

Интеграция костной ткани в пористые титановые импланты с алмазоподобными нанопокрывтиями

Э. Б. Макарова¹, Ю. М. Захаров⁴, А. П. Рубштейн², А. И. Исайкин³

Integration of bone tissue to porous titanium implants with diamond-like nanocoatings

E. B. Makarova¹, Yu. M. Zakharov⁴, A. P. Rubshtein², A. I. Isaikin³

¹ ФГУ «УНИИТО им. В. Д. Чаклина» Минздравсоцразвития России, г. Екатеринбург (директор — д. м. н. И. Л. Шлыков)

² Институт физики металлов УрО РАН, г. Екатеринбург (директор — академик РАН В. В. Устинов)

³ ГОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия», г. Екатеринбург (ректор — профессор С. М. Кутепов)

⁴ Челябинская государственная медицинская академия (ректор — член-корреспондент РАМН И. И. Долгушин)

Эксперимент выполнен *in vitro* и *in vivo* на 29 половозрелых кроликах. Исследовали влияние алмазоподобного углеродного нанопокрывтия (а-С) титановой матрицы на жизнеспособность, адгезию, активность NADPH-оксидаз, колониеобразующую способность миелокарицитов; на морфологию и прочность новообразованной в порах имплантов костной ткани. Выявлено увеличение жизнеспособности, клоногенной способности адгезирующей фракции миелокарицитов в присутствии титановых образцов титана с а-С. Применение углеродного алмазоподобного нанопокрывтия приводит к образованию более зрелой и прочной костной ткани в порах имплантов. Применение нанопокрывтия замедляет процессы склерозирования вновь образованной костной ткани.

Ключевые слова: пористый титан; имплантаты; алмазоподобное покрытие; кость; стромальные клетки.

The experiment has been performed *in vitro* and *in vivo* in 29 adult rabbits. The influence of titanium matrix diamond-like carbon nanocoating (a-C) on the cell viability, adhesion, NADPH-oxidase activity, colony-forming ability of myelocariocytes; on the morphology and strength of neoformations in the pores of bone tissue implants was investigated. The increase of cell viability, clonogenic ability of myelocariocytes in the presence of titanium samples with a-C titanium has been revealed. The use of carbon diamond-like nanocoating leads to the formation of more mature and strong bone tissue in the implant pores. The use of the nanocoating slows the sclerosing processes of newly formed bone tissue.

Keywords: porous titanium; implants; diamond-like coating; bone; stromal cells.

ВВЕДЕНИЕ

Биосовместимость (биоинертность) носителей для мезенхимальных клеток обязательна при использовании клеточных технологий в восстановительной хирургии [2, 7]. Пористые металлические носители и, в частности, пористый титан, обладают способностью одновременно выполнять функцию эндофиксатора и трехмерной матрицы для остеогенной ткани [12]. Тестирование имплантов из титана в культурах тканей и на животных показало, что титан и его сплавы относятся к группе биоинертных материалов, способных к самопассивации [5]. В порах титановых имплантатов образуется зрелая костная ткань со структурой, аналогичной материнской кости [15].

Однако, по данным ряда авторов, остеоинтеграция титана с немодифицированной поверхностью со временем уменьшается, вероятно, за счет гальвано-электрических тканевых реакций. Несмотря на образование при контакте с кислородом на поверхности титана окисной пленки, концентрация ионов титана увеличивается после внедрения имплантатов в костной ткани, в крови и моче. Считается, что увеличение содержания титана в организме не оказывает аллергического или канцерогенного воздействия и не приводит к развитию металлоза. Большая его часть депони-

руется в костях и легких, но также он был обнаружен и в паренхиматозных органах (почках, печени, лимфатических узлах) [5, 11].

Таким образом, титан считается одним из самых биоинертных металлов. Однако в ряде случаев тканевые реакции на титановые имплантаты приводят к формированию грануляционной ткани вокруг титановых имплантатов, подвергающейся созреванию к 30–60 суткам после операции [8]. Общеизвестно, что модификация поверхности, в том числе химическая или термическая ее обработка, обеспечивает ускорение вставания и усиление сцепления костной ткани с имплантатом [13]. С целью увеличения прочности и скорости формирования костного блока, а также максимального сохранения структуры полученного блока мы использовали алмазоподобные углеродные нанопокрывтия (а-С) пористых титановых имплантатов (ПТ).

Кроме того, изменяя пористость образцов, можно подобрать образцы ПТ, имеющие величину модуля упругости, сопоставимую с модулем упругости костной ткани. Так, модуль упругости поясничных и шейных позвонков человека составляет 0,16–0,23 ГПа, большеберцовой кости — 18,1 ГПа, бедренной кости — 17,2 ГПа [1]. Образцы пористого титана, иссле-

дуемые нами и полученные методом компактирования из пористых гранул (2–5 мм) титановой губки марки ТГ-ОП-1, при объемной доле пор в материале $\theta \leq 45\%$ имеют модуль упругости в интервале 2,2–3,6 ГПа.

Использование «мягкого» материала и повышение его коррозиоустойчивости снижает вероятность развития стрессорного ремоделирования костной ткани вокруг имплантата при упругих деформациях, а, сле-

довательно, и преобладания процессов деструкции над процессами остеогенеза костной ткани вокруг имплантата.

Цель исследования — теоретически-экспериментальное обоснование применения насыщенных аутогенными прилипающими клетками костного мозга пористых титановых имплантатов с алмазоподобными покрытиями для стимуляции репаративного остеогенеза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на 29 половозрелых 6–10-месячных кроликах массой 2,5–3 кг стандартного разведения. Животных содержали в стандартных условиях вивария, предусмотренными «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных Приказом МЗ СССР №755 от 12.08.1977 г. Манипуляции с экспериментальными животными выполнялись в соответствии с положениями Хельсинкской декларации о гуманном обращении с животными, методическими рекомендациями по их выведению из эксперимента и эвтаназии. Костный мозг кроликов получали под общим наркозом методом пункции из крыла подвздошной кости. Миелокарициты однократно отмывали избытком полной культуральной среды: RPMI-1640 (ФГУ ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор»), 20 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone), L-глутамин 30 мг/100 мл среды (Sigma), гентамицин — 5 мг/100 мл среды [4]. После центрифугирования удаляли супернатант с жировым костным мозгом. Клеточный осадок ресуспендировали в полной культуральной среде, доводили клеточность суспензии до $5-6 \times 10^6$ /мл живых клеток и переносили в лунки стерильных 24-луночных планшетов (SplLifeSciences) по 1 мл. Культивировали клетки в течение 7–32 суток при 37 °C, 4 % содержания CO_2 , абсолютной влажности. Смену 60 % среды осуществляли два раза в неделю.

Оценку жизнеспособности клеток проводили после 4-часовой инкубации миелокарицитов в присутствии образцов титана по общепринятым тестам: активность общей лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в супернатанте культуры оценивали на автоматическом селективном биохимическом анализаторе Sapphire-400 (Япония); активность NADPH-оксидаз по НСТ-тесту [14] проводили с автоматизированным учетом [6].

Для оценки влияния полированных титановых образцов с алмазоподобным покрытием или без него на адгезию миелокарицитов к их поверхности, а также клоногенную способность прилипающей фракции миелокарицитов в присутствии данных образцов, размером $0,8 \times 0,8 \times 0,2$ мм, осуществляли по общепринятой методике культивирования клеток (см. выше) в полной культуральной среде. Использование полированных образцов позволило исключить влияние на адгезию клеток макрорельефа исследуемых образцов. Клеточность культур прилипающей фракции миелокарицитов оценивали после добавления в каждую лунку 0,5 мл 0,25 % трипсин-ЕДТА (Sigma) на 20 минут [4]. Затем клетки осторожно ресуспендировали в одинаковом объеме полной культуральной среды, подсчитывали их количество в камере Горяева и выражали в

количестве клеток $\times 10^6$ /мл среды. Площадь на дне лунки, занятую фибробластоподобными клетками, культивируемыми в присутствии полированных образцов, оценивали с помощью аппаратно-программного комплекса видео Тест-морфология 4,0.

Пористые титановые имплантаты без алмазоподобного покрытия (ПТ) и пористые титановые имплантаты с алмазоподобными покрытиями (ПТ с а-С) с двойной системой пор (микроканалы 2–3 мкм и макроканалы — 200–300 мкм, объемная доля пор — 40 %, из них 75 % пор сообщаются с поверхностью) первоначально насыщали прилипающей фракцией клеток аутологичного костного мозга кроликов, внося в лунку с имплантатом $5-6 \times 10^6$ миелокарицитов/мл на 2 часа. Клетки проникали в поры с током жидкости за счет поверхностного натяжения. Среду с неприкрепившимися клетками удаляли, бережно отмывали имплантаты от неприлипших клеток и переносили их в лунки со свежей полной культуральной средой. Затем количество клеток увеличивали инкубированием имплантатов с клетками в порах в полной культуральной среде: 70 % McCoy's 5A (BioWhittakerRLONZA), 30 % эмбриональная телячья отборная сыворотка (HyClone, ПанЭко), L-глутамин (Sigma, ПанЭко) 30 мг/100 мл, гентамицин 5 мг/100 мл, гепарин-натрий (Braun) в стерильных 24-луночных планшетах (SplLifeSciences) при 37 °C, 4 % содержания CO_2 , абсолютной влажности. Клонирование проводили в CO_2 инкубаторе CELL 48 (стандартная линия) в течение 14 суток. Смену 60 % среды осуществляли два раза в неделю.

Для изучения организации клеточного слоя методом сканирующей электронной микроскопии образцы имплантатов с клетками фиксировали в 2,5 % растворе глутарового альдегида. Полученные препараты исследовали в растровом микроскопе Philips 500.

Операции по внедрению имплантатов, насыщенных аутологичными прилипающими клетками костного мозга, под общим наркозом (рометар — 8 мг/кг, золетил 6 мг/кг — внутримышечно) выполняли на базе ГОУ ВПО УГМА Росздрава Д. Г. Блинец, к. м. н. Э. Б. Макарова, к. м. н. А. И. Исайкин. Всего внедрено 76 имплантатов 29 кроликам. Имплантаты из ПТ или из ПТ с а-С диаметром 4,5 мм и длиной 6 мм вводили в мышелки большеберцовой и бедренных костей кроликов. С соблюдением правил асептики выполняли продольный разрез по внутренней поверхности метадиафиза кости до 1,5 см, выделяли костную площадку. Сверлом 4 мм формировали канал с проникновением в костномозговой канал, вход в него раззенковывали сверлом 4,5 мм, с помощью импактора в метадиафиз устанавливали титановый имплантат таким образом,

чтобы поверхность торца имплантата сравнялась с плоскостью кости. Положение имплантата контролировали рентгенологически. Через 5–6 часов животные наступали на оперированную конечность, их помещали в отдельные клетки, где они могли свободно перемещаться. Через 4, 16 и 52 недели после операции животных выводили из эксперимента.

Механические испытания прочности новообразованной костной ткани проводили на универсальной испытательной машине FP 100/1 с автоматической записью диаграммы. Нагрузка увеличивалась постепенно до разрыва образца. Предел прочности σ рассчитывался по формуле $\sigma = P/S$, где P — сила, при которой происходит разрыв образца, S — площадь, по которой произошел разрыв. Площадь определяли по увеличенным снимкам зоны разрыва. Относительный предел прочности на разрыв (σ_{rel}) определяли как отношение $(\sigma_{\text{HKT}}/\sigma_{\text{KT}}) \times 100\%$, где σ_{HKT} — предел прочности на раз-

рыв новообразованной костной ткани и σ_{KT} — предел прочности на разрыв нативной кости.

Для гистологического исследования новообразованной костной ткани костные блоки с имплантатами для удаления титановой матрицы помещали в раствор плавиковой кислоты и этиленгликоля [9]. После вытравливания титана новообразованную костную ткань изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа QUANTA 200 или проводили декальцинацию костной ткани в растворе BiodecR (Bio-Optica), затем обезживали в спиртах восходящей концентрации с дальнейшей заливкой парафином. Тонкие срезы (6–7 мкм), полученные на санном микротоме MC-2, окрашенные гематоксилином и эозином или пикрофуксином по ван Гизону, изучали с использованием микроскопа «Micros». Статистическую обработку результатов выполняли с использованием непараметрического критерия (двухсторонний вариант) Манна–Уитни [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты культивирования миелокариоцитов в присутствии образцов полированного титана с алмазоподобным покрытием и без покрытия. Применение образцов титана с а-С при инкубации миелокариоцитов кролика в течение 4 часов приводило к большей сохранности жизнеспособности клеток, о чем свидетельствовало значимое снижение (до 66,3 %) концентрации ЛДГ в супернатанте по сравнению с культурами, инкубированными с образцами без покрытия. При использовании в качестве подложки полированного титана с напыленной в вакууме углеродной алмазоподобной пленкой количество адгезировавших на ней клеток значимо не изменялось по сравнению с количеством клеток, адгезировавших на подложку из титана без покрытия. Не выявлено значимых отличий и в активности NADPH-оксида миелокариоцитов при тестировании образцов из полированного титана без покрытий и с алмазоподобными покрытиями.

При исследовании клоногенной способности костномозговых прекурсоров в присутствии титановых образцов через 7 суток была выявлена тенденция к увеличению колониеобразующей способности (КОС) адгезирующей фракции миелокариоцитов в культурах, инкубированных в присутствии титана с а-С, по сравнению с КОС костного мозга, культивированного в присутствии титана. В культурах с титаном с а-С имели тенденцию к увеличению количество кластеров фибробластоподобных клеток (колониеобразующих единиц, содержащих от 3 до 50 клеток [4]) до 126 % и количество колоний (колониеобразующих единиц, содержащих более 50 клеток) до 180 % по сравнению с культурами с титаном без а-С. Морфологически культуры прилипающей фракции миелокариоцитов, образованные в присутствии титана с а-С или без него, не различались. К 7 суткам во всех лунках основная масса клеток имела фибробластоподобную морфологию, часть располагалась упорядоченно, к 10–18 суткам образуя многослойные тяжистые структуры.

Клеточность культур фибробластоподобных клеток, образовавшихся в присутствии образцов титана с а-С, а также площади, занятые этими культурами к

18 суткам культивирования, имели тенденцию к увеличению по сравнению с культурами, выросшими в лунках с титаном без а-С. Так, площадь фибробластоподобных культур, образовавшихся в присутствии титана к 18 суткам, составляет $19,93 \pm 11,44$ мм²/лунку; в присутствии титана с а-С — $27,47 \pm 12,53$ мм²/лунку. На 32 сутки культивирования клеточность культур фибробластоподобных клеток с образцами титана с а-С значимо превышала клеточность культур с титаном без а-С ($15,3 \pm 3,5$; $9,7 \pm 0,34 \times 10^6$ клеток/мл соответственно).

Культивирование прилипающей фракции костного мозга кролика на образцах пористого титана с алмазоподобным покрытием и без покрытия. При исследовании поверхности пористых титановых образцов с покрытием и без покрытия, насыщенных прилипающей фракцией миелокариоцитов кроликов, с помощью сканирующей электронной микроскопии уже на 3 сутки инкубации обнаруживаются расположенные преимущественно в порах титановых матриц обоих тестируемых образцов многочисленные гранулоцитомакрофагальные и ядросодержащие эритроидные клетки, стромальные элементы (фибробластоподобные, веретенновидные клетки). Часть клеток располагается в нишах морфологически однородными группами, в 80–90 % это группы по 5–10 клеток, в 5–11 % по 10–50 клеток, в 2–5 % группы представлены 50 и более клетками. Колониеподобное расположение клеток позволяет предполагать их формирование следствием дифференциации КОЕэ и КОЕгм. Заполняющие ниши в титановой матрице клетки нередко образуют отростки и контактируют между собой (рис. 1).

На некоторых препаратах в нишах пористой титановой матрицы видны образующиеся, вероятно, коллагеновые волокна, располагающиеся параллельно друг другу.

Результаты имплантации пористых титановых образцов с углеродной пленкой и без покрытия, насыщенных *in vitro* прилипающей фракцией аутологичных миелокариоцитов, в дефект костной ткани. Через 4 недели после операции все сквозные поры

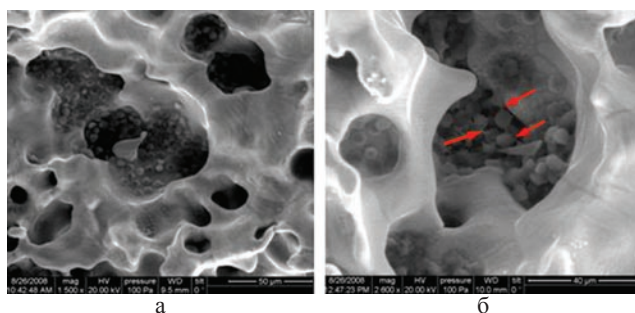


Рис. 1. Сканирующая электронная микроскопия. 3 сутки культивирования прилипающей фракции костного мозга кролика на пористом титане: а — ув. $\times 1500$, б — ув. $\times 2600$. Стрелками показаны цитоплазматические выросты в местах межклеточных контактов

имплантатов при использовании обоих тестируемых образцов (ПТ, ПТ с а-С) проросли новообразованной костной тканью.

Морфологическое исследование, выполненное совместно с к. м. н. И. П. Кудрявцевой, выявило, что в области смоделированного дефекта костной ткани между внедренным имплантатом и материнским ложем образуется ткань, состоящая из молодых костных трабекул с расположенными на их поверхности остеобластами (рис. 2, 3). Межтрабекулярные пространства характери-



Рис. 2. 4 недели после операции. Имплантат — пористый титан. Ув. $\times 200$, окраска гематоксилином и эозином: 1 — остеобласты, расположенные по периферии трабекул; 2 — межтрабекулярные пространства, характеризующиеся клеточностью, васкуляризацией

зуются высокой клеточностью, васкуляризацией. В периферических отделах области внедрения имплантата остеогенез идет за счет молодых костных трабекул, растущих из материнского ложа, по краям трабекул располагаются остеобласты. Костеобразование в порах происходило активнее при использовании имплантатов ПТ с а-С, что проявлялось меньшей неравномерностью окраски матрикса и менее выраженной его базофилией.

Через 16 недель после операции сеть костных трабекул становится более плотной, клеточность снижа-

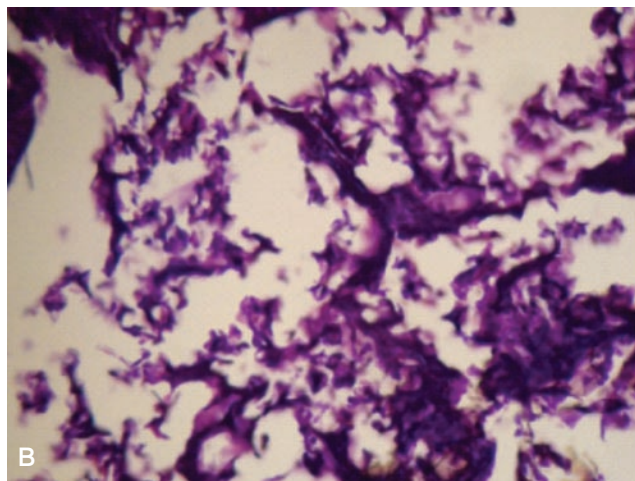
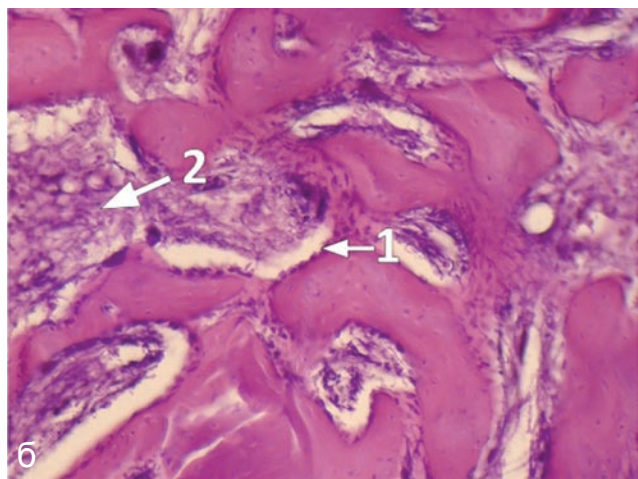
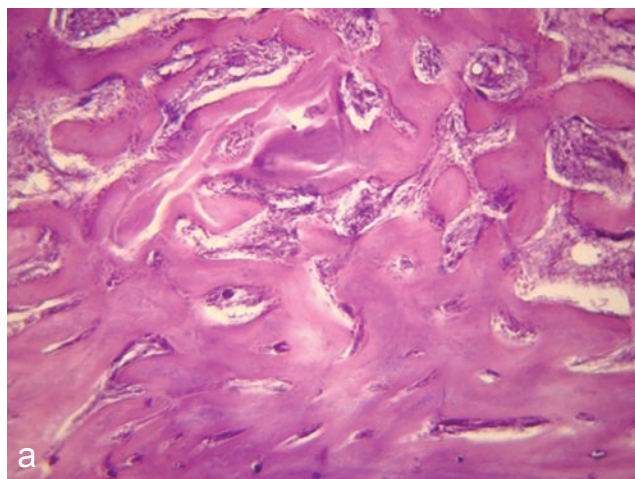


Рис. 3. Пористый титан с алмазоподобным покрытием, 4 недели после операции: а, б — новообразование костной ткани в области операционного поля; в, г — новообразование костной ткани в области имплантата (в порах имплантата). Ув. а, г — $\times 100$, б, в — $\times 200$; окраска гематоксилином и эозином: 1 — остеобласты, расположенные по периферии трабекул; 2 — межтрабекулярные пространства, характеризующиеся клеточностью, васкуляризацией

ется, клетки лежат в плоских лакунах, матрикс становится слабо, но более равномерно окрашенным. По периферии области внедрения имплантата наблюдаются зрелые костные трабекулы. Распространенность зрелых костных трабекул большая при использовании имплантатов с алмазоподобными пленками.

Через 52 недели после операции новообразованная в области операционного дефекта костная ткань прилежит непосредственно к имплантатам (ПТ и ПТ с а-С). Для нее характерны признаки склерозирования (сужение гаверсовых каналов, мозаичность строения), которое менее выражено при использовании имплантатов из ПТ с а-С по сравнению с имплантатами из ПТ.

Поры изучаемых имплантатов (ПТ и ПТ с а-С) заполнены по всей площади костными структурами различной степени зрелости. В области внедрения имплантатов ПТ с а-С по сравнению с ПТ зрелые трабекулы с четко выраженным остеоцитарным строением, присущим зрелой структуре, занимают большую площадь.

В течение всего срока наблюдения площадь, занимаемая новообразованной зрелой костной тканью в порах имплантатов, увеличивалась. В группе с ПТ с а-С площадь, занятая зрелой костной тканью, к 52 неделям увеличилась значимо — до 68 ± 4 %, по сравнению с имплантатами из ПТ — 59 ± 4 %. Возможно, это объясняется свойством алмазного покрытия связывать костный морфогенетический белок-2 (КМБ-2), являющийся истинным остеоиндуктором [10].

Относительный предел прочности новообразованной костной ткани на разрыв уже через 4 недели показал значимо большую прочность новообразованной кости на границе внедренного имплантата и материнской костной ткани при использовании ПТ с а-С, чем при использовании ПТ (табл. 1). Эта разница сохранялась до 16 недель и нивелировалась к 52 неделям после операции, когда прочность композита «новообразованная кость – имплантат – материнское ложе» приближалась к прочности нативной кости.

Таблица 1

Оценка прочности новообразованной костной ткани

	Относительный предел прочности, %		
	4 недели	16 недель	52 недели
ПТ, $M \pm s$, (n)	39 ± 2 (n = 3)	46 ± 2 (n = 3)	94 ± 4 (n = 3)
ПТ с а-С, $M \pm s$ (n)	$57 \pm 8^*$ (n = 3)	$70 \pm 1^*$ (n = 3)	94 ± 3 (n = 3)

Примечание: * — $p \leq 0,05$.

ВЫВОДЫ

1. Таким образом, при исследовании *in vitro* была выявлена большая жизнеспособность миелокариоцитов, тенденция к увеличению колониеобразующей способности прилипающей фракции миелокариоцитов при использовании образцов титана с алмазоподобным углеродным (а-С) покрытием по сравнению с образцами титана без покрытия.
2. Применение *in vivo* пористых титановых имплантатов с алмазоподобным углеродным нанопокрывом (а-С) приводит к образованию более зрелой и прочной костной ткани в порах имплантов.
3. Применение углеродного алмазоподобного нанопокрывы (а-С) пористого трансплантата замедляет процессы склерозирования вновь образованной костной ткани.

ЛИТЕРАТУРА

1. Буякова С. П., Хлусов И. А., Кульков С. Н. Пористая циркониевая керамика для эндопротезирования костной ткани // Физ. мезомеханика. 2004. № 7. (Спец. вып.). Ч. 1. С. 127–130.
2. Заживление костных дефектов ветви нижней челюсти кроликов под биоинженерными конструкциями из титана и золотого сплава с ксеногенными мезенхимальными стволовыми клетками / У. В. Вольперт [и др.] // Стоматология. 2009. № 1. С. 4–8.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. 459 с.
4. Гольдберг Е. Д., Дыгай А. М., Шахов В. П. Методы культуры ткани в гематологии. Томск: Изд-во ТГУ, 1992. 272 с.
5. Имплантат — носитель клеточного материала из пористого титана / В. И. Итин [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2006. № 3 (5). С. 59–63.
6. Киселева Е. П., Полевщиков А. В. Метод автоматизированного учета НСТ-теста // Клини. лаб. диагностика. 1994. № 4. С. 27–29.
7. Клеточные технологии в травматологии и ортопедии: пути развития / Р. В. Деев [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2007. Т. 2, № 4. С. 18–30.
8. Фролова Е. Н. Применение титанового сплава в качестве носителя для стволовых клеток с целью ускорения регенерации дефекта челюсти в эксперименте: автореф. дис... канд. мед. наук. М.: МГМСУ, 2008. 24 с.
9. Хафизов Р. Г. Изучение новообразованной ткани внутри пористой структуры никелид титанового имплантата методом глубокого травления по Миргазизову // Рос. вестн. дентальной имплантологии. 2006. № 1/2 (13/14). С. 26–29.
10. Immobilized BMP-2 on nano-crystalline diamond remains strongly bioactive / F. R. Kloss [et al.] // Nano Med. 5-th Intern. Workshop on Biomed. Appl. Nanotech. Febr, 16–17. Berlin: Germany, 2006. P. 34.
11. Release of metals from osteosynthesis implants as a method for identification: post-autopsy histopathological and ultrastructural forensic study / E. Palazzo [et al.] // Int. J. Legal Med. 2009. Vol. 125. No 1. P. 21–26.
12. Ryan G., Pandit A., Apatidis D. P. Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic application // Biomaterials. 2006. Vol. 27, No 13. P. 2651–2670.
13. Mechanical properties and osteoconductivity of porous bioactive titanium / M. Takemoto [et al.] // Biomaterials. 2005. Vol. 26, No 30. P. 6014–6023.

14. Rapid prototyping: porous titanium alloy scaffolds produced by selective laser melting for bone tissue engineering / P. H. Warnke [et al.] // *Tissue Eng. Part C Methods*. 2009. Vol. 15, No 2. P. 115–124.
 15. Fabrication of biomimetic apatite coating on porous titanium and their osteointegration in femurs of dogs / C. Y. Zhao [et al.] // *Materials Science and Engineering: C*. 2010. Vol. 30, No 1. P. 98–104.
-

Рукопись поступила 02.07.11.

Сведения об авторах:

1. Макарова Эмилия Борисовна — ФГУ «УНИИТО им. В. Д. Чаклина» Минздравсоцразвития России, г. Екатеринбург, с. н. с., к. м. н.; e-mail: emilia1907@yandex.ru.
2. Захаров Юрий Михайлович — Челябинская государственная медицинская академия, академик РАМН, заведующий кафедрой нормальной физиологии; e-mail: zaharovum@chelsma.ru.
3. Рубштейн Анна Петровна — Институт физики металлов УрО РАН, г. Екатеринбург, с. н. с., к. ф.-м. н.; e-mail: rubshtein@imp.uran.ru.
4. Исайкин Анатолий Иванович — ГОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия», г. Екатеринбург, заведующий экспериментальным отделом, к. м. н.