

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МОРФОЛОГИИ  
ЧЕЛОВЕКА»

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР»

---

*На правах рукописи*

Васильев Андрей Вячеславович

ВЛИЯНИЕ ОПИОИДА ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ДАЛАРГИНА  
НА КЛЕТОЧНУЮ ПРОЛИФЕРАЦИЮ *IN VITRO*  
И РЕПАРАТИВНУЮ РЕГЕНЕРАЦИЮ КОСТНОЙ ТКАНИ *IN VIVO*

Специальность 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:  
доктор биологических наук  
Большакова Г. Б.  
доктор биологических наук,  
профессор Гольдштейн Д. В.

Москва - 2015

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>4</b>
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>11</b>
1.1 Опиоидные рецепторы.....	11
1.2 Агонисты опиоидных рецепторов .....	13
1.3 Механизм действия.....	14
1.4 Биосинтез эндогенных опиоидных пептидов .....	15
1.5 Даларгин.....	16
1.6 Опиоидные пептиды и регенерация .....	18
1.7 Готовые препараты опиоидов, которые можно использовать для стимуляции регенерации.....	20
1.8 Роль опиоидов в регенерации костной ткани.....	21
1.9 Блокаторы опиоидных рецепторов.....	23
1.10 Экспериментальные модели репаративной регенерации костной ткани.....	24
1.10.1 Модели дефектов костной ткани <i>in vivo</i> .....	24
1.10.2 Способы морфометрического анализа материала.....	26
1.10.3 Мечение тетрациклинами .....	28
1.10.4 Исследование на клеточной культуре <i>in vitro</i> .....	29
1.11 РЕЗЮМЕ .....	30
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....</b>	<b>31</b>
2.1 Исследование модели критического дефекта теменных костей крыс с помощью объёмной морфометрии .....	33
2.2 Оценка пролиферации клеточных культур.....	47
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ.....</b>	<b>51</b>
3.1 Разработка и усовершенствование методов исследования .	51

3.1.1	<i>Способ формирования критического дефекта теменных костей</i> .....	51
3.1.2	<i>Способ двойного мечения для модели критического дефекта теменных костей</i> .....	52
3.1.3	<i>Выбор способа оценки рентгенограмм</i> .....	54
3.1.4	<i>Выбор малотоксичного реактива для заключения в полимерные блоки</i> .....	55
3.1.5	<i>Требования к приготовлению шлифов</i> .....	56
3.1.6	<i>Математическая модель «резаный цилиндр»</i> .....	57
3.1.7	<i>Сравнение методик морфометрии</i> .....	65
3.2	<b>РЕЗУЛЬТАТЫ ВЛИЯНИЯ ДАЛАРГИНА НА ПРОЦЕССЫ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ</b> .....	68
3.3	<b>РЕЗУЛЬТАТЫ ВЛИЯНИЯ ДАЛАРГИНА И НАЛОКСОНА НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР</b> .....	77
<b>4</b>	<b>ОБСУЖДЕНИЕ</b> .....	<b>85</b>
<b>5</b>	<b>ВЫВОДЫ</b> .....	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	<b>95</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

С момента открытия индукционного пути репаративной регенерации костной ткани [Полежаев, 1977] стали активно исследовать вещества, принимающие участие в этом процессе [Bilezikian et al., 2008]. Наиболее известные и изученные из них – это семейство костных морфогенетических белков (ВМР) [Burr, Allen, 2013]. В частности, ВМР-2 является сильнейшим индуктором неоостегенеза [Wikesjö et al., 2008]. Поскольку регенерация костной ткани является одной из основных проблем таких направлений практической медицины, как травматология и ортопедия, хирургическая стоматология и челюстно-лицевая хирургия, поиски новых веществ и создание препаратов, способных стимулировать образование костной ткани, не прекращаются.

После того, как была обнаружена реципрокная связь между экспрессией гена проэнкефалина (PENK) в созревающих остеобластах и их дифференцировкой, было высказано предположение о том, что опиоиды могут участвовать в регенерации костной ткани [Keshet et al., 1989; Rosen et al., 1995]. Опиодные рецепторы обнаружены на остеобластоподобных клетках линии MG-63 [Pérez-Castrillón et al., 2000]. Установлено, что образующие кость клеточные структуры, кроме зрелых остеобластов и остеокластов, способны синтезировать опиоиды [Elhassan et al., 1998].

Наиболее перспективным для изучения является структурный аналог эндогенного лей-энкефалина – даларгин. Это первый и единственный препарат опиоидов, изначально позиционированный как средство для ускорения регенерации. Показанием к его применению является язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки. Доказана его способность ускорять регенерацию

слизистой желудочно-кишечного тракта и других эпителиальных тканей в 1,5 - 2 раза [Виноградов, Полонский, 1986; Григоренко, 1990; Панькова, 1992]. Как опиоидный пептид периферического действия, даларгин не проникает через гематоэнцефалический барьер, то есть не является наркотическим средством [Виноградов, Полонский, 1986; Судаков, Судаков, 2003]. Влияние даларгина на регенерацию костной ткани практически не изучено.

Для оценки роли опиоидов в репаративной регенерации костной ткани и отсутствия туморогенной активности необходимы как исследования на клеточных культурах *in vitro*, так и эксперимент на животных *in vivo*, что позволит выявить непосредственное воздействие даларгина на рецепторы клеток, исключая влияние интегративных систем, а также позволит оценить его влияние в условиях целого организма.

### **Степень разработанности темы исследования**

Существуют единичные работы о влиянии как самого даларгина [Тургунов, Лаврищева, 1989], так и других опиоидов на процессы репаративной регенерации костной ткани [Ляшев, 2002]. Работа Н. Т. Тургунова и Г. И. Лаврищевой не содержала достоверных результатов, поскольку была пилотной и не была подкреплена статистической обработкой данных. Тем не менее в ней были выявлены следующие тенденции: даларгин ускоряет регенерацию костной ткани и увеличивает объём костного мозга. В работе Ю. Д. Ляшева показано, что к 7-му дню после перелома голени максимальные показатели остеогенеза были в той группе, где применялся селективный агонист κ-рецепторов динорфин, на 10-й день наилучший результат показал агонист μ-рецепторов DAGO, а на 14-й – агонист δ-рецепторов DSLET. Однако эксперимент был выполнен на трудно воспроизводимой модели перелома голени крыс: дефект не был строго фиксирован по размеру, а имел произвольный характер и был рассчитан на спонтанное сращение; методика

морфометрического анализа не соответствовала современным рекомендациям [Parfitt et al., 1987; Dempster et al., 2013]: главным образом вычисляли процентное соотношение костной ткани, хрящевой ткани и рубца в случайных полях зрения. Крайне малое количество однозначных достоверных данных по теме регенерации костной ткани под действием опиоидов требует проведения более тщательных исследований.

### **Цель исследования**

Целью настоящей работы является изучение влияния опиоида периферического действия даларгина на репаративную регенерацию костной ткани *in vivo* и пролиферацию нормальных и опухолевых клеток костной ткани *in vitro*.

### **Задачи исследования**

1. Оценить влияние даларгина на регенерацию костной ткани *in vivo* на модели критического дефекта теменных костей крыс.
2. Исследовать *in vitro* влияние даларгина на рост клеток разной степени зрелости одного дифферона: мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и дермальных фибробластов.
3. Изучить воздействие даларгина на пролиферацию клеток остеосаркомы человека линии HOS для оценки его влияния на опухолевый рост.
4. Определить тип опиоидных рецепторов, принимающих участие в регенерации костной ткани.

5. Для модели критического дефекта теменных костей крыс разработать доказательные методы объёмной динамической морфометрии костной ткани, включающие адаптацию двойного мечения флуорохромами и разработку метода 3D-морфометрии, точно характеризующего регенерат, с последующим сравнением с традиционными 2D-методиками.

### **Научная новизна исследования**

Данные, полученные *in vitro*, соответствуют результатам, полученным *in vivo*, что раскрывает механизм действия даларгина: он стимулирует пролиферацию, но не дифференцировку остеогенных клеток.

Впервые на модели критического дефекта теменных костей крыс с помощью объективных методов морфометрии показано подавляющее неоостеогенез действие даларгина и стимулирующее действие его сочетания с налоксоном.

Впервые выполнено сравнение пролиферативной активности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и их «опухолевого эквивалента» - клеток линии НОS - под действием опиоидов. Показано противоопухолевое действие даларгина, подавляющего пролиферацию линии клеток остеосаркомы. Установлено, что даларгин стимулирует пролиферацию незрелых клеток и не влияет на зрелые клетки в пределах одного дифферона.

Для точной оценки дефектов костной ткани цилиндрической формы, в частности критического дефекта теменных костей крыс, разработана математическая модель «резаный цилиндр» - метод 3D-морфометрии костной ткани на гистологических препаратах. Математическая модель «резаный цилиндр» самым точным образом воспроизводит контур дефекта и позволяет автоматически позиционировать срезы в пространстве. Её комбинация с адаптированным протоколом двойного мечения тетрациклиноподобными флуорохромами позволяет оценить динамику неоостеогенеза в объёме.

## **Теоретическая и практическая значимость исследования**

Полученные в работе результаты о подавлении даларгином пролиферации остеосаркомы линии HOS могут быть использованы для разработки новых подходов лечения опухолей костной ткани.

Полученные данные могут быть использованы для дальнейших исследований механизма действия опиоидов и разработки новых схем лечения и реабилитации в отделениях травматологии, ортопедии, челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии.

Разработанные новые подходы для объективной оценки регенерации костной ткани позволяют провести более точную количественную оценку этого процесса и повысить качество исследований, направленных на изучение репаративной регенерации костной ткани *in vivo*.

## **Методология и методы исследования**

В работе использованы следующие методы: гистологические (специфические методы окраски костной ткани, специальные методы подготовки костных шлифов и приготовление гистологических препаратов); морфометрические методы, методы флуоресцентной микроскопии, в том числе конфокальная микроскопия, компьютерное сегментирование и 3D-моделирование, математическое моделирование, статистические методы.



## **Положения, выносимые на защиту**

Даларгин замедляет репаративную регенерацию костной ткани, стимулируя пролиферацию клеток-предшественников, но не их дальнейшую дифференцировку, что приводит к снижению объёма костного регенерата.

Даларгин не оказывает влияния на пролиферацию зрелых соединительнотканых клеток - дермальных фибробластов и подавляет пролиферацию опухолевых клеток.

Разработанный метод 3D-морфометрии - математическая модель «резаный цилиндр» более точно характеризует регенерат в области критического дефекта теменных костей крыс по сравнению с классическими методами.

## **Степень достоверности и апробация работы**

Достоверность результатов обусловлена достаточным количеством контрольных групп в эксперименте и сравнением результатов, полученных различными методами морфометрии с помощью адекватно применённых статистических тестов.

Материалы диссертации были доложены на XVIII Межгородской конференции молодых учёных (СПб, 2012); V Всероссийской научно-практической конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина» (Москва, 2013); Всероссийской научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» с международным участием (Москва, 2014) и межлабораторной конференции (ФГБНУ НИИМЧ, Москва, апрель 2015).

## **Публикации**

По материалам диссертационной работы опубликовано 4 научные работы, из них 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, входящих в перечень ВАК.

## **Внедрение результатов работы**

Результаты исследования внедрены в лекционные курсы для студентов и ординаторов ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Минздрава России и ФГБНУ «Медико-генетический научный центр».

## **Объем и структура работы**

Диссертация изложена на 107 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов и их обсуждения, выводов, заключения и списка литературы, включающего в себя 45 российских и 66 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 39 рисунком и 3 таблицами.

## 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Опиоидные рецепторы

Опиоидные рецепторы включают 3 основные группы:  $\mu$ -рецепторы,  $\kappa$ -рецепторы,  $\delta$ -рецепторы. Их традиционно называют буквами греческого алфавита в соответствии с фармакологическими и анатомическими профилями взаимодействия их агонистов:  $\mu$  (мю)-рецепторы называются так, поскольку они имеют сродство к морфину,  $\kappa$  (каппа) – к кетоциклазоцину, а  $\delta$  (дельта) получили название от *vas deferens*, где они впервые были обнаружены. Номенклатура рецепторов менялась неоднократно. Существует номенклатура IUPHAR (International Union of Pharmacology) по обозначению опиоидных рецепторов как MOR ( $\mu$ ), KOR ( $\kappa$ ), DOR ( $\delta$ ) [International Union of Pharmacology., 2008; Girdlestone et al., 2000], но она является рекомендательной, поэтому в дальнейшем мы будем придерживаться ранее принятых названий.

Существуют и другие классы рецепторов, это прежде всего  $\tau$ -,  $\zeta$ -,  $\lambda$ -рецепторы, принадлежность которых к опиоидным остаётся неясной, главным образом из-за отсутствия их взаимодействия с неизбирательным блокатором опиоидных рецепторов – налоксоном. После выделения и клонирования  $\mu$ -,  $\kappa$ - и  $\delta$ -рецепторов их стали называть «классическими опиоидными рецепторами» [Сергеев и др., 1999; McNally, Akil, 2002]. Обращает на себя внимание их структурное родство (Рисунок 1)

Опиоидные рецепторы являются G-белок-связанными мембранными рецепторами. Ингибирование опиоидами аденилатциклазной системы приводит к закрытию потенциал-зависимых кальциевых каналов, стимуляции выброса калия и снижению концентрации в клетке циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) (Рисунок 2) [McDonald, Lambert, 2005]. Однако данные об

ингибировании аденилатциклазной системы носят несколько противоречивый характер, и поэтому неясно, каким именно образом происходит передача информации от рецептора в ядро клетки [Raynor et al., 1996; Dhawan et al., 1996].

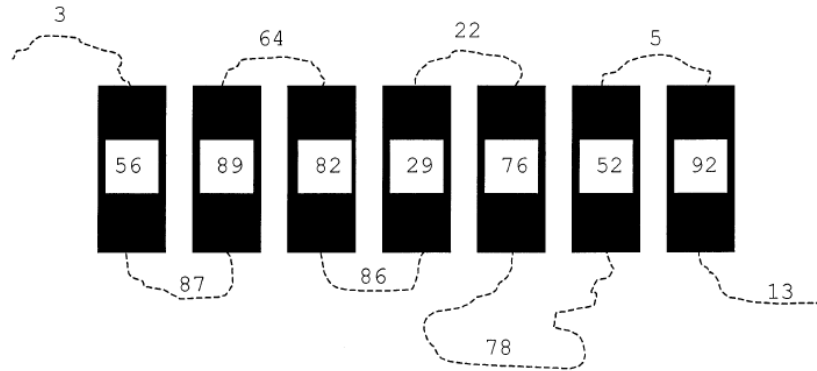


Рисунок 1 - Опиоидные рецепторы имеют высокую степень структурного сходства. Числа показывают проценты идентичных последовательностей аминокислот в разных участках, клонированных опиоидных  $\mu$ -,  $\delta$ - и  $\kappa$ -рецепторов. [McNally, Akil, 2002]

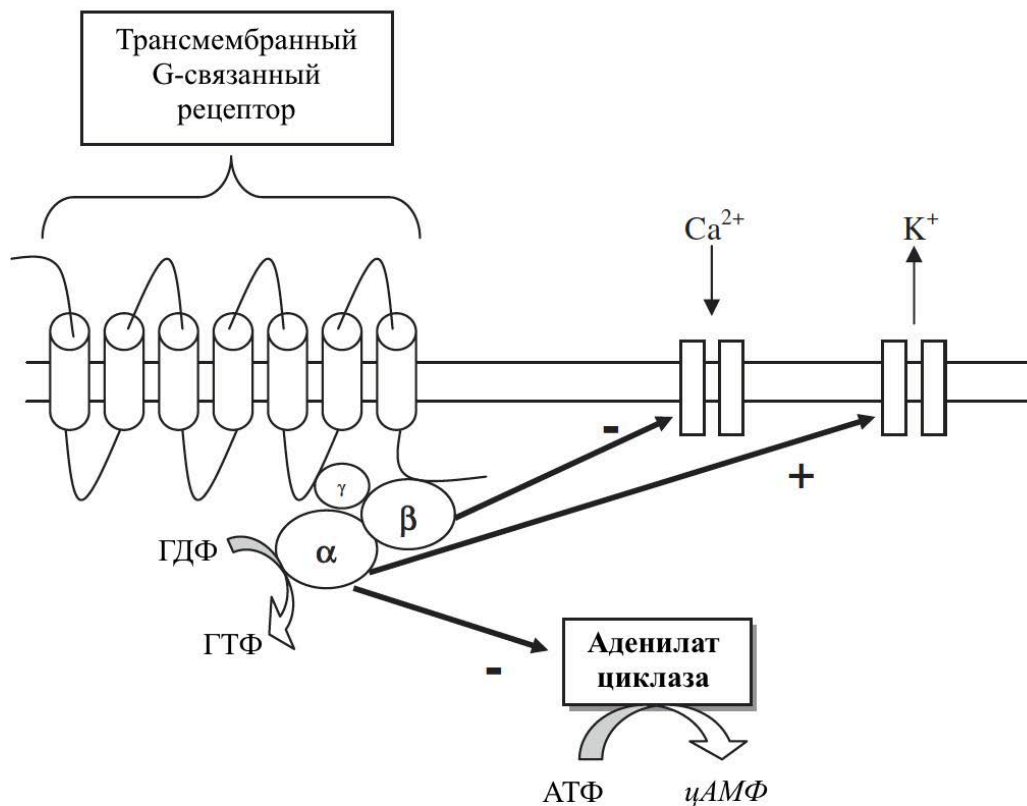


Рисунок 2 - Механизм действия опиоидов [McDonald, Lambert, 2005].

Разные типы опиоидных рецепторов имеют подтипы:  $\delta$ -рецепторы -  $\delta 1$  и  $\delta 2$  подтипы,  $\mu$ -рецепторы –  $\mu 1$ ,  $\mu 2$ ,  $\mu 3$ ;  $\kappa$ -рецепторы -  $\kappa 1$ ,  $\kappa 2$ ,  $\kappa 3$ . С помощью синтетических высокоспецифичных лигандов показано, что эти подтипы рецепторов также гетерогенны: например, для  $\kappa$ -опиоидных рецепторов описаны их варианты  $\kappa 1b$ ,  $\kappa 2a$ ,  $\kappa 2b$ ,  $\kappa 2a-1$ ,  $\kappa 2b-1$ ,  $\kappa 2b-2$ . [Lai et al., 1995]. Было высказано мнение, что такое разнообразие подтипов опиоидных рецепторов связано с аллостерическими модификациями одного комплекса, и опиоидные рецепторы могут модифицироваться (переходить из одного типа в другой) под влиянием конкретных физиологических условий [Голанов, 1986].

## 1.2 Агонисты опиоидных рецепторов

Агонистами опиоидных рецепторов являются главным образом сами опиоиды. Их можно разделить на две группы: эндогенные и экзогенные. Впервые эндогенные, то есть вырабатываемые самим организмом, опиоиды были обнаружены в середине 70-х годов XX века в желудочках мозга. Это были два пентапептида, названные энкефалинами [Уайт и др., 1981]. Их ген был выделен в 1982 году [Noda et al., 1982]. После энкефалинов были открыты и изучены динорфины [Horikawa et al., 1983] и эндорфины [Chang et al., 1980]. Сейчас к опиоидным пептидам относят и ноцицептин (орфанин FQ) [Meunier et al., 1995], но его рецептор (NOP) не относится к «классическим опиоидным рецепторам» [Сергеев и др., 1999; McDonald, Lambert, 2005]. До настоящего времени еще не классифицирован не так давно открытый эндоморфин - эндогенный морфиноподобный опиоид непептидной структуры [Zadina et al., 1997].

Экзогенные опиоиды, в свою очередь, можно разделить на природные, полусинтетические и синтетические. С древних времён наиболее популярным в

медицине природным опиоидом остаётся морфин, впервые выделенный немецким фармакологом Фридрихом Сертюрнером из опиума в 1804 году. Позже из морфина английским химиком Алдером Райтом в 1874 году [Becket, Wright, 1874] был синтезирован полусинтетический опиоид героин (диацетилморфин). Существует большое количество других природных и полусинтетических опиоидов, однако на сегодняшний момент в связи с развитием химических технологий стало возможным создавать их более эффективные синтетические аналоги. До открытия эндогенного морфина [Zadina et al., 1997] считалось, что природными эндогенными опиоидами человека являются опиоиды пептидной структуры, например энкефалины, эндорфины, динорфины. Большой интерес к изучению именно опиодных пептидов, появившийся с 80-х годов прошлого столетия, позволил в достаточной мере изучить их природу, чтобы внедрить в клиническую практику.

### **1.3 Механизм действия**

По механизму действия опиоидные пептиды очень схожи с гормонами, но в отличие от них имеют менее продолжительный период полураспада и синтезируются не только в специализированных органах - эндокринных железах. В связи с этим опиоидные пептиды относят к отдельной группе сигнальных молекул— регуляторным пептидам [Ашмарин, 2005]. В пользу такого разделения также свидетельствуют данные о том, что опиоиды являются эволюционно древними молекулами-сигнализаторами. Рецепторы к ним обнаружены у инфузорий [Дьяконова, 2001], гидр и планарий [Шейман, Крещенко, 2008], то есть у животных, у которых отсутствуют эндокринные железы. Опиоиды содержатся и в растениях, – первые попытки человечества изучения этих веществ начинались с изучения алкалоидов опия.

Опиоидные пептиды проявляют биологическую активность, воздействуя на опиоидные рецепторы, которые, как было показано в экспериментах, существуют практически во всех тканях организма: нервной системе, коже, печени, сердце, склере глаза, микрососудах, кишечнике, желудке, иммунной системе и так далее.

Существуют гипотезы о влиянии опиоидных пептидов и их синтетических аналогов не прямо на рецепторы, а посредством продуктов их метаболизма – аминокислот. Например, тирозин, находящийся на концевом участке опиоидных пептидов, активирует микролимфоциркуляцию, что связано с прямой активацией опиоидных рецепторов лимфатических сосудов тирозином [Хугаева, 1990]. Продолжительность жизни опиоидов измеряется минутами и десятками минут в зависимости от аминокислотного состава конкретного пептида, в то время как эффект может сохраняться более длительно. В связи с этим существует гипотеза об участии опиоидных пептидов в каскадных самоподдерживающихся реакциях, что приводит к сохранению их эффекта в течение длительного времени [Виноградов и др., 1991; Панченко и др., 1999].

#### **1.4 Биосинтез эндогенных опиоидных пептидов**

Предшественники опиоидных пептидов разделяют на 3 большие группы: 1) проопиомеланокортин [Chang et al., 1980], 2) препроэнкефалин [Noda et al., 1982] и 3) препродинорфин [Horikawa et al., 1983; McNally, Akil, 2002] [Сергеев и др., 1999]. Такое деление справедливо только для агонистов классических опиоидных рецепторов, в противном случае групп было бы больше [McDonald, Lambert, 2005]. Что интересно, структура веществ, дающих начало опиоидным пептидам, аналогична таковой у предшественников других биологически активных веществ, например, адренкортикотропного и

меланоцитостимулирующего гормона. Это говорит в пользу их эволюционного родства: они кодируются одними и теми же генами. Предшественники опиоидов, в частности энкефалинов, синтезируются в гранулярном эндоплазматическом ретикулуме, далее поступают в аппарат Гольджи, где в составе везикул проходят ряд изменений за счёт отщепления аминокислот и экскретируются из клетки. Но на этом этапе их метаболизм не заканчивается. Пре-формы подвергаются дальнейшему превращению в активную форму внеклеточными ферментами, после чего деградируют из-за воздействия мембранных и интерстициальных ферментов. Некоторые из ферментов участвуют не только в деградации энкефалинов, но и одновременно приводят к их активации, например, ангиотензинпревращающий фермент. Из известных ферментов следует также отметить участвующие в активации: внутриклеточную карбоксипептидазу Н, внеклеточную карбоксипептидазу М, карбоксипептидазу N; и в деградации: эндопептидазу, аминопептидазу и ариламидазу [Панченко и др., 1999; Costa et al., 1987].

### 1.5 Даларгин

Даларгин является синтетическим аналогом лей-энкефалина. В отличие от других препаратов опиоидных пептидов, которые являются наркотическими средствами, аминокислотная последовательность даларгина подобрана таким образом, чтобы препарат в терапевтических концентрациях не проникал через гематоэнцефалический барьер. Отсутствие взаимодействия даларгина с рецепторами головного мозга позволяет избежать формирования наркотической зависимости [Судаков, Судаков, 2003]. Даларгин является первым и на настоящий момент единственным препаратом опиоидов, изначально применяющимся с целью ускорения регенерации. Показания к его применению: язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки,



панкреатит, панкреонекроз. Показания связаны с многочисленными исследованиями стимулирующего влияния даларгина на пролиферацию клеток желудка и кишечника при язвенной болезни. Кроме того, доказана роль опиоидных пептидов как регуляторов эпителиального гомеостаза желудочно-кишечного тракта [Виноградов, 1988; Виноградов, Полонский, 1986; Григоренко, 1990]. Даларгин выпускают в форме лиофилизата для инъекций, что позволяет осуществить его доставку практически к любым органам и тканям.

**Способы введения даларгина.** Внутривенное введение даларгина сопровождается более выраженным и практически мгновенным наступлением эффекта, в то время как эффект от подкожного и внутримышечного введения может наблюдаться спустя 15 минут [Коваленко, 1991]. Особый интерес вызывает эндоназальное введение препарата с помощью электрофореза или закапывания. Такой путь введения эффективен благодаря большому количеству лимфатических микрососудов в слизистой носа, активность которых сама по себе стимулируется опиоидными пептидами. Эндоназальный способ наиболее приемлем для человека, так как не вызывает неприятных ощущений, сопряжённых с инъекцией, прост и удобен, а эффективность действия сопоставима с другими способами. В эксперименте на животных наиболее целесообразными являются подкожный, внутрибрюшинный и внутримышечный способы введения даларгина. Энтеральный путь введения даларгина неэффективен, т.к. препарат разрушается в ЖКТ.

**Дозировки.** В эксперименте при травме роговицы глаза у белых крыс наиболее эффективно повышающей процессы клеточного деления оказалась дозировка даларгина 100 мкг/кг, – оценивались результаты влияния на митоз по индексу меченых ядер (ИМЯ) и интенсивности метки (ИМ). Интересен тот факт, что эффект наблюдался и в сверхмалой дозировке 0,1 мкг/кг. При высоких дозировках, начиная с 1000 мкг/кг, эффект снижался вплоть до полного исчезновения и даже противоположного эффекта при 10000 мкг/кг

[Панькова, 1992]. В другом эксперименте при воздействии агонистов опиоидных рецепторов на моторику микролимфососудов наблюдались похожие тенденции: снижение эффективности при высоких дозировках и присутствие эффекта при низких, наиболее эффективной также была установлена дозировка 100 мкг/кг [Хугаева, 1990]. Кроме того, в инструкции к самому препарату рекомендуемой для человека дозировкой указывается 100 мкг/кг.

Существуют и несколько иные данные. Например, в одной из экспериментальных работ на собаках противоязвенная активность даларгина была отмечена, начиная с 1 мкг/кг. Максимальное действие препарат оказывал при дозировке 12,5 мкг/кг, когда язвенный индекс понижался в 6 раз по сравнению с контролем. Увеличение дозы даларгина свыше 125 мкг/кг приводило к постепенному уменьшению противоязвенной активности. При подкожном введении даларгина в дозе 10-15 мкг/кг даларгин не вызывал развития привыкания и физической зависимости, не влиял на функции центральной нервной системы и не оказывал обезболивающего эффекта [Виноградов и др., 1991]. Однако во всех этих работах прослеживается следующая закономерность: достоверного различия влияния на эффект удавалось достичь при изменении концентрации даларгина на порядок (в 10 раз).

Несмотря на то, что даларгин считается опиоидным пептидом периферического действия, в концентрации свыше 500 мкг/кг препарат способен проникать через гематоэнцефалический барьер и взаимодействовать с рецепторами мозга [Виноградов, Полонский, 1986].

## **1.6 Опиоидные пептиды и регенерация**

Можно выделить два основных пути влияния опиоидных пептидов на регенерацию тканей: во-первых, прямое воздействие на рецепторы клетки, что

приводит к повышению её митотической активности; во-вторых, не прямое воздействия за счёт нормализации стрессового фона. Опиоидные пептиды оказывают стресс-протекторное воздействие с помощью следующих механизмов: антиноцицептивное действие, улучшение гемо- и лимфоциркуляции [Матющенко, 2009; Хугаева, 1990; Ардасенов и др., 2004], антиоксидантное действие [Ганина, Рагимов, 1991], нормализация как тканевого иммунитета, так и реактивности всей иммунной системы [Булачевский и др., 2008; Парахонский, 2008], противовоспалительный эффект [Ардасенов и др., 2004; Клименко, Перин, 2010]. Опиоиды вызывают снижение колебаний общей гемодинамики и концентрации гормонов, негативно влияющих на регенерацию, - окситоцина и кортизола [Григоренко, 1990]. В ряде работ прослеживается мысль, что влияние опиоидных пептидов направлено скорее не на снижение или повышение каких-либо параметров, а скорее приводит к их нормализации [Кассир, 2006; Егоркина, Елисеева, 2010], т.е. делает организм невосприимчивым к стрессовым раздражителям.

Прямое воздействие опиоиды оказывают за счёт стимуляции соответствующих клеточных рецепторов. Так, в экспериментах на эпителиальных тканях опиоиды разных групп ускоряли регенерацию в 1,5 – 2 раза [Ганина, Рагимов, 1991; Максакова, 2002], причём при местном воздействии скорость регенерации была выше, нежели при инфузии препарата, что, вероятно, свидетельствует о большей эффективности прямого воздействия опиоидов.

Хотя в 80-е - 90-е годы активно изучалось влияние опиоидов на регенерацию других тканей, в подавляющем большинстве эпителиальных [Виноградов, Полонский, 1986; Слепушкин, 1989; Панькова, 1992; Глазунова и др., 2007], убедительных данных о влиянии опиоидов, в том числе даларгина или его прямых аналогов, на процессы репаративной регенерации костной ткани в отечественной и зарубежной литературе найдено не было.

## 1.7 Готовые препараты опиоидов, которые можно использовать для стимуляции регенерации

Действие опиоидов можно подразделить на центральное и периферическое. Центральное действие обусловлено прохождением опиоидов через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и воздействием на рецепторы центральной нервной системы (ЦНС) [Ken, Thomas, 2006]. Хорошо известные эффекты опиоидов, такие как гипотермия, противокашлевый эффект, эйфория, формирование наркотической зависимости связаны прежде всего с центральным механизмом [Харкевич, 2006]. Таким образом, если использовать опиоиды для коррекции процессов регенерации вне ЦНС, эти эффекты будут необоснованными. По этой причине наибольший интерес представляют препараты периферического действия, то есть не проникающие в терапевтических дозировках через ГЭБ. К ним относятся: лоперамид (агонист  $\mu$ -рецепторов [Nakamura et al., 1982]), тримебутин (полный агонист  $\mu$ -,  $\kappa$ -,  $\lambda$ -рецепторов [Pascaud et al., 1989]), альвимопан, метилналтрексон (оба  $\mu$ -агонисты не зарегистрированные в России) и даларгин (агонист  $\mu$ -,  $\lambda$ -рецепторов [Белоусова, Булгаков, 2011]).

Лоперамид, тримебутин, альвимопан и метилналтрексон являются производными морфина, то есть опиоидами непептидной структуры. Формы выпуска этих препаратов не позволяют вводить их парентерально, что затрудняет их доставку к органам помимо желудочно-кишечного тракта. Интересна особенность тримебутина оказывать продолжительное терапевтическое действие. Это связано со способностью как тримебутина, так и его метаболита N-десметил-тримебутина воздействовать на опиоидные рецепторы [Pascaud et al., 1989]. Поможет ли это отличие более выгодно повлиять на скорость репаративной регенерации костной ткани, прогнозировать сложно, потому что до конца не известны механизмы самоподдерживающихся каскадных реакций, триггерами которых выступают

опиоиды. Традиционно все перечисленные препараты используются в гастроэнтерологии. Однако нижеприведенные экспериментальные данные позволяют говорить о том, что область применения даларгина может не ограничиваться одной лишь гастроэнтерологией, в то время как для других препаратов информация в литературе либо отсутствует полностью, либо чрезвычайно скудна.

## **1.8 Роль опиоидов в регенерации костной ткани**

Впервые предположение о том, что опиоиды могут участвовать в регенерации костной ткани, было высказано ещё в 1995 году [Rosen et al., 1995; Keshet et al., 1989] в результате обнаружения реципрокной связи между экспрессией гена проэнкефалина (PENK) в созревающих остеобластах и их дифференцировкой. На настоящий момент существуют данные о том, что опиодные рецепторы обнаружены на остеобластоподобных опухолевых клетках [Pérez-Castrillón et al., 2000] и что образующие кость клеточные структуры, кроме зрелых остеобластов и остеокластов, способны синтезировать опиоиды [Elhassan et al., 1998].

Поскольку в процессе эмбрионального развития в созревающей костной ткани экспрессия генов других предшественников опиодных пептидов, кроме проэнкефалина, не наблюдается [Keshet et al., 1989], мы сделали вывод о том, что среди всех препаратов именно даларгин как синтетический аналог лей-энкефалина, имеет наибольший потенциал как препарат, который сможет использоваться в дальнейшем в клинике.

В одном из экспериментов рассматривалось действие самого даларгина на регенерацию костной ткани и костного мозга [Тургунов, Лаврищева, 1989]. К сожалению, эти работы были предварительными и не подкреплены статистическим анализом. Эксперимент проводился только на трубчатых

костях. Тем не менее, основываясь на представленных данных, можно отметить следующие тенденции, обозначенные в этой работе: даларгин ускоряет регенерацию костного мозга и костной ткани, а также увеличивает объём регенерации костного мозга.

Наибольший интерес вызывает работа Ю.Д. Ляшева (2002) [Ляшев, 2002]. Исследователю удалось с помощью стимуляции опиоидных рецепторов ускорить регенерацию кости в 1,5 раза. При этом скорость регенерации на разных сроках зависела от вида агонистов опиоидных рецепторов. На 7 день после перелома голени наивысшие показатели остеогенеза были в той группе, где применялся селективный агонист κ-рецепторов диноρφин, на 10 день наилучший результат показал агонист μ-рецепторов DAGO, а на 14-й – агонист δ-рецепторов DSLET. Однако в группе, где применялся DAGO, соединительной ткани не осталось вовсе к 14 дню – её заменила хрящевая и костная. Тем не менее, методика получения результатов в данной работе вызывает некоторые сомнения, связанные с тем, что дефект не был строго фиксирован по размеру, а имел произвольный характер и был рассчитан на спонтанное сращение; методика морфометрических подсчётов не соответствовала современным рекомендациям [Parfitt et al., 1987]. Всё это ставит под сомнение достоверность полученных данных и требует проведения более тщательных исследований.

Об участии опиоидов в процессах физиологического ремоделирования костной ткани мало известно. Однако в ряде работ сообщается, что хроническая интоксикация героином и метадоном у наркоманов и у больных, получающих препараты опиоидов в качестве обезболивания, не приводит к статистически значимому изменению минеральной плотности костной ткани [Pedrazzoni et al., 1993; Kim et al., 2006; Vestergaard et al., 2012]. Кроме того, установлено отсутствие эффекта опиоидных анальгетиков на ремоделирование костной ткани в процессе ортодонтического движения зубов [Rashidpour et al., 2012; Akhoundi et al., 2010]. Судя по этим данным, опиоиды не участвуют в

физиологической жизнедеятельности костной ткани, а проявляют свою активность только при патологических состояниях.

### **1.9 Блокаторы опиоидных рецепторов**

Блокатор опиоидных рецепторов имеет схожую с агонистом химическую структуру, но отличается по строению активного конца, который взаимодействует с рецептором. За счёт этого блокатор связывается с мембранным опиоидным рецептором, но не вызывает изменения его конформации - передача сигнала в клетку не происходит. Блокатор конкурентно вытесняет агониста, препятствуя его взаимодействию с рецептором.

Блокаторы опиоидных рецепторов используются для подтверждения рецептор-опосредованного действия изучаемых агонистов. В случае, если эффект, вызванный агонистом, исчезает при совместном использовании с блокатором, считается, что эффект обусловлен именно стимуляцией рецептора [Ардасенов и др., 2004].

Наиболее популярным и давно известным антагонистом опиоидных рецепторов является неизбирательный блокатор опиоидных рецепторов налоксон. Обращает на себя внимание особенность налоксона избирательно блокировать  $\mu$ -рецепторы в концентрации до 0,5 мг/кг. Неизбирательное блокирование всех типов опиоидных рецепторов наблюдается только в концентрации свыше 3 мг/кг [Millan, Morris, 1988; Millan, Colpaert, 1991; Allescher et al., 1988].

## 1.10 Экспериментальные модели репаративной регенерации костной ткани

### *1.10.1 Модели дефектов костной ткани in vivo*

Как было отмечено ранее, изучению влияния опиоидов на процессы репаративной регенерации костной ткани посвящены две работы [Тургунов, Лаврищева, 1989; Ляшев, 2002]. В обеих используют дефекты трубчатых костей. Работу Н.Т. Тургунова и Г.И. Лаврищевой можно считать пилотным экспериментом, не получившим продолжения. В этом исследовании использовалось крайне малое количество животных и выполнялась лишь качественная оценка материала, полученного после пропила большеберцовой кости крысы. Работа Ю.Д. Ляшева, напротив, выполнена на большом количестве животных, однако воспроизводимость модели исследования вызывает некоторые сомнения: использовался нестандартизированный перелом голени крыс. Анализ материала, в свою очередь, не соответствовал требованиям, предъявляемым к проведению морфометрического исследования костной ткани [Parfitt et al., 1987; Dempster et al., 2013]: исследователь измерял, главным образом, соотношение площади рубца к площади костной ткани в случайных полях зрения.

Считается общепринятым, что механизмы регенерации костной ткани мембранозного и энхондрального происхождения различны [Виноградова, Лаврищева, 1974; Burr, Allen, 2013]. По этой причине не совсем уместно сравнивать данные, полученные при анализе регенерации костей, различных по происхождению, что следует учитывать при постановке эксперимента.

Грызуны (мыши и крысы) и кролики чаще всего используются в качестве животных-моделей в биомедицинских исследованиях. Регенерация костной ткани у кроликов имеет некоторые особенности, что препятствует



интерполяции полученных данных на другие объекты исследования [Полежаев, 1977].

Использование крыс экономически выгодно, несложно и даёт возможность стандартизации экспериментальных условий у генетически схожих особей. Крысы хорошо подходят для изучения влияния системных заболеваний и фармакологического лечения на разрушение и восстановление тканей [Graves et al., 2008], а также для оценки физиологических возрастных изменений [Benatti et al., 2006]. В ряде случаев хирургическое вмешательство и оценка конечных точек эксперимента вызывают затруднения в связи с малыми размерами животных. По этой причине разработано ограниченное количество моделей для оценки регенерации костей черепа, используемых, в частности, для преклинических исследований в челюстно-лицевой хирургии, травматологии и стоматологии. Наиболее известные из них: модель фенестрации костной лунки, модель переимплантата у крыс, модель экстракционной лунки, модель вертикального прироста кости (капсулирование) и модели критического дефекта нижней челюсти и теменных костей. [Takagi, Urist, 1982; Pellegrini et al., 2009].

Среди этих моделей наиболее популярной можно считать модель критического дефекта теменных костей крыс [Spicer et al., 2012], позволяющая получить воспроизводимые данные и сравнить их со многочисленными результатами других исследований.

Модель критического дефекта теменных костей крыс используют для изучения эффективности и безопасности различных остеопластических материалов, клеточных продуктов и новых технологий для костной пластики [Полежаев, 1977; Pellegrini et al., 2009; Lee et al., 2010; Кулаков и др., 2010].

Для оценки регенерации кости применяются рентгенологические [Takagi, Urist, 1982] и гистологические методы исследования, которые позволяют определить объем и площадь, занимаемые костной тканью в регенерате. Однако для морфометрии критических дефектов теменных костей

из-за цилиндрической формы нанесенных повреждений [Parfitt et al., 1987] требуются адекватные методы морфометрии, адаптированные к объекту исследования.

### *1.10.2 Способы морфометрического анализа материала*

Для гистоморфометрии костной ткани существует общепринятая номенклатура параметров [Parfitt et al., 1987], которая обновляется и совершенствуется [Dempster et al., 2013]. Однако сами способы и подходы морфометрии весьма различны. Прежде всего отличие заключается в способе получения изображения, которое подвергается анализу. Так, например, морфометрию костной ткани можно выполнять по данным гистологических срезов и 3D-моделям, построенным по компьютерной томографии [Arvidsson et al., 2015].

Преимущество гистологического среза заключается в том, что на нём можно выявить большое количество морфологических структур в высоком разрешении, применяя различные способы окраски. К недостаткам классической морфометрии на гистологических срезах можно отнести то, что получаемые данные являются двухмерными, то есть они не могут в точности характеризовать изначально объёмный, трёхмерный объект исследования [Chappard et al., 2005; Dias et al., 2013].

В свою очередь, преимущество микрокомпьютерной томографии заключается в том, что этот способ позволяет получить 3D-изображение. Однако главным его недостатком является то, что получаемое изображение является картой распределения рентгенологической плотности и другой информации не несёт, в то время как гистологическая картина не является монохромной и в зависимости от применяемого метода окраски может

дифференцировать различные по химической природе структуры [Ромейс, 1953; Arvidsson et al., 2015].

В связи с этим наиболее интересным было бы совмещение преимуществ каждого из этих методов. Способы построения 3D моделей по данным гистологических срезов известны с XIX века [Ромейс, 1953]. Главным образом, они сводились к созданию восковых моделей по контурам, проецированным с гистологических срезов, или получению изображения на бумаге псевдо-3D-объекта. С началом цифровой эры появились программные продукты для выполнения виртуальных 3D-реконструкций [Fiala, 2005]. Однако предпосылки к разработке удобных в рутинной практике алгоритмов, которые были бы с достаточной точностью и удобством адаптированы к конкретным моделям исследования и включали бы рекомендации, начиная от подготовки образца до его гистоморфометрии с помощью персонального компьютера, стали появляться совсем недавно [Горбунов, 2008]. Для модели критического дефекта теменных костей крыс такие алгоритмы ещё не разработаны.

Серию гистологических срезов можно получить с бóльшими промежутками, чем виртуальные срезы при микрокомпьютерной томографии, что может привести к артефактам в виде "лесенки" на поверхности модели при выполнении реконструкции сложного объекта. В этом случае необходима адаптация математических вычислений к конкретному объекту исследования.

Помимо способов получения 3D-данных, особого внимания заслуживает такой параметр, как время. Отслеживание динамики регенерации на одном препарате с последующей 3D-реконструкцией позволит получить так называемую 4D-картину. В исследованиях костной ткани для получения такой информации подходит метод двойного мечения тетрациклиноподобными метками [Burr, Allen, 2013].

### *1.10.3 Мечение тетрациклинами*

Флуоресценция тетрациклинов в костной ткани была описана R.A. Milch и соавторами в 1958 году, после чего методика была модифицирована для мечения фронта минерализации [Baud, Dupont, 1962; Frost, 1962; Harris et al., 1962]. Суть данного метода заключается в том, что тетрациклины, попадая в организм, образуют хелатные соединения с ионами кальция, что обеспечивает их накопление в местах минерализации костной ткани [Ibsen, Urist, 1962]. В процессе дальнейшей минерализации кости тетрациклины, связанные с кальцием, «замуровываются», таким образом происходит отложение тетрациклиновых меток. Под воздействием ультрафиолетового излучения тетрациклины флуоресцируют - излучают фотоны видимого светового спектра. Каждый тетрациклиноподобный флуорохром излучает видимый свет определённой длины волны, т.е. определённого цвета, что позволяет дифференцировать метки.

Классическая методика мечения тетрациклиноподобными флуорохромами подразумевает окраску только фронта минерализации, что выглядит как линия, или, при двойном мечении, как две линии, отграничивающие области костной ткани, образованной в соответствующие сроки [Burr, Allen, 2013]. Такой результат неприемлем для модели дефекта теменных костей в связи со сложной формой самого регенерата и неравномерным аппозиционным ростом. Методика должна быть изменена так, чтобы костный регенерат на определенном сроке образования был полностью окрашен соответствующим флуорохромом. Полное окрашивание регенерата облегчает последующий компьютерный анализ изображения. Прижизненное введение животным флуоресцентных тетрациклиноподобных меток отменяет необходимость формирования многих экспериментальных групп на разных сроках наблюдения, используемых в классических исследованиях [Lim et al., 2000].

Стандартные критерии гистоморфометрии костной ткани не позволяют в полной мере оценить информацию, полученную таким способом [Parfitt et al., 1987; Dempster et al., 2013], в связи с чем требуется их методические модификации. Помимо этого, особого внимания заслуживают способы подготовки гистологического материала. Традиционные парафиновые срезы плохо подходят для этой задачи, так как при их изготовлении трудно избежать деформации материала. Поэтому наиболее подходящими для этой цели представляются серийные срезы образца, заключённого в твёрдые полимерные смолы. В этом случае отпадает необходимость освобождать образец от заливочной среды, которая служит жёсткой основой для препарата и предотвращает его деформацию. Кроме того, этот метод не требует декальцинации образцов, что позволяет использовать в эксперименте тетрациклиноподобные метки, которые связываются с ионами кальция.

Изготовление недекальцинированных срезов, пригодных для изучения флуоресценции, требует заливки в твёрдые среды, как правило, эпоксидные смолы или акриловые пластмассы. На сегодняшний момент самыми популярными наборами реактивов для заливки костной ткани являются Osteo-Bed (Polysciences Inc., США) и Technovit (Heraeus Kulzer GmbH, Германия). Основные компоненты этих наборов: мономер метилметакрилата, измельчённый полиметилметакрилат и активатор пероксид бензоила. Поскольку метилметакрилат является токсичным для человека [Aydin et al., 2002], желательно заменить его на безопасный аналог, например, мономер этилметакрилата, используемый в стоматологии [Leggat, Kedjarune, 2003].

#### ***1.10.4 Исследование на клеточной культуре in vitro***

Для определения непосредственного действия даларгина на активность самой клетки за счёт активации её клеточных рецепторов и исключения

интегративных систем и для подбора оптимальной концентрации препарата наиболее целесообразной моделью исследования является клеточная культура [Фрешни, 2011; Бухарова, 2014]. Поскольку на функциональную активность опиоидных рецепторов влияет показатель кислотности (pH) и баланс ионов в окружающем рецептор растворе [Белоконева, 1990], события, происходящие на клеточной модели, могут иметь некоторые отличия от событий, происходящих в целостном организме. По этим причинам исследования *in vitro* должны быть дополнены экспериментами *in vivo*.

Наиболее простым для изучения на клеточной модели является такой важный процесс регенерации, как пролиферация [Карлсон, 1986; Song et al., 2013], поэтому было бы разумным начать изучение механизма действия даларгина *in vitro* именно с неё.

### 1.11 Резюме

В настоящее время отсутствуют определённые данные о влиянии опиоидов на процессы регенерации костной ткани, в то время как существуют предпосылки для исследований в этом направлении. Во-первых, из фрагментарных данных литературы трудно сформировать заключение о роли эндогенных опиоидов в физиологии костной ткани, её ремоделировании и регенерации. Неизвестно, какие именно рецепторы в большей степени участвуют в этом процессе и каков механизм этого действия. Во-вторых, несмотря на предположения о том, что опиоиды могут положительно влиять на процессы регенерации костной ткани, убедительных доказательств о влиянии фармакологических препаратов опиоидов не было представлено. По этой причине требуются соответствующие исследования на воспроизводимых животных моделях *in vivo* с применением прогрессивных методик доказательного морфометрического анализа. При этом с целью понимания механизма действия и исключения воздействия других систем организма требуются исследования на клеточных моделях *in vitro*.

## 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование включало три этапа. Прежде всего были отработаны методики операции, гистологической обработки материала и разработаны новые методы объёмной морфометрии. Затем было проведено экспериментальное исследование влияния даларгина на репаративную регенерацию костной ткани на крысах. В дальнейшем изучали воздействие даларгина и его блокатора налоксона на пролиферацию клеточных культур *in vitro* (Таблица 1).

Таблица 1. Общая характеристика исследования.

<b>Предварительная отработка и модификация методик</b>					
Разработка техники операции для создания критического дефекта теменных костей крыс	Адаптация протокола двойного мечения флуорохромами к модели критического дефекта теменных костей крыс	Выбор способа оценки рентгенограмм	Подбор реактива для заливки образцов в полимерные блоки полиэтилметакрилата	Разработка метода объёмной морфометрии - Математической модели "резаный цилиндр"	Предварительный морфологический анализ по традиционным гистологическим срезам
5 крыс	9 крыс 27 препаратов	21 образец свода черепа	12 образцов заливочной смеси без образцов + 7 образцов костной ткани, полимеризованных в блок	12 образцов	6 крыс
<b>Исследование влияния даларгина и налоксона на репаративную регенерацию костной ткани <i>in vivo</i> и клеточную пролиферацию <i>in vitro</i></b>					
Изучение модели критического дефекта теменных костей крыс после отработки методик	Изучение пролиферации клеточных культур <i>in vitro</i>				
		ММСК	ФБД	линия НОS	
21 крыса 21 прицельная рентгенограмма 54 препарата	3 культуры по 21 чашки Петри	3 культуры по 21 чашки Петри	3 повтора по 21 чашки Петри		



## 2.1 Исследование модели критического дефекта теменных костей крыс с помощью объёмной морфометрии

Исследование проводили на 21 самце крыс линии Sprague-Dawley массой тела 350 г. Для отработки методик дополнительно использовали 12 крыс (см. главу 3.1). Эксперимент соответствовал рекомендациям локального биоэтического комитета (Протокол № 8а заседания биоэтической комиссии ФГБУ «ННИИМЧ» РАМН от 10.11.2012), при его постановке 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 в Российской Федерации» от 2003 г.

Под внутрибрюшинным наркозом (Золетил (Virbac, Франция) в дозировке 125 мкг/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.

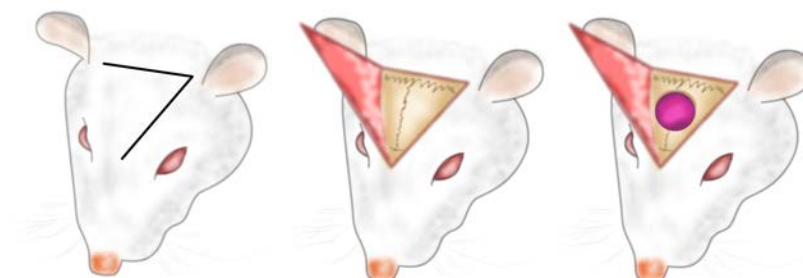


Рисунок 3 - Дизайн операционной раны при выполнении модели критического дефекта теменных костей крысы.

В послеоперационном периоде крысы были разделены на 3 группы по 7 крыс в каждой. В первой группе, контрольной (К), исследуемым животным ежедневно внутрибрюшинно вводили физиологический раствор в объеме 0,5 мл, во второй (Д) – 0,5 мл раствора даларгина в дозировке 100 мкг/кг, в третьей (Д+Н) – 0,5 мл смеси растворов даларгина и налоксона в дозировке 100 мкг/кг и 3 мг/кг соответственно. Поскольку налоксон является неизбирательным блокатором опиоидных рецепторов, его использование позволяет установить, действует ли даларгин непосредственно на рецепторы. Концентрации препаратов были выбраны исходя из того, что налоксон в дозировке 3 мг/кг неизбирательно блокирует все типы опиоидных рецепторов [Millan, Morris, 1988], а оптимальная дозировка даларгина для достижения наилучшего рецептор-опосредованного эффекта, по данным литературы, составляет 100мкг/кг [Панькова, 1992; Ардасенов и др., 2004].

Для оценки динамики неоостеогенеза на разных сроках мы проводили прижизненное двойное мечение новообразованной костной ткани по ранее разработанной методике (см. главу 3.1.2). Во всех экспериментальных группах крысам делали внутрибрюшинные инъекции раствора доксициклина к началу активной минерализации остеоида на 8-й, 9-й и 10-й день после операции. Механизм мечения основывается на связывании тетрациклиноподобных флуорохромов с ионами кальция с образованием хелатных соединений, которые накапливаются в новообразованной костной ткани, что обеспечивает их последующую визуализацию. Затем на 15-й, 16-й и 17-й день эксперимента крысам внутрибрюшинно вводили раствор ализарина красного С, который, включаясь в новообразованную костную ткань, образует новую меченую область. На 22-й, 23-й и 24-й день инъекции ализарина повторяли 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 четырехдневными перерывами).

На 28-й день, что соответствовало окончанию процессов первичного остеогенеза [Burr, Allen, 2013], крыс выводили из эксперимента передозировкой наркоза Золетил/Рометар. Далее с помощью зуботехнического отрезного диска забирали костный фрагмент свода черепа, который фиксировали в 40% этиловом спирте в течение 24 часов. Такой способ фиксации широко употребляется для сохранения флуоресцентных меток и хорошей пропитки костной ткани [Yuehuei, Kylie, 2003].

Полученный 21 образец свода черепа, включающий дефект, подвергали прицельной рентгенографии (радиовизиограф Gendex Expert DC) (Рисунок 4а). 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 (Рисунок 4б).

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  $+60^{\circ}\text{C}$ , после чего разогретую смесь этилметакрилата и перекиси бензоила разливали по пластиковым баночкам, погружали в них образцы кости и выдерживали в термостате при температуре  $+37^{\circ}\text{C}$  в течение 7 дней. Затем образцы выдерживали в термостате при температуре  $+60^{\circ}\text{C}$  для окончательной полимеризации (Рисунок 5а).

Срезы изготавливали с помощью закреплённой портативной стоматологической установки с использованием прямого наконечника и стандартного алмазного зуботехнического отрезного диска диаметром 42 мм (Рисунок 5б). 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 (Рисунок 5в).

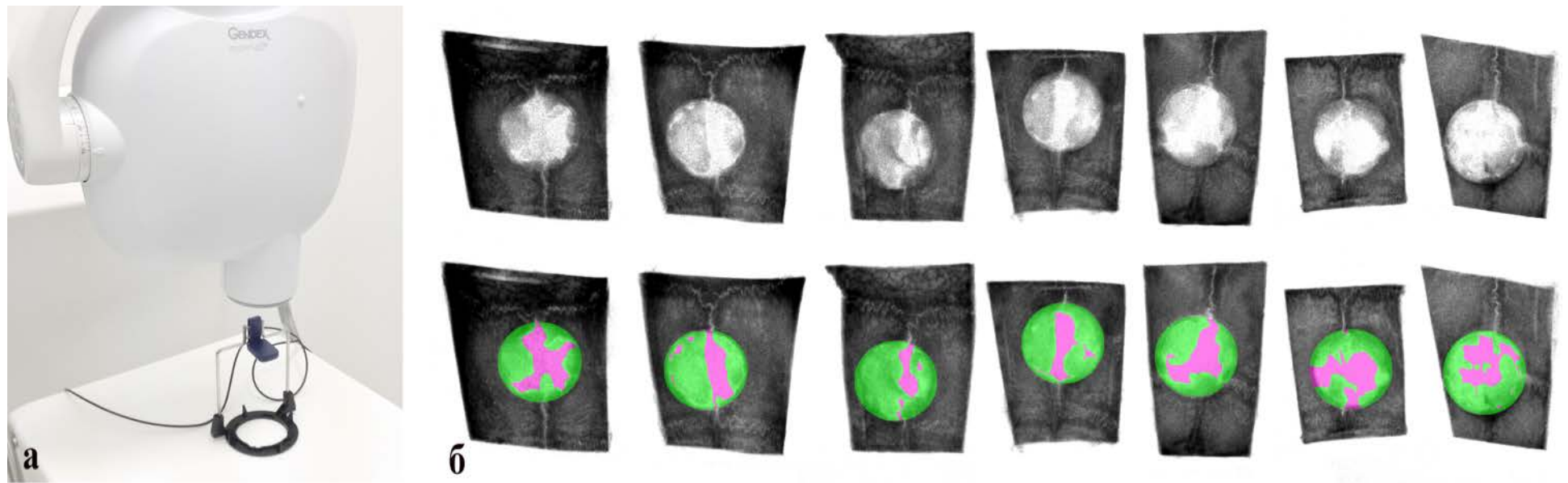


Рисунок 4 - Прицельная рентгенография образцов. **а** - Организация рабочего места. Штатив для позиционирования датчика собран из направляющих, входящих в комплект к прибору. **б** - Выделение на рентгенограмме области дефекта (розовый цвет) и образованного регенерата (зелёный цвет).

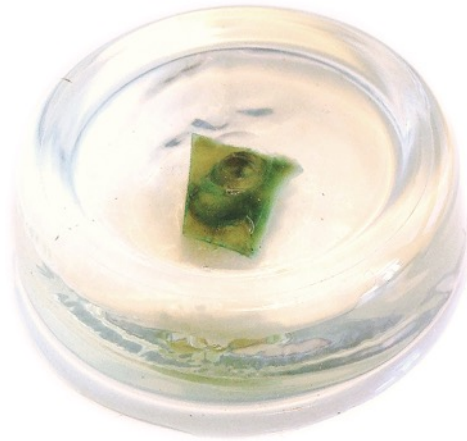
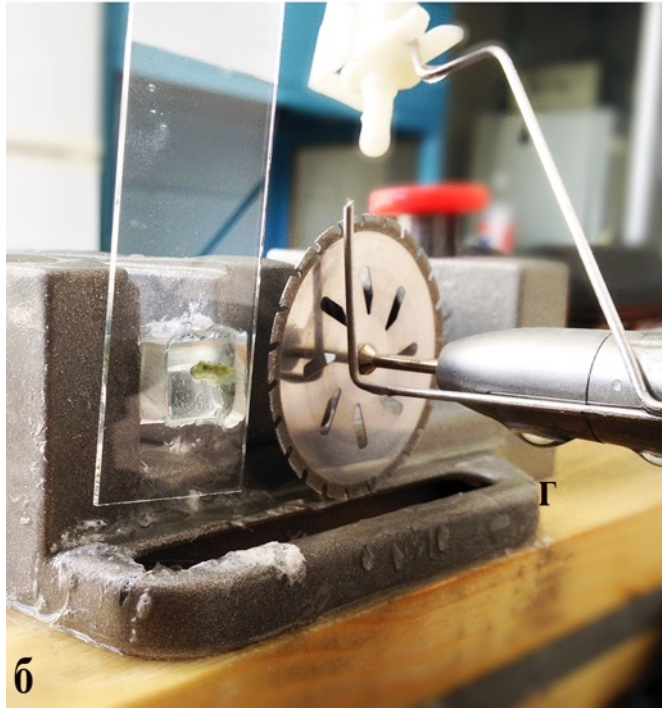
**а****б****в**

Рисунок 5 - Этапы приготовления шлифов. **а** - Образец свода черепа, заключённый в блок полиэтилметакрилата. **б** - Нарезка материала на самодельном отрезном станке. **в** - Серия шлифов, полученных из образца теменных костей крысы.

**Морфометрия по данным люминесцентной микроскопии.** 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) и микроскоп Биомед 6 ЛЮМ (Корея) со стандартным зелёным светофильтром) визуализировали флуорохромное свечение новообразованной костной ткани жёлто-зелёного (доксциклин) и красного цветов (ализариновый красный С). Полученные изображения объединяли в панорамное изображение каждого среза с помощью программы Adobe Photoshop CS6 (США) (Рисунок 6). 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, получая следующие морфометрические параметры [Parfitt et al., 1987] [Dempster et al., 2013]:

♦Т.Ar – площадь дефекта кости. Для определения других параметров все площади и периметры измеряли только в области Т.Ar, (Рисунок 7) (Рисунок 13), поскольку нашей целью было оценить характеристики регенерата, заполняющего непосредственно дефект. Такой подход облегчает стандартизацию метода;

♦Md.Ar.1 – площадь минерализованной костной ткани, содержащей первую метку;

♦Md.Ar.2 – площадь минерализованной костной ткани, содержащей вторую метку;

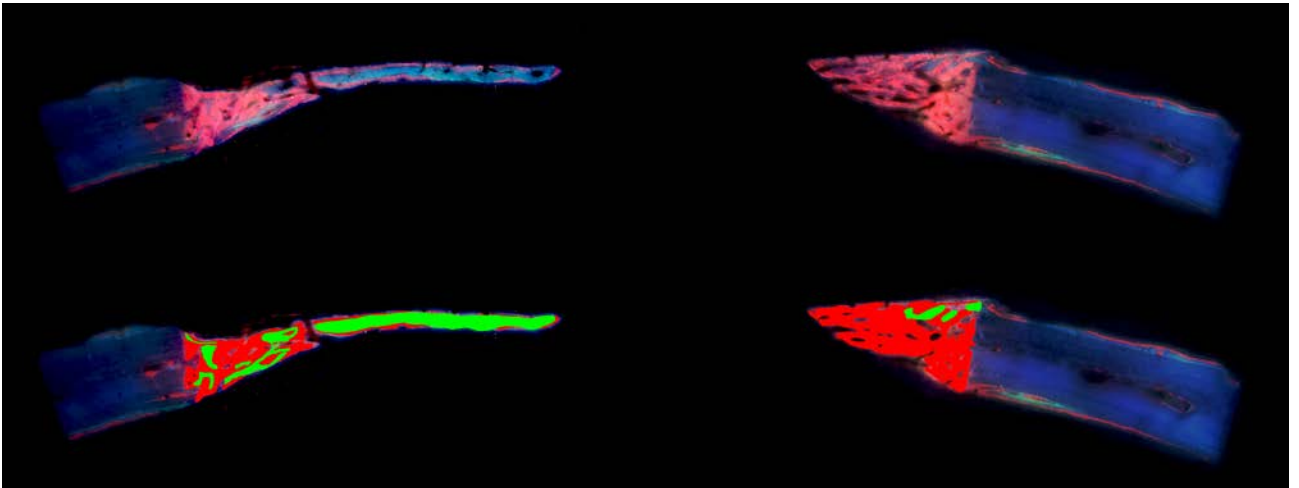


Рисунок 6 - Шлиф дефекта теменных костей крысы при флуоресцентной микроскопии. Сверху - свечение бирюзовым доксицилина и красным - ализарина. Снизу – обработка того же изображения для морфометрического анализа в Photoshop: зелёным выделена доксицилиновая метка, красным - ализариновая метка. Объектив х5.

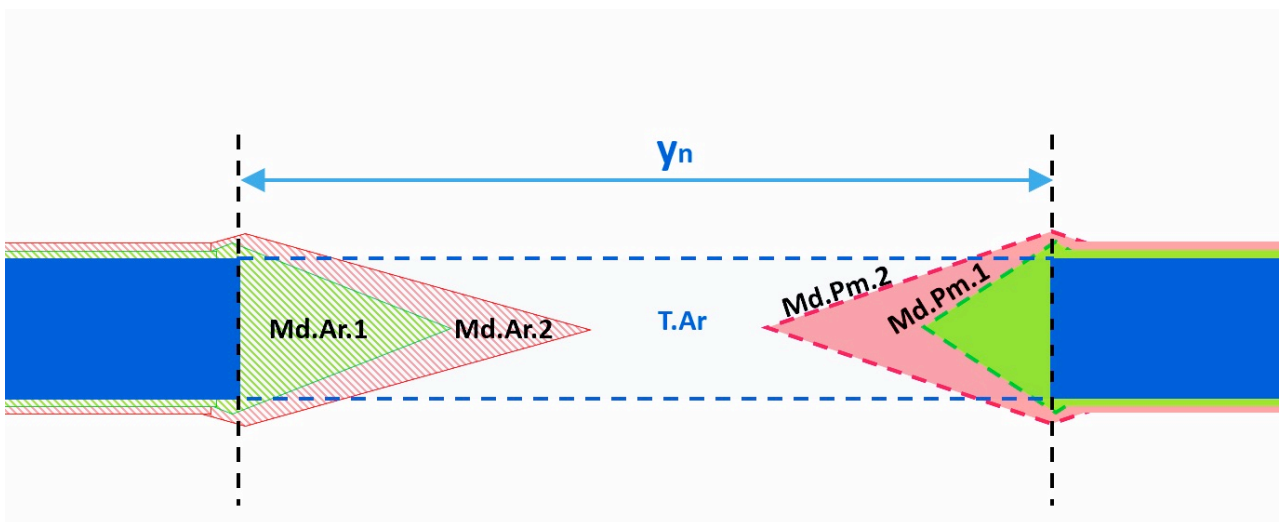


Рисунок 7 – Схема определения 2D параметров на срезе критического дефекта теменной кости. Первая метка показана зелёным цветом, вторая - красным.



На основе плоскостных параметров регенерата, определенных на каждом шлифе [Parfitt et al., 1987; Dempster et al., 2013], вычисляли его объемные параметры с помощью построения 3D-моделей по данным шлифов. Для этого изображения серии гистологических шлифов загружали в программу Visage Imaging Amira v5.5 (США), где размещали в пространстве (Рисунок 8), выполняли разметку (Рисунок 9) и осуществляли построение трёхмерной модели в соответствии с разметкой (Рисунок 10, Рисунок 11). Далее производилось вычисление объёмов регенерата и дефекта, а также их соотношение, то есть значение относительного объёма регенерата.

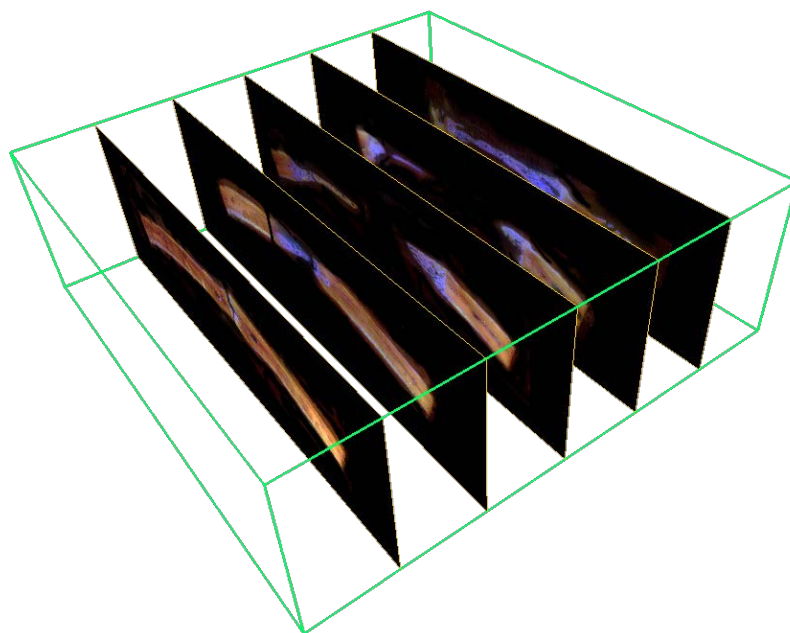


Рисунок 8 - Позиционирование гистологических срезов в пространстве.

Этот метод имеет неоспоримое преимущество: в результате получалась 3D-модель, по которой можно было визуально оценить характер распространения регенерата в объёме дефекта (Рисунок 11). Нами было выполнено 3 таких реконструкции.

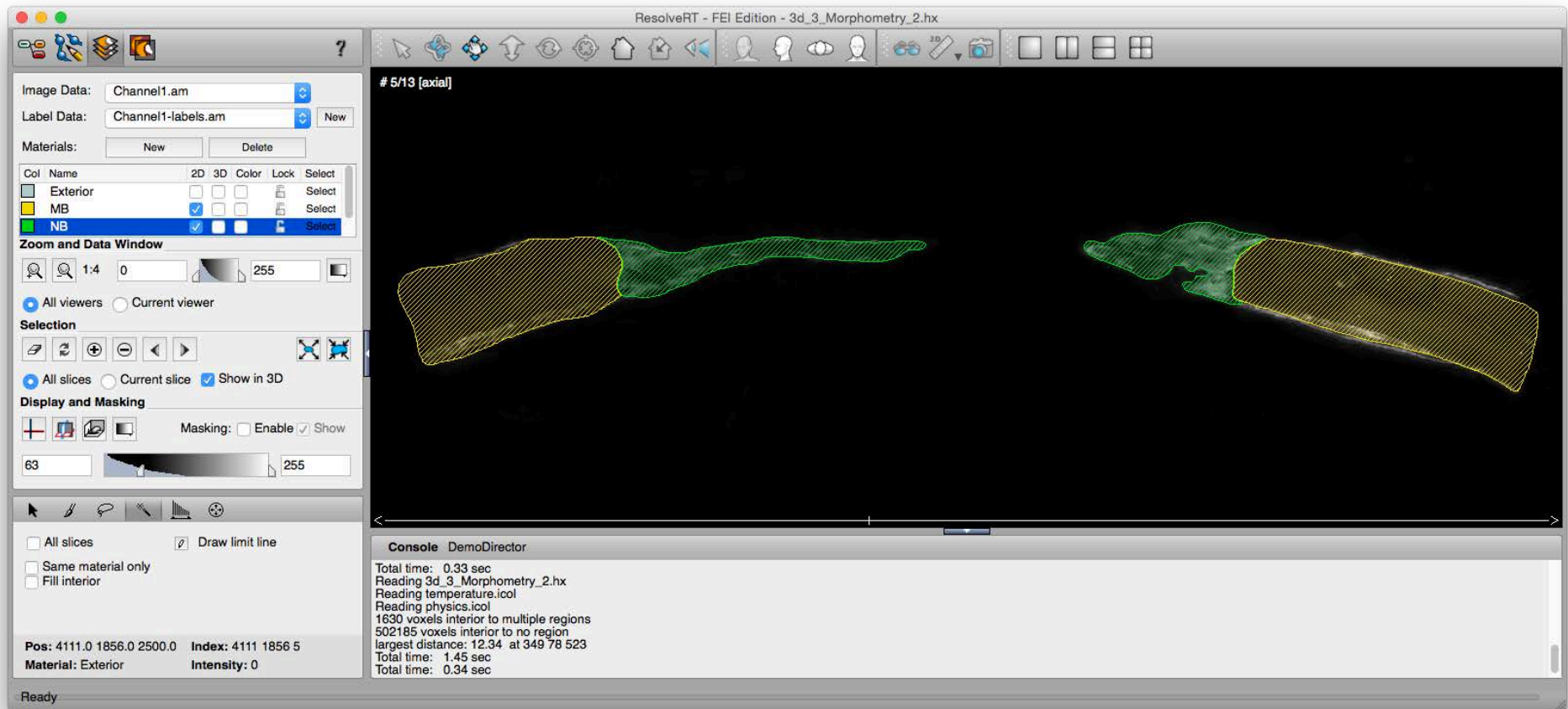


Рисунок 9 - Разметка изображений серии гистологических препаратов в программе Amira.

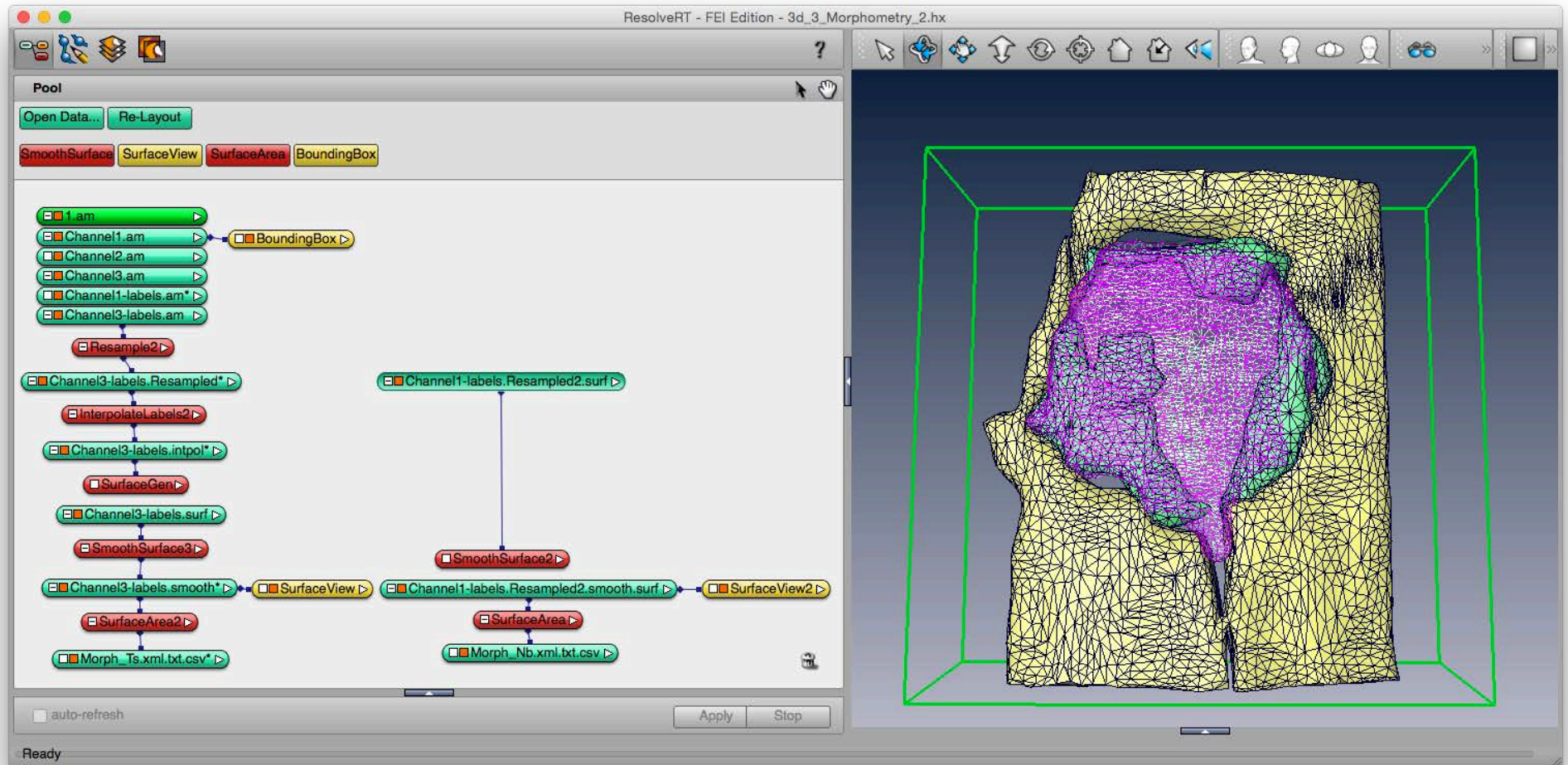


Рисунок 10 - Построение 3D-моделей в соответствии с выполненной ранее разметкой в программе Amira. Слева в окне программы показана группа модулей, используемых для реконструкции и морфометрии.

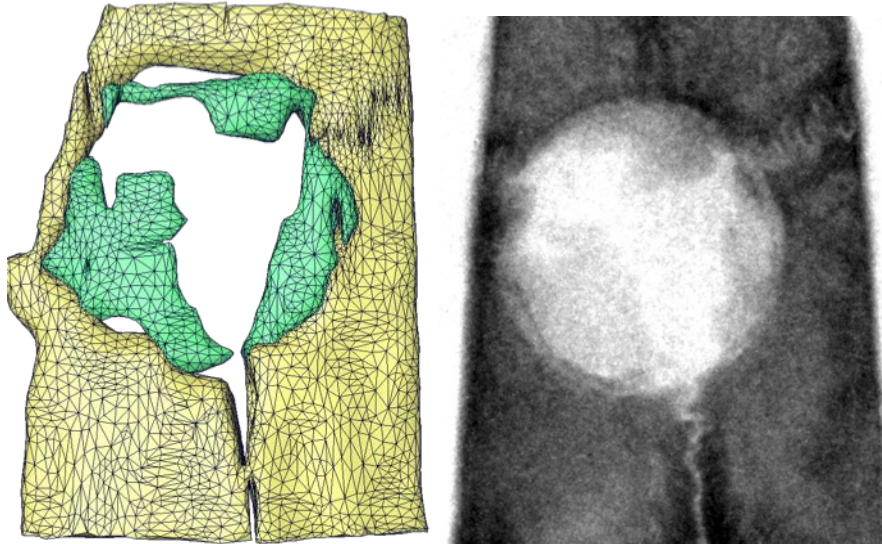


Рисунок 11 - 3D-реконструкция по гистологическим срезам. Зелёным цветом показана новообразованная костная ткань. Справа для сравнения показана прицельная рентгенограмма того же образца.

Несмотря на безусловные достоинства, метод не лишен существенных недостатков:

- Позиционирование каждого среза приходилось проводить на глаз, что при использовании оборудования с нестандартизированным шагом реза вносило существенные искажения размеров и форм.
- При получении малого количества срезов (меньше 10) пространственные искажения слишком велики. В нашем случае мы получали от 8 до 14 срезов с препарата
- Стандартный протокол программы Amira не адаптирован к построению 3D-модели цилиндрической формы (костного регенерата).

В связи с этим возникла необходимость в альтернативной более точной методике для выполнения объёмной морфометрии. Для этого нами была разработана математическая модель «резанный цилиндр» (см. главу 3.1.6), хорошо адаптированная к модели критического дефекта теменных костей крыс.

Эта модель основывается на алгебраической формуле окружности, находящийся в координатной плоскости. Её использование за счёт применения индивидуальных для каждого среза коэффициентов ( $k_n$ ) позволяет максимально точно воспроизвести 3D-структуру дефекта по данным шлифов, которые

выполнялась на самодельном отрезном станке с нестандартизированным шагом реза (Рисунок 5) (см. главу 3.1.6, пункт 2б).

Используя выведенные коэффициенты, объёмные параметры вычислялись следующим образом.

- ♦ MV.1 – объём минерализованной новообразованной костной ткани в первые 14 дней во всём дефекте - параметр пересчёта 2D информации в 3D. Вычисляется через определённый ранее множитель, индивидуальный для каждого среза -  $k_n$ . Для нахождения MV.1 параметр Md.Ar.1 умножали на  $k_n$ , после чего складывали полученные со всех срезов значения. Для первого среза множитель  $k$  определялся иначе, чем в остальных случаях (см.  $k_1$ ).

- ♦ MV.2 - объём минерализованной новообразованной костной ткани в последние 14 дней. Вычисляли через Md.Ar.2, аналогично MV.1.

- ♦ MV.nb - объём всей минерализованной костной ткани в области дефекта, образованной к концу эксперимента. Вычисляли через Md.Ar.nb, аналогично MV.1. или как сумма MV.1 и MV.2. ( $MV.nb = MV.1 + MV.2$ )

- ♦ TV - объём дефекта кости. Вычислялся через T.Ar, аналогично MV.1.

**Конфокальная микроскопия.** С целью детального анализа морфологии костного регенерата, меченного флуоресцентными метками, шлифы изучали с помощью конфокального микроскопа (Leica TCS SP8 X). Его использование позволяло получать послойное изображение регенерата и визуализировать клеточные структуры на толстых шлифах. Ализариновую метку визуализировали с помощью возбуждающего источника света длинной волны 580 нм и фильтрацией эмиссии 679 нм. Доксициклиновую метку визуализировали с помощью возбуждающего источника света частотой 450 нм и фильтрацией эмиссии 540 нм.

**Микроскопия в проходящем свете.** После того как шлифы исследовали с помощью люминесцентной и конфокальной микроскопии, их окрашивали в водном растворе толудинового синего, подкисленного уксусной кислотой (10 мин) и кислого фуксина (30 мин). Далее шлифы обезвоживали в

восходящих спиртах, карбол-ксилоле и ксилоле и заключали в канадский бальзам.

Оценку морфологии тканей и клеток в области регенерата проводили на классических парафиновых срезах. Для этого дополнительно использовали образцы теменных костей, полученные в процессе пилотного эксперимента. Всего использовали 6 образцов, по 2 образца для каждой группы исследования. Теменные кости, содержащие дефект, после фиксации в нейтральном 10% растворе формалина декальцинировали в смеси концентрированной муравьиной кислоты и 15% раствора формалина 1:1 в течение 2-3 суток, после чего образцы обезвоживали в восходящих спиртах, просветляли в ксилоле и заливали в парафиновые блоки по общепринятой методике. Далее на санном микротоме (Microm HM 430, Thermo Scientific, Германия) выполняли срезы толщиной 5-10 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином и заключали под покровное стекло в бальзам (Bio-Optica, Италия)

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.

**Статистический анализ.** Относительные площади дефекта, измеренные на рентгенограммах, 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 рангового дисперсионного анализа Краскала-Уоллиса с последующим тестом Данна.

Для сравнения методик морфометрии их результаты подвергали статистическому анализу. В зависимости от характера распределения данных были использованы методы параметрической (парный *t*-тест Стьюдента) и непараметрической (корреляционный анализ по Спирмену) статистики с помощью программы SigmaStat 3.5 (SyStat Software).

## 2.2 Оценка пролиферации клеточных культур

Изучение влияния даларгина (Биолек, Украина) и его блокатора налоксона (Польфа, Польша) на пролиферацию клеток проводили на мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках человека (ММСК), дермальных фибробластах человека (ФБД) и опухолевых клетках саркомы человека линии НОS.

**Получение клеточных культур.** Культуры ФБД и ММСК были получены, соответственно, из кожного биоптата и липоасpirата взрослых здоровых доноров после подписания добровольного развернутого информированного согласия.

Три культуры ММСК жировой ткани от трех доноров были получены по ранее разработанной методике из липоасpirата [Бухарова и др., 2011; Бухарова, 2014]. Полученные культуры соответствовали требованиям, предъявляемым к ММСК [Dominici et al., 2006]: они представлены адгезивными фибробластоподобными клетками (Рисунок 12а), экспрессируют CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, способны к дифференцировке в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях [Бухарова и др., 2011; Бухарова, 2014].

Три культуры ФБД были получены от трёх доноров. Для выделения дермальных фибробластов у донора забирали фрагмент кожи (2х3х4 мм), промывали в растворе Хэнкса (Панэко, Россия), измельчали и дезагрегировали в 0,25% растворе трипсина (Панэко, Россия) в течение 40 мин при 37°C. Клетки осаждали центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 мин, ресуспензировали в ростовой среде, состоящей из DMEM/F12 (ПанЭко, Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, РАА, Австрия) и 0,1 мг/мл амикацина (Синтез, Россия), высевали на чашки Петри с плотностью посева 0,5-1х10<sup>3</sup> кл/см<sup>2</sup> и культивировали до формирования конфлюентного монослоя при стандартных условиях (37°C, 5% CO<sup>2</sup>) (Рисунок 12б). Ростовую

среду меняли каждые 3 сут. В культурах дермальных фибробластов путем иммунофлуоресцентного анализа была выявлена экспрессия коллагена I, III типа и эластана.

Клетки остеосаркомы человека линии HOS были любезно предоставлены компанией «РеМеТэкс» (Россия) (Рисунок 12в).

Замораживание клеток в концентрации 1,5 млн/мл производили в криопробирках в ЭТС с добавлением 10% раствора ДМСО (диметилсульфоксида, ПанЭко, Россия). Сначала криопробирки помещали в морозильную камеру для охлаждения со скоростью  $-1^{\circ}\text{C}/\text{ч}$  до  $-80^{\circ}\text{C}$ , а затем в жидкий азот.

**Экспериментальная часть.** Клетки после размораживания культивировали в течение 1 суток, затем рассеивали в чашки Петри диаметром 90 мм, выполненные из адгезивного полимера (Nunc, Дания). Три культуры ММСК и три культуры ФБД рассеивали по  $70 \times 10^3$  клеток на чашку. Клетки остеосаркомы человека линии HOS рассеивали по  $50 \times 10^3$  клеток на чашку, эксперимент повторяли трижды.

Для культивирования использовали ростовую среду DMEM/F12 1:1 (ПанЭко, Россия), содержащую 2 mM L-глутамин (ПанЭко, Россия), 10% ЭТС (РАА, Австрия) и 0,1 мг/мл амикацина (Синтез, Россия).

Оценка влияния различных доз даларгина и его блокатора налоксона на пролиферацию ММСК, ФБД и клеток остеосаркомы линии HOS проводилась в 5 экспериментальных группах для каждой клеточной культуры:

Контроль - изотонический раствор хлорида натрия 0,09%.

1 группа – комбинация даларгина (100 мкг/л) и налоксона (0,5 мг/л);

2 группа – комбинация даларгина (100 мкг/л) и налоксона (3 мг/л)

3 группа – даларгин в концентрации 10 мкг/л;

4 группа – даларгин в концентрации 100 мкг/л;

5 группа – даларгин в концентрации 1000 мкг/л;



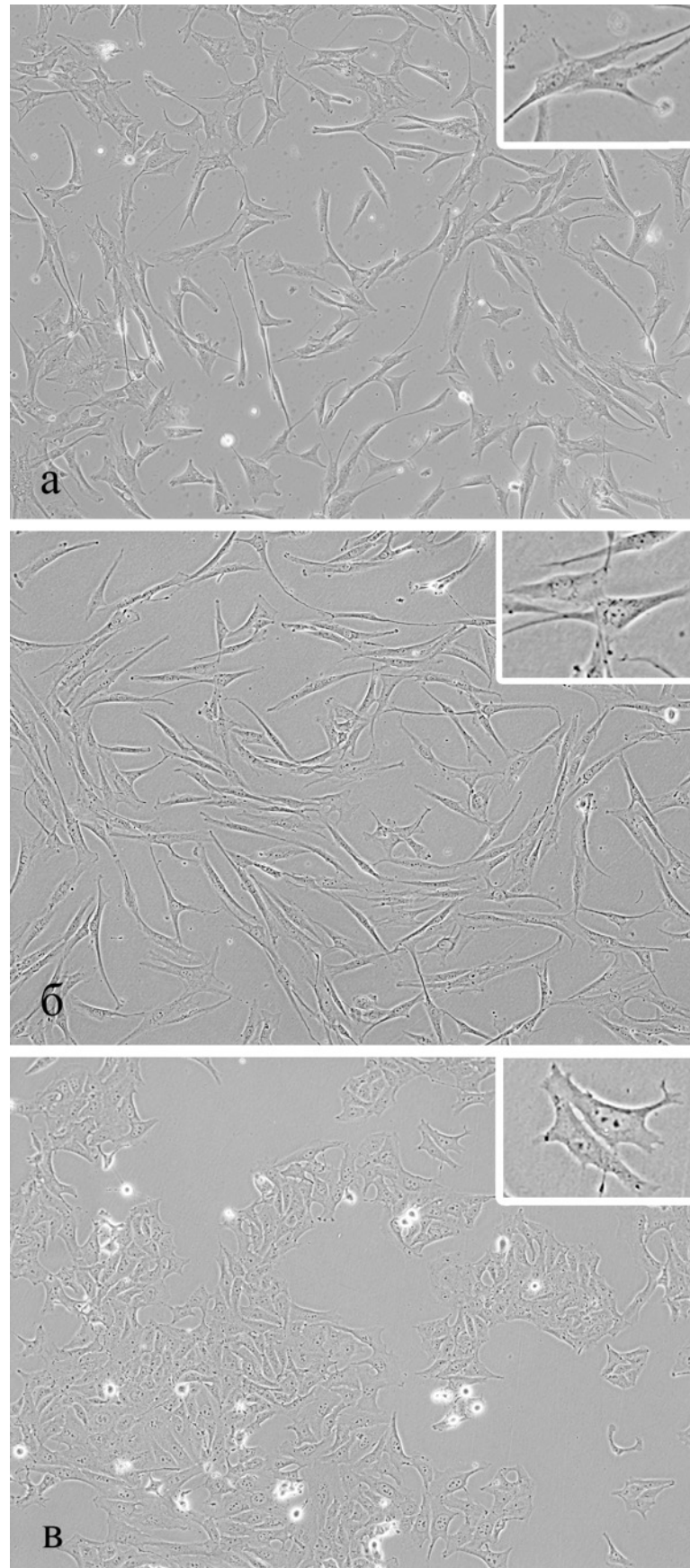


Рисунок 12 - Общий вид культур ММСК (а), ФБД (б) и клеток остеосаркомы линии НОS (в). Фазовый контраст, увеличение  $\times 100$ . Во врезках увеличенное изображение отдельных клеток,  $\times 200$ .

Ежедневно в течение 3 суток в ростовую среду к клеткам, находящимся в логарифмической фазе роста, добавляли растворы исследуемых веществ в объёме 100 мкл для создания нужных концентраций этих веществ в каждой группе.

После 3 суток инкубирования клетки снимали с чашек Петри смесью растворов 0,02% Версена (ПанЭко, Россия) и 0,25% трипсина (ПанЭко, Россия) в соотношении 1:1. Получившуюся суспензию помещали в закрытые пробирки для предупреждения испарения. Лизис клеток под действием трипсина предотвращали добавлением к суспензии клеток 2 мл ростовой среды, содержащей сыворотку. Клетки подсчитывали на аппарате "Пикоскель ПС-4М" (ООО «НПВ Лабовэй», Россия) который работает по принципу регистрации изменений импеданса, вызванных исследуемыми частицами, проходящими через отверстие измерительной трубки. Для большей точности данных подсчёт клеток с каждой чашки Петри выполнялся трижды в 3 разных измерительных кюветах из комплекта "Пикоскель ПС-4М" в одинаковом разведении для нивелирования ошибки метода. В свою очередь, измерение количества клеток в каждой измерительной кювете производили тоже 3 раза.

Полученные данные анализировали с помощью программы GraphPad Prism 6. Поскольку распределение отличалось от нормального, для оценки различий использовали ранговый дисперсионный анализ Краскала-Уоллеса и тест Данна.

### 3 РЕЗУЛЬТАТЫ

#### 3.1 Разработка и усовершенствование методов исследования

##### *3.1.1 Способ формирования критического дефекта теменных костей*

Нами было установлено, что для проведения операции формирования критического дефекта теменных костей наилучшим образом подходят трепаны, используемые в хирургической стоматологии для операции открытого синус-лифтинга. Конструкция их рабочей части имеет различные размеры и предусматривает защиту от повреждения подлежащих мягких тканей. В нашей работе использовался и хорошо зарекомендовал себя трепан C-reamer диаметром 5,5 мм и высотой 1,5 мм из набора Neobiotech SLA (Корея) (Рисунок 13). Данный способ позволяет получить круглый дефект воспроизводимых размеров, не повреждая сагиттальный синус, в отличие от ранее предложенных способов [Полежаев, 1977; Montjovent et al., 2007].



Рисунок 13 - Рабочая поверхность трепана C-reamer из набора Neobiotech SLA для открытого синус-лифтинга позволяет препарировать только твёрдые ткани, не травмируя подлежащие мягкие ткани.

### ***3.1.2 Адаптация способа двойного мечения для модели критического дефекта теменных костей***

Классическая схема введения флуорохромов [Ревелл, 1993] была модифицирована для достижения полной равномерной окраски частей регенерата, образованных на разных сроках эксперимента. К началу активной минерализации остеоида (на 8-й, 9-й и 10-й день после операции) 21 крысе делали внутрибрюшинные инъекции раствора доксициклина. На 15-й, 16-й и 17-й день эксперимента крысам вводили раствор ализарина красного С для создания границ между метками. На 22-й, 23-й и 24-й день повторяли инъекции ализарина - в результате получали полное окрашивание краёв минерализованного регенерата, образованного к концу первичного неоостеогенеза (Рисунок 14).

Внутрибрюшинный способ введения был выбран потому, что он обеспечивал наибольшую интенсивность свечения меток при минимальной травматизации животных (Рисунок 15). Так, при отработке методики на 2 крысах нами замечено, что интенсивность свечения флуоресцентных меток меньше при подкожном введении. Выполнение внутримышечных инъекций 5 крысам не влияло на интенсивность флуоресценции меток, однако травмировало животных, приводя к хромоте. Пероральный метод введения для ряда флуорохромов оказался неприемлемым. На 2 крысах нами показано, что при доставке ализарина и доксициклина *per os* с питьевой водой не наблюдалось мечения ализарином и снижалась флуоресценция доксициклина (суточная дозировка составляла 25мг/кг животного; концентрации растворённых веществ были подобраны в соответствии с установленным нами среднесуточным объёмом потребления крысой воды, которая составляла 70 мл). (Рисунок 15). Двум крысам метки вводили внутрибрюшинно в обратной последовательности в разных концентрациях - сначала ализарин 60 мг/кг, потом доксициклин 25 мг/кг, в результате чего при флуоресцентной микроскопии получали эффект маскировки первой метки.

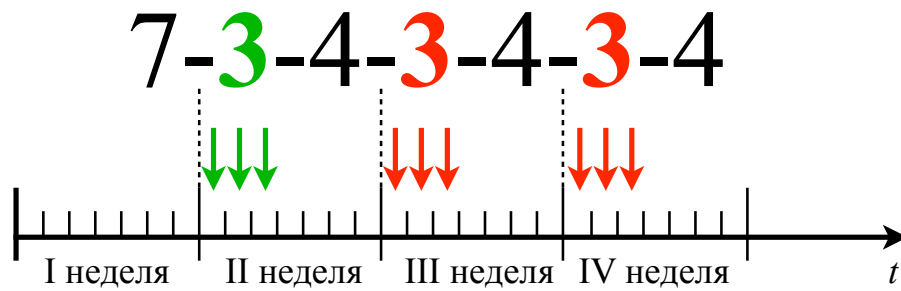


Рисунок 14 - Адаптация схемы введения флуоресцентных меток для модели критического дефекта теменных костей крыс с целью окрашивания регенерата, образованного в процессе первичного неоостеогенеза.

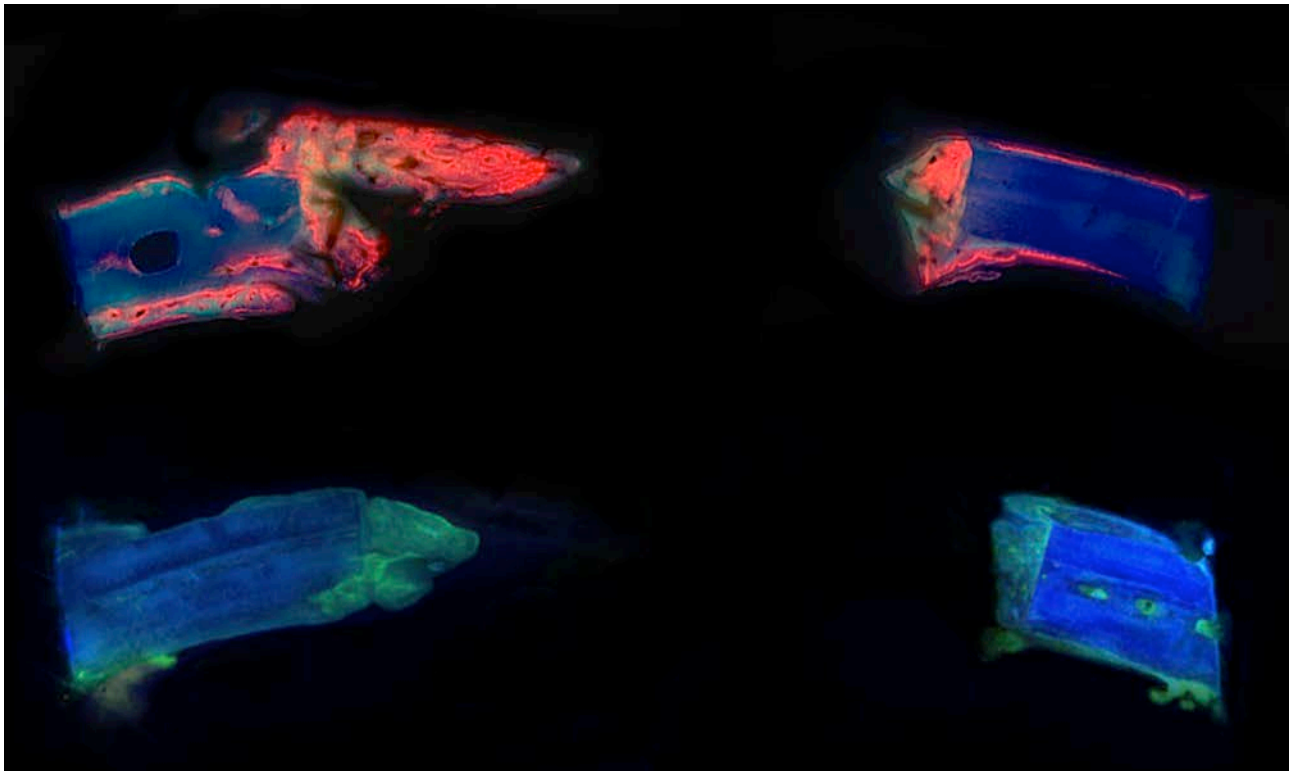
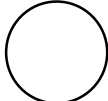






Рисунок 15 - Сравнение флуоресценции меток при различных способах введения. Панорамное изображение, объектив x5. Сверху - флуоресценция ализарина (красный цвет) и доксициклина (зелёный цвет) в области регенерата при внутрибрюшинном способе введения флуорохромов. Снизу - отсутствие флуоресценции ализарина и слабая флуоресценция доксициклина (зелёный цвет) при пероральном введении флуорохромов (выдержка увеличена в 5 раз).

### 3.1.3 Выбор способа оценки рентгенограмм

Полученные в ходе рентгенографии изображения критического дефекта теменных костей (см. главу 2.1) оценивали двумя способами. Первый способ заключался в визуальной оценке заполнения дефекта регенератом по балльной шкале от 0 до 4 [Patel et al., 2008; Spicer et al., 2012] (Таблица 2).

Таблица 2 - Балльная шкала оценки заполнения регенератом критического дефекта теменных костей крыс.

Баллы	Описание	Иллюстрация
0	в регенерате отсутствует костная ткань	
1	рассредоточенные маленькие островки костной ткани	
2	костный регенерат только по краям дефекта	
3	костные мостики между ближайшими краями дефекта	
4	костные мостики между противоположными краями дефекта	

Второй способ заключался в измерении относительной площади регенерата. Для этого на рентгенограммах в программе Adobe Photoshop CS6 (США) выполняли измерение площади костного регенерата и площади самого дефекта. После этого вычисляли отношение площади регенерата к площади дефекта, то есть относительную площадь регенерата. Использование такой величины позволяет исправить пространственные искажения, которые возникают при позиционировании образцов относительно лучевой трубки или датчика.

При сравнении количественных данных выявлена статистически значимая положительная корреляция между визуальной балльной оценкой регенерата и относительной площадью дефекта, определенной по рентгенограммам ( $r=0,72$ ,  $p<0,001$ ). Таким образом, примененные 2D методы дали сходную оценку регенерата. Однако в связи с тем, что балльная шкала является дискретной,

незначительные различия с её помощью выявить невозможно. По этой причине при исследовании влияния даларгина на процессы репаративной регенерации костной ткани мы предпочли использовать второй способ, то есть измерять относительную площадь регенерата в процентах от общей площади дефекта.

### ***3.1.4 Выбор малотоксичного реактива для заключения в полимерные блоки***

Для полимеризации образцов в твёрдые блоки полимера мы отказались от использования уже готовых наборов, содержащих токсичный метилметакрилат, в пользу безопасного этилметакрилата. Это потребовало самостоятельного подбора компонентов для заливочной смеси. В результате мы остановились на двух способах полимеризации в блоки этилметакрилата.

Первый способ был основан на классической методике Диффорда [Саркисов, Перов, 1996]. Этилметакрилат (ЗАО "Вектон", Россия) очищали от примесей стабилизатора (гидрохинона) с помощью трёхкратного промывания равными объёмами раствора 10% NaOH в сепарационной воронке с последующей трёхкратной отмывкой дистиллированной водой. К очищенному этилметакрилату добавляли перекись бензоила (ЗАО "Вектон", Россия) в количестве 100:1 и прогревали в течении 2 часов при +60°C. После этого 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.

Второй способ заключался в использовании уже готовой очищенной смеси этилметакрилата, выпускаемой для ортопедической стоматологии, торговой марки АКР-7 (ВладМива, Россия). Для этого к мономеру АКР-7 добавляли перекись бензоила в количестве 100:1 и по способу, описанному выше, последовательно помещали получившуюся смесь в термостаты на +60°C и +37°C. По сравнению с первым способом этот имел существенные преимущества:

1. Получившаяся заливочная смесь была прозрачнее и не содержала остатков воды, щёлочи и стабилизатора.

2. Флакон АКР-7 имеет оптимальный объём (125мл), который удобен для хранения и приготовления заливочной смеси прямо в нём, что избавляет от необходимости в дополнительной лабораторной посуде.

3. Стоимость АКР-7 меньше, чем стоимость химического реактива этилметакрилата (ЗАО "Вектон", Россия).

При исследовании влияния даларгина на процессы репаративной регенерации костной ткани в качестве среды для заливки материала в твёрдые блоки использовали мономер АКР-7 (ВладМива, Россия) (см. главу 2.1).

### ***3.1.5 Требования к приготовлению шлифов***

На основе полученного опыта в процессе пилотного эксперимента нами сформулированы следующие требования к изготовлению шлифов, которые необходимы для получения точных 3D реконструкций и последующего морфометрического анализа:

1. Образец свода черепа для всех групп исследования следует позиционировать одинаково по отношению к пиле: плоскость гистологических срезов должна совпадать с фронтальной плоскостью, при этом сам образец располагается строго перпендикулярно по отношению к поверхности пилы во избежание геометрических искажений.

2. Срезы для приготовления шлифов выполняют серийно, без пропусков.

3. Шлифы не освобождают от полиэтилметакрилата, чтобы не деформировать срезы и не исказить истинных размеров регенерата.

4. Окраску шлифов не проводят во избежание автофлуоресценции гистологического красителя.



### 3.1.6 Математическая модель «резанный цилиндр»

Для получения данных об объёме всего регенерата необходимо выполнить пересчёт 2D-параметров в 3D. Поскольку стандартные протоколы программ для 3D-реконструкций недостаточно адаптированы для воспроизведения объектов цилиндрической формы (см. главу 2.1, раздел Морфометрия), то для получения более точных данных нами был разработан и использован индивидуальный для каждого среза множитель-коэффициент ( $k_n$ ), обоснование и вычисление которого представлено ниже.

Пространство критического дефекта теменных костей крыс представляет собой цилиндр. Его высота не изменяется на протяжении всего дефекта, что связано с практически одинаковой высотой теменной кости в этой области. Очертание основания цилиндра представляет собой круг. Его математическое описание помогло нам вывести необходимый коэффициент (Рисунок 16а).

Уравнение окружности

$$(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2 = R^2, (1)$$

в декартовой системе координат не является графиком функции, поэтому может быть описана как объединение графиков функций:

$$y = y_0 \pm \sqrt{R^2 - (x - x_0)^2}, (2)$$

где точка  $(x_0, y_0)$  – центр окружности. (Рисунок 16б).

Поскольку количество срезов и их толщина представляют собой положительные числа и удобнее высчитываются через значение по оси X – мы перенесли окружность в новую систему координат. Уравнение окружности принимает вид:

$$y = \pm \sqrt{R^2 - (x - R)^2}, (3)$$

или упрощённый

$$y = \pm \sqrt{2Rx - x^2}, (4)$$

(Рисунок 16в).

Хорды ( $L$ ) (Рисунок 16в) соответствуют параллельным разрезам, выполняемым с помощью микротом, либо специальных пил. Круг - фигура радиально симметричная. Площадь и периметр верхней и нижней его половины равны между собой. Поскольку все разрезы должны выполняться параллельно, соответствующие хорды тоже будут параллельны - расположим все хорды перпендикулярно оси  $X$  (Рисунок 16в). Тогда ось  $X$  будет делить каждую хорду пополам, и длина каждой хорды будет равна значению координаты  $y$  точки, принадлежащей верхней половине окружности и хорде, длину которой необходимо вычислить. Отсюда следует, что длину хорды, площадь и периметр удобнее вычислить через функцию «двойной полуокружности»:

$$y = 2\sqrt{2Rx - x^2}, \quad (5)$$

где значение  $y$  равно длине соответствующей хорды  $L$ :

$$y_n = L_n = 2\sqrt{2Rx_n - x_n^2}, \quad (6)$$

(Рисунок 16г).

Теперь, в получившейся формуле, при любых значениях  $x$ , значения  $y$  будут положительными.

Для расчётов нужно знать, где именно в пространстве нашей системы координат проходят разрезы. То есть необходимо вычислить значения  $x$  для разреза в начале полученного среза -  $x_n$ , и для его конца, т.е. начала следующего за ним среза -  $x_{n+1}$ .

Значения  $x_n$  и  $x_{n+1}$  будут высчитываться разными способами, в зависимости от техники получения среза.

1. Если используется микротом или пила **со строго определённым** фиксированным шагом реза и толщина каждого среза равна друг другу, то рациональнее применять следующий способ вычисления  $x_n$  и  $x_{n+1}$ :

$$x_n = \frac{2Rn}{N}, \quad (7)$$

$$x_{n+1} = \frac{2R(n+1)}{N}, \quad (8)$$

или

$$x_{n+1} = x_n + t + s, \quad (9)$$

где  $R$  - радиус окружности (известен заранее и составляет половину от диаметра наносимого дефекта),

$n$  - номер среза по порядку,

$N$  - общее количество срезов, (Рисунок 16д).

Это выражение будет справедливо только для срезов, выполненных со строго определённым фиксированным шагом реза.

2а. Если применяется микротом или пила *с нестандартизированным* шагом реза, то следует применять иные формулы для вычисления координат начала и конца каждого среза. Для расчётов нужно знать, где именно в пространстве нашей системы координат проходят разрезы. То есть необходимо вычислить значения  $x$  для разреза в начале полученного среза –  $x_n$ , и для его конца, т.е. начала следующего за ним среза –  $x_{n+1}$ . С этой задачей справляется выражение, выведенное из формулы "двойной полуокружности":

$$x_n = R \pm \sqrt{R^2 - \left(\frac{y_n}{2}\right)^2}, (10).$$

Такая формула даёт зеркальные значения относительно центра "двойной полуокружности", то есть дойдя до её середины, значения координаты  $x$  как бы возвращаются обратно. В результате этого середина дефекта может гипотетически проходить в двух положениях, и предсказать, в каком именно, данное выражение не позволяет (Рисунок 17). Кроме того, необходимо задать условия, при которых следует использовать знак "+" или "-" в представленной выше формуле.

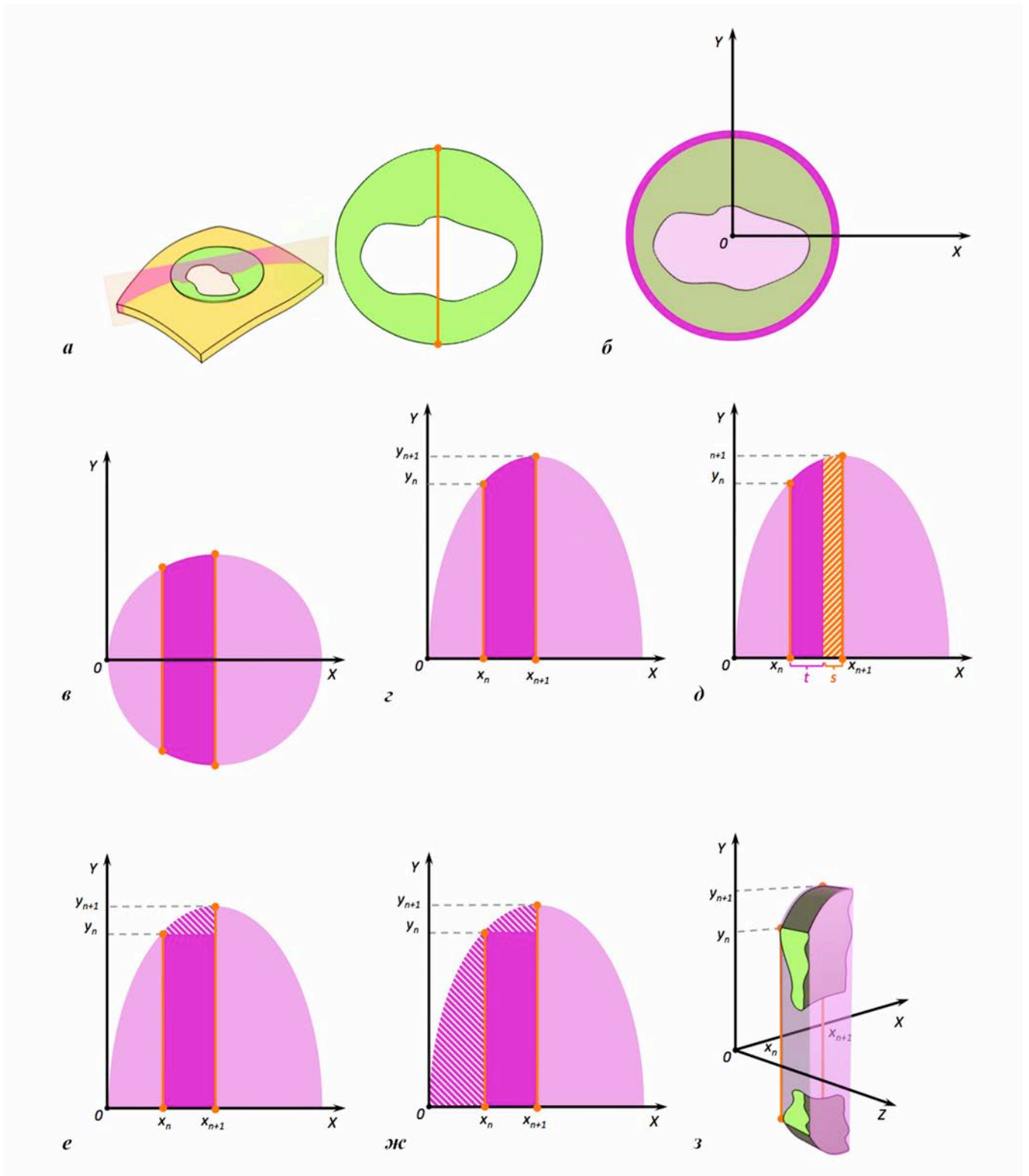


Рисунок 16 - Вычисление коэффициента для пересчёта 2D параметров в 3D через уравнение окружности.

Таким образом, с помощью описанного выше способа нахождения  $x_n$  через  $y_n$  нельзя предсказать, какой именно срез содержит середину дефекта. Для решения этой задачи требуется изменение методики выполнения самих срезов. Так, препарат, содержащий цилиндрический дефект, следует распилить через центр дефекта, после чего резать каждую половину отдельно, выполняя срезы от центра дефекта к его краю. В таком случае координаты начала среза, полученного с первой половины следует вычислять по формуле:

$$x_n = R - \sqrt{R^2 - \left(\frac{y_n}{2}\right)^2}, \quad (11)$$

а для второй половины по формуле:

$$x_n = R + \sqrt{R^2 - \left(\frac{y_n}{2}\right)^2}, \quad (12).$$

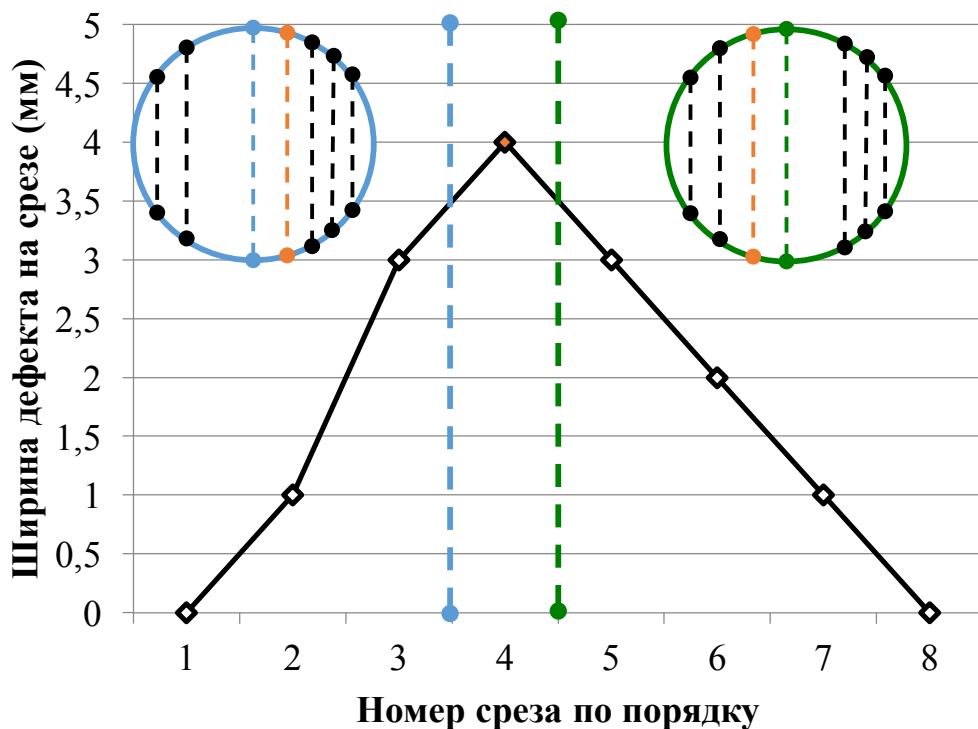


Рисунок 17 - График динамики изменения толщины дефекта, измеряемой на шлифе, относительно их номера по порядку. Пунктирными линиями на графике показано вероятное нахождение среза. Сверху на сегментированных окружностях показано то же самое: возможное расположение центра окружности относительно положения выполненных срезов, для которых известна только ширина измеренного на них дефекта.

2б. Иногда *попадание фрезы в центр дефекта не может быть гарантировано*, например, при использовании очень тонких пил или ножа микротома, а также при заливке в непрозрачных среды, не позволяющие визуально проконтролировать прохождение разреза через центр дефекта. В этом случае вышеописанный способ вычислений является неприемлемым. Тогда для вычисления координат начала и конца среза обязательным условием будет измерение толщины среза и толщины пропила:

$$x_{n+1} = x_n + t + s, \quad (13)$$

где  $t$  - толщина среза,

$s$  - толщина пропила.

Методически сумма толщины среза и пропила определяется с помощью микрометра: сначала измеряют длину всего образца до выполнения среза, а потом после выполнения среза и находят разницу значений. Если при изготовлении срезов используется фреза с известной шириной пропила, то в этом случае достаточно измерить микрометром только толщину получившегося среза.

Однако для этого способа требуется начальное значение  $x_n$  хотя бы для одного среза, относительно которого будут выполняться вычисления, которое можно выполнить для первого среза содержащего дефект по ранее предложенной формуле:

$$x_n = R - \sqrt{R^2 - \left(\frac{y_n}{2}\right)^2}, \quad (14).$$

Теперь, зная способы вычисления всех переменных, стало возможным перейти к вычислению индивидуального коэффициента. Коэффициент находится следующим способом. Площадь участка круга, ограниченная  $x_n$  и  $x_{n+1}$ , следует разделить на площадь прямоугольника, ограниченного  $x_n$ ,  $x_{n+1}$  и  $y_n$ . (Рисунок 16е).

Площадь участка круга:

$$S_{\circ} = \int_{x_n}^{x_{n+1}} 2\sqrt{2Rx - x^2} dx, \quad (15)$$

Площадь прямоугольника:

$$S_{\blacksquare} = (x_{n+1} - x_n) \cdot y_n, \quad (16)$$

Напомним, что

$$y_n = 2\sqrt{2Rx_n - x_n^2}, \quad (17)$$

Таким образом, чтобы перевести плоскостной параметр, измеренный на срезе в объемный, следует умножить его на следующий коэффициент ( $k_n$ ):

$$k_n = (x_{n+1} - x_n) \cdot \frac{\int_{x_n}^{x_{n+1}} 2\sqrt{2Rx - x^2} dx}{2(x_{n+1} - x_n)\sqrt{2Rx_n - x_n^2}}, \quad (18)$$

Однако следует учесть, что настоящие расчёты справедливы только для вычислений срезов до середины дефекта. Для выведения коэффициента после середины потребуется не делить площадь участка круга на площадь прямоугольника, а напротив, умножать. То есть, если

$$\frac{\int_{x_n}^{x_{n+1}} 2\sqrt{2Rx - x^2} dx}{2(x_{n+1} + x_n)\sqrt{2Rx_n - x_n^2}} < 1, \quad (19)$$

то для вычисления  $k_n$  следует использовать формулу:

$$k_n = (x_{n+1}x_n) \cdot \frac{2(x_n - x_{n+1})\sqrt{2Rx_n - x_n^2}}{\int_{x_n}^{x_{n+1}} 2\sqrt{2Rx - x^2} dx}, \quad (20)$$

Итак, нами **выведены необходимые множители**. Однако ясно, что первый срез при использовании методов описанных в пунктах 1 и 2б не будет нести никакой информации, так как будет содержать только «горбушку» дефекта. Поэтому его необходимо отбросить, представить как нулевой по порядку, а первым считать следующий по счёту (число  $n$  в представленной выше формуле) (Рисунок 16ж, Рисунок 18). Первый срез будет определять распределение регенерата в области от нулевого до второго среза ( $x_0 - x_2$ ). (Рисунок 16ж). Множитель для первого среза ( $k_1$ ) позволит описать пространство для нулевого и первого срезов и примет вид:

$$k_1 = \frac{\int_0^{x_2} 2\sqrt{2Rx - x^2} dx}{2\sqrt{2Rx_1 - x_1^2}}, \quad (21)$$

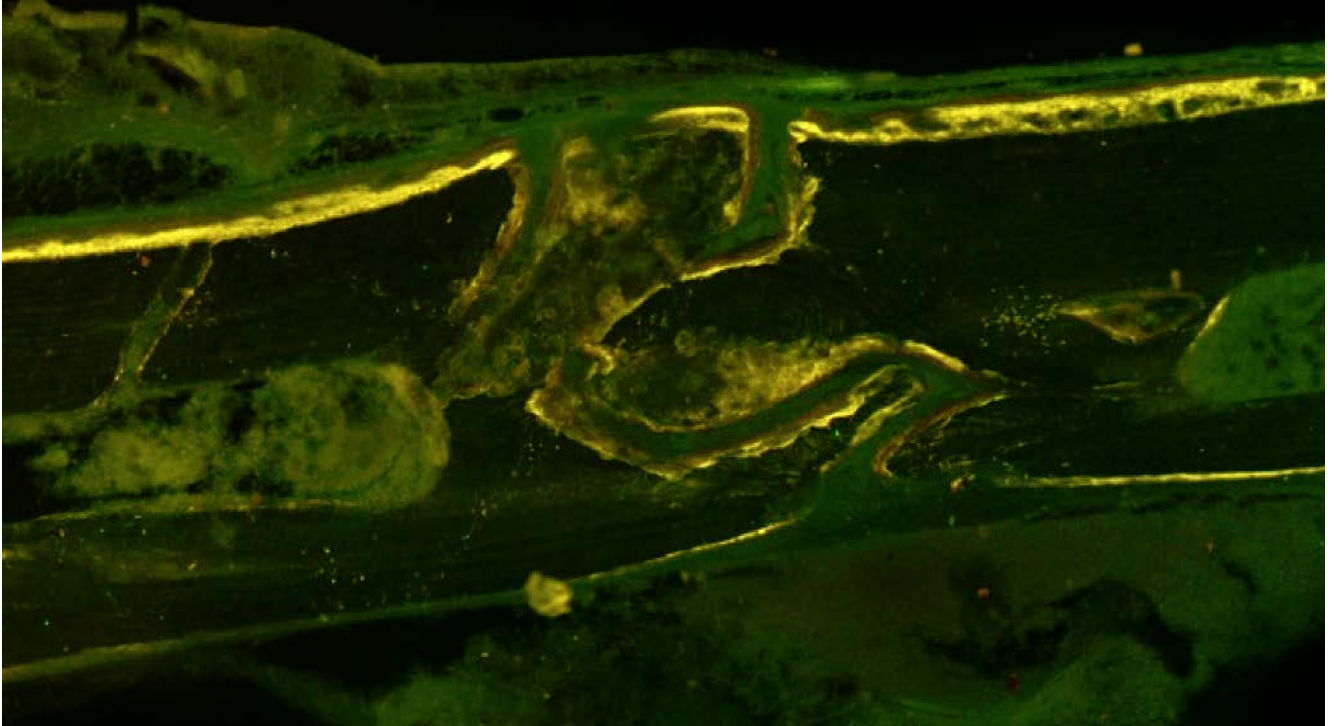


Рисунок 18 - Шлиф «нулевого» среза, захватывающего край дефекта. В процессе приготовления шлифа пространство, содержащее регенерат, практически полностью сошлифовано. Объектив х5.

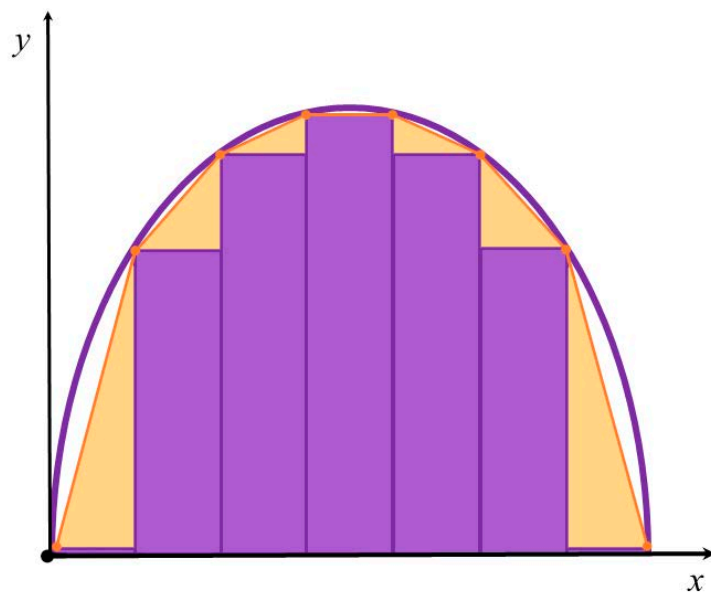


Рисунок 19 – Сравнение математических способов описания круглого дефекта. Наглядно продемонстрирован метод реконструкции края дефекта с помощью прямоугольников (обозначены сиреневым), трапеций (обозначены жёлтым), и разработанной нами модели «резанный цилиндр» (фиолетовый контур). Очевидно, что модель «резанный цилиндр» характеризует край дефекта без погрешностей.



В результате разработанная нами математическая модель "резаный цилиндр" имеет следующие преимущества:

1) автоматически позиционирует срез в пространстве модели и находит его толщину;

2) позволяет отказаться от использования очень дорогостоящего оборудования, которое позволяет выполнять срезы со строго стандартизированным шагом.

3) более точно воссоздаёт контур регенерата и избавляет от артефактов типа "ступеньки" (Рисунок 19);

Математическая модель «резаный цилиндр» была рецензирована и одобрена ФГБУН Институт вычислительной математики Российской академии наук (ИВМ РАН). Особую благодарность выражаем специалисту в области математического сегментирования Александру Анатольевичу Данилову за вклад в исправления и совершенствование модели.

### *3.1.7 Сравнение методик морфометрии*

При сравнении количественных данных, полученных с помощью различных способов морфометрии, выявлена статистически значимая положительная корреляция между визуальной балльной оценкой регенерата с относительной площадью дефекта, определенной по рентгенограммам ( $r=0,72$ ,  $p<0,001$ ). Таким образом, примененные 2D методы дали сходную оценку регенерата. Относительная площадь дефекта по данным рентгенографии ( $66,1\pm 2,7\%$ ) статистически значимо превышала долю регенерата в дефекте, определенную методами объемной морфометрии: при использовании математической модели "резаный цилиндр" она составила  $35,8\pm 6,5\%$  ( $p=0,002$ ), наглядной 3D-реконструкции -  $30,3\pm 6,7\%$  ( $p<0,001$ ).

Таким образом, балльная оценка регенерата по прицельным рентгенограммам может использоваться для приблизительной оценки регенерата,

поскольку данные, полученные этим методом, коррелируют с результатами измерения относительной площади регенерата на рентгенограммах.

Измерение площади минерализованного регенерата на прицельных рентгенограммах не даёт точного представления об объёме новообразованной костной ткани, но позволяет оценить аппозиционный рост от края дефекта. Данные измерений относительной площади дефекта по рентгенограмме всегда превышали значения, полученные методами 3D морфометрии, поскольку рентгеновский 2D-снимок не позволяет визуализировать пустоты над и под регенератом. Этот метод может применяться для оценки закрытия площади дефекта без учёта толщины регенерата.

Наглядная 3D-реконструкция по гистологическим срезам уступает математической модели "резаный цилиндр" в связи с тем, что использует универсальный протокол интерполяции, не позволяющий точно воспроизвести форму дефекта. Появление артефактов напрямую зависит от шага реза: чем он меньше, тем точнее полученные данные (Рисунок 20). Тем не менее мы получали данные, сопоставимые с таковыми при использовании математической модели "резаный цилиндр". Однако в отличие от этой модели, универсальность метода наглядной 3D-реконструкции позволяет использовать его для морфометрии и реконструкции морфологических структур любой формы.

Математическая модель "резаный цилиндр" очень удобна в применении и при использовании флуоресцентных меток позволяет охарактеризовать динамику регенерации на одном образце. Алгоритм этого метода позволяет получить наиболее точные данные, однако в нашем случае он ещё не был внедрён в программный пакет для 3D-реконструкций и не позволял визуализировать данные.

В связи с наибольшей точностью получаемых данных при применении модели «резаный цилиндр» нами был использован именно этот метод для 3D-морфометрии регенерата.

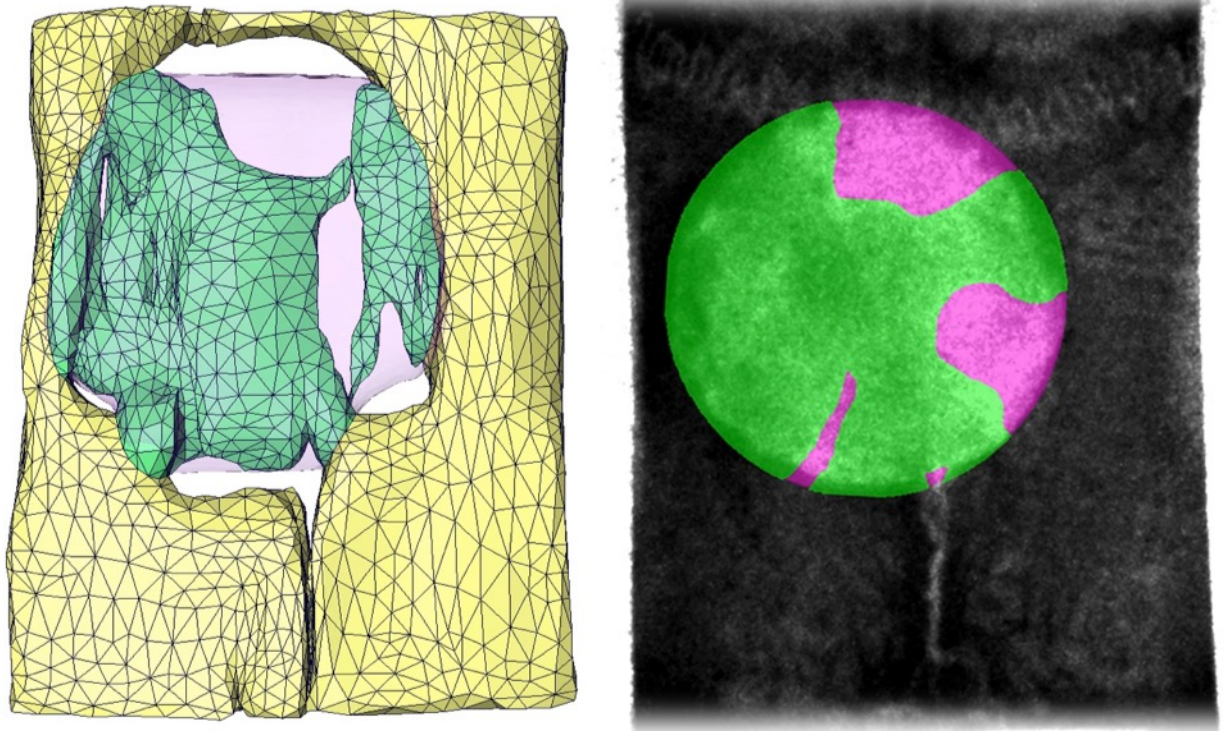


Рисунок 20 - Сравнение контура дефекта и регенерата по данным наглядной 3D-реконструкции и рентгенологической картины. В ходе 3D-моделирования на модели в области дефекта обнаруживаются пустые зоны сверху и снизу. Контур самого дефекта (розовый цвет) и регенерата (зелёный цвет) имеют очертания сглаженных "ступенек".

### 3.2 Результаты влияния даларгина на процессы репаративной регенерации костной ткани

**Морфология регенерата.** Различия в размере регенерата хорошо видны на шлифах в проходящем свете (Рисунок 21, Рисунок 22). 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. Новообразованная костная ткань содержала большое количество полнокровных венул и артериол. Центральная область дефекта была представлена фиброзной соединительной тканью. Однако толщина шлифов не позволяла должным образом визуализировать клеточные элементы (Рисунок 23). При флуоресцентной микроскопии наблюдается накопление флуорохромов в местах минерализации, которые расположены на небольшом удалении от сосудов и краёв дефекта. Накопление флуорохромов является показателем минерализации регенерата, то есть процессов неоостеогенеза.

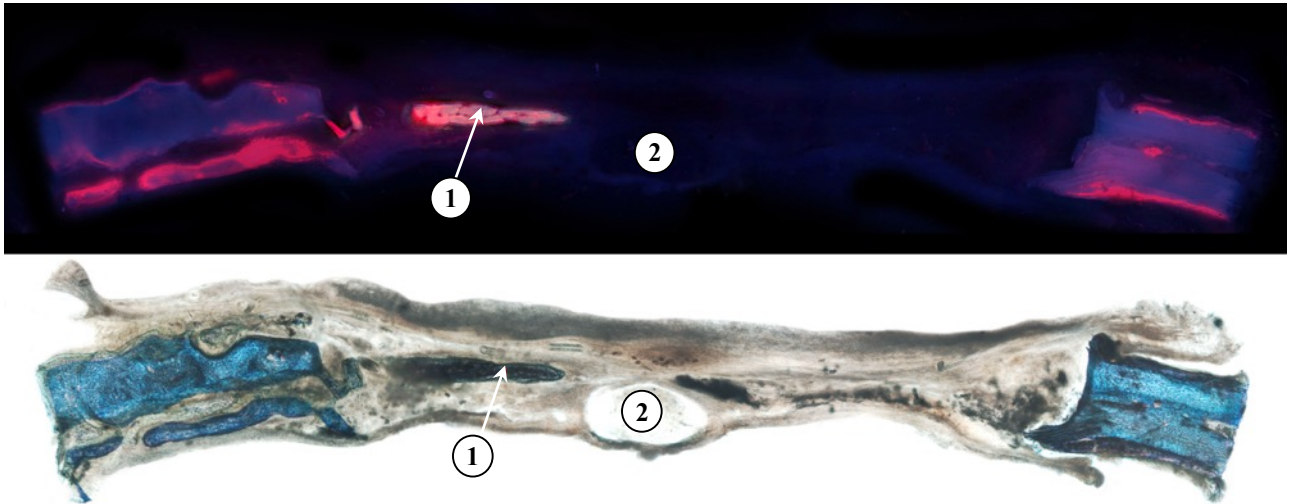


Рисунок 21 - Сравнение изображений, полученных в ходе флуоресцентной микроскопии и световой микроскопии после окраски толуидиновым синим. Группа с введением даларгина. Объектив x5.

1 – регенерат, 2 – неповрежденный сагиттальный венозный синус.

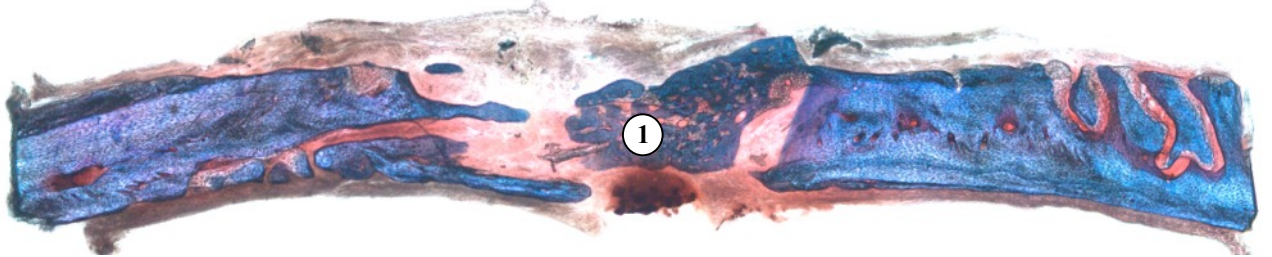


Рисунок 22 - Регенерат в области дефекта. Группа с введением даларгина и налоксона. Микроскопия в проходящем свете. Панорамное изображение. Окраска толуидиновым синим и кислым фуксином. Объектив x5.

1 – регенерат.

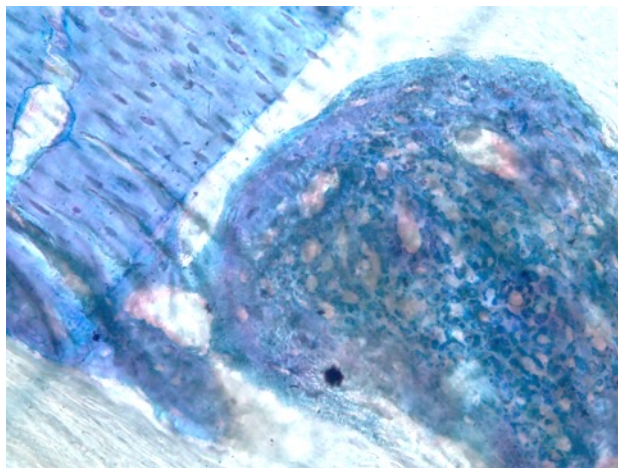


Рисунок 23 - Регенерат в области дефекта. Группа с введением физраствора. Микроскопия в проходящем свете. Окраска толуидиновым синим и кислым фуксином. Объектив x10.

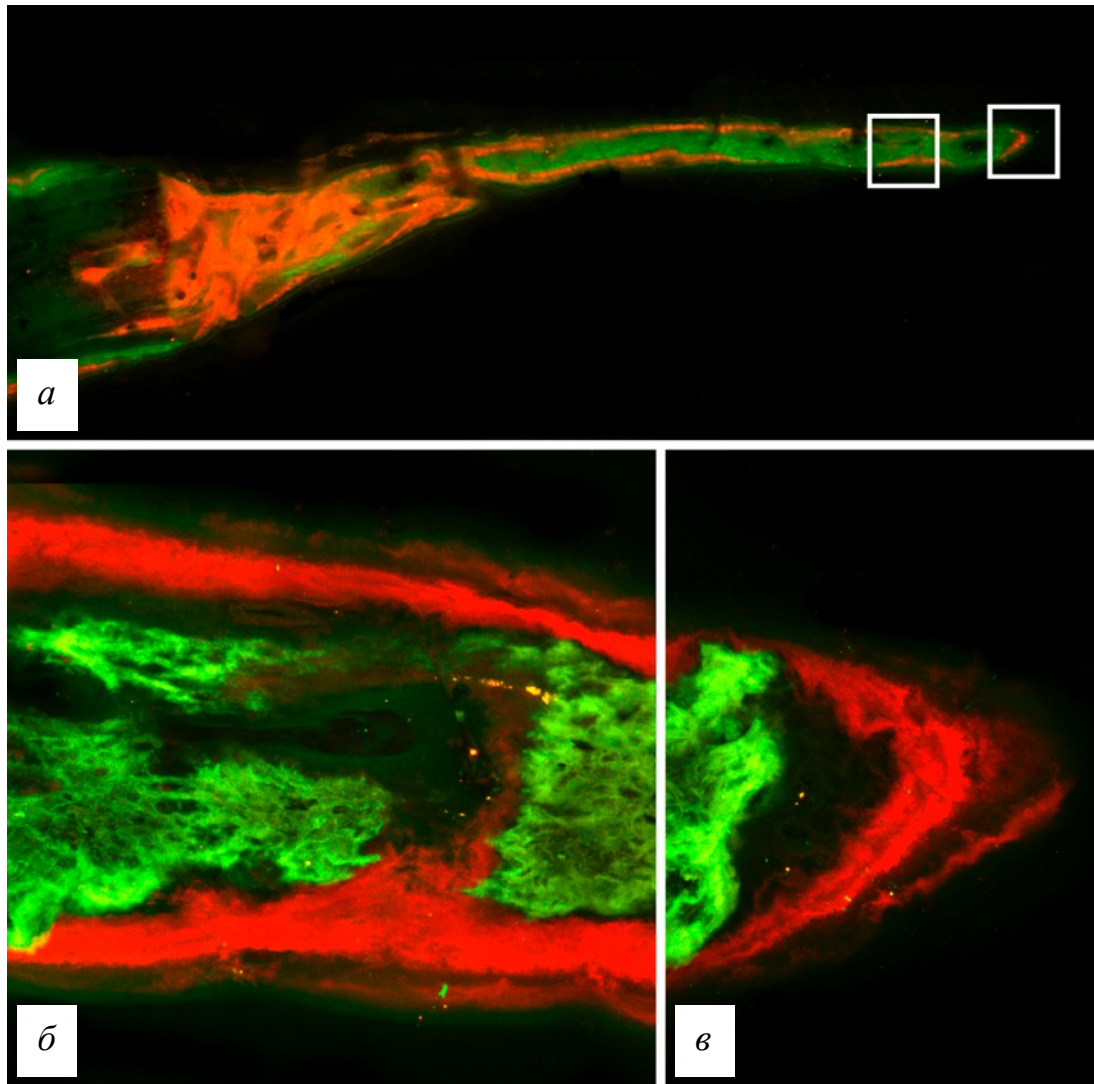


Рисунок 24 – Сравнение изображений регенерата, полученного с помощью обычной флуоресцентной микроскопии (*a*) и с помощью конфокального микроскопа (*б, в*). Зелёным окрашена костная ткань, меченная доксициклином, красным – ализарином. Объектив х63.

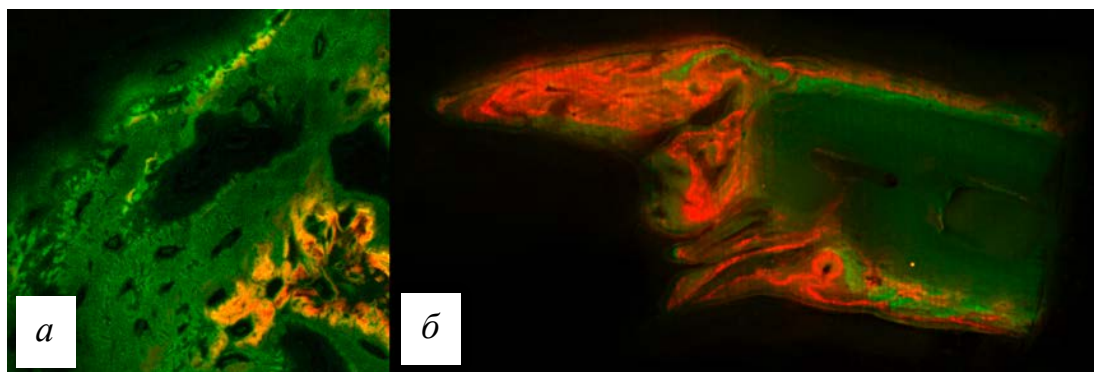


Рисунок 25 – Сравнение изображений регенерата, полученных с помощью конфокальной микроскопии (*a*) и флуоресцентной микроскопии (*б*). Послойный анализ препарата с помощью конфокального микроскопа позволил выявить на толстых шлифах лакуны первичных остеоцитов и их ядра, в отличие от флуоресцентной микроскопии (*a*, объектив х63; *б*, объектив х5).

На парафиновых срезах, выполненных по традиционной методике с последующей окраской гематоксилином и эозином, морфология регенерата и его клеточный состав были визуализированы более точно. Край дефекта представлен новообразованной грубоволокнистой костной тканью, которая прилежит к материнской кости - пластинчатой костной ткани ( Рисунок 26, Рисунок 27). Новообразованная костная ткань окружена первичными остеобластами и содержит первичные остеоциты (Рисунок 28). Оставшаяся часть дефекта представлена неоформленной соединительной тканью, распространяющейся от новообразованной грубоволокнистой костной ткани к центру дефекта и заполняющей его. Неоформленная соединительная ткань содержит полнокровные сосуды: венулы, артериолы и капилляры (Рисунок 29). Она представлена неупорядоченными волокнами коллагена с фибробластами, имеющими веретенообразную форму. Лейкоциты и лимфоциты в поле зрения не обнаружены, что свидетельствует об отсутствии воспалительной реакции в области дефекта.

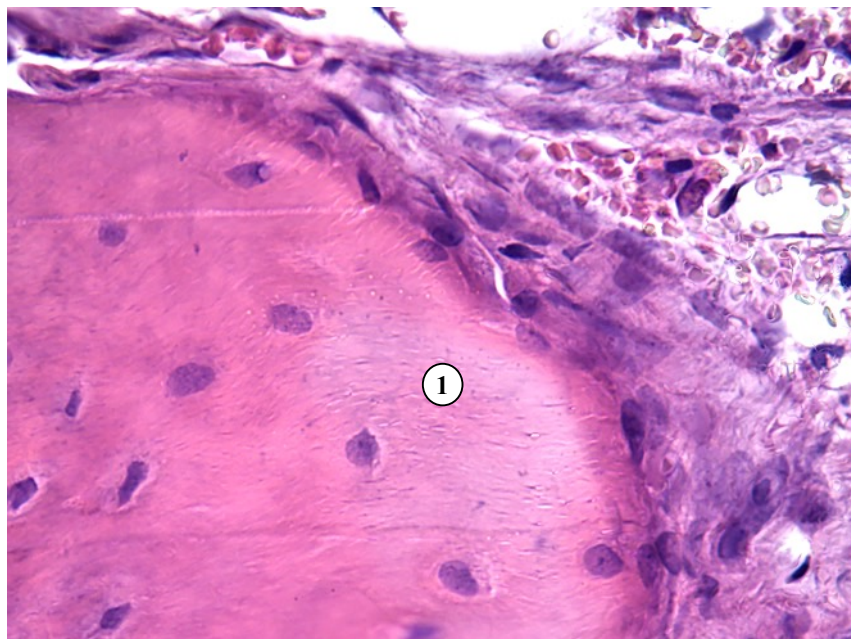


Рисунок 26 - Новообразованная грубоволокнистая костная ткань (1).  
Объектив 60х.

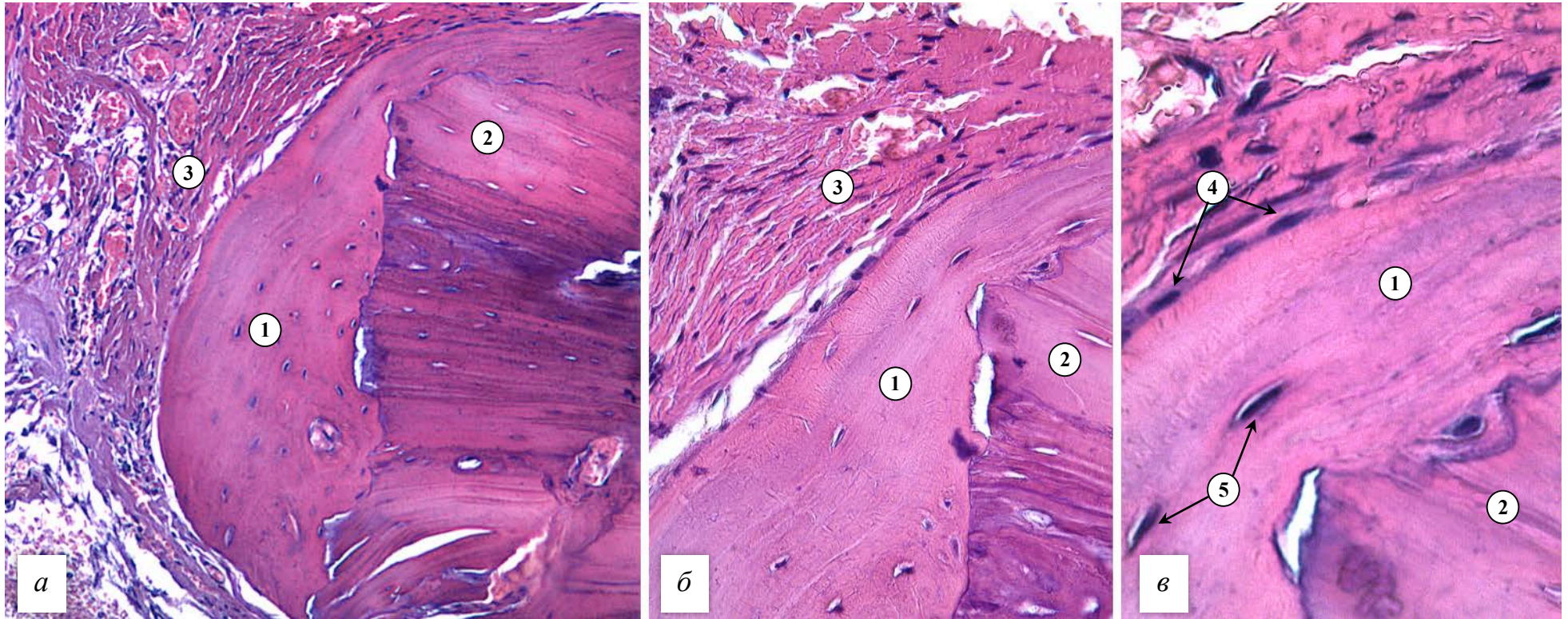


Рисунок 27 - Край дефекта на 28-е сутки. Г-Э. место соединения новообразованной костной ткани (1) с материнской костью (2) и рыхлой неоформленной соединительной тканью (3). Новообразованная кость представляет собой грубоволокнистую костную ткань, окружённую снаружи первичными остеобластами (4) и содержащую первичные остециты (5). *a* - объектив 10х, *б* - объектив 40х, *в* - объектив 100х.



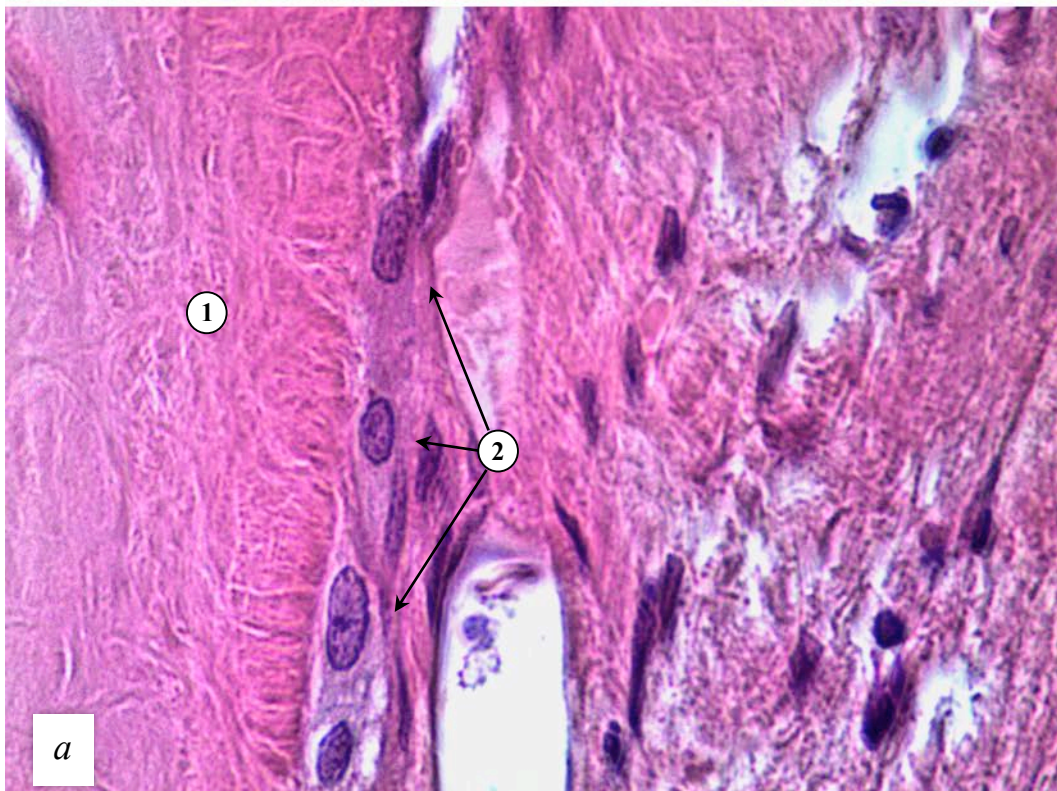
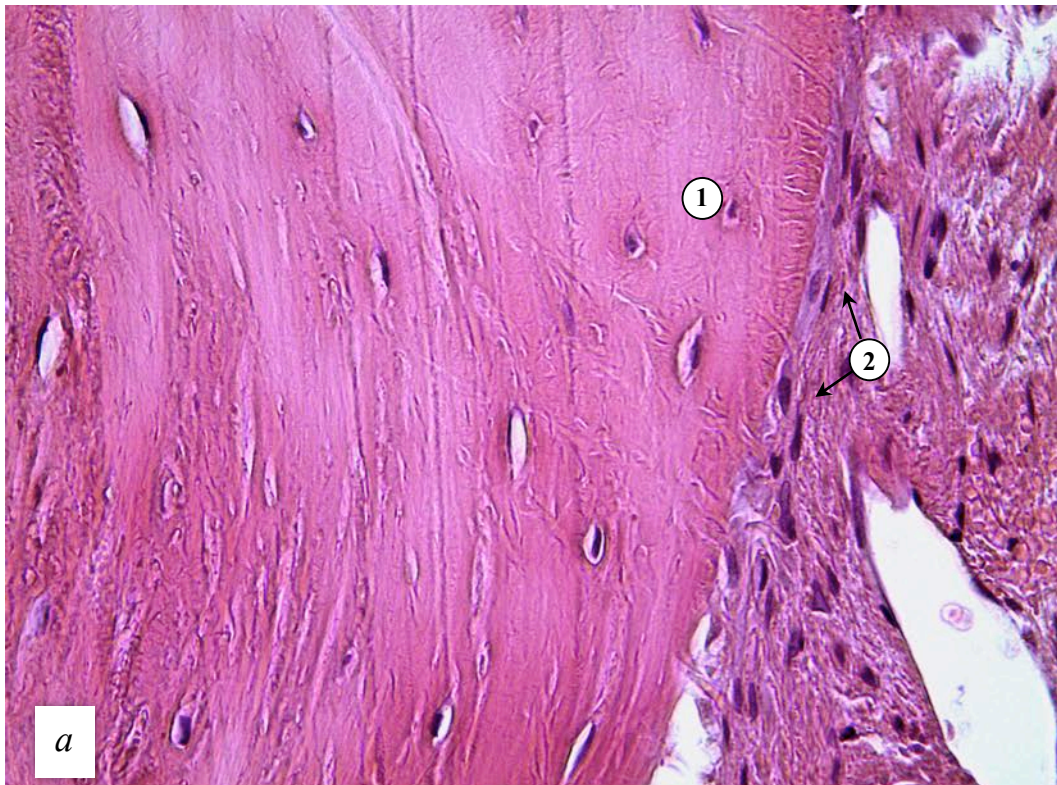


Рисунок 28 - Поверхность новообразованной костной ткани (1), окружённая остеобластами (2). *a* - объектив 40х, *б* - объектив 100х.

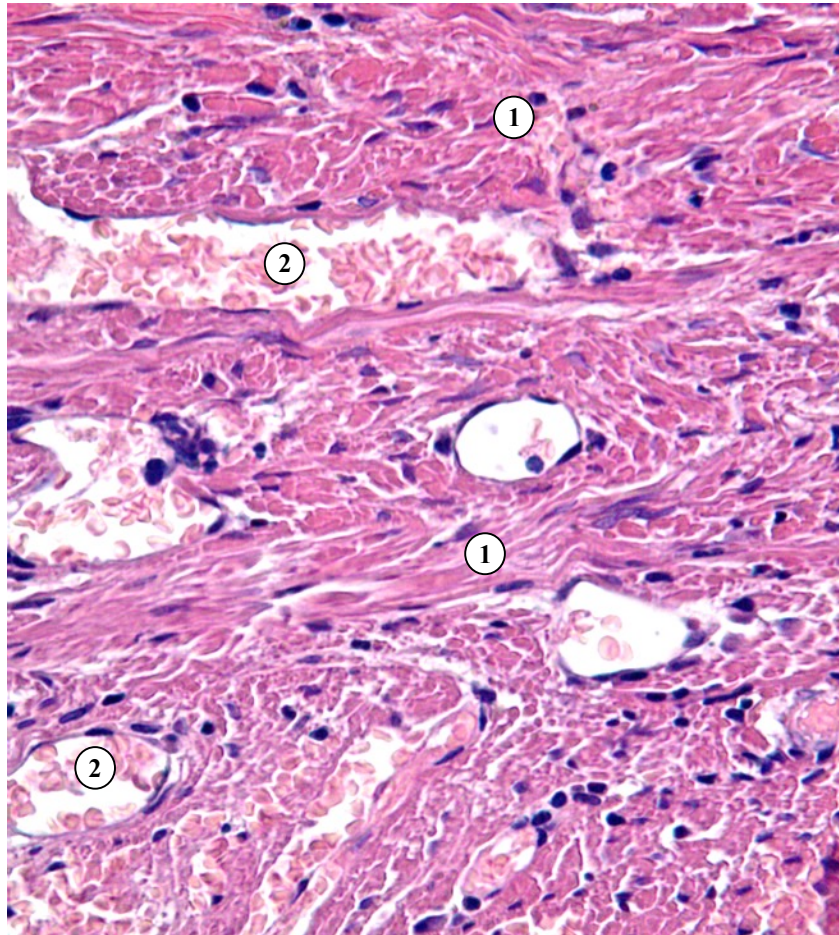


Рисунок 29 - Центр дефекта. Объектив 20х. Г-Э. В центре дефекта находится рыхлая неоформленная соединительная ткань (1), содержащая полнокровные сосуды (2). Сегментоядерные клетки и лейкоциты в поле зрения не определяются, что свидетельствует об отсутствии воспалительной реакции в области дефекта.

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 целиком (Рисунок 4).

**Морфометрическое исследование.** По данным рентгенографии, относительная площадь регенерата в группе, где применяли комбинацию даларгина и налоксона, статистически значимо превышала площадь регенерата в группе, где применяли даларгин, на 30% ( $45,0 \pm 14,0\%$  по сравнению с  $64,0 \pm 11,0\%$ ). Таким образом, блокирование опиодных рецепторов, в отличие от их стимуляции, ускоряло неоостеогенез (Рисунок 30). Статистически значимых

различий между группой контроля и группами, где применяли даларгин и его комбинацию с налоксоном, обнаружено не было (Таблица 3).

Мечение флуоресцентными метками позволило разграничить области новообразованной костной ткани. Так, костная ткань, окрашенная доксициклином, образовалась в первые 14 суток эксперимента, ализариновым красным С – в последующие 14 суток (Рисунок 24). Флуоресцентная микроскопия гистологический срезов с последующей 3D-морфометрией показала, что соотношения площадей меток, полученных в каждой группе, статистически значимо не различались (Рисунок 30), что говорит в пользу того, 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.

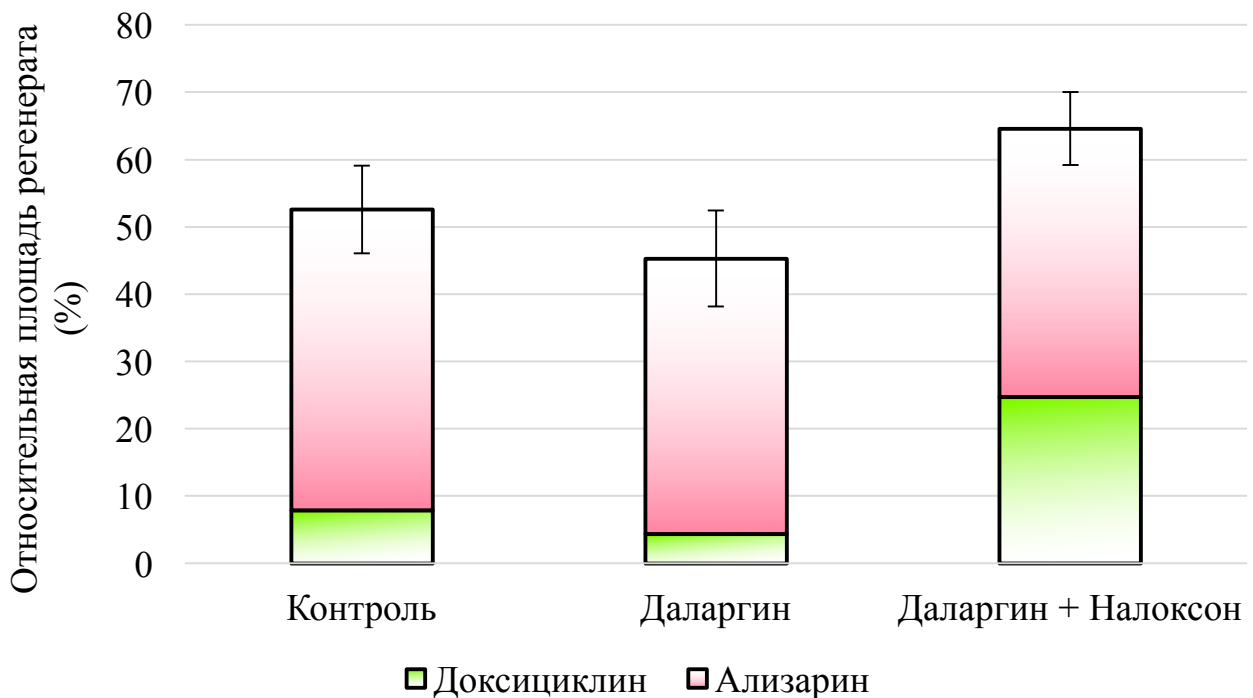


Рисунок 30 - Относительный объём регенерата, измеренный по данным рентгенографии. На гистограмме показаны арифметические средние и стандартное отклонение. Столбики гистограммы разделены на две части, соответствующие относительному объёму каждой метки по данным флуоресцентной микроскопии.

Таблица 3 - Относительная площадь регенерата (%) в группах сравнения, измеренная по данным рентгенографии.

Группы сравнения	Площадь регенерата
Контроль	52,0 ± 13,0
Даларгин	45,0 ± 14,0*
Даларгин + Налоксон	64,0 ± 11,0*
<b>Примечание</b> - *статистически значимые различия при $p < 0,05$ .	

### 3.3 Результаты влияния даларгина и налоксона на пролиферацию клеточных культур

К концу третьих суток эксперимента количество мультипотентных мезенхимальных клетках (ММСК) в группе с применением даларгина в концентрации 100 мкг/л было статистически значимо больше по сравнению с контрольными значениями. В этой группе у всех доноров наблюдался более высокий прирост клеток по сравнению с контрольной группой (на 19-34%) (Рисунок 31 - Рисунок 33) (Таблица 3).

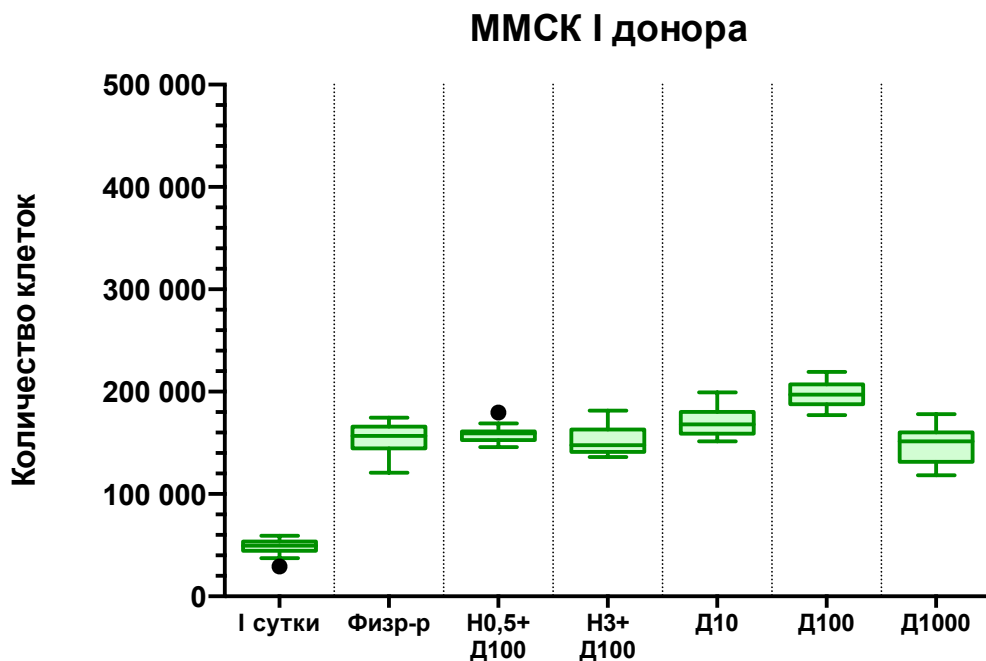


Рисунок 31 - Количество мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток от первого донора к концу 3 суток культивирования. Обозначение групп здесь и далее: I сут. – количество клеток до начала эксперимента. К – контрольная группа, (добавлен физраствор). Н0,5+Д100 – группа, получавшая комбинацию налоксона в концентрации 0,5 мг/л и даларгина в концентрации 100 мкг/л. Н3+Д100 – группа, получавшая комбинацию налоксона 3 мг/л и даларгина 100 мкг/л. Д10 – группа, получавшая даларгин в концентрации 10 мкг/л. Д100 – группа, получавшая даларгин в концентрации 100 мкг/л. Д1000 – группа, получавшая даларгин в концентрации 1000 мкг/л.

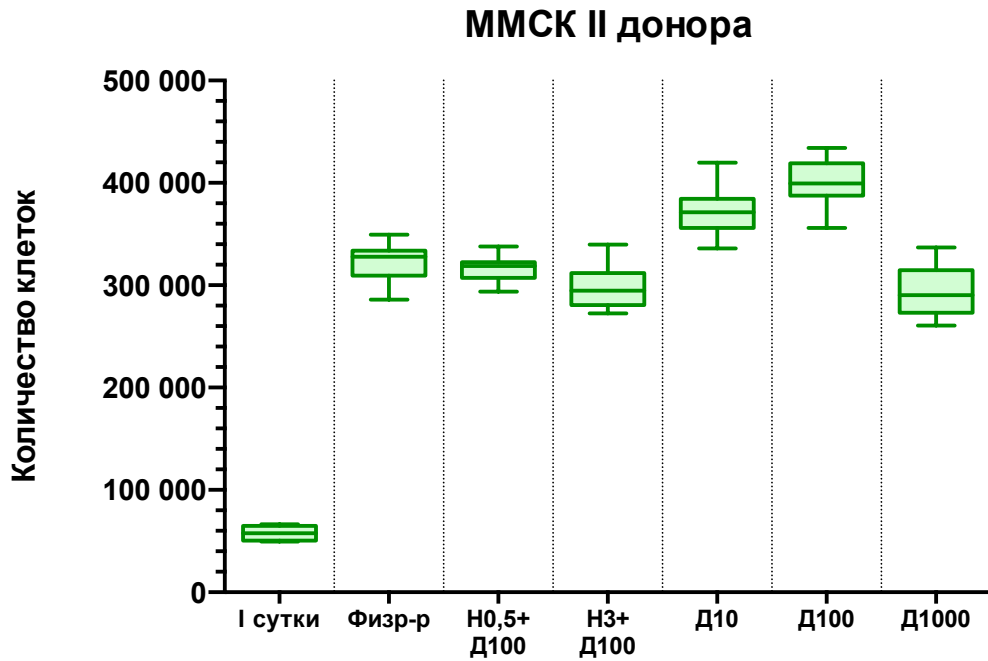


Рисунок 32 - Количество мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток от второго донора после 3 суток культивирования.

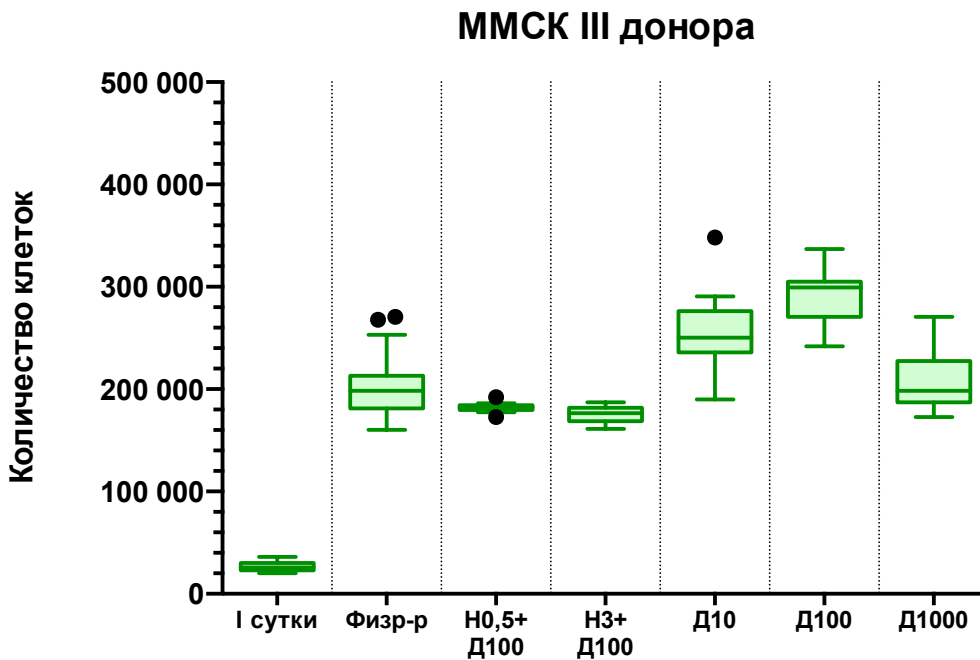


Рисунок 33 - Количество мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток от третьего донора после 3 суток культивирования.

При применении даларгина в меньшей концентрации, а именно 10 мкг/л, количество клеток ММСК от двух доноров из трёх было статистически значимо

больше по сравнению с контролем, но меньше по сравнению с применением даларгина в концентрации 100 мкг/л (Рисунок 32, Рисунок 33).

Использование даларгина в концентрации 1000 мкг/л не привело к статистически значимым изменениям количества клеток относительно контрольных значений (Рисунок 31 - Рисунок 33).

Таким образом, оптимальной концентрацией для воздействия на ММСК можно считать 100 мкг/л. Воздействие комбинацией налоксона в концентрациях 0,5 мг/л и 3 мг/л и даларгином в концентрации 100 мкг/л значимо не изменило количество клеток на момент окончания эксперимента. Полученные данные свидетельствуют о рецепторном механизме действия даларгина, как агониста  $\mu$ - и  $\delta$ -опиоидных рецепторов, а именно о превалирующем участии  $\delta$ -опиоидных рецепторов при стимуляции пролиферации ММСК, поскольку налоксон в концентрации 0,5 мг/л не блокирует  $\mu$ -опиоидные рецепторы, а в концентрации 3 мг/л неизбирательно блокирует все опиоидные рецепторы. В пользу рецепторного механизма действия даларгина свидетельствует характер изменения эффекта в зависимости от дозировки: по сравнению со средними дозировками применение больших и малых доз не было эффективным.

При анализе данных, полученных при исследовании клеток остеосаркомы линии HOS, нами были получены совершенно иные результаты (Таблица 3). Так, даларгин в концентрации 100 мкг/л не повышал, а статистически значимо снижал количество клеток линии HOS, выросших к концу эксперимента по сравнению с контрольными значениями (Рисунок 34 - Рисунок 36). Наблюдалось уменьшение прироста клеток на 22-34% по сравнению с контрольной группой.

В двух повторах эксперимента из трёх в группе с применением меньшей дозировки даларгина, 10 мкг/кг, статистически значимых отличий замечено не было (Рисунок 34, Рисунок 36).

Только во втором повторе наблюдалось статистически значимое уменьшение количества клеток по сравнению с контрольными значениями, но менее выраженное по сравнению с группой, где применяли дозировку 100 мкг/л (Рисунок 35). Таким образом, как и для ММСК, оптимальной концентрацией

даларгина для воздействия на опухолевые клетки линии HOS можно считать 100 мкг/л. Однако под действием даларгина происходит угнетение пролиферации клеток линии HOS, в то время как у ММСК – напротив, происходит усиление пролиферативной активности. Воздействие на клетки линии HOS комбинациями налоксона в концентрациях 0,5мг/л и 3мг/л и даларгина в концентрации 100 мкг/л статистически значимо не повлияло на изменение количества клеток к концу эксперимента, как и случае с ММСК (Рисунок 34 - Рисунок 36).

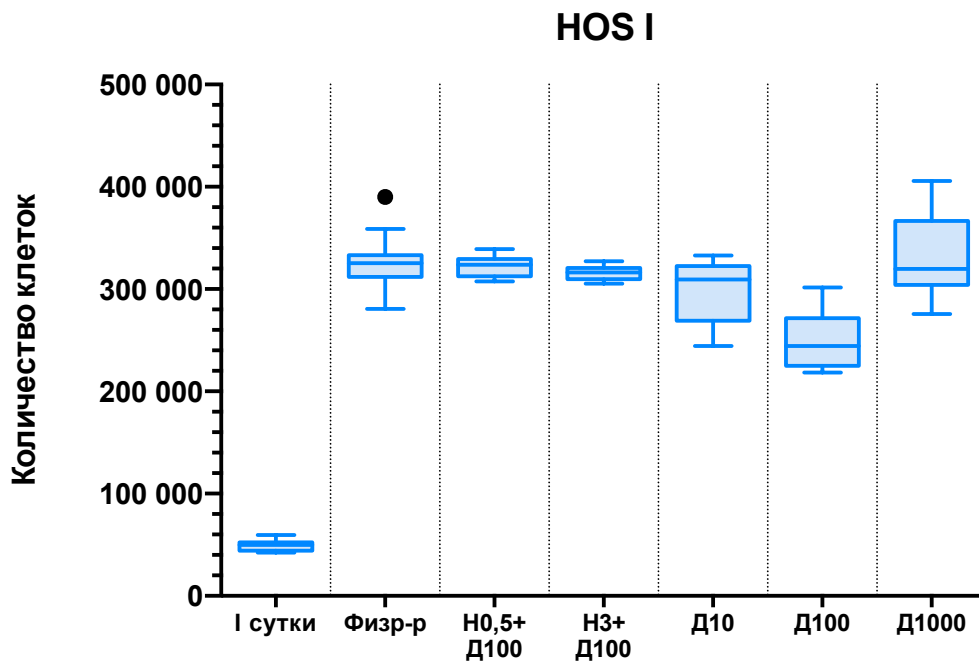


Рисунок 34 - Количество клеток остеосаркомы линии HOS опыте к концу 3 суток культивирования.



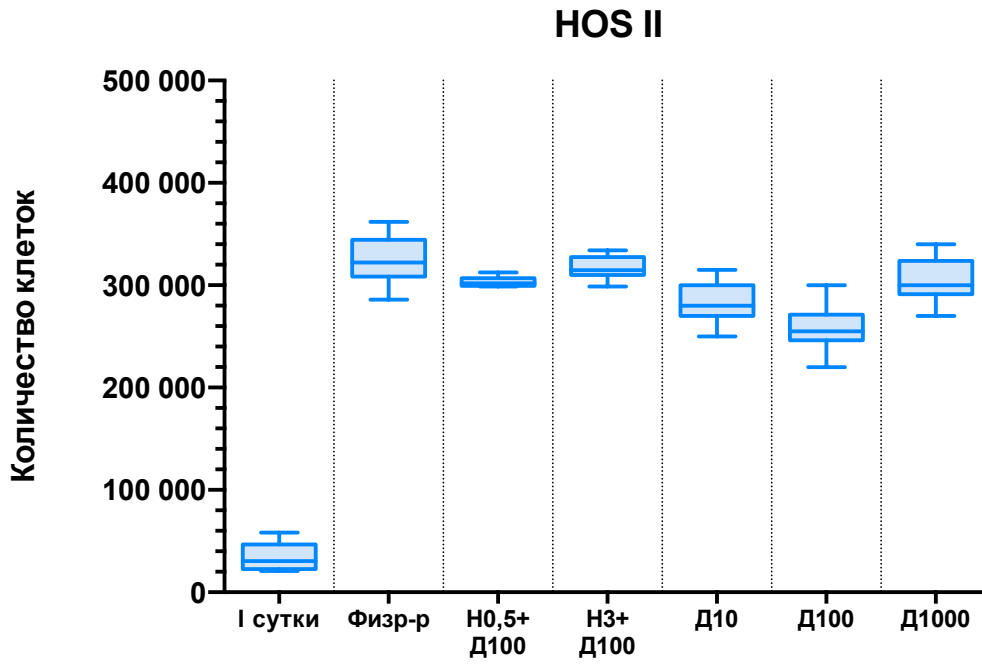


Рисунок 35 - Количество клеток остеосаркомы линии HOS к концу 3 суток культивирования при первом повторе.

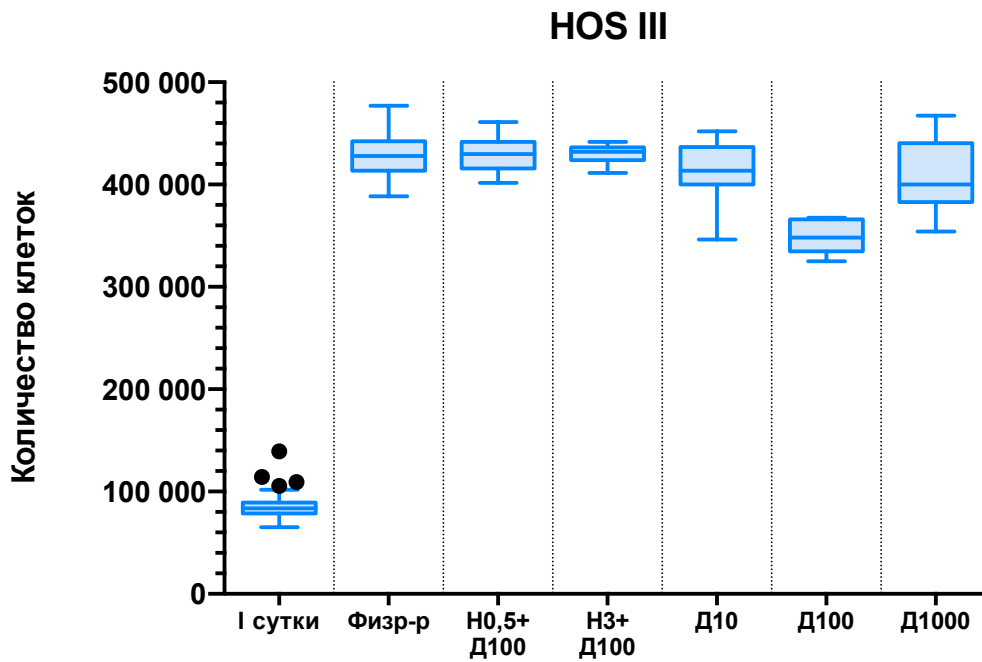


Рисунок 36 - Количество клеток остеосаркомы линии HOS к концу 3 суток культивирования при втором повторе.

Распределение медиан количества дермальных фибробластов (ФБД) во всех группах напоминало распределение, полученное при исследовании пролиферации ММСК (Рисунок 31 - Рисунок 39). Однако меньшая амплитуда этих изменений в группах исследования не обуславливала статистически значимых различий по сравнению с группой контроля (Таблица 3). Исключение составили 2 случая: у первого донора при применении даларгина в концентрации 1000мкг/л наблюдалось статистически значимое уменьшение количества ФБД по сравнению с контролем (Рисунок 37); у второго донора при воздействии даларгина, 100мкг/кг количество ФБД по сравнению с контрольными значениями было статистически значимо больше (Рисунок 38).

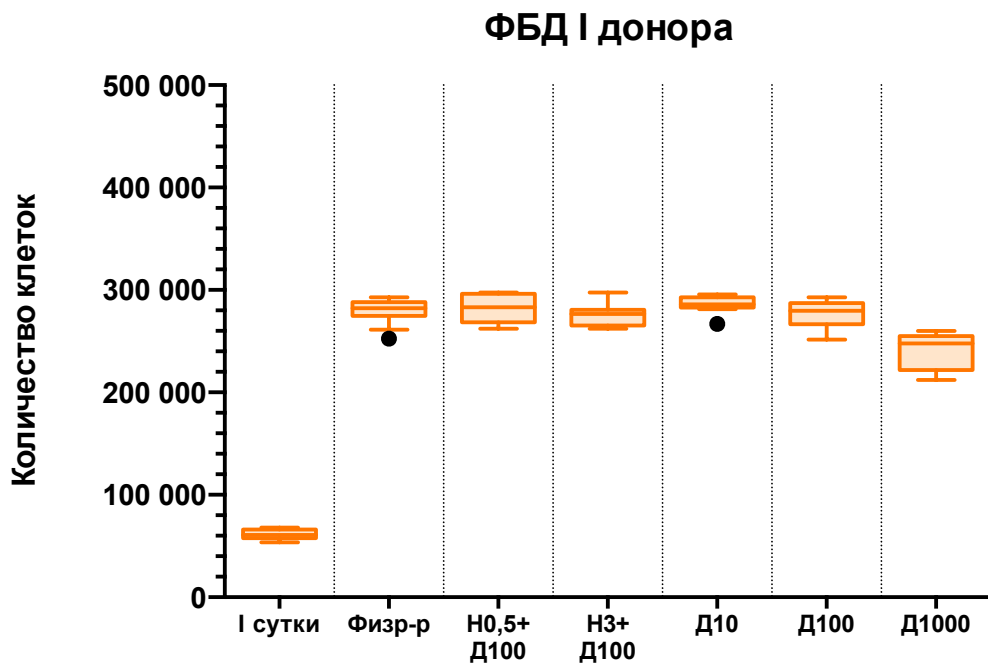


Рисунок 37 - Количество дермальных фибробластов от первого донора после 3 суток культивирования.

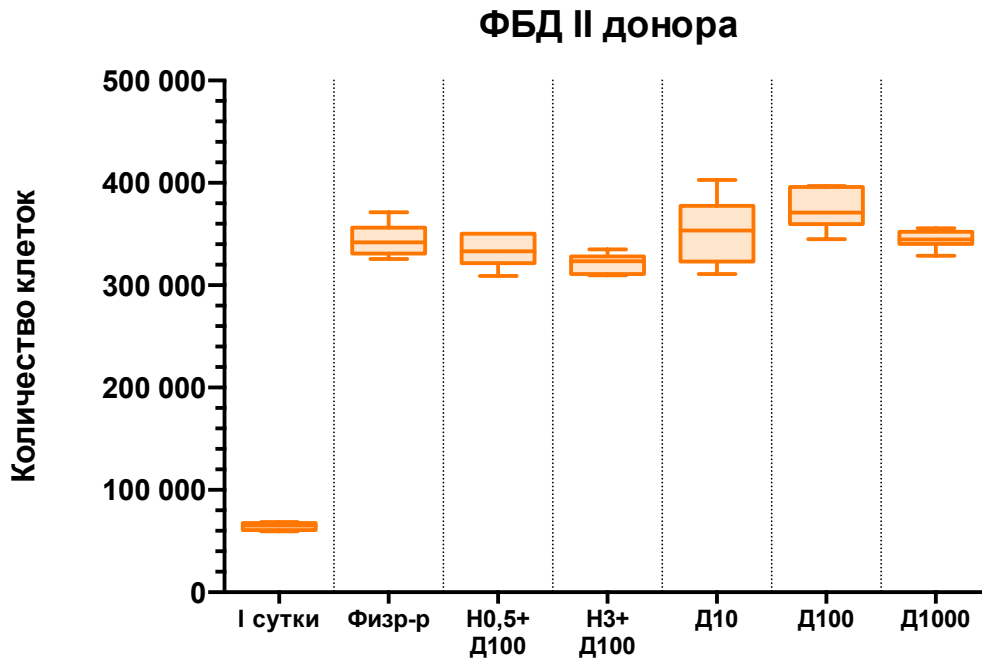


Рисунок 38 - Количество дермальных фибробластов от второго донора после 3 суток культивирования.

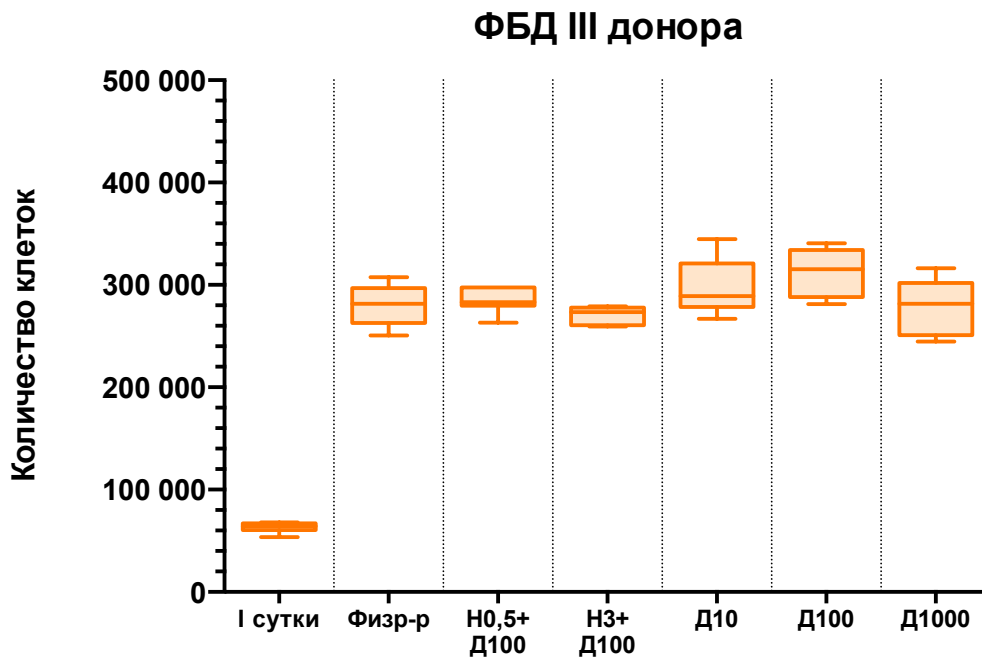


Рисунок 39 - Количество дермальных фибробластов от третьего донора после 3 суток культивирования.

Таблица 3. Сводные данные статистического анализа пролиферации с помощью теста Краскала-Уоллеса.

**Клетки линии НОS**

Группы сравнения с контролем	I повтор		II повтор		III повтор	
	Различие	Me (Q25;Q75) (тыс. клеток)	Различие	Me (Q25;Q75) (тыс. клеток)	Различие	Me (Q25;Q75) (тыс. клеток)
Н 0,5 + Д 100	нет	325 (312; 333)	нет	302 (300; 307)	нет	430 (416; 442)
Н 3 + Д 100	нет	316 (310; 321)	нет	315 (310; 327)	нет	432 (424; 436)
Д 10	нет	309 (269; 322)	да	280 (270; 300)	нет	414 (400; 437)
Д 100	да	244 (225; 272)	да	255 (246; 271)	да	348 (335; 366)
Д 1000	нет	320 (304; 367)	нет	300 (291; 323)	нет	400 (383; 440)

**Клеточная культура ММСК**

Группы сравнения с контролем	I донор		II донор		III донор	
	Различие	Me (Q25;Q75) (тыс. клеток)	Различие	Me (Q25;Q75) (тыс. клеток)	Различие	Me (Q25;Q75) (тыс. клеток)
Н 0,5 + Д 100	нет	159 (153; 161)	нет	319 (307; 323)	нет	183 (180; 184)
Н 3 + Д 100	нет	148 (141; 163)	нет	295 (281; 312)	да	177 (169; 182)
Д 10	нет	168 (159; 180)	да	371 (356; 384)	да	250 (236; 276)
Д 100	да	197 (188; 207)	да	400 (388; 419)	да	299 (271; 305)
Д 1000	нет	152 (131; 160)	нет	290 (273; 315)	нет	199 (187; 227)

**Клеточная культура ФБД**

Группы сравнения с контролем	I донор		II донор		III донор	
	Различие	Me (Q25;Q75) (тыс. клеток)	Различие	Me (Q25;Q75) (тыс. клеток)	Различие	Me (Q25;Q75) (тыс. клеток)
Н 0,5 + Д 100	нет	283 (268; 296)	нет	333 (322; 250)	нет	283 (280; 298)
Н 3 + Д 100	нет	276 (265; 281)	нет	324 (311; 328)	нет	273 (261; 278)
Д 10	нет	286 (283; 293)	нет	354 (323; 378)	нет	289 (278; 321)
Д 100	нет	280 (267; 287)	нет	371 (360; 396)	нет	315 (288; 334)
Д 1000	да	248 (222; 255)	нет	345 (340; 352)	нет	282 (251; 302)

Таким образом, исследование ММСК и ФБД показало, что эффективность воздействия даларгина на пролиферацию клеток в пределах одного дифферона снижается по мере созревания клеток.

## 4 ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее рассматривалось действие как самого даларгина на репаративную регенерацию костной ткани и костного мозга, так специфических агонистов пептидной структуры [Тургунов, Лаврищева, 1989; Ляшев, 2002]. По результатам этих работ (подробно рассмотренных в главе 1.8) можно сделать вывод, что стимуляция опиоидных  $\delta$ -рецепторов ускоряет регенерацию костного мозга и костной ткани, увеличивает объём регенерата костного мозга и уменьшает объём рубца. Это не согласуется с нашими данными. Нами установлено, что у крыс Sprague-Dawley использование даларгина, агониста  $\delta$ -рецепторов, снижает объём костного регенерата на начальных сроках неоостеогенеза на 30% по сравнению с его комбинированным применением с налоксоном - неизбирательным блокатором опиоидных рецепторов. Такой результат может быть связан, во-первых, с блокадой  $\delta$ -рецепторов, через которые даларгин осуществляет действие и, во-вторых, с блокадой опиоидных рецепторов других типов, через которые осуществляют действие эндогенные опиоиды, которые в этом случае принимают участие в репаративной регенерации костной ткани.

Результаты части нашего исследования, проведённого на культуре клеток, показали, что даларгин рецептор-опосредованно стимулирует пролиферацию ММСК (увеличивает их прирост к 3-м суткам на 19-34%), но не дифференцированных ФБД. Это позволяет предположить, что влияние опиоидов на пролиферацию клеток снижается по мере их дифференцировки. Данное предположение соотносится с результатами экспериментов, в которых было показано, что гены проэнкефалина (PENK) экспрессируются в клетках-предшественниках остеобластов, но не в зрелых клетках [Keshet et al., 1989] [Rosen et al., 1995].

Даларгин стимулирует  $\delta$ - и  $\mu$ -рецепторы [Виноградов, 1988; Ардасенов и др., 2004], а избирательность блокатора опиоидных рецепторов налоксона зависит от его дозы воздействия: в концентрации 0,5 мг/кг налоксон *in vivo* избирательно

блокирует  $\delta$ -рецепторы, в то время как в концентрации 3 мг/кг происходит неизбирательное блокирование опиоидных рецепторов всех типов, в том числе  $\mu$ -рецепторов [Millan, Morris, 1988]. В настоящей работе при одновременном использовании даларгина и налоксона в концентрации 0,5 мг/л *in vitro* статистически значимого отличия от группы с использованием налоксона в концентрации 3мг/л выявлено не было. Эти данные позволяют предположить, что даларгин оказывает действие преимущественно за счёт стимулирования  $\delta$ -рецепторов.

Известно, что инициаторы дифференцировки в остеогенном направлении, например, такой интенсивно изучаемый индуктор, как BMP-2, позволяют не только увеличить объём костного регенерата в области дефекта кости [Terbish et al., 2015; Полежаев, 1977], но и индуцировать эктопический неоостеогенез [Lee et al., 2015]. Так, при введении BMP-2 под кожу там образуется костная ткань [Бухарова, 2014]. В то же время стимуляторы пролиферации остеобластов и их клеток-предшественников, например, bFGF, наоборот, препятствуют неоостеогенезу [Ma et al., 2015]. Как нами было показано в эксперименте на клеточной культуре *in vitro*, даларгин стимулирует именно пролиферацию ММСК. Таким образом, хроническое введение одного лишь даларгина с целью увеличения объёма костного регенерата нецелесообразно, что было нами подтверждено в эксперименте *in vivo*. В экспериментальных работах последних лет было показано, что bFGF потенцирует действие рекомбинантного BMP-2 при совместном их введении, в результате увеличивая объём новообразованной костной ткани по сравнению с применением одного только BMP-2 [Ma et al., 2015; Li et al., 2014]. Учитывая то, что репаративная регенерация костной ткани – процесс, включающий как дифференцировку, так и пролиферацию клеток, в дальнейшем было бы рационально изучить эффекты поэтапного введения даларгина и инициатора дифференцировки с целью создания более эффективного комплексного препарата или протокола лечения.

В нашем эксперименте ускорение пролиферации ММСК, но не ФБД под действием даларгина позволяет предположить, что даларгин не влияет на

образование посттравматического рубца, не увеличивая количество его основных клеточных элементов – собственно фибробластов. В клинической практике относительное торможение процессов рубцевания очень важно: например, в хирургической стоматологии широко известны такие понятия, как фибро- и остеоинтеграция имплантата [Вортингтон и др., 2005]. Хирург во время костных пластик всегда стремится добиться образования именно костной ткани с помощью фармакологических препаратов и оперативных техник. Образование рубца (фиброинтеграция) – является неприемлемым результатом лечения и считается синонимом отторжения имплантата [Параскевич, 2006]. По этой причине мы предполагаем, что именно избирательность даларгина в отношении ММСК при его комбинированном использовании с инициатором дифференцировки в остеогенном направлении, например, таким как BMP-2, позволит добиться лучшего результата, нежели использование для этих задач bFGF [Ma et al., 2015; Li et al., 2014], который неизбирательно стимулирует пролиферацию фибробластов.

Противоопухолевое действие опиоидов было показано и ранее в других работах [Nomura et al., 2014]. Однако в отдельных исследованиях выводы о необходимости использования блокаторов опиоидных рецепторов с целью стимуляции регенерации были сомнительными, поскольку в качестве модели эксперимента использовался «опухолевый эквивалент» нормальных клеток, и полученные результаты были ошибочно перенесены на нормальные неопухолевые клетки [Sadee, Bilsky, 2007]. В нашем эксперименте впервые однозначно были сопоставлены данные о воздействии опиоидов и их блокаторов на рост нормальных и опухолевых клеток на примере сравнения пролиферации ММСК как клеток-предшественников остеобластов, и клеток остеосаркомы линии HOS, как их «опухолевого эквивалента». Таким образом, в перспективе нам представляется возможным позиционировать опиоиды периферического действия как противоопухолевую группу препаратов.

Во многочисленных работах обсуждалась наиболее эффективная дозировка даларгина для воздействия на опиоидные рецепторы эпителиоцитов и гладких

миоцитов микрососудов и была установлена логарифмическая зависимость между дозировкой даларгина и оказываемым им эффектом [Панькова, 1992; Виноградов и др., 1991; Хугаева, 1990; Ардасенов и др., 2004]. Результаты этих работ указывают на то, что оптимальная дозировка составляет 10 мкг/кг и 100 мкг/кг. В нашей работе при сравнении этих дозировок наибольший эффект наблюдался при концентрации даларгина 100 мкг/л. Поскольку даларгин – вещество пептидной структуры, возможную кумуляцию его в организме следует исключить. Таким образом, исходя из наших данных, концентрация в эксперименте на животных *in vivo* 100 мкг/кг является оптимальной.

\*\*\*

Предложенный нами протокол операции выполнения критического дефекта теменных костей крыс позволяет, в отличие от ранее предложенных способов [Полежаев, 1977; Montjovent et al., 2007; Spicer et al., 2012], получить более аккуратно сформированный дефект и добиться более воспроизводимых результатов. Кроме того, при использовании предложенного нами метода не возникает перфорации сагиттального венозного синуса, что уменьшает процент выбракованных животных и снижает летальность животных в процессе операции.

Разработанные нами методики объёмной морфометрии могут использоваться не только для анализа критического дефекта теменных костей крыс. Например, математическая модель "резаный цилиндр" может с успехом применяться для гистоморфометрического анализа практически любых объектов цилиндрической формы, будь то столбчатая биопсия или ткани, окружающие дентальный имплантат. Что касается последнего, то классический параметр для анализа остеоинтеграции дентального имплантата BIC (bone-to-implant contact), является двумерным [Giannobile, Nevins, 2011]. С помощью математической модели "резаный цилиндр" возможно адаптировать BIC к условиям 3D морфометрии и в дальнейшем пересмотреть протокол гистоморфометрической оценки остеоинтеграции имплантата.

Алгоритм построения 3D-модели при визуальной 3D-реконструкции по гистологическим срезам аналогичен алгоритму построения 3D-модели по срезам



компьютерной томографии (КТ) [Соловьёв et al., 2010]. Однако гистологическая картина позволяет дать гораздо больше информации по сравнению с картой распределения рентгенологической плотности на срезах компьютерной томографии. Это обеспечивает универсальность предложенного нами метода.

Прижизненное введение животным флуоресцентных тетрациклиноподобных меток позволяет исследовать динамику неоостеогенеза на одной группе животных и избежать формирования многих экспериментальных групп на разных сроках наблюдения, необходимых для классических методов исследования [Lim et al., 2000]. Способы адаптации техники двойного мечения для модели критического дефекта теменных костей крыс предпринимались и ранее [Guskuma et al., 2010; Blum et al., 2003]. Однако именно наша методика, временные рамки которой конкретно рассчитаны на изучение первичного остеогенеза, позволяет полностью окрасить регенерат, образованный на разных сроках неоостеогенеза, что облегчает последующий компьютерный анализ изображения. Оценка динамики регенерации костной ткани с помощью двойного мечения флуорохромами в сочетании с методами 3D-реконструкции позволяет получить 4D-картину, что существенно раздвигает информационные рамки при применении такого способа.

Помимо этого, особого внимания заслуживает разработанный нами алгоритм подготовки гистологического материала для объёмного морфометрического анализа. В качестве основы для объёмной морфометрии мы использовали серийные срезы образца, заключённого в твёрдые полимерные смолы. При таком подходе отпадает необходимость освобождать образец от заливочной среды, которая служит жёсткой основой для препарата и предотвращает его деформацию, что при использовании традиционных парафиновых срезов является труднодостижимым [Ромейс, 1953]. Кроме того, этот метод не требует декальцинации образцов, что позволяет использовать в эксперименте тетрациклиноподобные метки, которые связываются с ионами кальция.

Для изготовления недекальцинированных срезов в качестве заливочной среды нами предложен полиэтилметакрилат. По сравнению с классическими реактивами метилметакрилата для заливки костной ткани, например, Osteo-Bed (Polysciences Inc., США) и Technovit (Heraeus Kulzer GmbH, Германия) предложенный нами реактив этилметакрилата АКР-7 (ВладМива, Россия) является менее токсичным для человека [Aydin et al., 2002; Leggat, Kedjarune, 2003]. Кроме того, реактив АКР-7 не требует существенного изменения классической методики полимеризации в блоки исследуемого образца [и др., Перов, 1996] и является более дешёвым реактивом, по сравнению с готовыми наборами и даже с фасованными чистыми химическими реактивами.

Результаты сравнения классических методик оценки регенерата по данным рентгенографии с методиками объёмной морфометрии по гистологическим срезам позволяют дать рекомендации к использованию каждой из них. Так, применение рентгенологических 2D-методик оценки регенерата целесообразно только в случае, когда необходимо оценить заполнение дефекта регенератом в одной плоскости и его толщина не важна, причём анализу подвергаются только минерализованные рентгеноконтрастные структуры, так как получаемое исходное изображение – это всего лишь карта распределения рентгенологической плотности. Применение методов 3D-морфометрии по гистологическим срезам даёт представление об объёме регенерата. Кроме того, информация, полученная с гистологических срезов, в отличие от рентгенологических способов, позволяет различить тканевые и клеточные структуры регенерата.

## 5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как показано в нашей работе, использование даларгина, агониста  $\delta$ -рецепторов, снижает объём костного регенерата, у крыс Sprague-Dawley на начальных сроках неоостеогенеза на 30% по сравнению с его комбинированным применением с налоксоном - неизбирательным блокатором опиоидных рецепторов. Это можно объяснить, во-первых, блокадой  $\delta$ -рецепторов, через которые даларгин осуществляет действие и, во-вторых, блокадой опиоидных рецепторов других типов, через которые осуществляют действие эндогенные опиоиды, участвующие в репаративной регенерации костной ткани.

В культуре клеток даларгин рецептор-опосредованно стимулирует пролиферацию ММСК (увеличивает их прирост к 3-м суткам на 19-34%), но не влияет на пролиферацию дифференцированных ФБД. Это позволяет предположить, что по мере дифференцировки клеток снижается влияние опиоидов на их пролиферацию.

В настоящей работе не было выявлено статистически значимого отличия в группе с одновременным использованием даларгина и налоксона в концентрации 0,5 мг/л *in vitro* от группы с использованием налоксона в концентрации 3мг/л. Возможно, даларгин оказывает действие преимущественно за счёт стимулирования  $\delta$ -рецепторов.

*In vitro* даларгин стимулирует именно пролиферацию, а не дифференцировку ММСК. Таким образом, хроническое введение одного лишь даларгина с целью увеличения объёма костного регенерата нецелесообразно, что было подтверждено нами в эксперименте *in vivo*.

Учитывая то, что репаративная регенерация костной ткани – процесс, включающий как дифференцировку, так и пролиферацию клеток, в дальнейшем было бы рационально изучить эффекты поэтапного введения даларгина и

инициатора дифференцировки с целью создания более эффективного комплексного препарата или протокола лечения.

В нашем эксперименте ускорение пролиферации ММСК, но не ФБД под действием даларгина позволяет также предположить, что даларгин не влияет на образование посттравматического рубца, что имеет большое значение для клинической практики.

Мы предполагаем, что именно избирательность даларгина в отношении действия на ММСК при его комбинированном использовании с инициатором дифференцировки в остеогенном направлении, например, таким, как BMP-2, позволит добиться лучшего результата, нежели использование для этих задач менее избирательных стимуляторов пролиферации, например, bFGF.

Нами впервые однозначно были сопоставлены данные о воздействии опиоидов и их блокаторов на рост нормальных и опухолевых клеток на примере сравнения пролиферации ММСК как клеток-предшественников остеобластов, и клеток остеосаркомы линии HOS как их «опухолевого эквивалента». Таким образом, в перспективе нам представляется возможным позиционировать опиоиды периферического действия как противоопухолевую группу препаратов.

Разработанная нами математическая модель "резаный цилиндр" может с успехом применяться для гистоморфометрического анализа практически любых объектов цилиндрической формы, будь то столбчатая биопсия или ткани, окружающие дентальный имплантат.

Методика двойного мечения тетрациклиноподобными флуорохромами костного регенерата, позволяет полностью окрасить регенерат, образованный на разных сроках неоостеогенеза, что облегчает последующий анализ изображения, и позволяет оценить динамику регенерации костной ткани.

Результаты сравнения классических методик оценки регенерата по данным рентгенографии с методиками объёмной морфометрии по гистологическим срезам позволили дать рекомендации к использованию каждой из них.

## 6 ВЫВОДЫ

1. Длительное курсовое введение даларгина замедляет репаративную регенерацию костной ткани на 30% по сравнению с применением его комбинации с налоксоном, стимулируя пролиферацию клеток-предшественников, но не их дальнейшую дифференцировку, что приводит к снижению объёма костного регенерата.

2. Даларгин в концентрации 100 мкг/л, воздействуя через опиоидные  $\delta$ -рецепторы, стимулирует пролиферацию в культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), увеличивая их прирост к 3-м суткам на 19-34%.

3. Даларгин не оказывает существенного влияния на пролиферацию *in vitro* дермальных фибробластов, т.е. более зрелых клеток, дифференцированных из ММСК.

4. Даларгин в оптимальной концентрации 100 мкг/л оказывает выраженное антипролиферативное действие на клетки остеосаркомы линии NOS за счёт стимулирования опиоидных  $\delta$ -рецепторов, уменьшая их прирост к 3-м суткам на 22-34%.

5. На модели критического дефекта теменных костей крыс разработан протокол двойного мечения костного регенерата флуорохромами, позволяющий получить полное окрашивание регенерата метками разного цвета, соответствующими различным срокам остеогенеза, что делает возможным анализ динамики неоosteогенеза. Его комбинация с методами трёхмерной гистоморфометрии позволяет оценить динамику изменения объёма регенерата.

6. Для точной оценки дефектов костной ткани цилиндрической формы, в частности критического дефекта теменных костей крыс, разработана математическая модель «резаный цилиндр» - метод 3D-морфометрии костной ткани на гистологических препаратах. Математическая модель «резанный цилиндр» самым точным образом воспроизводит контур дефекта и позволяет автоматически позиционировать срезы в пространстве.

## 7 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

Г-Э - гематоксилин-эозин

ЖКТ - желудочно-кишечный тракт

КТ - компьютерная томография

ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

ФБД – дермальные фибробласты

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

ЦНС – центральная нервная система

ВІС - bone-to-implant contact (контакт кость-имплантат)

bFGF - basic fibroblast growth factor (основной фактор роста фибробластов)

ВМР-2 - bone morphogenetic protein-2 (костный морфогенетический белок-2)

НОС – human osteosarcoma (остеосаркома человека)

## 8 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Ардасенов, А. В.** Микроциркуляторное русло кожи в условиях воспаления и коррекции методом лимфостимуляции / А. В. Ардасенов, В. К. Хугаева, П. Н. Александров — М. : Научный Мир, 2004. — 148 с.
2. **Ашмарин, И. П.** Гормоны и регуляторные пептиды: различия и сходство понятий и функций. Место гормонов среди других межклеточных сигнализаторов. / И. П. Ашмарин // Российский Химический Журнал. — 2005. — Т. XLIX, №1. — С. 4-7.
3. **Белоконева, О. С.** Всесоюзный симпозиум "Биохимия рецепторных систем" / О. С. Белоконева // Стабильность опиоидных рецепторов в растворах. — 1990. — С. 4-5.
4. **Белоусова, Е. А.** Лекарственные средства – лиганды опиатных рецепторов и их применение в гастроэнтерологии / Е.А. Белоусова, С.А. Булгаков // Фарматека. — 2011. — №2. — С. 26-31.
5. **Булачевский, Б. В.** Даларгин-индуцируемая модуляция функционально-метаболической активности нейтрофильных лейкоцитов. / Б. В. Булачевский, А. Н. Курзанов, А. А. Славинский // Успехи современного естествознания. — 2008. — №5. — С. 75-77.
6. **Бухарова, Т. Б.** Разработка тканеинженерной конструкции на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани, полилактидных носителей и тромбоцитарного геля для восполнения костного дефекта: дис. ... канд. биол. наук: 03.03.04 / Татьяна Борисовна Бухарова. — М., 2014.
7. **Бухарова, Т. Б.** Тканеинженерная конструкция на основе мультипотентных стромальных клеток жировой ткани и материала «Остеоматрикс» для регенерации костной ткани / Т. Б. Бухарова, И. В. Арутюнян, С. А. Шустров [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине.. — 2011. — №3. — С. 167-73.

8. **Виноградов, В. А.** Опиоидный гексапептид - даларгин в патогенетической терапии заболеваний органов пищеварения / В. А. Виноградов // Сов.медицина. — 1988. — №10. — С. 59-63.
9. **Виноградов, В. А.** Создание даларгина, история и этапы исследования / В. А. Виноградов, С. А. Булгаков, В. М. Полонский // Актуальные вопросы гастроэнтерологии. — Москва, 1991. — С. 9-14.
10. **Виноградов, В. А.** Даларгин – наиболее активный синтетический аналог эндогенных опиоидов для лечения язвенной болезни / В. А. Виноградов, В. М. Полонский // Бюллетень Всесоюзн. корд. науч. центра. — 1986. — №2. — С. 62-63.
11. **Виноградова, Т.П.** Регенерация и пересадка костей / Т.П. Виноградова, Г.И. Лаврищева — М. : Медицина, 1974. — 248 с.
12. **Вортингтон, Ф.** Остеоинтеграция в стоматологии / Ф. Вортингтон, Б. Р. Ланг, В. Е. Лавелле — М. : Квинтэссенция, 2005. — 126 с. — ISBN: 5-85610-010-7.
13. **Ганина, С. С.** Оценка эффективности лечения даларгином больных с флегмонами лица и шеи по показателям свободнорадикального окисления периферической крови / С. С. Ганина, Ч. Р.Рагимов // Стоматология. — 1991. — №6. — С. 28-30.
14. **Глазунова, И. Б.** Влияние даларгина на эффективность терапии атопического дерматита. / И. Б. Глазунова, Л. В. Силина, И. И. Бобынцев // Клиническая медицина. — 2007. — С. 22-26.
15. **Голанов, Е. В.** Современное состояние проблемы эндогенных морфиноподобных веществ / Е. В. Голанов— М. : ВНИИМИ. Медицина и здравоохранение. Серия: фармакология и фармация. Выпуск 1. — 1986. — 76 с.
16. **Горбунов, А. А.** Пространственная реконструкция соединительнотканного компонента миокарда крыс/ **А. А. Горбунов** // Морфология.. — 2008. — Т. 2, №2. — С. 10-14.



17. **Григоренко, Е. И.** Четвертый Всесоюзный съезд гастроэнтерологов. // Амбулаторно-поликлиническое лечение язвенной болезни двенадцатиперстной кишки новыми способами введения даларгина / Е. И. Григоренко — 1990. — Т. 1. — С. 216-217.
18. **Дьяконова, В. Е.** Поведенческие функции опиоидных пептидов у беспозвоночных / В. Е. Дьяконова // Журн. эвол. биохим.-физиол.. — 2001. — Т. 37, №4. — С. 253–261.
19. **Егоркина, С. Б.** Опиоидные пептиды как нейромодуляторы адаптивных процессов / С. Б. Егоркина, Е. В. Елисеева // Вестник удмуртского университета. (Биология. Науки о земле.). — 2010. — №3. — С. 25-28.
20. **Карлсон, Б. М.** Регенерация / Карлсон, Б. М. — Москва : Наука, 1986. — 296 с.
21. **Кассир, Н. Н.** Влияние даларгина и иммуномодуляторов на стресс-протекторную систему и неспецифическую резистентность больных при общей анестезии: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.37 / Кассир Нидал Насредин — Ростов-на-Дону, 2006. — 22 с.
22. **Клименко, Н. А.** Роль опиоидных пептидов в реакции тучных клеток очага воспаления / Н. А. Клименко, В. А. Перин // Медицина сьогодні і завтра. — 2010. — №2-3. — С. 47-48.
23. **Коваленко, О. Е.** Применение малых регуляторных пептидов в анестезиологии и интенсивной терапии / Коваленко О. Е. // Особенности фармакодинамики даларгина при различных способах введения. — 1991. — С. 62-64.
24. **Кулаков, А. А.** Устранение критических костных дефектов с помощью биоинженерной конструкции на нерезорбируемой полимерной основе с использованием аутогенных мультипотентных стромальных клеток из жировой ткани / А. А. Кулаков, А. С. Григорьян, Е. В. Киселева [и др.] // Стоматология. — 2010. — №3. — С. 9-12.

25. **Ляшев, Ю. Д.** Влияние опиоидных пептидов на репаративную регенерацию костной ткани / Юрий Дмитриевич Ляшев // Архив патологии. — 2002. — Т. 64, №1. — С. 6-8.
26. **Ляшев, Ю. Д.** Опиоидные пептиды как регуляторы репаративного остеогенеза: дис. ... д-ра мед. наук: 03.00.13 / Юрий Дмитриевич Ляшев. — Курск, 2002. — 217 с.
27. **Максакова, Е. В.** Эффективность применения пептидного биорегулятора в комплексном лечении травматических заболеваний роговицы / Е. В. Максакова // Офтальмол. журнал. — 2002. — №2. — С. 31-34.
28. **Матющенко, С. А.** Применение даларгина при длительных операциях на мягких тканях лица : автореф. ... дис. канд. мед. наук: 14.00.27 / Сергей Александрович Матющенко. — Хабаровск, 2009. — 22 с.
29. **Панченко, Л. Ф.** Метаболизм энкефалинов при различных функциональных и патологических состояниях организма / Л. Ф. Панченко, Н. В. Митюшина, М. Т. Генгин // Вопросы медицинской химии. — 1999. — №4. — С. 277-289.
30. **Панькова, Т. Д.** Влияние лиганда опиатных рецепторов даларгина на процессы клеточного деления различных видов эпителия: автореф. ... дис. канд. мед. наук: 03.00.11 / Татьяна Дмитриевна Панькова — Владивосток, 1992. — 20 с.
31. **Панькова, Т. Д.** Доказательства реализации стимулирующего эффекта даларгина на процесс клеточного деления через опиатные рецепторы / Татьяна Дмитриевна Панькова // Бюл.эксперим. биологии и медицины. — 1990. — Т. 110, №7. — С. 96-98.
32. **Параскевич, В. Л.** Дентальная имплантология. Основы теории и практики / В. Л. Параскевич. — Минск : Медицинское информационное агентство, 2006. — 400 с.
33. **Парахонский, А. П.** Регуляция иммунного ответа опиоидными пептидами / А. П. Парахонский // Успехи современного естествознания. — 2008. — №10. — С. 77-78.

34. **Полежаев, Л. В.** Регенерация путём индукции / Л. В. Полежаев. — М. : Медицина, 1977. — 184 с.
35. **Ревелл, П. А.** Патология кости / П. А. Ревелл. — М. : Медицина, 1993. — 368 с.
36. **Ромейс, Б.** Микроскопическая техника / Б. Ромейс — М. : Издательство иностранной литературы, 1953. — 719 с.
37. **Саркисов, Д. С.** Микроскопическая техника / под ред. Д. С. Саркисова и Ю. Л. Перова. — М. : Медицина, 1996.
38. **Сергеев, П. В.** Рецепторы физиологически активных веществ / П. В. Сергеев, Н. Л. Шимановский, В. И. Петров. — Волгоград : Семь ветров, 1999. — 640 с.
39. **Слепушкин, В. Д.** Энкефалины и регенерация / В. Д. Слепушкин // Бюл. Сиб. отд-ния АМН СССР. — 1989. — №2. — С. 87-92.
40. **Соловьёв, В. М.** Технология построения твердотельных моделей бедренных костей на основе данных компьютерной томографии / В. М. Соловьёв, П. В. Ирматов, М. С. Ирматова, М. Г. Щербаков // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер.. — 2010. — Т. 10, №2. — С. 81-87.
41. **Судаков, С.К.** Церебральные механизмы опиатной зависимости / С. К. Судаков, К. В. Судаков // Клиническая наркология. — 2003. — №1. — С. 38-43.
42. **Тургунов, Н. Т.** Влияние гексапептида даларгина на репаративные процессы в посттравматически изменённых тканях костей / Н. Т. Тургунов, Г. И. Лаврищева // Медицинский журнал Узбекистана. — 1989. — №. — С. 70-71.
43. **Уайт, А.** Основы биохимии / **А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит, Р. Хилл, И. Леман**; под ред. Овчинников Ю.А.. — 1981. — Т. 3 : 1449-1450 с.
44. **Фрешни, Р. Я.** Культура животных клеток / Фрешни Р. Я.; перев. Ю. Н. Хомяков, Т. И. Хомякова. — М. : Бином, 2011. — 5-е : 611 с.
45. **Харкевич, Д. А.** Фармакология: учебник / Под ред. Д. А. Харкевича — М. : ГЕОТАР-Медиа, 2006. — 9-е издание. : 736 с.

46. **Хугаева, В. К.** Роль концевых аминокислот в физиологической активности опиоидных пептидов (лимфостимуляция, сосудистая проницаемость) / Валентина Каргоевна Хугаева // Физиологический журнал СССР им И.М. Сеченова. — 1990. — №1. — С. 92-99.
47. **Шейман, И. М.** Морфологическая активность регуляторных нейропептидов и регенерация планарий. / И. М. Шейман, Н. Д. Крещенко // Биомедицина. — 2008. — №1. — С. 79–87.
48. **Akhoundi M. S.** The effect of morphine on orthodontic tooth movement in rats. / Akhoundi M. S., Dehpour A. R., Rashidpour M. [et al.] // Aust Orthod J.. — Nov 2010. — Vol. 26 (2). — P. 113-8.
49. **Allescher H. D.** Inhibitory opioid receptors in canine pylorus. / Allescher H. D., Ahmad S., Daniel E. E. [et al.] // Am J Physiol.. — Sep 1988. — Vol. 255 (3 Pt 1). — P. G352-60.
50. **Arvidsson A.** Comparing and visualizing titanium implant integration in rat bone using 2D and 3D techniques. / Arvidsson A., Sarve H., Johansson C. B. // J Biomed Mater Res B Appl Biomater. — 2015. — Vol. 103 (1). — P. 12-20.
51. **Aydin O.** The Effects of Methyl Methacrylate on Nasal Cavity, Lung, and Antioxidant System (An Experimental Inhalation Study) / Aydin O., Attila G., Dogan A. [et al.] // Toxicol Pathol. — 2002. — Vol. 30 (3). — P. 350-356.
52. **Baud C.A.** Histologie intrastructurale sur la bifluorescence du tissu, osseux tonitée par les tétracyclines / Baud C.A., Dupont D.H. // C R Séances Acad Sci.. — 1962. — Vol. 254. — P. 3129-30.
53. **Becket G.H.** On the Action of Organic Acids and their Anhydrides on the Natural Alkaloids. / Becket G. H., Wright C. R. A. // Journal of the Chemical Society. — 1874. — Vol. 27. — P. 1031–1043.
54. **Benatti B.B.** Periodontal healing may be affected by aging: a histologic study in rats / Benatti B.B., Neto J.B., Casati M.Z. [et al.] // J Periodontal Res. — 2006. — Vol. 41. — P. 329-333.
55. **Bilezikian, J.** Principles of Bone Biology / Bilezikian, J., Raisz, L., Martin, T. — USA, San Diego: Academic Press. — 735p.

56. **Blum J.S.** In Vivo Evaluation of Gene Therapy Vectors in Ex Vivo - Derived Marrow Stromal Cells for Bone Regeneration in a Rat Critical-Size Calvarial Defect Model / Blum J.S., Barry M.A., Mikos A.G. [et al.] // Human gene therapy. — 2003. — Vol. 14 (18). — P. 1689-701.
57. **Burr D.B.** Basic and Applied Bone Biology / Burr D.B., Allen M.R. — Academic Press, 2013. — 392 p.
58. **Chang A.C.** Structural organization of human genomic DNA encoding the pro-opiomelanocortin peptide / Chang A.C., Cochet M., Cohen S.N. // Proceedings of the National Academy of Sciences. — Aug 1980. — Vol. 77 (8). — P. 4890-4.
59. **Chappard D.** Comparison insight bone measurements by histomorphometry and microCT / Chappard D., Retailleau-Gaborit N., Legrand E. [et al.] // J Bone Miner Res. — 2005. — Vol. 20 (7). — P. 1177-84.
60. **Costa E.** Opioid peptide biosynthesis: enzymatic selectivity and regulatory mechanisms / Costa E., Mocchetti I., Spattapone S. [et al.] // The FASEB journal. — 1987. — Vol. 1. — P. 16-21.
61. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee / **Dempster D. W.**, Compston J. E., Drezner M. K., Glorieux F. H., Kanis J., Malluche H., Meunier P. J., Ott S. M., Recker R. R., Parfitt M. // Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. — 2013. — Vol. 28 (1). — P. 2-17.
62. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors / **Dhawan B. N.**, Cesselin F., Raghupir R., Reisine T., Bradley P. B., Portoghese P. S., Hamon M. // Pharmacological reviews. — 1996. — Vol. 48 (4). — P. 567-92.

63. **Dias D. R.** Agreement between Histomorphometry and Microcomputed Tomography to Assess Bone Microarchitecture of Dental Implant Sites / Dias D.R., Leles C.R., [et al.] // *Clin Implant Dent Relat Res.* — Nov 2013. — P. 1-9.
64. **Dominici M.** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. / Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., [et al.] // *Cytotherapy.* — 2006. — Vol. 8 (4). — P. 315-7.
65. **Elhassan A. M.** Methionine-enkephalin in bone and joint tissues / Elhassan A. M., Lindgren J. U., Hultenby K., [et al.] // *J Bone Miner Res.* — Jan 1998. — Vol. 13(1). — P. 88-95.
66. **Fiala J. C.** Reconstruct: a free editor for serial section microscopy / Fiala J. C. // *J Microsc.* — 2005. — Vol. 218 (Pt 1). — P. 52-61.
67. **Frost H. M.** Tetracycline labeling of bone and the zone of demarcation / Frost H. M. // *Can J Biochem.* — 1962. — Vol. 40. — P. 485-9.
68. **Giannobile W. V.** Osteology Guidelines for Oral and Maxillofacial Regeneration: Preclinical Models for Translational Research / Giannobile W.V., Nevins M. [et al.] — Quintessence, 2011. — 1 edition : 256 p. — ISBN 9781850972112.
69. The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification / **Girdlestone D.**, Cox B.M., Chavkin C., Christie M.J., Civelli O., Evans C., Hamon M.D., [et al.] — 2nd.. — London : IUPHAR Media, 2000. — P. 321–333.
70. **Graves D. T.** The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases / Graves D.T., Fine D., Teng Y.T., [et al.] // *J Clin Periodontol.* — 2008. — Vol. 35. — P. 89-105.
71. **Guskuma M. H.** Bone regeneration in surgically created defects filled with autogenous bone: an epifluorescence microscopy analysis in rats / Guskuma M. H., Hochuli-Vieira E., Pereira F. P., [et al.] // *Journal of applied oral science : revista FOB.* — 2010. — Vol. 18 (4). — P. 346-53.

72. **Harris W.H.** The in vivo distribution of tetracycline in canine bone / Harris W. H., Jackson R. H., Jowsey J. // *J BoneJtSurg [Am]*.. — 1962. — Vol. 44. — P. 1308-20.
73. **Horikawa S.** Isolation and structural organization of the human preproenkephalin B gene / Horikawa S., Takai T., Toyosato M. [et al.] // *Nature*. — Dec 8-14, 1983. — Vol. 306 (5943). — P. 611-4.
74. **Ibsen K. H.** Complexes of calcium and magnesium with oxytetracycline. / Ibsen K. H., Urist M. R. // *ProcSocExpBiolMed*. — 1962. — Vol. 109. — P. 797-8.
75. Opioid receptors / **International Union of Pharmacology**. — IUPHAR Database., 2008.
76. **Ken A. W.** CNS Drug Delivery: Opioid Peptides and the Blood-Brain Barrier / Ken A. W., Thomas P. D. // *The AAPS Journal*. — 2006. — Vol. 8 (1) Article 9. — P. 76-88.
77. **Keshet E.** Proenkephalin A is expressed in mesodermal lineages during organogenesis / Keshet E., Polakiewicz R. D., Itin A. [et al.] // *EMBO J*. — Oct 1989. — Vol. 8 (10). — P. 2917-23.
78. **Kim T.W.** Low bone density in patients receiving methadone maintenance treatment / Kim T.W., Alford D.P., Malabanan A. [et al.] // *Drug Alcohol Depend*. — Dec 1, 2006. — Vol. 85 (3). — P. 258-62.
79. **Lai J.** Treatment with anticense oligodeoxynucleotide to a conserved sequence of opioid receptors inhiblts antinociceptive effects of delta subtype selective ligands. / Lai J., Bilsky E. J., Porreca F. // *J. Recep. Signal Transduct. Res.*.. — Jan-Mar 1995. — Vol. 15 (1-4). — P. 643-50.
80. **Lee Chang-Hwan.** Effect of Dual Treatment with SDF-1 and BMP-2 on Ectopic and Orthotopic Bone Formation / Lee Chang-Hwan, Jin Myoung Uk, Jung Hong-Moon [et al.] // *Plos One*. — 17 March 2015 г.. — T. 10 (3). — C. 1-15.
81. **Lee J.A.** Effects of fibrin-binding oligopeptide on osteopromotion in rabbit calvarial defects. / Lee J.A., Ku Y., Rhyu I.C. [et al.] // *J Periodontal ImplantSci.*.. — 2010. — Vol. 40 (5). — P. 211-9.

82. **Leggat P.A.** Toxicity of methyl methacrylate in dentistry. / Leggat P.A., Kedjarune U. // *Int Dent J.* — 2003. — Vol. 53 (3). — P. 126-131.
83. **Li P.** Synergistic and sequential effects of BMP-2, bFGF and VEGF on osteogenic differentiation of rat osteoblasts / Li P., Bai Y., Yin G. [et al.] // *Journal of Bone and Mineral Metabolism.* — 2014. — T. 32. — C. 627-635.
84. **Lim S. C.** Effects of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats. / Lim S. C., Lee M. J., Yeo H. H. // *Pathology international.* — 2000. — Vol. 50 (8). — P. 594-602.
85. **Ma Shu-Yuan.** Synergistic effect of RhBMP-2 and bFGF on ectopic osteogenesis in mice / Ma Shu-Yuan, Feng Zhi-Qiang, Lai Ren-Fa [et al.] // *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.* — 2015. — Vol. 8 (1). — P. 53-59.
86. **McDonald J.** Opioid receptors / McDonald J., Lambert D. G. // *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain.* — 2005. — Vol. 5 (1).
87. **McNally G. P.** Opioid peptides and their receptors: overview and function in pain modulation / McNally G. P., Akil H. // *Neuropsychopharmacology : The Fifth Generation of Progress.* — 2002. — №. — P. 35-46.
88. **Meunier J. C.** Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor / Meunier J. C., Mollereau C., Toll L. [et al.] // *Nature.* — October 1995. — Vol. 377 (6549). — P. 532-5.
89. **Millan M. J.** Opioid systems in the response to inflammatory pain: sustained blockade suggests role of kappa- but not mu-opioid receptors in the modulation of nociception, behaviour and pathology / Millan M.J., Colpaert F.C. // *Neuroscience.* — 1991. — Vol. 42 (2). — P. 541-53.
90. **Millan M. J.** Long-term blockade of mu-opioid receptors suggests a role in control of ingestive behaviour, body weight and core temperature in the rat / Millan M. J., Morris B. J. // *Brain Res.* — May 31, 1988. — Vol. 450 (1-2). — P. 247-58.
91. **Montjovent M. O.** Repair of critical size defects in the rat cranium using ceramic-reinforced PLA scaffolds obtained by supercritical gas foaming /



- Montjovent M.O., Mathieu L., Schmoekel H. [et al.] // *Journal of biomedical materials research.* — 2007. — 1. — Vol. 83. — P. 41-51.
92. **Nakamura H.** [Physical dependence on loperamide hydrochloride in mice and rats]: in Japanese / Nakamura H., Ishii K., Yokoyama Y. [et al.] // *Yakugaku Zasshi.* — November 1982. — Vol. 102 (11). — P. 1074–85.
93. **Noda M.** Isolation and structural organization of the human preproenkephalin gene / Noda M., Teranishi Y., Takahashi H. [et al.] // *Nature.* — Jun 3, 1982. — Vol. 297 (5865). — P. 431-4.
94. **Nomura Y.** Effects of morphine and fentanyl on 5-fluorouracil sensitivity in human colon cancer HCT116 cells. / Nomura Y., Kawaraguchi Y., Sugimoto H., [et al.] // *J Anesth.* — 2014. — Vol. 28 (2). — P. 298-301.
95. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee / **Parfitt A. M.**, Drezner M. K., Glorieux F. H., Kanis J.A., Malluche H., Meunier P. J., Ott S. M., Recker R. R. // *J Bone Miner Res.* — 1987. — Vol. 2 (6). — P. 595-610.
96. **Pascaud X.** Mode of action of trimebutine: involvement of opioid receptors / Pascaud X., Petoux F., Roman F., [et al.] // *Presse Med.* — Feb 15, 1989. — Vol. 18 (6). — P. 298-302.
97. **Patel Z. S.** Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model / Patel Z. S., Young S., Tabata Y. [et al.] // *Bone.* — 2008. — Vol. 43 (5). — P. 931-40.
98. **Pedrazzoni M.** Effects of chronic heroin abuse on bone and mineral metabolism / Pedrazzoni M., Vescovi P. P., Maninetti L. [et al.] // *Acta Endocrinologica.* — Jul 1993. — Vol. 129 (1). — P. 42-5.
99. **Pellegrini G.** Pre-clinical models for oral and periodontal reconstructive therapies / Pellegrini G., Seol Y. J., Gruber R., [et al.] // *J Dent Res.* — 2009. — Vol. 88 (12). — P. 1065-76.
100. **Pérez-Castrillón J. L.** 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 / Pérez-Castrillón J. L., Olmos J. M., Gómez J. J. [et al.] // *Neuroendocrinology*. — Sep 2000. — Vol. 72 (3). — P. 187-94.
101. **Rashidpour M.** Effect of Tramadol ( $\mu$ -opioid receptor agonist) on orthodontic tooth movements in a rat model / Rashidpour M., Ahmad Akhoundi M. S., Nik T. H. [et al.] // *J. Dent.*. — Tehran, Spring 2012. — Vol. 9 (2). — P. 83-9.
102. **Raynor K.** Molecular biology of opioid receptors / Raynor K., Kong H., Law S. [et al.] // *NIDA research monograph*. — 1996. — Vol. 161 (12). — P. 83-103.
103. **Rosen H.** Developmental regulation of proenkephalin gene expression in osteoblasts / Rosen H., Krichevsky A., Polakiewicz R. D. [et al.] // *Mol Endocrinol*. — Nov 1995. — Vol. 9 (11). — P. 1621-31.
104. **Sadee W.** Compositions and methods in the treatment of bone metabolic disorders. Al. : 2007/0197573 / Sadee W., Bilsky E. J. — USA, Aug 23, 2007.
105. **Song Y.** In vitro proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on nanoporous alumina / Song Y., Ju Y., Song G. [et al.] // *International journal of nanomedicine*. — 2013. — Vol. 8. — P. 2745-56.
106. **Spicer P.P.** Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect / Spicer P.P., Kretlow J.D., Young S. [et al.] // *Nat Protoc*. — 2012. — Vol. 7 (10). — P. 1918-29.
107. **Takagi K.** The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects / Takagi K., Urist M. R. // *AnnSurg*. — 1982. — Vol. 196 (1). — P. 100-9.
108. **Terbish M.** Accelerated Bone Formation in Distracted Alveolar Bone After Injection of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 / Terbish M. Yoo S. H., Kim H. J. [et al.] // *J Periodontol*. — EPUB, 2015. — C. 1-16.
109. **Vestergaard P.** Effects of paracetamol, non-steroidal anti-inflammatory drugs, acetylsalicylic acid, and opioids on bone mineral density and risk of fracture: results of the Danish Osteoporosis Prevention Study (DOPS) / Vestergaard P., Hermann P., Jensen J. E. [et al.] // *Osteoporos Int.*. — Apr 2012. — Vol. 23 (4). — P. 1255-65.

110. **Yuehwei H. An.** Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage / Yuehwei H. An., Kylie L. M. — New York: Springer Science & Business Media, 2003. — 588 c.
111. **Zadina J. E.** A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor / Zadina J. E., Hackler L., Ge L. J. [et al.] // Nature. — April 1997. — Vol. 386 (6624). — P. 499–502.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Применение флуоресцентных меток для оценки регенерации костной ткани на модели критических дефектов теменных костей крыс с использованием адаптированного метода гистоморфометрии / Волков, А.В., Васильев, А.В., Рачинская, О.А, Большакова, Г.Б., Гольдштейн, Д.В. // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2013. – № 2. – С. 73-80.
2. Влияние даларгина на пролиферацию мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, дермальных фибробластов и клеток остеосаркомы человека *in vitro* / Васильев А.В., Бухарова Т.Б., Волков А.В., Вихрова Е.Б., Большакова Г.Б., Гольдштейн Д.В. // Гены и клетки. – 2014. – № 4. – С. 76-80
3. Влияние даларгина на репаративную регенерацию критического дефекта теменных костей крыс / Васильев А.В., Большакова Г.Б. // Морфологические ведомости. – 2014. – № 4. – С.11-18
4. Характеристика неоостеогенеза на модели критического дефекта теменных костей крыс с помощью традиционной и трёхмерной морфометрии. / Васильев А.В., Волков А.В., Большакова Г.Б., Гольдштейн Д.В. // Гены и клетки. – 2014. – № 4. – С. 121-127
5. Возможности влияния опиоидов на репаративную регенерацию костной ткани: перспективы синтетического опиоидного пептида периферического действия «даларгина» / Васильев А.В., Волков А.В. // Актуальные проблемы физиологии. XVIII межгородская конференция молодых учёных. Сборник тезисов. – 2012. – С. 27-28.
6. Влияние даларгина на пролиферацию культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и дермальных фибробластов и линии клеток саркомы человека / Васильев А.В., Бухарова Т.Б., Волков А.В., Вихрова Е.Б., Гольдштейн Д.В., Большакова Г.Б. // V Всероссийская научно-практическая конференция «Стволовые клетки и регенеративная медицина». Сборник тезисов. 2013. – С. 12.
7. Влияние даларгина на пролиферацию культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и их дифференцировку в остеобластическом направлении / Васильев А.В., Бухарова Т.Б., Волков А.В., Большакова Г.Б., Гольдштейн Д.В., Салимханов В.Я. // Всероссийская научная конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» с международным участием. Сборник научных трудов. – 2014. – С. 53-54.