

РЕНТГЕНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАЛЛЕЛИ ОСТЕОРЕГЕНЕРАТИВНОГО ПРОЦЕССА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ЭТИНДРОНАТОВ ИОНОВ ЛАНТАНОИДОВ

X-RAY AND MORPHOLOGICAL PARALLELS OF THE OSTEOREGENERATIVE PROCESS AFTER USING THE AGENT BASED ON ION LANTHANIDE ETIDRONATE

Ахтямов И.Ф. Akhtyamov I.F.
Житлова Е.А. Zhitlova E.A.
Цыплаков Д.Э. Tsyplakov D.E.
Бойчук С.В. Boichuk S.V.
Шакирова Ф.В. Shakirova F.V.
Коробейникова Д.А. Korobeynikova D.A.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

Kazan State Medical University,

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины» Министерства науки и образования Российской Федерации,

Kazan State Academy of Veterinary Medicine,

г. Казань, Россия

Kazan, Russia

Цель – изучить влияние препарата на основе этидронатов ионов лантаноидов и кальция на процесс остеорегенерации на модели дефекта большеберцовой кости в эксперименте.

Методы. Экспериментальной моделью явились 36 кроликов, которым моделировали повреждение большеберцовой кости с последующим введением на 3-и и 5-е сутки в сформированный дефект препарата на основе ионов лантаноида и кальция в дозе 0,2 мл в основной группе (n = 18) и без такового – в группе сравнения (n = 18). Рентгенометрический и морфологический анализы костных тканей, заполнявших перфоративное отверстие, проводили на первой, четвертой и восьмой неделях эксперимента. Для количественной оценки площадей изучаемых структур применялся морфометрический метод. Для определения механизма действия препарата была проведена качественная оценка остеобластной активности с использованием клеточной линии MC3T3-E1 Subclone 4 (ATCC® CRL-2593™).

Результаты. Изучаемый препарат стимулировал процесс заживления костного дефекта уже на 7-е сутки эксперимента, что выражалось в уменьшении площади перфоративного отверстия и объема лейкоцитарно-некротических масс. На четвертой неделе это привело к закрытию дефекта грубоволокнистой костью. На финишных сроках наблюдения в области травмы визуализировалась сформированная пластинчатая кость. Авторами установлено, что исследуемое соединение индуцирует остеобластную активность клеток.

Вывод. Применение препарата на основе этидронатов лантаноидов и кальция эффективно на ранних сроках заживления небольших костных дефектов.

Ключевые слова: дефекты костной ткани; репаративная остеорегенерация; стимуляция.

Objective – to study the effect of the agent based on ion lanthanide etidronate and calcium on the process of osteoregeneration in the experimental model of the tibial defect.

Methods. The experiment included 36 rabbits with the experimental tibial damages and subsequent introduction (on the days 3 and 5) of the agent based on ion lanthanide etidronate and calcium with the dosage of 0.2 ml in the main group (n = 18) and without it in the comparison group (n = 18). The roentgen metric and morphological analyzes of the bone tissues, which filled the perforative hole, were performed on weeks 1, 4 and 8 of the experiment. A morphometric method was used in order to quantify the areas of the studied structures. A qualitative assessment of osteoblastic activity was carried out using the cell line MC3T3-E1, Subclone 4 (ATCC® CRL-2593™) in order to determine the mechanism of action of the drug.

Results. The studied agent stimulated the healing process of the bone defect already on the day 7 of the experiment that consisted in a decrease of the area of the perforative hole and the volume of leukocyte-necrotic masses. On the fourth week, it caused the closure of the defect by the membrane reticulated bone. At the end of the experiment, in the area of experimentally induced of trauma, the formed lamellar bone could be visualized. The authors found that the tested compound induced the osteoblastic cell activity.

Conclusion. The use of the drug based on lanthanide etidronate and calcium is effective in the early stages of healing of small bone defects.

Keywords: defects of bone tissue; reparative osteoregeneration; stimulation.

Закрытие дефектов и поврежденной костной ткани является достаточно длительным многостадийным процессом. Поиск соединений, стимулирующих остеогенез, является актуальной задачей современной травматологии и ортопедии. Значительный прогресс, достигнутый при использовании остеоиндукторов и остеокондукторов для восстановления костных дефектов, не подвел финишную черту в решении столь сложной проблемы [1-4]. Комплексные соединения, содержащие ряд минеральных компонентов, такие как органические стимуляторы функции остеобластов, являются перспективными средствами активации костной репарации. В этой связи для лечения переломов костей следует отметить новый запатентованный препарат из группы безазотистых бисфосфонатов (этидронат), в состав которого входят лантанид-ионы и ионы кальция [5]. Сам этидронат представляет собой двунатриевую соль 1-гидроксиэтилидендифосфоновой кислоты, являющийся производным этидроновой кислоты.

1-Гидроксиэтилидендифосфоновая кислота (H4L) относится к классу бисфосфонатов и находит применение в медицине для предупреждения чрезмерного выхода кальция из костей, патологической кальцификации мягких тканей. Благодаря высокому сродству к фосфатам при добавлении комплексов ионов лантаноидов к гидроксиапатитам, образующим основу костной ткани, они прочно связываются с минералами, не нарушая структуру гидроксиапатитов. Лантаноиды подавляют развитие клеток (остеокластов), отвечающих за резорбцию костной ткани. Эта способность ионов лантаноидов подражать функциям ионов кальция позволяет не только моделировать поведение последних с помощью ионов лантаноидов, но и реально использовать лантаноиды в качестве компонентов для терапии заболеваний костной ткани.

Считается, что гадолиний (III) является «парамагнитным зондом», моделирующим поведение кальция в биосистемах в отсутствие и в присутствии 1-гидроксиэтилидендифосфоновой кислоты, регули-

рующей кальциевый метаболизм; важно сопоставление поведения этих ионов, выявление сходства и различия в химизме (стехиометрии и устойчивости) комплексобразования с 1-гидроксиэтилидендифосфоновой кислотой. Рабочее неофициальное название препарата — «Инрок».

В первичных публикациях отмечалась его потенциальная возможность влиять на репаративные процессы костной ткани [6, 7].

Цель исследования — изучить влияние препарата на основе этидроната ионов лантаноидов и кальция на процесс остеорегенерации на модели дефекта большеберцовой кости в эксперименте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве экспериментальной разработки для исследований был использован препарат следующего химического состава с соотношением ингредиентов, г/л:

- Этидроновой кислоты моногидрат — 1,8
- Кальция хлорида дигидрат — 1,44
- Гадолиния (III) нитрата гексагидрат — 0,30
- Диспрозия (III) хлорида гексагидрат — 0,038
- Вода для инъекций
- pH раствора 7,3-7,8

Описание. Препарат представляет водную суспензию белого с перламутровым оттенком цвета.

Исследования проведены на 36 кроликах в возрасте 6-10 месяцев с массой тела 2500-2800 гр. Для опыта использовались животные, содержащиеся в условиях вивария. Содержание и уход животных для эксперимента соответствовали требованиям ГОСТ ИСО 10993 (Р). Для изучения репаративного остеогенеза у животных использована экспериментальная модель несквозного дефекта в медиальной поверхности проксимального отдела большеберцовой кости [8] с применением нейролептаналгезии (Rometar 2 %: 0,15-0,2 мл/кг; Zoletil 100: 10-15 мг/кг). Оперативный доступ осуществляли на два см ниже бедро-берцового сочленения. Сверлом формировалось

отверстие в одном кортикальном слое диаметром 3 мм. Рану ушивали прерывисто-узловатыми швами.

На проведение эксперимента получено разрешение Республиканского этического комитета при ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет Минздрава России (протокол заседания № 9 от 25 ноября 2014 г.).

В ходе исследования препарат вводился в смоделированный дефект большеберцовой кости кролика на третьи и пятые сутки после операции в дозе 0,2 мл животным опытной группы (n = 18). В группе сравнения (n = 18) препарат не вводился.

Рентгенографические исследования для изучения динамики изменений и степени выраженности репаративного остеогенеза в зоне дефекта проводили в конце первой, четвертой и восьмой недель эксперимента с использованием рентгеновского аппарата 9Л5У2*. Время экспозиции 0,1 сек на расстоянии 70 см при мощности тока 20 мА. На этих же сроках был проведен морфологический анализ ткани, заполнявшей перфоративное отверстие, и костных краев дефекта. Гистологический материал фиксировали в 10% нейтральном формалине, в последующем декальцинировали по известной методике [7, 9], обезживали и заливали в парафин. Изготавливали гистологические срезы толщиной 5-7 мкм на микротоме «Leica SM 2000R», которые окрашивали гематоксилином-эозином и пикрофуксином по ван Гизону. Морфометрический метод использован для количественной оценки площадей изучаемых структур [10]. Расчет производился в % к общей площади гистологического среза [11].

Статистическая обработка проводилась с использованием пакета программ SPSS (v.13.0). Нормальность распределения показателей оценивалась с помощью критерия Колмогорова—Смирнова. Для сравнения показателей двух групп использовался критерий Стьюдента. При сравнении показателей трех и более групп применялся дисперсионный анализ. Последующее межгрупповое сравнение проводилось с использованием критерия

Стьюдента с поправкой Бонферрони. Отличия полагались статистически значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое значение, m – стандартная ошибка среднего.

Параллельно с рентген-, морфометрическим анализами для определения механизма действия препарата была проведена оценка остеобластной активности с использованием клеточной линии MC3T3-E1 Subclone 4 (ATCC® CRL-2593™). В качестве контроля был использован раствор мелатонина в концентрации 50 нМ/л. Качественная оценка исследуемого соединения проводилась согласно общепринятому протоколу с использованием коммерческого набора In Vitro Osteogenesis Assay Kit (Millipore, США) (Cat. ECM810). Культивирование клеточной линии MC3T3-E1 производили в полной культуральной среде alpha-MEM (Gibco, США) до достижения клетками конfluence с последующим пассированием в 24-луночные плоскодонные планшеты (Corning, США). Подсчет клеток в суспензии осуществляли на автоматическом счетчике клеток TC-20 (BioRad, США). Изучение остеобластной активности исследуемого препарата *in vitro* проводили общепринятым методом с использованием коммерческого набора In Vitro Osteogenesis Assay Kit (Millipore, USA) и клеточной линии MC3T3-E1, полученной из американского банка клеточных культур ATCC. Набор и вышеуказанная клеточная линия на протяжении многих лет используются для оценки остеобластной активности исследуемых веществ *in vitro*. Мелатонин входил в данный набор и был нами использован (согласно протоколу) в качестве положительного контроля, то есть индуктора остеобластной активности у исследуемой клеточной линии. То есть были культуры клеток, инкубированные с различными концентрациями исследуемого соединения, а также культуры клеток, инкубированные с мелатонином (положительный контроль) и без внесения каких-либо веществ (отрицательный контроль).

Нами было показано, что остеобластная активность изучаемого соединения в концентрациях 500 мкМ и 1 мМ превышала показатели положительного контроля. Более того, для исследуемого соединения был показан четкий дозо-зависимый эффект, свидетельствующий об индукции остеобластной активности. На основании вышеизложенного был сделан вывод о том, что одним из возможных молекулярных механизмов действия исследуемого соединения является его способность повышать активность остеобластов в местах повреждения.

По достижению клетками конfluence полную питательную среду на основе Alpha Minimum Essential Medium заменяли на среду Osteogenesis Induction Medium. После шестидневного периода культивирования клеток линии MC3T3-E1 осуществляли замену культуральной среды в лунках на среду Osteogenesis Induction Medium с раствором исследуемого соединения, который вносили в культуральную среду в концентрациях 1, 10, 100, 250, 500 и 1000 мкМ. После истечения шестидневного периода культивирования проводили качественную реакцию на предмет определения остеобластной активности с использованием красителя ализарина. По завершении инкубации лунки четырежды промывали дистиллированной водой и производили световую микроскопию.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кролики адекватно переносили общее обезболивание и оперативное вмешательство. Через полчаса после операции у них восстанавливалась двигательная активность; через пять часов животные принимали пищу. Послеоперационные раны зажили в каждом конкретном случае первичным натяжением. Инфицирования ран, аллергических реакций и других осложнений у животных не наблюдалось.

Рентгенологически в обеих группах лабораторных животных визуализировались перфоративные отверстия в верхних отделах большеберцовых костей с четкими ровными краями (рис. 1а).

При микроскопическом анализе на этот период эксперимента у животных опытной группы незаполнение площади дефекта составило $15,9 \pm 1,4 \%$ ($p = 0,003$). Травматический отек на данном этапе либо отсутствовал, либо был выражен незначительно. Сосуды были расширены, полнокровны. Находящиеся в зоне дефекта свертки крови подвергались организации. В каждом наблюдении на фоне организации гематомы имелась сформированная грануляционная ткань, площадь которой (по сравнению с группой сравнения $53,6 \pm$

Рисунок 1
Рентгенограмма и микрофотография (x400) зоны дефекта животного опытной группы на сроке 7 дней после операции: а) перфоративное отверстие большеберцовой кости; б) грануляционная ткань. Остеобласты указаны стрелками. Окраска гематоксилином и эозином.

Figure 1
The X-ray image and photomicrography (x400) of the defect in the animal of the experimental group 7 days after surgery: а) a perforative hole of the shin bone; б) granulation tissue. The osteoblasts are marked with the arrows. Hematoxylin and eosine staining.



3,1 %) составляла до $70,6 \pm 1,1$ % ($p = 0,002$) (рис. 1b). Визуализировались остеобласты наряду со вновь образованными сосудами и мезенхимальными клеточными элементами. Воспалительная реакция была лишь в отдельных наблюдениях, где сохранялась незначительная макрофагальная инфильтрация. В двух наблюдениях опытной группы встречались незначительные лейкоцитарно-некротические массы – $5,5 \pm 0,8$ % ($p = 0,001$), занимавшие меньшую площадь, чем в группе сравнения ($14,6 \pm 1,4$ %).

У животных группы сравнения площадь незаполнения перфоративного отверстия составила $27,6 \pm 2,1$ %. Морфологически видимы были остаточные явления реактивных процессов (экссудативного воспаления) как последствия травмы. В той или иной степени присутствовала инфильтрация полиморфно-ядерными лейкоцитами, которая сменялась макрофагальной.

В ряде случаев у животных групп сравнения по краю дефекта кости имели место некротические изменения с наличием запусев-

ших полостей остеоцитов и очагов обызвествления. В целом лейкоцитарно-некротические массы занимали $14,6 \pm 1,4$ % от площади среза. В большинстве случаев начинался процесс регенерации с пролиферацией кровеносных сосудов и миграцией фибробластов, которые при этом располагались между сосудистыми петлями, то есть формировалась грануляционная ткань, площадь которой составила не более $53,6 \pm 3,1$ % (табл.). В одном случае воспалительный процесс присутствовал с наличием

Таблица
Площади структурных компонентов, заполняющих перфоративное отверстие на разных сроках эксперимента (в % от общей площади гистологического среза, $M \pm m$)

Table
The squares of structural components filling up the perforative hole at different time points of the experiment (the percent of total square of histological section, $M \pm m$)

	7-е сутки 7th day		14-е сутки 14th day		28-е сутки 28th day		56-е сутки 56th day	
	Группа сравнения Comparison group (n = 4)	Опытная группа Experimental group (n = 4)						
Незаполненное перфоративное отверстие Non-filled perforative hole	27.6 ± 2.1	$15.9 \pm 1.4^*$	10.4 ± 0.7	$1.5 \pm 0.7^*$	-	-	-	-
Лейкоцитарно- некротические массы, сгустки крови Leukocytic-necrotic masses and blood clots	14.6 ± 1.4	$5.5 \pm 0.8^*$	2.2 ± 0.6	0.6 ± 0.6	-	-	-	-
Грануляционная ткань Granulation tissue	53.6 ± 3.1	$70.6 \pm 1.1^*$	17.2 ± 2.1	$6.7 \pm 1.1^*$	1.5 ± 0.3	$0.4 \pm 0.2^*$	-	-
Соединительная ткань Connective tissue	4.1 ± 1.2	8.0 ± 0.9	48.2 ± 0.6	$68.0 \pm 2.5^*$	7.3 ± 1.1	3.6 ± 0.6	-	-
Хрящевая ткань Cartilaginous tissue	-	-	16.1 ± 1.5	$5.1 \pm 1.3^*$	4.0 ± 0.9	0.6 ± 0.1	4.2 ± 0.2	0.4 ± 0.2
Грубоволокнистая кость балочного строения Membrane reticulated bone of beam structure	-	-	6.0 ± 1.0	$18.2 \pm 0.6^*$	86.0 ± 1.9	92.2 ± 0.9	7.1 ± 0.4	0.8 ± 0.1
Пластинчатая кость Lamellar bone	-	-	-	-	1.2 ± 0.3	$3.2 \pm 0.4^*$	88.7 ± 0.6	$98.8 \pm 0.2^*$

Примечание: * – статистически значимые отличия показателей между группами.

Note: * – statistically significant differences in values between the groups.

обширных лейкоцитарно-некротических масс. Признаки репарации при этом отсутствовали.

К концу второй недели эксперимента площадь перфоративного дефекта у животных группы сравнения уменьшилась в 2,65 раза. В каждом наблюдении, где на предыдущем этапе сформировалась грануляционная ткань, произошло разрастание коллагеновых волокон и начался процесс остеогенеза. На фоне гомогенизации коллагена образовывались костные балки, пространство между которыми заполняла рыхлая волокнистая соединительная ткань. Между отдельными костными балками появлялись поперечные перемычки. Обнаруживались пролиферирующие остеобласты. Соединительная ткань заняла в общей сложности площадь $48,2 \pm 0,6$ %. Некротические массы, в том числе и в костной ткани, практически полностью рассосались.

По краям дефекта в гаверсовы каналы вросли кровеносные сосуды. Вместе с тем в ряде наблюдений костеобразование происходило через образование хрящевой ткани, которая была представлена либо в виде островков, либо – обширных участков среди соединительнотканых структур. Площадь хряща на данном сроке составила $16,1 \pm 1,5$ %. У двух кроликов воспалительные процессы сохранились с клеточной инфильтрацией и очаговыми некрозами ткани, но площадь их была незначительна ($2,2 \pm 0,6$ %). В одном случае некротические изменения наблюдались в прилежащих параоссальных тканях.

В основной группе на этом же сроке происходило снижение грануляционной ткани и увеличение объема соединительной соответственно до $6,7 \pm 1,1$ % ($p = 0,004$) и $68,0 \pm 2,5$ % ($p < 0,001$). В трех случаях наблюдалось формирование грубоволокнистой ткани, балки которой были связаны с костной тканью краев дефекта. Площадь грубоволокнистой костной ткани составляла $18,2 \pm 0,6$ % ($p < 0,001$). Дефект к этому времени был практически полностью закрыт и имел площадь всего $1,5 \pm 0,7$ % ($p < 0,001$). Образование хряща было минимальным и не превышало $5,1 \pm 1,3$ % ($p = 0,001$). Воспа-

лительная реакция либо отсутствовала, либо была минимальна на фоне репаративных процессов.

В большинстве наблюдений на конец четвертой недели эксперимента костный дефект большеберцовой кости был полностью закрыт. У животных группы сравнения имелась сформированная грубоволокнистая кость, площадь которой составляла $86,0 \pm 1,9$ %. По краям бывшего отверстия трабекулы частично резорбировались и началась перестройка кости в пластинчатую, объем которой был еще незначителен ($1,2 \pm 0,3$ %). В случаях, когда в процессе заживления дефекта образовывалась хрящевая ткань, на данном этапе происходило ее рассасывание, обызвествление и замещение костной тканью. Признаки воспалительной реакции не наблюдались. При этом в отдельных случаях имело место закрытие дефекта с наличием по краям хрящевой ткани (без явления оссификации), а в центре присутствовала незрелая грубоволокнистая кость.

У животных опытной группы на этом сроке наблюдений перфоративное отверстие было замещено грубоволокнистой костью ($92,2 \pm 0,9$ %) с диффузным обызвествлением балок, которая в 2,66 раза чаще, чем в группе сравнения, трансформировалась в пластинчатую (рис. 2б). Хрящевая ткань была сведена до минимума ($0,6 \pm 0,1$ %).

Рентгенологически у животных обеих групп визуально определялся костный дефект с неравномерной по ширине зоной склероза (1-2 мм) и локальным гиперостозом. У животных группы сравнения края отверстия были, как правило, с нечеткими внутренними контурами. В опытной группе наблюдались незначительные признаки перистальной реакции на уровне краев дефекта (рис. 2а).

В конце эксперимента (восьмая неделя наблюдений) у большинства животных группы сравнения была сформирована пластинчатая кость, занимавшая $88,7 \pm 0,6$ % от площади среза. Однако в отдельных случаях сохранялись фрагменты грубоволокнистой кости ($7,1 \pm 0,4$ %), участки рассасывания хрящевой ткани с явлениями оссификации, а также наличие очагов некроза и де-

струкции как хряща, так и кости. В целом хрящевая ткань сохранялась лишь на $4,2 \pm 0,2$ % площади перфоративного отверстия.

На этом сроке у кроликов опытной группы, в отличие от животных группы сравнения, констатировано полное неосложненное заживление костного дефекта. На месте перфоративного отверстия была сформирована пластинчатая кость на площади до $98,8 \pm 0,2$ % ($p < 0,001$) с развитой системой гаверсовых каналов и восстановленными окружающими параоссальными тканями.

Рентгенологически на этом сроке эксперимента не определялось полного возмещения костного дефекта

Рисунок 2
Рентгенограмма и микрофотография (x400) зоны дефекта животного основной группы на сроке 28 дней после операции: а) перфоративное отверстие большеберцовой кости; б) трансформация хрящевой ткани в грубоволокнистую кость. Окраска гематоксилином и эозином.

Figure 2
The X-ray image and photomicrography (x400) of the defect in the animal of the main group 28 days after surgery: a) a perforative hole of the shin bone; b) transformation of cartilaginous tissue into a rough fibrous bone. Hematoxylin and eosine staining.



у животных обеих групп. Контуры отверстия были нечеткие с неравномерной по ширине зоной склероза от 1,5-3 мм и локальным гиперостозом на протяжении 0,5 мм. Таким образом, объективная дешифровка рентгенограмм не выявила существенных отличий между животными группы сравнения и опытной группы.

ВЫВОДЫ:

1. Дозированное применение препарата, содержащего этидронаты ионов лантаноидов и кальция, эффективно уже на ранних сроках заживления небольших костных дефектов. Особенностью действия препарата (или его специфичностью) является комплексное действие в виде: 1) снижения интенсивности воспаления; 2) ускорения репарации;

3) влияния на остеогенез, который в подавляющем большинстве случаев прямой.

2. Эффективность данного соединения может быть основана на усилении остеобластной активности клеточных элементов в области повреждения.

3. Научная новизна исследований заключается в том, что впервые получены сведения о применении инъекционной формы препарата на основе этидронатов ионов лантанида и кальция, обладающего остеоиндукционными свойствами. На основании комплексного подхода выявлено, что введение препарата не вызывает острых воспалительных явлений в тканях в зоне введения. При проведении морфометрических (морфологических) исследований доказано, что в первые 7 суток по-

сле инициации дефекта у животных опытной группы происходит формирование грануляционной ткани с последующим образованием ретикулофиброзной и пластинчатой кости.

4. На основании полученных данных о специфической активности препарата, содержащего ионы лантаноидов и кальция на модели частичного повреждения кости можно сделать вывод о возможной перспективе его клинического использования.

Информация о финансировании и конфликте интересов

Исследование не имело спонсорской поддержки.

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES:

1. Pakht AV, Manizer NM. The features of bone tissue preparation. *Library by Anatomical Pathologist: scientific practical journal*. 2008; 89: 6-11. Russian (Пахт А.В., Манизер Н.М. Особенности обработки костной ткани //Библиотека патологоанатома: научно-практический журнал. 2008. Вып. 89. С. 6-11.)
2. Talashova IA, Osipova NA, Kononovich NA. The comparative quantitative estimation of the reparative process during implantation of biocomposite materials into bone defects. *Genius of Orthopedics*. 2012; 2: 68. Russian (Талашова И.А., Осипова Н.А., Кононович Н.А. Сравнительная количественная оценка репаративного процесса при имплантации биокomпозиционных материалов в костные дефекты //Гений ортопедии. 2012. № 2. С. 68.)
3. Tsyplakov DE, Izosimova AE, Shakirova FV, Akhtyamov IF, Gatina EB. Morphometric substantiation of osteosynthesis with implants coated with titanium nitrides and hafnium. *Kazan Medical Journal*. 2016; 4: 585-591. Russian (Цыплаков Д.Э., Изосимова А.Э., Шакирова Ф.В., Ахтямов И.Ф., Гатина Э.Б. Морфометрическое обоснование остеосинтеза с использованием имплантатов с покрытием нитридами титана и гафния //Казанский медицинский журнал. 2016. № 4. С. 585-591.)
4. Kabirov G, Shakirova F, Manirambona JC, Akhtyamov I, Gatina E, Tsiplakov D. Morphological studies of local influence of implants with coatings based on superhard compounds on bone tissue under conditions of induced trauma. *J. Fac. Vet. Med. Istanbul Univ*. 2015; 41(2): 177-184.
5. Devyatov FV, Kholmogortsev EG. A method of bone tissue regeneration in the experiment: the patent No.2248210C1/ No.2003120703/14; 07.07.2003. Russian (Девятков Ф.В., Холмогорцев Е.Г. Способ регенерации костной ткани в эксперименте: патент № 2248210C1/ № 2003120703/14; 07.07.2003.)
6. Zhitlova EA, Shakirova FV. The quantitative staged estimation of bone regenerate in the region of induced trauma during introduction of the diphosphate-based agent. *Ippology and Veterinary*. 2016; 3(21): 43-48. Russian (Житлова Е.А., Шакирова Ф.В. Количественная этапная оценка костного регенерата в зоне индуцированной травмы при введении препарата на основе дисфосфатов //Иппология и ветеринария. 2016. № 3(21). С. 43-48.)
7. Zhitlova EA, Tsyplakov DE, Shakirova FV. The quantitative estimation of the reparative process during introduction of lantanoid etidronate and calcium-based agent into the bone defect. *Morphology*. 2016; 3: 82-83. Russian (Житлова Е.А., Цыплаков Д.Э., Шакирова Ф.В. Количественная оценка репаративного процесса при введении в костный дефект препарата на основе этидронатов лантаноидов и кальция //Морфология. 2016. № 3. С. 82-83.)
8. Korzhevskiy DE. The summary of the foundations of histological technique for physicians and histological laboratory technicians. St. Petersburg: Krof, 2005. 48 p. Russian (Коржевский Д.Э. Краткое изложение основ гистологической техники для врачей и лаборантов-гистологов. СПб: Кроф, 2005. 48 с.)
9. Netylko GI, Rumakin VP, Konev VA. The experimental modelling of the bone defect with sclerotic wall. *Genius of Orthopedics*. 2014; 3: 72. Russian (Нетьлько Г.И., Румакин В.П., Конев В.А. Экспериментальное моделирование костного дефекта со склерозированной стенкой //Гений ортопедии. 2014. № 3. С. 72.)
10. Avtandilov GG. Medical morphometry. M.: Medicine, 1990. 384 p. Russian (Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М.: Медицина, 1990. 384 с.)
11. Belyanin VL, Zyplakov DE. Morphometric analysis. Diagnostics of reactive hyperplasia of lymphatic vessels. St. Petersburg; Kazan, 1999. P. 56-58. Russian (Белянин В.Л., Цыплаков Д.Э. Морфометрический анализ. Диагностика реактивных гиперплазий лимфатических узлов. СПб.; Казань, 1999. С. 56-58.)

Сведения об авторах:

Ахтямов И.Ф., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой травматологии, ортопедии и хирургии экстремальных состояний, ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет», г. Казань, Россия.

Житлова Е.А., аспирант кафедры ветеринарной хирургии, ФГБОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины», г. Казань, Россия.

Цыплаков Д.Э., д.м.н., профессор кафедры патологической анатомии, ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет», г. Казань, Россия.

Бойчук С.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой общей патологии, ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет», г. Казань, Россия.

Шакирова Ф.В., д-р ветеринар. наук, профессор кафедры ветеринарной хирургии, ФГБОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины», г. Казань, Россия.

Коробейникова Д.А., аспирант кафедры ветеринарной хирургии, ФГБОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины», г. Казань, Россия.

Адрес для переписки:

Ахтямов И.Ф., КГМУ, Бултерова, 49, г. Казань, Россия, 420012
Тел: +7 (905) 315-01-50
E-mail: yalta60@mail.ru

Information about authors:

Akhtyamov I.F., MD, PhD, professor, chief of chair of traumatology, orthopedics and surgery of critical states, Kazan State Medical University, Kazan, Russia.

Zhitlova E.A., postgraduate of veterinary surgery chair, Kazan State Academy of Veterinary Medicine, Kazan, Russia.

Tsyplakov D.E., MD, PhD, professor of pathologic anatomy chair, Kazan State Medical University, Kazan, Russia.

Boichuk S.V., MD, PhD, professor, chief of general pathology chair, Kazan State Medical University, Kazan, Russia.

Shakirova F.V., doctor of veterinary sciences, professor of veterinary surgery chair, Kazan State Academy of Veterinary Medicine, Kazan, Russia.

Korobeynikova D.A., postgraduate of veterinary surgery chair, Kazan State Academy of Veterinary Medicine, Kazan, Russia.

Address for correspondence:

Akhtyamov I.F., Butlerova St., 49, Kazan, Russia, 420012
Kazan State Medical University
Tel: +7 (905) 315-01-50
E-mail: yalta60@mail.ru

