

РАЗДЕЛ 2 ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ВЛИЯНИЕ ДАЛАРГИНА НА РЕПАРАТИВНУЮ РЕГЕНЕРАЦИЮ КРИТИЧЕСКОГО ДЕФЕКТА ТЕМЕННЫХ КОСТЕЙ КРЫС

ВАСИЛЬЕВ А.В.^{1,2}, БОЛЬШАКОВА Г.Б.¹

THE EFFECT OF DALARGINUM ON THE REPARATIVE REGENERATION OF CRITICAL SIZE CALVARIAL DEFECT IN RATS

VASILYEV A.V., BOLSHAKOVA G.B.

¹ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва (директор - член-кор. РАН, профессор Л.В. Кактурский); ²ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН, Москва (директор - академик РАН, профессор Е.К. Гинтер).

На модели критического дефекта теменных костей крыс показано, что хроническое введение даларгина в концентрации 100 мкг/кг с целью стимулирования δ -рецепторов дает меньший прирост относительной доли минерализованной костной ткани, чем применение комбинации даларгина и налоксона в концентрации 100 мкг/кг и 0,5 мг/кг. Сравнение полученных данных с нашей предыдущей работой, позволяют предположить, что даларгин стимулирует пролиферацию, но не дифференцировку клеток-предшественниц остеобластов.

Ключевые слова: опиоиды, даларгин, неоостеогенез, репаративная регенерация костной ткани, флуоресцентные метки, недекальцинированные срезы.

The model of rat critical size calvarial defect in rats showed that the chronic introduction of dalarginum at 100 μ g/kg in order to stimulate the δ -receptors yields a smaller increase in the percentage of mineralized bone than the combination of naloxone and dalarginum at 100 μ g/kg and 0, 5 mg/kg. Comparing our data with those obtained in our previous work, we suggest that dalarginum stimulates proliferation and differentiation of osteoblast precursor cells.

Keywords: *opioids, dalarginum, neo-osteogenesis, reparative regeneration of bone tissue, fluorescent labels, non-decalcified slices.*

Введение. Впервые предположение о том, что опиоиды могут участвовать в регенерации костной ткани, было высказано в 1995 году [1; 2] после обнаружения реципрокной связи между экспрессией гена проэнкефалина (PENK) в созревающих остеобластах и их дифференцировкой.

Опиоидные рецепторы были обнаружены на остеобластоподобных опухолевых клетках [3]. Кроме того, было показано, что клеточные элементы кости, кроме зрелых остеобластов и остеокластов, способны синтезировать опиоиды [4].

В процессе эмбрионального развития в созревающей костной ткани была выявлена экспрессия генов только одного предшественника опиоидных пептидов - проэнкефалина [2], который превращается в лей-энкефалин, изучение влияния которого на остеогенез представляет несомненный интерес. Синтетическим аналогом лей-энкефалина является даларгин. Его основным преимуществом является то, что, в отличие от лей-энкефалина, препарат не проникает через гематоэнцефалический барьер [5]. Таким образом, даларгин представляется наиболее перспективным для исследования неоостеогенеза среди известных препаратов опиоидов.

В 80-е - 90-е годы XX века активно изучалось влияние даларгина на регенерацию эпителиальных тканей [6-8]. Было выяснено, что в концентрации 100 мкг/кг даларгин стимулирует пролиферацию эпителиальных тканей. Однако информация о влиянии опиоидов, в том числе даларгина или его прямых аналогов, на процессы репаративной регенерации костной ткани, недостаточна [9] и не основана на использовании воспроизводимых экспериментальных моделей [10].

Для изучения влияния даларгина на остеогенез нами была выбрана воспроизводимая модель критического дефекта теменных костей крыс, которая часто используется для изучения эффективности и безопасности различных остеопластических материалов, клеточных продуктов и новых технологий для костной пластики [11-14]. Ранее нами были разработаны точные методики объёмной морфометрии для этой модели [15; 16].

Цель исследования - оценить влияние даларгина на репаративную регенерацию костной ткани и доказать рецептор-опосредованный механизм действия даларгина.

Материал и методы исследования. Исследование проводили на 21 самце крыс линии Sprague-Dawley массой тела 350 г. В постановке экспериментов руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» в соответствии с приказами МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. и № 701 от 24.07.1978 г. и Правилами лабораторной практики 2003 г.

Под внутривентриальным наркозом [Золетил (Virbac, Франция)] в дозировке 125 мг/кг крысам производили поперечный и вертикальный латерально-смещённый разрез кожи головы, формируя треугольный лоскут и последовательно тупым и острым путём обнажали теменные кости. Посередине сагиттального шва на теменных костях формировали круглое отверстие с помощью трепана C-reamer диаметром 5,5 мм и высотой 1,5 мм из набора Neobiotech SLA (Корея), избегая перфорации сагиттального венозного синуса. Рану послойно ушивали.

В послеоперационном периоде крысы были разделены на 3 группы по 7 крыс в каждой. В первой группе (К) исследуемым животным ежедневно внутривентриально вводили физиологический раствор в объёме 0,5 мл, во второй (Д) – 0,5 мл раствора даларгина в дозировке 100 мг/кг, в третьей (Д+Н) – 0,5 мл смеси растворов даларгина и налоксона в дозировке 100 мг/кг и 0,5 мг/кг соответственно. Поскольку налоксон является неизбирательным блокатором опиоидных рецепторов, его использование позволяет установить рецепторный механизм действия даларгина. Концентрации препаратов были выбраны исходя из того, что налоксон в дозировке 0,5 мг/кг неизбирательно блокирует все типы опиоидных рецепторов [17], а оптимальная дозировка даларгина для достижения наилучшего рецептор-опосредованного эффекта, по данным литературы, составляет 100 мг/кг [18].

Для оценки динамики неоостеогенеза на разных сроках мы проводили прижизненное двойное мечение новообразованной костной ткани по ранее разработанной методике [16]. Во всех экс-

периментальных группах крысам делали внутривентриальные инъекции раствора доксициклина к началу активной минерализации остеоида на 8-й, 9-й и 10-й день после операции. Затем на 15-й, 16-й и 17-й день эксперимента крысам внутривентриально вводили раствор ализарина красного С для создания границ между метками. На 22-й, 23-й и 24-й день повторяли инъекции ализарина для полного окрашивания краёв минерализованного регенерата. Метки вводили в дозировке 25 мг/кг массы тела. Таким образом, мечение осуществляли по схеме 7-3-4-3-4-3-4 (три дня введения чередовались с четырёхдневными перерывами).

На 28-й день, что соответствовало окончанию процессов первичного остеогенеза [19], крыс выводили из эксперимента передозировкой наркотика Золетил/Рометар. Далее с помощью зуботехнического отрезного диска забирали костный фрагмент свода черепа, который фиксировали в 40% этиловом спирте в течение 24 часов.

Полученный 21 образец свода черепа, включающий дефект, подвергали прицельной рентгенографии (радиовизиограф Gendex Expert DC). На рентгенограммах измеряли площадь рентгеноконтрастных зон внутри дефекта, соответствующих новообразованной минерализованной костной ткани. Во избежание проекционных искажений, связанных с позиционированием образца по отношению к лучевой трубке и датчику, измеряли также площадь изначального дефекта.

После фиксации образцы обезвоживали в восходящих концентрациях этанола и пропитывали мономером этилметакрилата АКР-7 (ВладМива, Россия) в течение нескольких суток. К новой порции мономера этилметакрилата АКР-7 (ВладМива, Россия) добавляли перекись бензоила (ЗАО «Вектон», Россия) в количестве 100:1 и прогревали в течение 2 часов при +60°C, после чего разогретую смесь этилметакрилата и перекиси бензоила разливали по пластиковым баночкам, погружали в них образцы кости и помещали в термостат на +37°C. Через неделю образцы перемещали в другой термостат на +60°C для окончательной полимеризации.

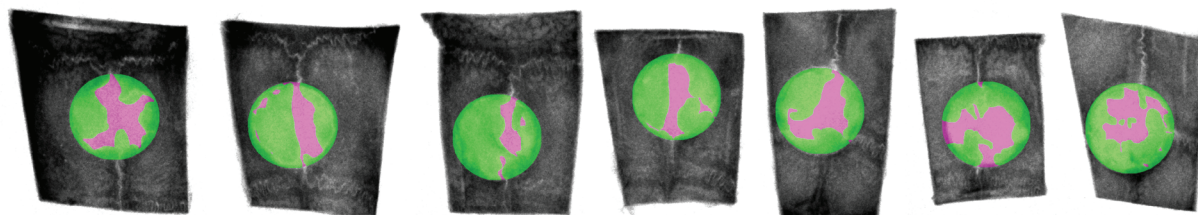


Рис. 1. Выделение области дефекта (розовый цвет) и образованного регенерата (зелёный цвет).

Срезы изготавливали с помощью закреплённой портативной стоматологической установки с использованием прямого наконечника и стандартного алмазного зуботехнического отрезного диска диаметром 42 мм (Васильев, Большакова). Образцы закрепляли в тиски, которые, в свою очередь, фиксировали на платформе со взаимоперпендикулярными векторами движения поверхности. Далее срезы шлифовали до толщины 50-60 мкм под контролем микрометра с помощью наждачной бумаги. Шлифы полировали бруском из пробкового дерева.

С помощью люминесцентной микроскопии (микроскоп Leica DM 4000 (Германия), цифровая камера Leica DFC 310 FX) с использованием систем светофильтров GFP (возбуждающий фильтр – 470/40, пропускающий – 525/50), «S-Orange» (546/12, 585/40), DAPI ET (350/50, 460/50) визуализировали флуорохромное свечение новообразованной костной ткани жёлто-зелёного (доксидиклин) и красного цветов (ализариновый красный С). Полученные изображения объединяли в панорамное изображение каждого среза с помощью программы Adobe Photoshop CS6 (США). Далее на полученных изображениях отдельно определяли площадь каждой флуоресцентной метки. Дополнительно измеряли ширину и площадь дефекта черепа. Данные переносили в Microsoft Excel 2011. Полученные значения пересчитывали в метрические размеры. Затем на основе плоскостных параметров регенерата, определенных на каждом шлифе [20; 21], вычисляли его объёмные параметры с помощью использования математической модели «резанный цилиндр» [15; 16].

После того как шлифы исследовали с помо-

щью люминесцентной микроскопии, их окрашивали в водном растворе толудинового синего, подкисленного уксусной кислотой (10 мин) и кислого фуксина (30 мин). Далее шлифы обезжизивали в восходящих спиртах, карбол-ксилоле и ксилоле и заключали в канадский бальзам.

Фотосъёмку препаратов в проходящем свете выполняли с помощью микроскопа Leica DM 4000 (Германия) и цифровой камеры Leica DFC 310 FX. Полученные изображения объединяли в панораму каждого среза с помощью программы Adobe Photoshop CS6 (США) и проводили морфологический анализ.

Относительные площади дефекта сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа и теста Холма-Сидака (GraphPad Prism 6, США). Данные, полученные в ходе анализа соотношений флуоресцентных меток, сравнивали с помощью непараметрического теста Краскала-Уоллиса.

Результаты исследования и их обсуждение. Различия в размере регенерата хорошо видны на шлифах в проходящем свете. Не было выявлено межгрупповых различий в морфологии регенерата. Регенерат имел вид треугольника, основанием обращённого к материнской кости и разрастался по твёрдой мозговой оболочке к центру дефекта. На отдельных препаратах можно заметить отдельные островки остеогенеза, не связанные с материнской костью. При сравнении с рентгенограммами, полученными в плоскости, перпендикулярной гистологическим шлифам, становится понятна природа этих островков остеогенеза - это зачастую были мостики между краями дефекта, которые не попали в конкретный срез.

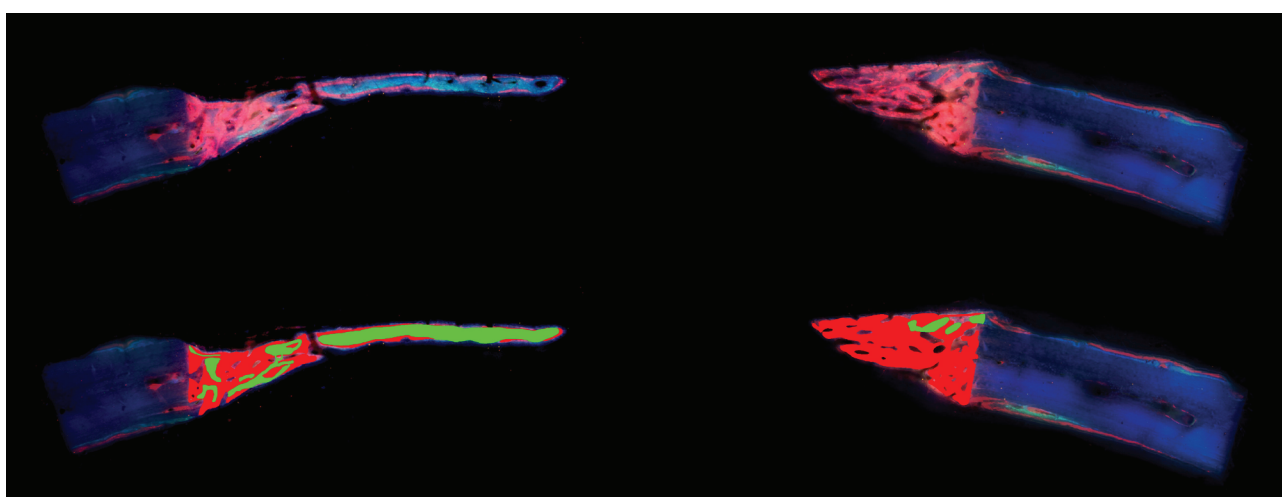


Рис. 2. Шлиф дефекта теменных костей крысы при флуоресцентной микроскопии. Сверху - свечение бирюзовым доксициклина и красным - ализарина. Снизу – обработка того же изображения для морфометрического анализа в Photoshop: зелёным выделена доксициклиновая метка, красным - ализариновая метка.

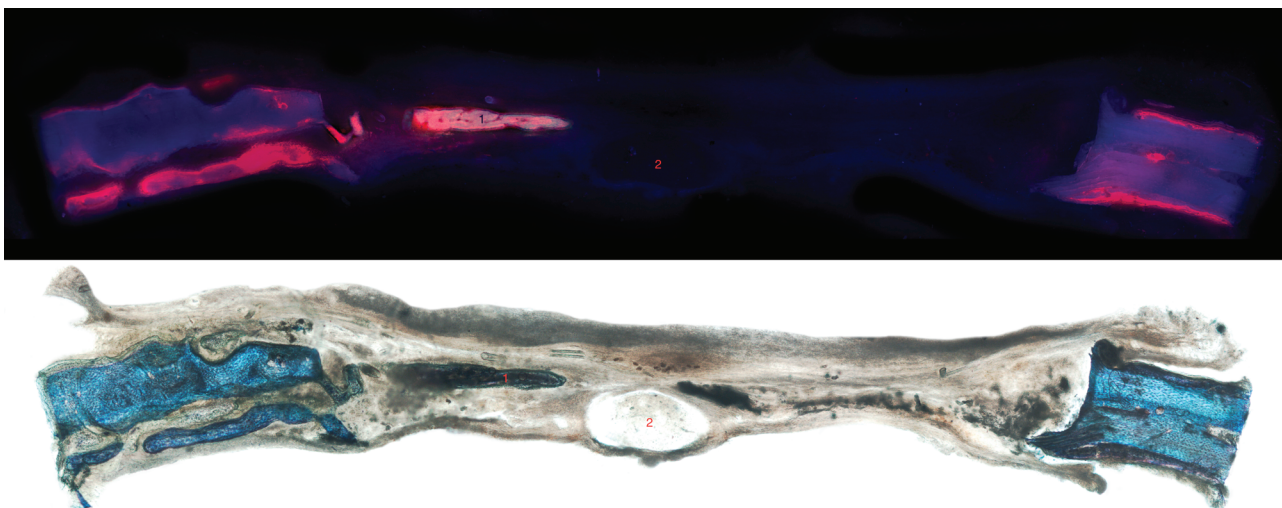


Рис. 3. Сравнение изображений, полученных в ходе флуоресцентной микроскопии и световой микроскопии после окраски толуидиновым синим. Группа с введением даларгина. Объектив х5. 1 – регенерат, 2 – неповрежденный сагиттальный венозный синус.

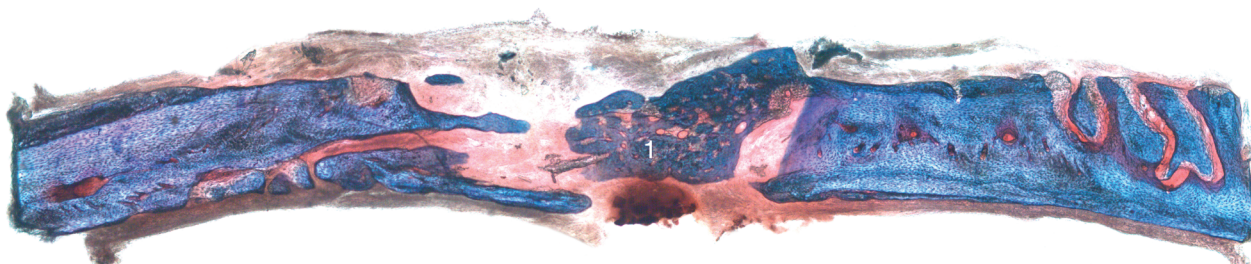


Рис. 4. Регенерат в области дефекта. Группа с введением даларгина и налоксона. Микроскопия в проходящем свете. Панорамное изображение. Окраска толуидиновым синим и кислым фуксином. Объектив х5. 1 – регенерат.

Новообразованная костная ткань представлена клетками, напоминающими хондроциты «Место рисунка 5», и содержала большое количество полнокровных венул и артериол. Однако метакромазия при окраске, характерная именно для хряща, выявлена не была. Центральная область дефекта была представлена фиброзной соединительной тканью. Однако толщина шлифов не позволяет должным образом визуализировать клеточные элементы. При флуоресцентной микроскопии наблюдается накопление флуорохромов в местах минерализации которые расположены на небольшом удалении от сосудов и краёв дефекта. Накопление флуорохромов в области локализации хондроцитообразных клеток, является показателем минерализации регенерата, то есть процессов неоостеогенеза.

На рентгенограммах виден чёткий край круглого дефекта, имеющего правильную геометрическую форму. В области дефекта различаются рентгеноконтрастные зоны новообразованной костной ткани, стремящиеся от края дефекта к

центру, но не заполняющие его полностью.

По данным рентгенографии, относительная площадь регенерата в группе, где применяли комбинацию даларгина и налоксона, статистически значительно превышала площадь регенерата в группе, где применяли даларгин, то есть блокирование опиоидных рецепторов, в отличие от их стимуляции, ускоряло неоостеогенез «Место рисунка 6». Статистически значимых различий между группой контроля и группами, где применяли даларгин и его комбинацию с налоксоном, обнаружено не было.

Соотношения площадей меток, полученных в каждой группе, статистически значимо не различались. Это показывает, что воздействия на опиоидные рецепторы в нашем эксперименте не изменяли характер неоостеогенеза, и в группе с даларгином и налоксоном мы имеем дело с истинным ускорением процессов неоостеогенеза, а не увеличением длительности какой-либо стадии регенерации.

В отдельных работах рассматривалось дей-

ствие как самого даларгина на репаративную регенерацию костной ткани и костного мозга [9], так специфических агонистов пептидной структуры [10]. По результатам этих работ можно сделать вывод, что стимулирование опиоидных δ -рецепторов ускоряет регенерацию костного мозга и костной ткани, увеличивает объем регенерата костного мозга и уменьшает объем рубца. Это противоречит полученным нами данным о том, что использование даларгина, агониста δ -рецепторов, снижало объем костного регенерата на начальных сроках неоостеогенеза. Применение неизбирательного блокатора опиоидных рецепторов налоксона в сочетании с даларгином приводило к противоположному эффекту. Это может быть связано, во-первых, с блокадой δ -рецепторов, через которые даларгин осуществляет действие и, во-вторых, с блокадой опиоидных рецепторов других типов, через которые осуществляют действие эндогенные опиоиды. В нашей предыдущей работе [22] на культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток было показано, что даларгин рецептор-опосредованно стимулирует их пролиферацию.

Таким образом, можно заключить, что даларгин стимулирует пролиферацию, но не дифференцировку клеток-предшественниц остеобластов,

что в настоящем эксперименте обуславливало прирост объема минерализованной костной ткани, достоверно не отличающийся от такового в контрольной группе и меньший, чем в группе с использованием даларгина и налоксона.

Выводы. На модели критического дефекта теменных костей крыс показано, что хроническое введение даларгина в концентрации 100мкг/кг с целью стимулирования δ -рецепторов дает меньший прирост относительной доли минерализованной костной ткани, чем применение комбинации даларгина и налоксона. Это связано с тем, что налоксон неизбирательно блокирует действие эндогенных агонистов и других опиоидных рецепторов, которые, по-видимому, также не ускоряют репаративную регенерацию костной ткани.

Сравнение полученных данных с нашей предыдущей работой [22], позволяют предположить, что даларгин стимулирует пролиферацию, но не дифференцировку клеток-предшественниц остеобластов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Rosen H., Krichevsky A., Polakiewicz R.D., Benzakine S., and Bar-Shavit Z. Developmental regulation of proenkephalin gene expression in osteoblasts. // *Mol Endocrinol*. Nov 1995. Vol. 9(11).

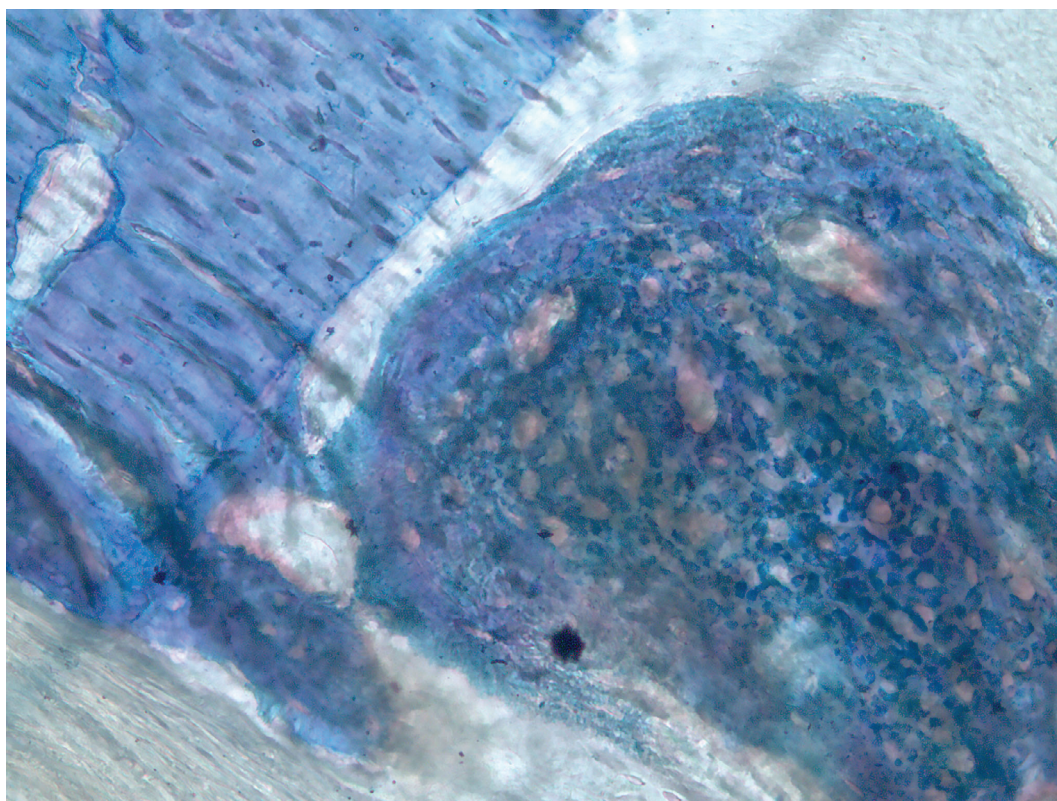
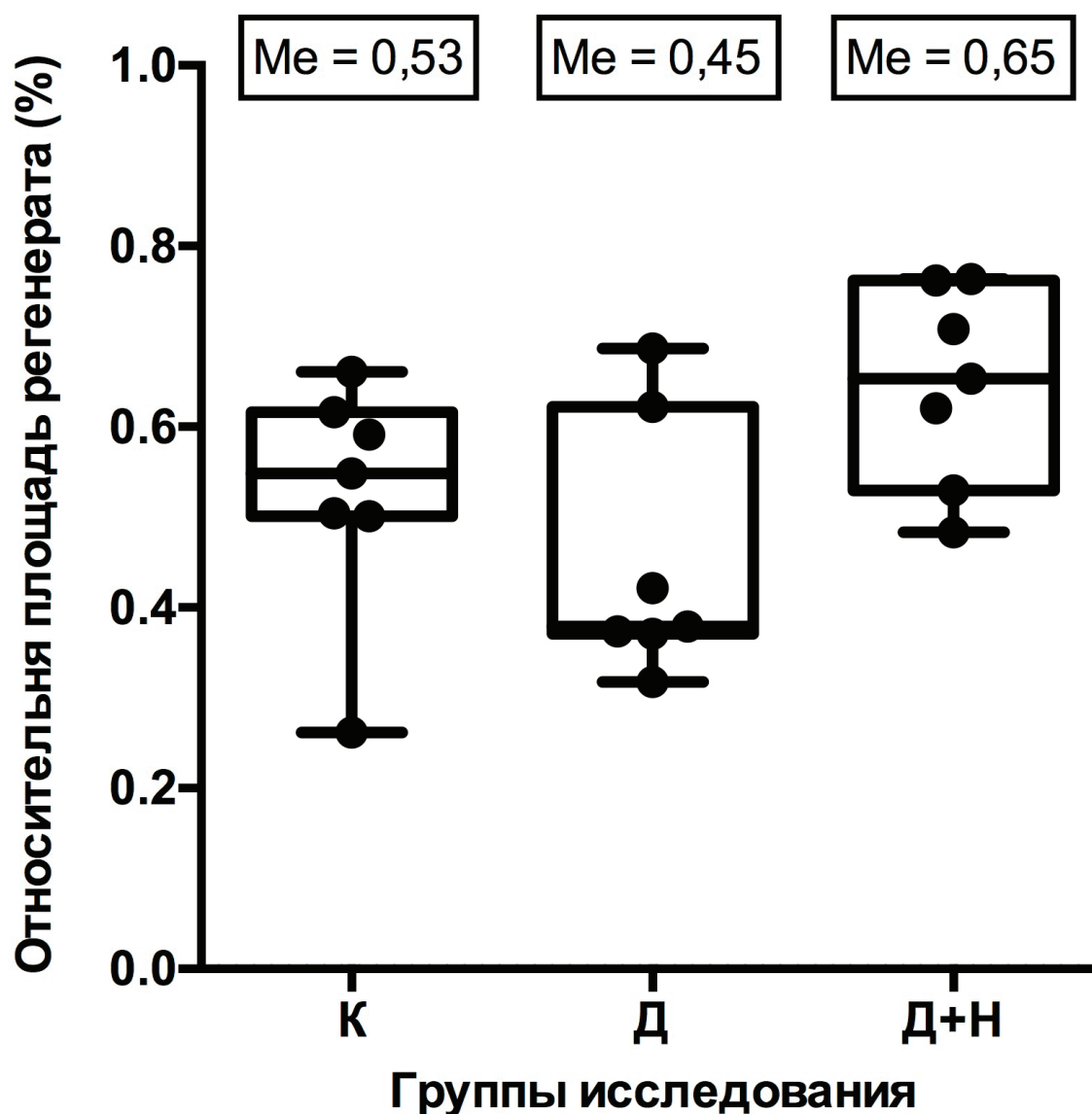


Рис. 5. Регенерат в области дефекта, содержащий хондроцитообразные клетки. Группа с введением физраствора. Микроскопия в проходящем свете. Окраска толуидиновым синим и кислым фуксином. Объектив $\times 10$.



Результаты теста Краскала-Уоллиса		
Группы сравнения	Различие	p
К vs. Д	нет	0,2989
К vs. Д+Н	нет	0,186
Д vs. Д+Н	есть	0,0339

Рис. 6. Относительная площадь регенерата, измеренная по данным рентгенографии. Показаны медиана, 25-й и 75-й процентиля и разбор данных. К - группа контроля. Д – группа, в которой крысам ежедневно вводили даларгин в дозе 100мкг/кг. К+Д – группа, в которой вводили комбинацию даларгина в дозе 100мкг/кг и налоксона в дозе 0,5мг/кг.

pp. 1621-31.

2. Keshet E., Polakiewicz R.D., Itin A., Ornoy A., and Rosen H. Proenkephalin A is expressed in mesodermal lineages during organogenesis. // *EMBO J.* Oct 1989. Vol. 8(10). pp. 2917-23.

3. Pérez-Castrillón J.L., Olmos J.M., Gómez J.J., Barrallo A., Riancho J.A., Perera L., Valero C., Amado J.A., and González-Macías J. Expression of opioid receptors in osteoblast-like MG-63 cells, and effects of different opioid agonists on alkaline phosphatase and osteocalcin secretion by these cells. // *Neuroendocrinology.* Sep 2000. Vol. 72(3). pp. 187-94.

4. Elhassan A.M., Lindgren J.U., Hultenby K., Bergström J., and Adem A. Methionine-enkephalin in bone and joint tissues. // *J Bone Miner Res.* Jan 1998. Vol. 13(1). pp. 88-95.

5. Судаков С.К., Судаков К.В. Церебральные механизмы опиатной зависимости // *Клиническая наркология.* 2003. No. 1. pp. 38-43.

6. Виноградов В.А. Опиоидный гексапептид - далаггин в патогенетической терапии заболеваний органов пищеварения. // *Сов. медицина.* 1988. № 10. С. 59-63.

7. Панькова Т.Д. Доказательства реализации стимулирующего эффекта далаггина на процесс клеточного деления через опиатные рецепторы. // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* 1990. Т. 110. № 7. С. 96-98.

8. Ганина С.С., Рагимов Ч.Р. Оценка эффективности лечения далаггином больных с флегмонами лица и шеи по показателям свободнорадикального окисления периферической крови // *Стоматология.* 1991. № 6. С. 28-30.

9. Тургунов Н.Т., Лаврищева Г.И. Влияние гексапептида далаггина на репаративные процессы в посттравматически изменённых тканях костей. // *Медицинский журнал Узбекистана.* 1989. С. 70-71.

10. Ляшев Ю.Д. Влияние опиоидных пептидов на репаративную регенерацию костной ткани. // *Архив патологии.* 2002. Т. 64. № 1. С. 6-8.

11. Полежаев Л.В. Регенерация путём индукции. Москва: Медицина, 1977.

12. Pellegrini G., Seol Y.J., Gruber R., and Giannobile W.V. Pre-clinical models for oral and periodontal reconstructive therapies. // *J Dent Res.* 2009. Vol. 88(12). pp. 1065-76.

13. Lee J.A., Ku Y., Rhyu I.C., Chung C.P., and Park Y.J. Effects of fibrin-binding oligopeptide on osteopromotion in rabbit calvarial defects. // *J Periodontal Implant Sci.* 2010. Vol. 40. No. 5. pp. 211-9.

14. Кулаков А.А., Григорьян А.С., Киселева Е.В., Хамраев Т.К., Филонов М.Р., Гатиев А.Б. Устранение критических костных дефектов с помощью биоинженерной конструкции на нерезорбируемой полимерной основе с использованием аутогенных

мультипотентных стромальных клеток из жировой ткани. // *Стоматология.* 2010. № 3. С. 9-12.

15. Волков А.В., Васильев А.В., Рачинская О.А., Большакова Г.Б., Гольдштейн Д.В. Применение флуоресцентных меток для оценки регенерации костной ткани на модели критических дефектов теменных костей крыс с использованием адаптированного метода гистоморфометрии. // *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2013. № 2. С. 73-80.

16. Васильев А.В., Большакова Г.Б. Характеристика неоостеогенеза на модели критического дефекта теменных костей крыс с помощью традиционной и трёхмерной морфометрии // *Гены и клетки. В печати.*

17. Millan M.J., Morris B.J. Long-term blockade of mu-opioid receptors suggests a role in control of ingestive behaviour, body weight and core temperature in the rat. // *Brain Res.* May 1988. Vol. 450(1-2). pp. 247-58.

18. Ардасенов А.В., Хугаева В.К., Александров П.Н. Микроциркуляторное русло кожи в условиях воспаления и коррекции методом лимфостимуляции. Москва: Научный Мир, 2004. 148 с.

19. Burr D.B., Allen M.R. Basic and Applied Bone Biology. Academic Press, 2013. 392 pp.

20. Parfitt A.M., Drezner M.K., Glorieux F.H., Kanis J.A., Malluche H., Meunier P.J., Ott S.M., and Recker R.R. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. // *J Bone Miner Res.* 1987. Vol. 2. No. 6. pp. 595-610.

21. Dempster D.W., Compston J.E., Drezner M.K., Glorieux F.H., Kanis J.A., Malluche H., Meunier P.J., Ott S.M., Recker R.R., and Parfitt A.M. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. // *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2013. Vol. 28(1). pp. 2-17.

22. Васильев А.В., Бухарова Т.Б., Волков А.В., Вихрова Е.Б., Большакова Г.Б., и Гольдштейн Д.В. Влияние далаггина на пролиферацию мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, дермальных фибробластов и клеток остеосаркомы человека in vitro // *Гены и клетки. В печати.*

REFERENCES:

1. Rosen H., Krichevsky A., Polakiewicz R.D., Benzakine S., and Bar-Shavit Z. Developmental regulation of proenkephalin gene expression in osteoblasts. // *Mol Endocrinol.* Nov 1995. Vol. 9(11). pp. 1621-31.

2. Keshet E., Polakiewicz R.D., Itin A., Ornoy A., and Rosen H. Proenkephalin A is expressed in mesodermal lineages during organogenesis. //

- EMBO J. Oct 1989. Vol. 8(10). pp. 2917-23.
3. Pérez-Castrillón J.L., Olmos J.M., Gómez J.J., Barrallo A., Riancho J.A., Perera L., Valero C., Amado J.A., and González-Macías J. Expression of opioid receptors in osteoblast-like MG-63 cells, and effects of different opioid agonists on alkaline phosphatase and osteocalcin secretion by these cells. // *Neuroendocrinology*. Sep 2000. Vol. 72(3). pp. 187-94.
4. Elhassan A.M., Lindgren J.U., Hultenby K., Bergström J., and Adem A. Methionine-enkephalin in bone and joint tissues. // *J Bone Miner Res*. Jan 1998. Vol. 13(1). pp. 88-95.
5. Sudakov S.K., Sudakov K.V. Cerebral'nye mexanizmy opiatnoj zavisimosti // *Klinicheskaya narkologiya*. 2003. No. №1. pp. 38-43.
6. Vinogradov V.A. Opioidnyj geksapeptid - dalargin v patogeneticheskoy terapii zabolevanij organov pishhevarenija. // *Sov.medicina*. 1988. № №10. S. 59-63.
7. Pan'kova T.D. Dokazatel'stva realizacii stimuliruyushhego e'ffekta dalargina na process kletoch'nogo deleniya cherez opiatnye receptory. // *Byul.e'ksperim. biologii i mediciny*. 1990. T. 110. № №7. S. 96-98.
8. Ganina S.S., Ragimov Ch.R. Ocenka e'ffektivnosti lecheniya dalarginom bol'nyx s flegmonami lica i shei po pokazatelyam svobodnoradikal'nogo okisleniya perifericheskoy krvi // *Stomatologiya*. 1991. № №6. S. 28-30.
9. Turgunov N.T., Lavrishheva G.I. Vliyanie geksapeptida dalargina na reparativnye processy v posttravmaticheski izmenyonnyx tkanyax kostej. // *Medicinskij zhurnal Uzbekistana*. 1989. S. 70-71.
10. Liashev Yu.D. Vliyanie opioidnyx peptidov na reparativnyuyu regeneraciyu kostnoj tkani. // *Arxiv patologii*. 2002. T. 64. № №1. S. 6-8.
11. Polezhaev L.V. Regeneraciya putyom indukcii. Moskva: Medicina, 1977.
12. Pellegrini G., Seol Y.J., Gruber R., and Giannobile W.V. Pre-clinical models for oral and periodontal reconstructive therapies. // *J Dent Res*. 2009. Vol. 88(12). pp. 1065-76.
13. Lee J.A., Ku Y., Rhyu I.C., Chung C.P., and Park Y.J. Effects of fibrin-binding oligopeptide on osteopromotion in rabbit calvarial defects. // *J Periodontal ImplantSci*. 2010. Vol. 40. No. 5. pp. 211-9.
14. Kulakov A.A., Grigor'yan A.S., Kiseleva E.V., Xamraev T.K., Filonov M.R., Gatiev A.B. Ustranenie kriticheskix kostnyx defektov s pomoshh'yu bioinzhenernoj konstrukcii na nerezorbiруемой полимерно́й основе s ispol'zovaniem autogennyx mul'tipotentnyxstromal'nyx kletok iz zhirovoj tkani. // *Stomatologiya*. 2010. № 3. S. 9-12.
15. Volkov A.V., Vasil'ev A.V., Rachinskaya O.A., Bol'shakova G.B., Gol'dshtejn D.V. Primenenie fluorescentnyx metok dlya ocenki regeneracii kostnoj tkani na modeli kriticheskix defektov temennyx kostej krysa s ispol'zovaniem adaptirovannogo metoda gistomorfometrii. // *Klinicheskaya i e'ksperimental'naya morfologiya*. 2013. № 2. S. 73-80.
16. Vasil'ev A.V., Bol'shakova G.B. Xarakteristika neoosteogeneza na modeli kriticheskogo defekta temennyx kostej krysa s pomoshh'yu tradicionnoj i tryoxmernoj morfometrii // *Geny i kletki. Ozhidaetsya publikaciya*
17. Millan M.J., Morris B.J. Long-term blockade of mu-opioid receptors suggests a role in control of ingestive behaviour, body weight and core temperature in the rat. // *Brain Res*. May 1988. Vol. 450(1-2). pp. 247-58.
18. Burr D.B., Allen M.R. Basic and Applied Bone Biology. Academic Press, 2013. 392 pp.
19. Parfitt A.M., Drezner M.K., Glorieux F.H., Kanis J.A., Malluche H., Meunier P.J., Ott S.M., and Recker R.R. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. // *J Bone Miner Res*. 1987. Vol. 2. No. 6. pp. 595-610.
20. Dempster D.W., Compston J.E., Drezner M.K., Glorieux F.H., Kanis J.A., Malluche H., Meunier P.J., Ott S.M., Recker R.R., and Parfitt A.M. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. // *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2013. Vol. 28(1). pp. 2-17.
21. Vasil'ev A.V., Buxarova T.B., Volkov A.V., Vixrova E.B., Bol'shakova G.B., and Gol'dshtejn D.V. Vliyanie dalargina na proliferaciyu mul'tipotentnyx mezenximal'nyx stromal'nyx kletok, dermal'nyx fibroblastov i kletok osteosarkomy cheloveka in vitro // *Geny i kletki. Ozhidaetsya publikaciya*.

Авторская справка:

1. Васильев Андрей Вячеславович, научный сотрудник лаборатории роста и развития НИИМЧ РАМН, младший научный сотрудник лаборатории генетики стволовых клеток МГНЦ РАМН. Тел. +7 (926) 813 35 00, E-mail: vav-stom@yandex.ru;

2. Большакова Галина Борисовна, д.б.н. заведующая лабораторией роста и развития НИИМЧ РАМН Тел.+7 (903) 188 57 87, E-mail: gbolshakova@gmail.com