

REFERENCES

1. Efimov Yu. V., Mukhaev Kh. Kh., Stomatov A. V. i dr. The innovative techniques at the surgical treatment of chronic periodontitis. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2010;11:55-58.
2. Anitua E., Andia I., Ardanza B. et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb. Haemost.* 2004;91:4-15.
3. Prosyannikova N. V., Lipova E. V., Pokrovskiy K. A. Prosyannikova N.V. The effectiveness of treatment of long-nonhealing wounds and sores of skin with the applicative and injective introduction of autologous, rich in thrombocytes plasma. *Kremlevskaya meditsina. Klinicheskiy vestnik*. 2014; 3:81-84.
4. El-Sharkawy H., Kantarci A., Deady J. et al. Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. *J. Periodontol.* 2007;78:661-669.
5. Anusaksathien O., Jin Q., Zhao M. et al. Effect of sustained gene delivery of platelet-derived growth factor or its antagonist (PDGF-1308) on tissue engineered cementum. *J. Periodontol.* 2004;75:429-440.
6. Nikulina O. M. Primenenie obogashchennoy trombocitami plazmy, s osteoplasticheskim materialom, v kompleksnom lechenii parodontita (eksperimental'no-klinicheskoe issledovanie) [The use of the enriched with thrombocytes plasma with osteoplastic material in the complex treatment of periodontitis (the experimental-clinical study)]. : Abstract of a candidate's thesis of medical sciences. *Moskva*, 2010:24.
7. Pavlenko A. V., Bugorkova I. A. The use of osteoplastic materials and enriched with thrombocytes plasma for the raising of the effectiveness of flap surgeries at treatment of generalized periodontitis. *Sovremennaya stomatologiya*. 2006;3:45-48.
8. Marx R. E. Platelet-rich plasma (PRP): Wat is PRP and what is not PRP? *Implant. Dent.* 2001;4(10):225-228.
9. Beloklitskaya G. F., Kopchak O. V. The estimation of the clinical effectiveness of the use of injective form of rich with thrombocytes autoplasm in the complex treatment of generalized periodontitis. *Sovremennaya stomatologiya*. 2014;4:38-41.
10. Makhmutova A. F., Nasibullin A. M., Akhmerov R. R. i dr. The results of the complex treatment of periodontal diseases with rich in thrombocytes autoplasm. *Vestnik RUDN (Rossiyskogo universiteta družby narodov)*. – Seriya: Meditsina. 2008;2: 5-10.
11. Kozlyanina N. P. Fiziologicheskaya antioksidantnaya sistema desny i kosti al'veolyarnogo otrostka v norme i pri patologii: [The physiological antioxidant system of gum and bone of alveolar appendix in norm and pathology]. Dissertation of candidate of biological sciences. *Odessa*, 1989:204.
12. Sukmanskii O. I., Makarenko O. A. The experimental simulation of generalized periodontitis. *Visnyk stomatologii*. 2006;2:2-3.
13. Visser L., Blaut E. R. The use of p-nitrophenyl-N-tert-butyl-oxycarbonyl- α -alaninate as substrate for elastase. *Biochem. Biophys. Acta*. 1972;1(268):275-280
14. Koroljuk M. A., Yvanova L. Y., Majorova N. T., Tokarev V. E. The method of estimation of activity of catalase. *Laboratornoye delo*. 1988;1:16-18.
15. Stal'naja Y. D., Garyshvily T. G. Metod opredeleniya malonovogo dial'degida s pomoshch'yu tiobarbiturovoy kisloty [The method of determination of malonic dialdehyde with thiobarbituric acid]. *Sovremennyye metody v biokhymii*. Moskva.: Medycyna. 1977:66-68.
16. Asatyany V. S. Novyye metody biokhimicheskoy fotometrii [The new methods of biochemical photometry]. Moskva.: Nauka. 1965: 298.
17. Goryachkovskiy A. M. Klinicheskaya biokhimiya [The clinical biochemistry]. Odess: «Astroprint», 1998:245-247.

УДК 611.715.28:611.08+616.314.17-008.1

Ю. Г. Чумакова, д. мед. н., Т. В. Николаенко

Государственное учреждение «Институт стоматологии
Национальной академии медицинских наук Украины»

ВЛИЯНИЕ ГЕЛЯ, СОДЕРЖАЩЕГО 0,2 % ГИАЛУРОНОВУЮ КИСЛОТУ, НА ПРОЦЕСС РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ ЧЕЛЮСТЕЙ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАРОДОНТИТЕ

По результатам биохимических исследований установлено, что применение геля, содержащего 0,2 % гиалуроновую кислоту, в виде ежедневных аппликаций на десну у крыс с экспериментальным пародонтизом вызывает активный процесс ремоделирования костной ткани, о чем свидетельствует достоверное повышение активности щелочной фосфатазы (маркер остеобластов, $p < 0,001$) и кислой фосфатазы (маркер остеокластов, $p < 0,01$). На гистоморфологических препаратах челюстей видны участки активного ремоделирования кости (остеокласты и остеобласты) и участки вновь образованной костной ткани.
Ключевые слова: экспериментальный пародонтит, крысы, гиалуроновая кислота, ремоделирование кости, остеокласты, остеобласты

Ю. Г. Чумакова, Т. В. Николаенко

Державна установа «Інститут стоматології
Національної академії медичних наук України»

ВПЛИВ ГЕЛЮ, ЩО МІСТИТЬ 0,2 % ГІАЛУРОНОВУ КИСЛОТУ, НА ПРОЦЕС РЕ- МОДЕЛЮВАННЯ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ ЩЕЛПІ ЩУРІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО- МУ ПАРОДОНТИТІ

За результатами біохімічних досліджень встановлено, що застосування гелю, що містить 0,2 % гіалуронову кислоту, у вигляді щоденних аппликацій на ясна у щурів з експериментальним пародонтизом викликає активний процес ремоделивання кісткової тканини, про що свідчить достовірне підвищення активності лужної фосфатази (маркер остеобластів, $p < 0,001$) і кислій фосфатази (маркер остеокластів, $p < 0,01$). На гистоморфологічних препаратах щелеп видно ділянки активного ремоделивання кістки (остеокласти та остеобласти) і ділянки новоутвореної кісткової тканини.

Ключові слова: експериментальний пародонтит, щури, гіалуронові кислота, ремоделивання кістки, остеокласти, остеобласти

Y. G. Chumakova, T. V. Nikolaenko

State Establishment “The Institute of Stomatology
of the National academy of medical science of Ukraine”

INFLUENCE OF AN 0,2 % HYALURONIC ACID GEL ON PROCESS OF ALVEOLAR BONE REMODELING IN RATS WITH EXPERIMENTAL PERIODONTITIS

ABSTRACT

The aim of the present study is to evaluate the efficacy of an hyaluronic acid (HA) gel on periodontal tissues in rats.

Material and Methods. The study was conducted on 32 white Wistar rats. The animals were divided into three groups: 1 - intact rats; 2 - rats with a “peroxide” model of periodontitis,

which was reproduced by the addition to the diet of overoxidized sunflower oil, daily for 60 days (model); 3 - rats with a "peroxide" model and local application of an 0,2% HA-gel on gingiva, daily for 10 days. Activity of alkaline phosphatase (ALP) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in the alveolar bone were measured by biochemical method. Histologic researches of periodontal tissues were conducted.

Results. The activity of ALP ($p<0.001$) and TRAP ($p<0.05$) in the alveolar bone significantly increased in treatment group (HA-gel). It indicates activation of process of remodeling of a bone tissue under the influence of HA-gel. Sites of new alveolar bone formation and many "active" osteoblasts was histologically observed in tissues sections in rats of treatment group.

Conclusion. The present results indicate that the local application of an 0,2 % hyaluronic acid gel on gingiva in rats renders osteoinductive effect.

Keywords: experimental periodontitis, rats, hyaluronic acid, bone remodelling, osteoclasts, osteoblasts.

Среди биорегуляторных веществ, которые участвуют в регенерации тканей пародонта, выделяют гиалуроновую кислоту [1].

Гиалуроновая кислота является несulfатированным гликозаминогликаном и относится к гетерополисахаридам. Она обнаруживается главным образом во внеклеточном матриксе и является структурообразующим материалом соединительной ткани. Экзогенная гиалуроновая кислота увеличивает синтез протеогликанов, снижает продукцию провоспалительных медиаторов и матриксных металлопротеиназ, влияет на функцию иммуно-компетентных клеток [2]. Установлена роль гиалуроновой кислоты в формировании кристаллов гидроксиапатита и выявлены другие остеотропные эффекты [3, 4]. Представленные свойства гиалуроновой кислоты позволяют использовать ее в тканевой биоинженерии, в том числе в пародонтологии и имплантологии [5-7].

Представлены единичные публикации о клинической эффективности местного (в виде аппликаций) применения препаратов гиалуроновой кислоты при заболеваниях пародонта [8-11]. Поэтому актуальными являются экспериментальные исследования на животных для дальнейшего уточнения механизма действия гиалуроновой кислоты на ткани пародонта.

Цель работы. Исследовать в эксперименте, на модели пародонтита у крыс, остеотропные эффекты геля Генгигель, содержащего 0,2 % гиалуроновую кислоту.

Материал и методы. В эксперименте использовано 32 белые крысы линии Вистар стадного разведения, 4-х месячного возраста, обоего пола, массой 350-450 г., которые были поделены на 3 группы.

Первую группу составили интактные крысы ($n=10$, 5 самцов и 5 самок), которые находились на стандартном рационе вивария. Крысам второй группы моделировали пародонтит путем введения в рацион питания перекисленного подсолнечного масла в течение 2-х месяцев («перекисная» модель, $n=10$, 5 самцов и 5 самок) [12]. Крысам третьей (опытной) группы после моделирования пародонтита, ежедневно, в течение 10 дней, проводили аппликации на десну геля Генгигель (Ricerfarma s.r.l., Италия), содержащего 0,2 % гиалуроновую кислоту ($n=12$, 6 самцов и 6 самок).

Животных выводили из эксперимента под тио-

пенталовым наркозом (20 мг/кг) путем тотального кровопускания из сердца и выделяли челюсти для дальнейших биохимических и морфологических исследований. Биохимическими методами в гомогенатах альвеолярной кости (75 мг/мл 0,1М цитратного буфера, pH 6,1) определяли активность щелочной (ЩФ) и кислой (КФ) фосфатаз [13] и содержание кальция и неорганического фосфата [14]. Для морфологического исследования челюсти фиксировали в 10 % нейтральном формалине. Проводили стандартную обработку ткани для заливки в парафин, готовили срезы, окрашивали их гематоксилином и эозином и изучали под микроскопом с увеличением $\times 40$ [15].

Результаты исследования. Проведенные исследования показали (табл. 1), что длительное моделирование пародонтита вызывает у крыс замедление темпа формирования кости, о чем свидетельствует достоверное снижение активности костной ЩФ – биохимического маркера активности остеобластов (с $69,41\pm 2,90$ мккат/кг у интактных крыс до $42,56\pm 3,96$ мккат/кг в группе «модель пародонтита», $p<0,001$). Это происходит на фоне усиления остеокластической резорбции костной ткани, на что указывает тенденция к повышению активности КФ – биохимического маркера остеокластов.

При длительном введении в пищевой рацион перекисленного масла у крыс достоверно снижается концентрация минеральных компонентов (кальция и фосфора) в костной ткани челюстей. Так, уровень кальция в костной ткани снижается с $2,70\pm 0,04$ ммоль/кг у интактных крыс до $2,47\pm 0,05$ ммоль/кг в группе с пародонтитом ($p<0,005$), а уровень фосфора – соответственно с $1,69\pm 0,06$ ммоль/кг до $1,46\pm 0,05$ ммоль/кг ($p<0,01$). При этом не выявлено существенных гендерных отличий (табл. 1).

Ежедневные аппликации на десну Генгигеля в течение 10 дней вызвали активизацию процесса ремоделирования кости, о чем свидетельствует достоверное повышение активности ЩФ – с $42,56\pm 3,96$ мккат/кг у крыс с пародонтитом до $79,94\pm 3,17$ мккат/кг после воздействия геля ($p<0,001$). При этом показатель активности ЩФ в костной ткани крыс опытной группы достоверно превышает аналогичный показатель у интактных крыс ($69,41\pm 2,90$ мккат/кг, $p<0,05$) (табл. 1).

Высокая активность остеобластов, характеризующая интенсивный процесс ремоделирования кости, поддерживает высокую активность остеокластов, что реализуется через систему регуляторных белков RANKL-RANK-OPG [16]. Так, активность КФ в костной ткани после применения Генгигеля у крыс с пародонтитом составила $4,57\pm 0,30$ мккат/кг по сравнению с $2,81\pm 0,37$ мккат/кг у интактных крыс ($p<0,001$) и с $3,38\pm 0,26$ мккат/кг у крыс после моделирования пародонтита ($p<0,01$).

В связи с ростом активности ЩФ определяется также достоверное увеличение концентрации фосфата в костной ткани после применения Генгигеля (с $1,46\pm 0,05$ ммоль/кг у крыс с пародонтитом до $1,60\pm 0,04$ ммоль/кг в опытной группе, $p<0,05$). При этом существенно не меняется содержание кальция в костной ткани (табл. 1).

Таблица

Влияние геля Генгигель на биохимические показатели в гомогенатах кости нижней челюсти крыс (M±m)

Исследуемые группы	Щелочная фосфатаза, мккат/кг			Кислая фосфатаза, мккат/кг			Кальций, ммоль/кг			Фосфор, ммоль/кг		
	самцы	самки	самцы и самки	самцы	самки	самцы и самки	самцы	самки	самцы и самки	самцы	самки	самцы и самки
1. Интактные крысы, n = 10	65,81±1,90	73,01±5,28	69,41 ± 2,90	2,18 ± 0,42	3,45 ± 0,48	2,81 ± 0,37	2,68 ± 0,03	2,72 ± 0,07	2,70 ± 0,04	1,69 ± 0,10	1,70 ± 0,07	1,69 ± 0,06
2. Модель пародонтита, n = 10	37,24 ± 2,96 P ₁₋₂ < 0,001	46,82 ± 6,40 P ₁₋₂ < 0,02	42,56 ± 3,96 P ₁₋₂ < 0,001	3,15 ± 0,31	3,56 ± 0,41	3,38 ± 0,26	2,49 ± 0,07 P ₁₋₂ < 0,05	2,46 ± 0,08 P ₁₋₂ < 0,05	2,47 ± 0,05 P ₁₋₂ < 0,005	1,46 ± 0,05 P ₁₋₂ = 0,090	1,45 ± 0,10 P ₁₋₂ = 0,080	1,46 ± 0,05 P ₁₋₂ < 0,01
3. Модель пародонтита + аппликация геля Генгигель, n = 12	80,76 ± 4,63 P ₁₋₃ < 0,05 P ₂₋₃ < 0,001	79,12 ± 4,76 P ₂₋₃ < 0,005	79,94 ± 3,17 P ₁₋₃ < 0,05 P ₂₋₃ < 0,001	4,49 ± 0,50 P ₁₋₃ < 0,01 P ₂₋₃ = 0,078	4,64 ± 0,40 P ₁₋₃ = 0,085 P ₂₋₃ = 0,092	4,57 ± 0,30 P ₁₋₃ < 0,001 P ₂₋₃ < 0,01	2,60 ± 0,10	2,57 ± 0,08	2,59 ± 0,06	1,58 ± 0,05	1,62 ± 0,05	1,60 ± 0,04 P ₂₋₃ < 0,05

В результате эксперимента не выявлено выраженных отличий в воздействии препарата Генгигель на ткани пародонта у самцов и самок, однако показатели активности ЩФ и КФ у самцов изменяются с большей степенью достоверности, что указывает на более высокую активность процесса ремоделирования кости (табл. 1).

Полученные результаты биохимических исследований о выраженных остеотропных свойствах Генгигеля подтверждены данными морфологических исследований челюстей крыс.

Так, на гистоморфологическом препарате нижней челюсти интактных крыс (рис. 1) видны участки зрелой сформированной кости с «замурованными» остеоцитами, а также строма костного мозга с гемопоэтическими клетками. Костная ткань находится в состоянии «покоя», остеобласты и остеокласты отсутствуют.

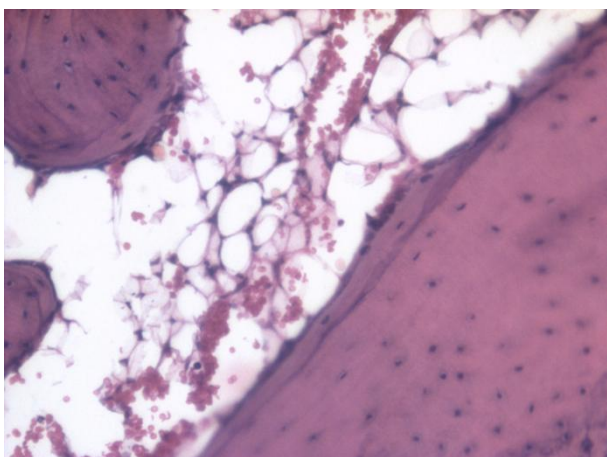


Рис. 1. Микропрепарат нижней челюсти интактных крыс. Окраска гематоксилин-эозин, х 40.

На микропрепарате нижней челюсти крыс, которым моделировали пародонтит с использованием «перекисной» модели в течение 2-ух месяцев (рис. 2), представлена костная ткань с участком гранулематозного воспаления, видны участки разрушения кости. В поле зрения большое количество клеток воспаления (клеточно-воспалительный инфильтрат) в строме костного мозга.

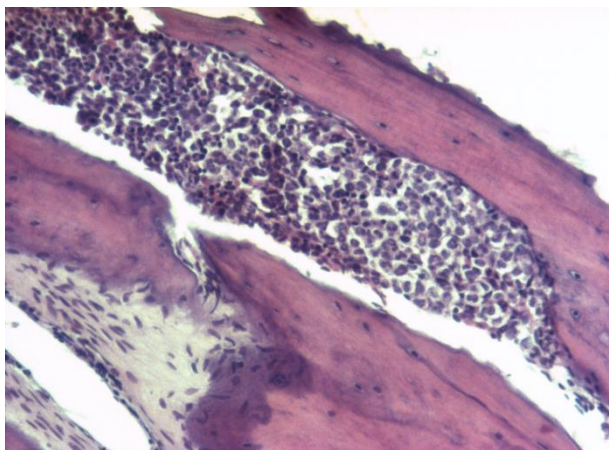


Рис. 2. Микропрепарат нижней челюсти крыс с экспериментальным пародонтитом. Окраска гематоксилин-эозин, х 40.

В то же время, морфологические исследования челюстей крыс опытной группы указывают на активный процесс ремоделирования кости, вызванный аппликациями геля Генгигель на десну в течение 10 дней после моделирования пародонтита. На рис. 3 четко видны участки вновь образованной костной ткани. Отмечаются единичные гигантские многоядерные остеокласты и множество активных остеобластов со светлой цитоплазмой, участвующих в формировании кости. Очаг активного костеобразования характеризует способность гиалуроновой кислоты запускать процесс ремоделирования костной ткани с формированием новой кости у достаточно взрослых крыс, у которых до этого костная ткань была в состоянии покоя и разрушения.

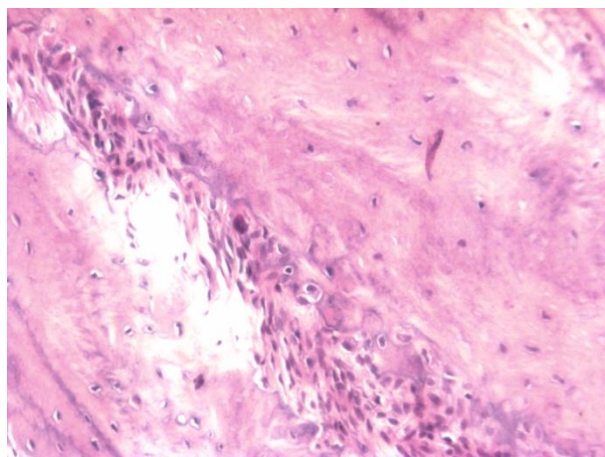


Рис. 3. Микропрепарат нижней челюсти крыс с пародонтитом после применения геля Генгигель. Окраска гематоксилин-эозин, х 40.

Заключение. Таким образом, в эксперименте на модели пародонтита у крыс по результатам биохимических и морфологических исследований установлены выраженные остеотропные и усиливающие процесс регенерации костной ткани свойства геля Генгигель, содержащего 0,2 % гиалуроновую кислоту. Это свидетельствует о перспективе его использования в качестве профилактического средства при возрастной атрофии тканей пародонта и в качестве эффективного лечебного средства в комплексной терапии генерализованного пародонтита.

Список литературы

1. Advanced reconstructive technologies for periodontal tissue repair / C. A. Ramseier, G. Rasperini, S. Batia, W. V. Giannobile // *Periodontology* 2000. – 2012. – Vol. 59. – P. 185-202.
2. Азнабаев М. Т. Противовоспалительная активность гиалуроновой кислоты / М. Т. Азнабаев, А. Р. Имаева, С. А. Башкатов, А. Ф. Габдрахманова // *Эксперим. и клинич. фармакология*. – 2003. – Т. 66, № 5. – С. 28-29.
3. Пустынников А. В. Современные возможности препаратов гиалуроновой кислоты в пародонтологии и имплантологии (Обзор литературы) / А. В. Пустынников, Р. В. Ушаков, Т. В. Ушакова // *Стоматолог*. – 2011. – № 3. – С. 53-58.
4. Sakasi T. Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid / T. Sakasi, C. Watanabe // *Bone*. – 1995. – Vol. 16. – P. 9-15.
5. An autologous cell hyaluronic acid graft technique for gingival augmentation: a case series / G. P. Pini Prato, R. Rotundo, C. Magnani [et al.] // *J. Periodontol.* – 2003. – Vol. 74. – P. 262-267.

6. **Dahiya P.** Hyaluronic acid: a boon in periodontal therapy / P. Dahiya, R. Kamal // *North American Journal of Medical Sciences*. – 2013. – Vol. 5, N. 5. – P. 309-315.
7. **Sukumar S.** Hyaluronic acid and periodontitis / S. Sukumar, I. Drizhal // *ACTA MEDICA (Hradec Kralove)*. – 2007. – Vol. 50, N. 4. – P. 225-228.
8. **Белоклицкая Г. Ф.** Оценка эффективности применения препарата «Генгигель» в комплексном лечении больных генерализованными заболеваниями тканей пародонта / Г. Ф. Белоклицкая, Н. А. Колесова, Т. Д. Центилю // *Современная стоматология*. – 2011. – № 5. – С. 16-23.
9. **Афанасенко К. Ю.** Досвід використання гелю на основі гіалуронової кислоти при лікуванні хронічного катарального гінгівіту / К. Ю. Афанасенко // *Вісник стоматології*. – 2013. – № 4. – С. 119-120.
10. **Болатова Л. Х.** Лечение воспалительных заболеваний пародонта препаратами на основе гиалуроновой кислоты группы «Гиалудент»: автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. мед. наук: спец. 14.01.21 «Стоматология» / Л. Х. Болатова. – Ставрополь, 2010. – 17 с.
11. Evaluation of the efficacy of an hyaluronic acid-based biogel on periodontal clinical parameters. A randomized-controlled clinical pilot study / A. Pilloni, S. Annibali, F. Dominici [et al.] // *Annali di Stomatologia*. – 2011. – Vol. II, N. 3-4. – P. 3-9.
12. **Сукманский О. И.** Экспериментальная модель генерализованного пародонтита / О. И. Сукманский, О. А. Макаренко // *Вісник стоматології*. – 2006. – № 2. – С. 2-3.
13. Левицкий А. П. Сравнительная оценка трех методов определения активности фосфатаз слюны / А. П. Левицкий, А. И. Марченко, Т. Л. Рыбак // *Лабор. дело*. – 1973. – № 10. – С. 624-625.
14. **Камышников В. С.** Справочник по клинико-биохимической и лабораторной диагностике / Камышников В. С. – М., 2004. – 834 с.
15. **Меркулов Г. А.** Курс патологистологической техники / Меркулов Г. А. – Л.: Медицина, 1969. – 423 с.
16. Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands / M. C. Horowitz, Y. Xi, K. Wilson, M. A. Kacena // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2001. – N. 12. – P. 9-18.
3. **Pustynnikov A. V., Ushakov R. V., Ushakova T. V.** The present abilities of the preparations of hyaluronic acid in periodontology and implantology (literary review). *Stomatolog*. 2011;3:53-58.
4. **Sakasi T., Watanabe C.** Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. *Bone*. 1995;16: 9-15.
5. **Pini Prato G. P., Rotundo R., Magnani C. et al.** An autologous cell hyaluronic acid graft technique for gingival augmentation: a case series. *J. Periodontol*. 2003;74:262-267.
6. **Dahiya P. P., Kamal R.** Hyaluronic acid: a boon in periodontal therapy. *North American Journal of Medical Sciences*. 2013;5(5):309-315.
7. **Sukumar S., Drizhal I.** Hyaluronic acid and periodontitis. *ACTA MEDICA (Hradec Kralove)*. 2007; 4(50):225-228.
8. **Beloklitskaya G. F., Kolesova N. A., Tsentilo T. D.** The estimation of the effectiveness of the use of preparation "Gengigel" in the complex treatment of patients with generalized diseases of periodontal tissues. *Sovremennaya stomatologiya*. 2011;5:16-23.
9. **Afanasenko K. Ju.** The experience of the application of gel on the base of hyaluronic acid at treatment of chronic catarrhal gingivitis. *Visnyk stomatologii*. 2013;4:119-120.
10. **Bolatova L. Kh.** Lechenie vospalitel'nykh zabolevaniy parodonta preparatami na osnove gialuronovoy kisloty grupy «Gialudent» [The treatment of the inflammatory diseases of periodontium with the preparations on the base of hyaluronic acid of "Hyaludent" group]: abstr. of candidate's thesis in medicine]; Abstract of a candidate's thesis of medical sciences. *Stavropol'*, 2010:17.
11. **Pilloni A., Annibali S., Dominici F. et al.** Evaluation of the efficacy of an hyaluronic acid-based biogel on periodontal clinical parameters. A randomized-controlled clinical pilot study. *Annali di Stomatologia*. 2011;3-4(II): 3-9.
12. **Sukmanskiy O. I., Makarenko O. A.** The experimental simulation of generalized periodontitis. *Visnyk stomatologii*. 2006;2:2-3.
13. **Levitskiy A. P., Marchenko A. I., Rybak T. L.** The comparative estimation of three methods of the determination of activity of saliva phosphatases. *Labor. delo*. 1973;10:624-625.
14. **Kamyshnikov V. S.** Spravochnik po kliniko-biokhimicheskoy i laboratornoy diagnostike [The guidelines on clinicobiochemical and laboratorial diagnostics]. *Moskva*, 2004:834.
15. **Merkulov G. A.** Kurs patologistologicheskoy tekhniki [The course of pathohistological techniques]. *L'vov: Meditsina*; 1969: 423.
16. **Horowitz M. C., Xi Y., Wilson K., Kacena M. A.** Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001;12:9-18.

REFERENCES

