-2 в реализации ФНО- α опосредованного апоптоза лимфоцитов / Н. В. Рязанцева [и др.] // *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2010. Т. 148, № 2. С. 139–143.
- Роль NF- κ B, p53 и p21 в регуляции ФНО- α опосредованного апоптоза лимфоцитов / Н. В. Рязанцева [и др.] // *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2010. Т. 148, № 2. С. 56–60.
- Роль редокс-зависимых сигнальных систем в регуляции апоптоза при окислительном стрессе / Н. В. Рязанцева [и др.] // *Цитология*. 2009. Т. 51, № 4. С. 329–334.
- Роль цитокинов в редокс-зависимой регуляции апоптоза / О. Е. Чечина [и др.] // *Бюл. сиб. медицины*. 2009. № 2. С. 67–71.
- Свойства кальцийфосфатных покрытий, осаждаемых из абляционной плазмы, создаваемой мощными ионными пучками / В. К. Струц [и др.] // *Взаимодействие ионов с поверхностью: труды XIX междунар. конф. М.: Издательство «Галлея-принт», 2009. Т. 2. С. 402–405.*
- Тиц Н. Клиническое руководство по лабораторным тестам: пер. с англ. / под ред. В. В. Меньшикова. М.: Юнимед-Пресс, 2003. 943 с.
- Хлусов И. А. Вопросы клеточных технологий и биоинженерии тканей (обзор) // *Журн. Сиб. федер. университета. Серия «Биология»*. 2008. Т. 1, № 3. С. 269–294.
- Aerts F., Wagemaker G. Mesenchymal stem cell engineering and transplantation // *Genetic engineering of mesenchymal stem cells / ed. by J. A. Nolte*. Dordrecht: Springer, 2006. P. 1–44.

14. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure / M. Van Engeland [et al.] // *Cytometry*. 1998. Vol. 31, No 1. P. 1–9.
15. Application of high-frequency magnetron sputtering to deposit thin calcium-phosphate biocompatible coatings on a titanium surface / V. F. Pichugin [et al.] // *Journal of Surface Investigation. X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques*. 2007. Vol. 1. No. 6. P. 679–682.
16. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine: 2nd edition* / ed. by B. D. Ratner [et al.]. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press, 2004. 851 p.
17. Da Silva Meirelles L., Chagastelles P. C., Nardi N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues // *J. Cell Sci*. 2006. Vol. 119, No Pt 11. P. 2204–2213.
18. Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts / V. N. Lama [et al.] // *J. Clin. Invest*. 2007. Vol. 117, No 4. P. 989–996.
19. Increased levels of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 protein and messenger RNA in human peripheral blood monocytes due to titanium particles / T. A. Blaine [et al.] // *J. Bone Jt. Surg*. 1996. Vol.78-A, No 8. P. 1181–1192.
20. Osteogenic potential of mesenchymal stem cells from bone marrow in situ: role of physicochemical properties of artificial surfaces / I. A. Khlusov [et al.] // *Bull. Exp. Biol. Med*. 2005. Vol. 140, No 1. P. 144–152.
21. Physical-chemical manipulations with microbial and mammalian cells: from experiments to clinics / I.A. Khlusov, L. V. Zagrebin, S. S. Shestov, S. A. Naumov // *Stem cell applications in disease and health* / Ed. by W. B. Burnside, R. H. Ellsley. N.Y.: Nova Science Publishers, 2008. P. 37–80.
22. The structure and physical and mechanical properties of a novel biocomposite material, nanostructured titanium-calcium-phosphate coating / Yu. P. Sharkeev [et al.] // *Composite Interfaces*. 2009. Vol. 16. P. 535–546.
23. Vogiatzi P., Cassone M., Claudio P. P. Personalizing gene therapy in gastric cancer // *Drug News Perspect*. 2006. Vol. 19, No 9. P. 533–540.

Рукопись поступила 11.05.10.

Сведения об авторах:

1. Хлусов Игорь Альбертович — ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России, профессор кафедры морфологии и общей патологии; научный руководитель НОЦ «Биосовместимые материалы и биоинженерия» при НИ ТПУ и СибГМУ, д. м. н., профессор; e-mail: khlusov63@mail.ru.
2. Шаркеев Юрий Петрович — Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, заведующий лабораторией физики наноструктурных биосовместимых композитов, профессор, д. ф.-м. н.
3. Пичугин Владимир Федорович — Томский политехнический университет, зав. кафедрой теоретической и экспериментальной физики, научный руководитель НОЦ «Биосовместимые материалы и биоинженерия» при Томском политехническом университете и Сибирском государственном медицинском университете, профессор, д. ф.-м. н.
4. Легостаева Елена Викторовна — Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, с. н. с. лаборатории физики наноструктурных биосовместимых композитов, к. ф.-м. н.
5. Рязанцева Наталья Владирировна — Сибирский государственный медицинский университет, проректор, зав. кафедрой фундаментальных основ клинической медицины, научный руководитель НОЦ молекулярной медицины Сибирского государственного медицинского университета, профессор, д. ф.-м. н.
6. Чечина Ольга Евгеньевна — Сибирский государственный медицинский университет, руководитель НОЦ молекулярной медицины, к. м. н.
7. Сазонова Елена Викторовна — Сибирский государственный медицинский университет, аспирант.
8. Биктасова Асель Кинжибулатовна — Сибирский государственный медицинский университет, интерн.
9. Зайцев Константин Васильевич — Томский НИИ курортологии и физиотерапии ФМБА России, зав. лаб. изучения механизмов действия физических факторов, к. м. н.
10. Нечаев Кирилл Андреевич — Сибирский государственный медицинский университет, аспирант кафедры фармакологии
11. Дворниченко Марина Владимировна — Сибирский государственный медицинский университет, докторант кафедры патофизиологии, к. м. н.