

Морфологія кісткового регенерату у тварин молодого віку в умовах гіпоосмолярної гіпергідрії

Сікора В.З., Погорелов М.В., Бумейстер В.І., Бончев С.Д.

Медичний інститут Сумського державного університету

м.Суми, вул. Санаторна, 31, 40018

0542 – 65-40-64, pogorelov_max@mail.ru

Ключові слова: репаративний остеогенез, морфометрія, гіпергідратація

Резюме: В роботі проведено вивчення перебігу репаративного остеогенезу великогомілкових кісток щурів молодого віку за умов гіпоосмолярної гіпергідрії різного ступеня важкості. Отримані дані свідчать про порушення перебігу загоєння кісткового дефекту, що виявляється у затримці формування тканинспецифічних структур регенерату та кальцифікації новоутвореного матриксу. Виявлені зміни мають пряму залежність від ступеня порушення водно-сольового балансу.

Morphology of the young rats' bone repair during hypoosmolarity overhydration.

Sikora V.Z., Pogorelov M.V., Bumeyster V.I., Bonchev S.D.

Key words: repair osteogenesis, morphometria, overhydration.

Summary: In article has been studied repair osteogenesis of the young rat's tibia during the different level of overhydration. The dates indicate disorders of the bone repair that display in latency of tissue formation and new matrix calcification. The alteration is depend on rate of aqua-salts disorders.

Морфология костного регенерата у животных молодого возраста в условиях гипоосмолярной гипергидрии

Сикора В.З., Погорелов М.В., Бумейстер В.И., Бончев С.Д.

Ключевые слова. Репаративный остеогенез, морфометрия, гипергидратация.

Резюме. В работе проведено изучение протекания репаративного остеогенеза большеберцовых костей крыс молодого возраста в условиях гипоосмолярной гипергидратации различной степени тяжести. Полученные данные свидетельствуют о нарушении протекания восстановления костного дефекта, что проявляется в задержке формирования тканеспецифичных структур регенерата и кальцификации новообразованного матрикса. Виявленые изменения имеют прямую зависимость от степени нарушения водно-солевого обмена.

Вступ. Репаративна регенерація кістки являє собою послідовність процесів міграції, проліферації та диференціювання клітин, утворення первинних і вторинних гістіонних структур, що завершується формуванням повноцінної кісткової тканини [Корж, Дедех, 2006; Karin A. Ning, 2004]. Регенерація супроводжується зміною метаболічної активності як кісткових структур, так і організму в цілому [Гололобов, 2001; Данилов и др., 2000]. Порушення остеогенезу можливе при впливі на будь-який із механізмів, що контролюють процеси регенерації, і розуміння особливостей відновлення кістки при патології гомеостазу дасть можливість ефективно впливати на протікання репарації скелетної тканини [Корж и др., 2006а; Корж и др., 2006в; Martin Braddock et all., 2001].

Однією з розповсюджених патологій гомеостазу є порушення водно-електролітного обміну [Судаков, 2000]. Дегідратаційні зміни організму, метаболізм кісткової тканини та особливості репаративної регенерації в даних умовах достатньо висвітлені в літературі [Бумейстер, 2008; Сікора, 2006]. Протікання ж репаративного остеогенезу при гіпергідратації майже не вивчалось. За даними літератури, гіпергідратаційні порушення водно-сольового балансу достатньо часто зустрічаються в клінічній практиці. Серед них – захворювання нирок з порушенням сечовидільної функції [S. Wang et all, 2001], патологія серцево-судинної системи із затримкою рідини, ендокринні розлади [de Sa D. D et all., 2008], тощо. У сучасних умовах при надходженні пацієнта в клініку є можливості для адекватної

діагностики та лікування порушень водно-електролітного балансу [Avasthi G et all., 2003]. Травматичні ушкодження кісток скелета є випадковим непередбаченим процесом і при надходженні хворого у відділення травматології та ортопедії лікар може зустрітися з некорегованими порушеннями водного гомеостазу і зазвичай в даному випадку є всі умови для максимально можливого лікування даного синдрому.

Тому метою нашої роботи стало вивчення морфологічних перетворень під час протікання репаративного остеогенезу за умов гіпоосмолярної гіпергідратації різного ступеня важкості.

Матеріали та методи. Експеримент був проведений на 96 щурах-самцях 3-х місячного віку. Експериментальним серіям тварин (72 особини) для досягнення гіпергідрії кожен день зондово вводили дистильовану воду в кількості 10 мл тричі на добу. Також використовували виварені знесолені харчі для зменшення надходження солей в організм. Для запобігання фізіологічної підтримки водного гомеостазу та досягнення необхідного ступеня гідратації щурам вводили синтетичний аналог АДГ (вазопресину) – «Минирін» (Ferring). Препарат має виражену антидіуретичну дію, і вводився тваринам зондово разом із питною водою 2 рази на добу у дозі 0,01 мг. Тривалість моделювання гіпергідрії залежала від її ступеня: легка – 5 днів (зростання гідратації на 5%), середньої тяжкості – 10 днів (зростання гідратації на 8%) та важкого ступеня – 15 днів (зростання гідратації на 15%). Після досягнення відповідного ступеню гіпергідрії всім тваринам під загальною анестезією стоматологічним бором наносився дефект у середній третині діафізу великогомілкової кістки. Контрольна група тварин утримувалася на звичайному кормовому режимі. Щурів виводили з експерименту через 3, 10, 15 та 24 доби після перелому, що відповідає основним стадіям репаративного остеогенезу за Корж Н.А., Дедух Н.В [Корж Н.А., Дедух Н.В, 2006].

Для вивчення особливостей протікання репаративної регенерації виділяли місце дефекту, яке фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну, проводили декальцинацію в розчині Трилону Б протягом двох місяців, зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації та заливали в парафін. Готували гістологічні зрізи товщиною 5-7 мкм та забарвлювали їх гематоксилін-еозином та за Ван-Гізон. Отримані препарати вивчали за допомогою світлового мікроскопа "OLIMPUS". Зображення зберігали на вінчестері з наступним друком кольорових ілюстрацій. Морфометричні дослідження проводили за допомогою комп'ютерних програм "Відео Тест 5,0" та "SEO Image Lab 1.0". Через 3 дні після нанесення дефекту вивчався клітинний склад регенерату, який описувався у вигляді відсотку окремих популяцій клітин від їхньої загальної кількості в ділянці дефекту. Проводився підрахунок фібробластів, макрофагів, лімфоцитів, плазмоцитів, нейтрофілів і малодиференційованих клітин. У гістологічних препаратах, отриманих в наступні терміни репаративного остеогенезу проводилось визначення відсоткового вмісту грануляційної, фіброретикулярної, грубоволокнистої та пластинчастої кісткової тканини, а також червоного кісткового мозку. Проводилося також вимірювання товщини кісткових трабекул на периферії та в центральній ділянці дефекту, а також загальна площа судин у регенераті та їх діаметр. Отримані цифрові дані оброблялися статистично на персональному комп'ютері з використанням пакета прикладних програм. Достовірність розходження експериментальних і контрольних даних оцінювали з використанням критерію Ст'юдента, достовірною вважали ймовірність помилки менше 5% ($p \leq 0,05$).

Результати та їх обговорення.

Через 3 дні після травми при легкому ступеню гіпергідрії ділянка дефекту була заповнена клітинами лейкоцитарно-фібробластичного та макрофагального диферонів. У центрі дефекту були помітні залишки посттравматичної гематоми у вигляді острівців, площа яких не перевищує аналогічний показник контрольної групи тварин. Серед клітин переважають макрофаги, лімфоцити та фібробласти. Макрофаги знаходяться на стадії активного фагоцитозу, зустрічаються гинучі клітини та їх секреторний фенотип. По периферії дефекту починають формуватися капіляри синусоїдного типу з великою кількістю периваскулоцитів та фібробластів навколо. Морфологія материнської кістки не має

відмінностей від тварин контрольної серії. Спостерігаються поодинокі пусті остеоцитарні лакуни, в періості відмічаються мітози камбіальних клітин, посилюється базофілія цитоплазми пре- та остеобластів.

Гістоморфометрія регенерату характеризується порушенням співвідношення клітинного складу. Так, вміст фібробластів та макрофагів зменшується у порівнянні з контролем на 7,92% ($p \leq 0,05$), макрофагів – на 8,15% ($p \leq 0,05$), натомість вміст лімфоцитів, плазмоцитів та нейтрофілів зростає на 6,41% ($p \leq 0,05$), 6,03% ($p \leq 0,05$) та 6,92% ($p \leq 0,05$), при цьому площа гематоми достовірно не змінюється.

Через 10 днів після моделювання перелому в умовах гіпоосмолярної гіпергідрії легкого ступеню відмічається різке порушення співвідношення тканинного складу регенерату, що є наслідком зрушення міжклітинної кооперації в першу стадію остеогенезу (Рис. 1). Так значно зменшується вміст грубоволокнистої кісткової тканини – на 17,04% ($p \leq 0,05$), новоутворені балочки витончені з низьким вмістом клітин. Зниження синтетичної активності характеризується уповільненням регресії грануляційної тканини, площа якої перевищує контроль на 13,47% ($p \leq 0,05$). Значними за площею є також залишки гематоми, відсоток якої складає в даній групі $4,80 \pm 0,35\%$. Не зважаючи на значну площу грануляційної тканини, на 8,03% ($p \leq 0,05$) зменшується також площа судинного русла, що має знизити метаболічну активність тканин, які формуються в місці травми.

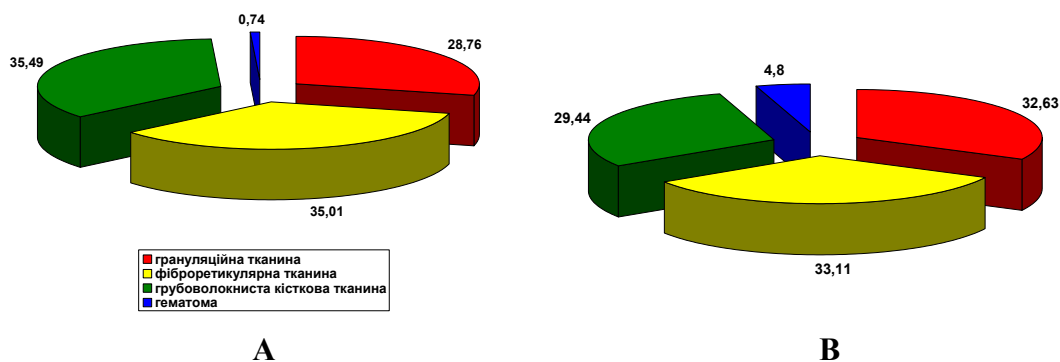


Рисунок 1. Відсоткове співвідношення тканинного складу регенерату великогомілкової кістки щура молодого віку через 10 днів після нанесення дефекту (А – контроль, В – за умов гіпоосмолярної гіпергідрії легкого ступеню)

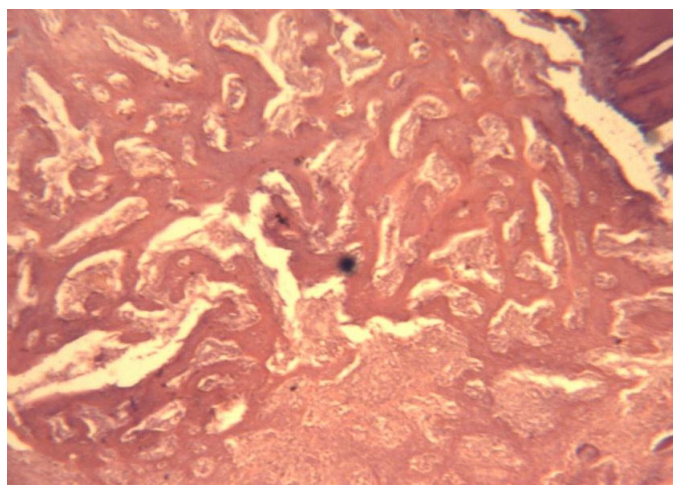


Рисунок 2. Ділянка дефекту діафізу великогомілкової кістки щура молодого віку через 15 днів після нанесення дефекту за умов гіпоосмолярної гіпергідрії легкого ступеню. Забарвлення гематоксилін-еозин. Zoom X 400

Через 15 днів після нанесення дефекту зона регенерату заповнена характерним для даної стадії тканинним складом. Але їх співвідношення значно відрізняється від контролю,

що вказує на значні порушення в перебігу репаративного процесу. Регенерат представлений переважно фіброретикулярною та грубоволокнистою кістковою тканиною з незначним вмістом пластинчастої кістки в кортикальному шарі (рис. 2). Новоутворені трабекули витончені з незначною кількістю остеобластів на їх поверхні, місцями зустрічаються розриви між балками. Їх товщина зменшена у порівнянні з контролем на 7,41% - 9,72% ($p \leq 0,05$). Міжбалочний простір вивпунений фіброретикулярною тканиною та червоним кістковим мозком. Судини, площа яких менша за контроль на 6,79% ($p \leq 0,05$), повнокровні, з періваскулярним набряком, місцями зустрічається стаз еритроцитів та їх діapedез. Відсотковий склад регенерату характеризується зменшенням вмісту грубоволокнистої та пластинчастої кісткової тканини на 14,32% ($p \leq 0,05$) та 10,48% ($p \leq 0,05$) відповідно і зростанням площі фіброретикулярної тканини на 6,59% ($p \leq 0,05$) (рис. 3).

Основним морфологічним субстратом кортикальної пластинки через 24 доби є пластинчаста кісткова тканина, однак її кількість зменшується на 13,29% ($p \leq 0,05$). Вона утворена нерівномірно розміщеними остеонами з різнонаправленими вставними пластинами. Часто остеонні структури утворені всього 2-3 концентричними пластинами, що характеризує їх як первинні. Місцями зустрічаються лакуни резорбції, що свідчить про зниження швидкості перебудови грубоволокнистої кістки в пластинчасту. Площа грубоволокнистої тканини зростає на 7,54% ($p \leq 0,05$) в порівнянні з контролем. Товщина трабекул в центрі дефекту менша за контроль на 10,28% ($p \leq 0,05$), по периферії – на 7,13% ($p \leq 0,05$). Забарвлення кісткових балок та пластинчастої кісткової тканини менш інтенсивне та більш мозаїчне, ніж у контрольних тварин, що може свідчити про порушення осифікації новоутвореного матриксу. Судинне русло представлене капілярами та повнокровними артеріолами, загальна площа яких менша за контроль на 9,85% ($p \leq 0,05$).

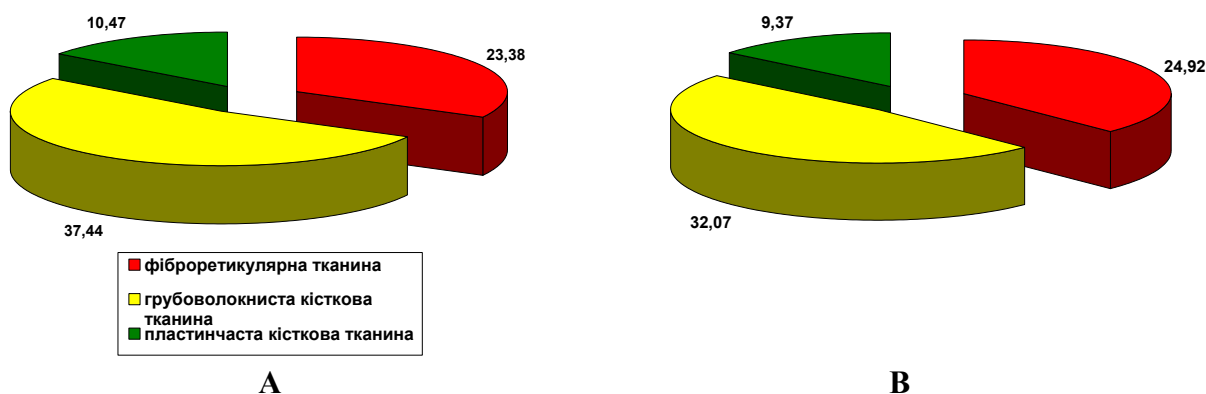


Рисунок. 3. Відсоткове співвідношення тканинного складу регенерату великогомілкової кістки щура молодого віку через 15 діб після нанесення дефекту (А – контроль, В – за умов гіпоосмолярної гіпергідрії легкого ступеню)

Гістологічна картина регенерата у тварин молодого віку за умов змодельованої гіпергідратації середнього ступеня характеризується подібними до попередньої групи змінами. Через 3 дні після нанесення травми більша частина зони дефекту заповнена гематомою, площа якої складає $67,35 \pm 1,57\%$, що на 4,67% ($p \leq 0,05$) перевищує контрольні показники. Відсоток грануляційної та фіброретикулярної тканини достовірно зменшується, відповідно на 7,98% ($p \leq 0,05$) та 9,53% ($p \leq 0,05$). Клітинний склад гематоми також достовірно змінюється. Превалюючим дифероном є макрофагально-фібробластичний, але кількість макрофагів зменшується на 8,92% ($p \leq 0,05$), фібробластів – на 9,44% ($p \leq 0,05$). При цьому відмічається достовірно збільшення вмісту прозапальних клітин – лімфоцитів, плазмочитів та лейкоцитів, відповідно на 8,12% ($p \leq 0,05$), 7,53% ($p \leq 0,05$) та 7,28% ($p \leq 0,05$) (рис. 4). Подібний клітинний дисбаланс на фоні порушення тканних співвідношення є несприятливим фактором подальшого перебігу остеогенезу.

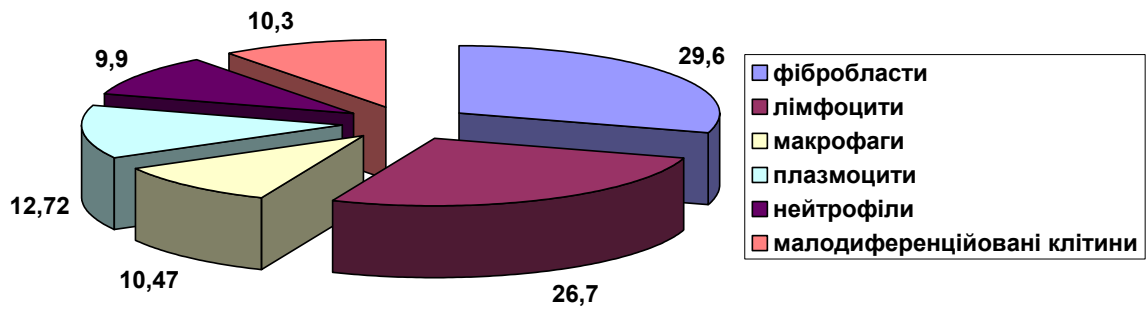
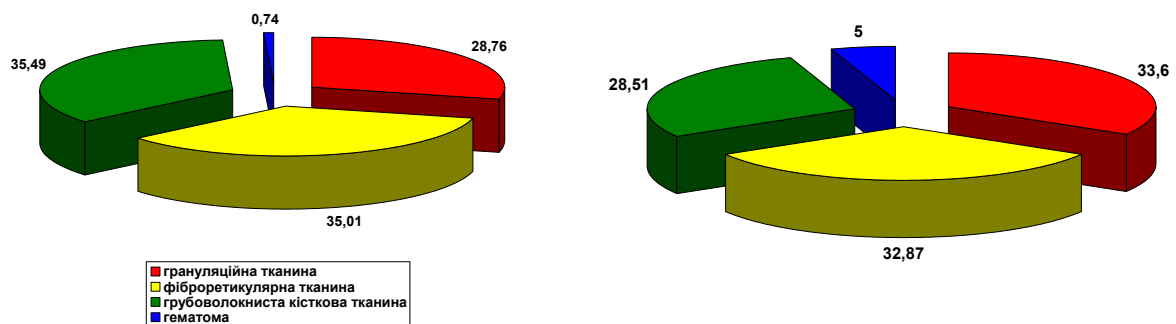


Рисунок 4. Клітинний складу регенерату великогомілкової кістки щура молодого віку за умов гіпоосмолярної гіпергідрії середнього ступеня через 3 дні після нанесення дефекту

Через 10 днів після травми спостерігається значне порушення тканинних співвідношень у регенераті. Помітні значні залишки гематоми в центральних ділянках дефекту, площа якої становить $5,00 \pm 0,37\%$ від загального об'єму тканин. Значно перевищує контрольні показники також відсоток грануляційної тканини, розташованої в основному по периферії та між новосформованими болочками грубоволокнистої кістки. Різниця з контролем становить $13,47\%$ ($p \leq 0,05$) (рис. 5). Натомість кількість фіброретикулярної та грубоволокнистої тканин менша в даний термін відповідно на $5,41\%$ ($p \leq 0,05$) та $17,04\%$ ($p \leq 0,05$). Кісткові балочки до кінця не сформовані з низькою клітинною щільністю. Незважаючи на значну кількість грануляційної тканини, площа судин менша за контроль на $11,76\%$ ($p \leq 0,05$).



А

В

Рисунок 5. Відсоткове співвідношення тканинного складу регенерату великогомілкової кістки щура молодого віку через 10 днів після нанесення дефекту (А – контроль, В – за умов гіпоосмолярної гіпергідрії середнього ступеня)

Порушення остеогенезу, виявлені в попередній термін спостереження, призводять до значних змін структури регенерату через 15 днів після травми. У периферійних ділянках зустрічаються залишки грануляційної тканини ($4,57 \pm 0,63\%$), яка відсутня у контрольній групі тварин, що вказує на глибоку затримку репаративного остеогенезу. Разом із тим зростає вміст фіброретикулярної тканини на $8,43\%$ ($p \leq 0,05$), рівень якої був менший за контроль у попередній термін спостереження. Це також вказує на затримку перебудови тканин регенерату. Натомість зменшується вміст грубоволокнистої тканини на $16,83\%$ ($p \leq 0,05$) та пластинчастої кісткової тканини на $13,42\%$ ($p \leq 0,05$). Новоутворені кісткові трабекули витончені, різниця з контролем у їх ширині складає $12,82\%$ ($p \leq 0,05$) в периферійних відділах та $16,03\%$ ($p \leq 0,05$) - в центральних. Забарвлення трабекул менш інтенсивне, кількість клітин на їх поверхні значно менша у порівнянні з контролем, зустрічаються порожні остеоцитарні лакуни та порожнини резорбції. Затримка перебудови кісткової тканини характеризується появою ліній склеювання на поверхні материнської кістки.

Ділянка дефекту великогомілкової кістки молодих тварин через 24 доби після травми виповнена грубоволокнистою та пластинчастою кістковою тканиною. На відміну від контрольної серії, кортикальна пластинка відновлюється за рахунок обох видів кісткової тканини. Площа грубоволокнистої кістки перевищує контроль на 10,54% ($p \leq 0,05$), пластинчастої зменшується на 17,81% ($p \leq 0,05$). Структурно спостерігається значне витончення кісткових трабекул, різниця з контролем складає по периферії дефекту 13,69% ($p \leq 0,05$), в центрі – 15,28% ($p \leq 0,05$). Новоутворені балочки характеризуються багаточисельними пустуючими остеоцитарними лакунами, фенестрацією, наявністю порожнин резорбції та нерівномірним забарвленням. У кортикальній пластинці формуються поодинокі остеоцитарні структури, більшість з яких неправильної форми, що утворені 2-3 концентричними пластинками.

Зміни будови регенерату великогомілкових кісток за умов гіпоосмолярної гіпергідрії важкого ступеню набувають загрозливого характеру.

Через 3 доби після нанесення травми відбувається виражене порушення співвідношення клітинного складу регенерату. Значно зменшується кількість клітин фібробластично-макрофагального диферону – вміст фібробластів менший за контроль на 14,51% ($p \leq 0,05$), макрофагів – на 13,81% ($p \leq 0,05$) та плазмоцитів – на 6,88% ($p \leq 0,05$). При цьому зростає відсоток лімфоцитів, нейтрофілів та малодиференційованих клітин відповідно на 10,14% ($p \leq 0,05$), 7,82% ($p \leq 0,05$) та 26,93% ($p \leq 0,05$). Площа гематоми становить $62,52 \pm 3,27\%$, що перевищує контроль на 6,49% ($p \leq 0,05$). Натомість значно зменшується відсоток тканин регенерату, що свідчить про зниження синтетичної активності клітин. Так, вміст грануляційної та фіброретикулярної тканини менший за показники контрольної серії відповідно на 10,55% ($p \leq 0,05$) та 14,64% ($p \leq 0,05$).

Через 10 днів після нанесення травми спостерігаються значні залишки гематоми, відсоток якої складає $6,16 \pm 0,74\%$. Значно перевищує контроль також площа грануляційної тканини, яка розташована по всій площі регенерату. Її відсоток становить $33,60 \pm 2,17\%$ від загальної площі тканин, що на 19,21% ($p \leq 0,05$) перевищує показники контролю. В даній групі тварин спостерігається значна затримка остеогенезу, що полягає у зменшенні відсотка грубоволокнистої кісткової тканини в середньому на 23,81% ($p \leq 0,05$). Новоутворені кісткові трабекули витончені, з низькою щільністю клітин на їх поверхні (рис. 6). Значно зменшується також площа судинного русла, в основному за рахунок зменшення кількості капілярів та артеріол. Різниця з контролем при цьому складає 15,68% ($p \leq 0,05$).

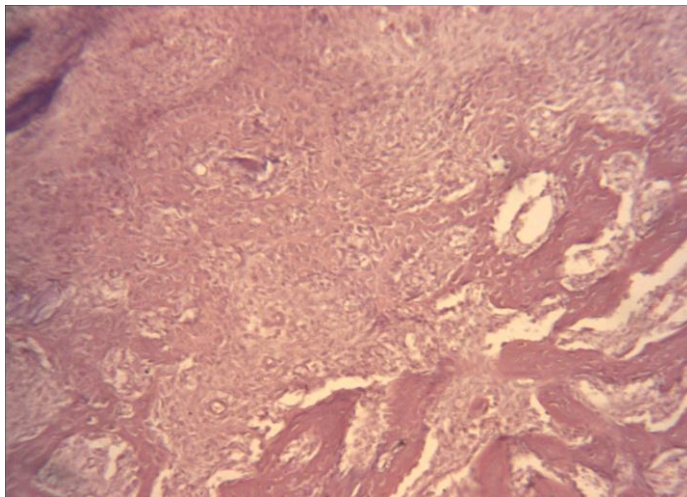


Рисунок 6. Ділянка дефекту діяфізу великогомілкової кістки щура молодого віку через 10 днів після нанесення дефекту за умов гіпоосмолярної гіпергідрії важкого ступеня. Забарвлення гематоксилін-еозин. Zoom X 400

Важкий ступінь гіпергідрії викликає зрушення остеогенезу в третій термін репаративної регенерації. Тканинний склад характеризується значними залишками

грануляційної та фіброретикулярної тканини. Площа останньої перевищує контроль на 11,15% ($p \leq 0,05$). Новоутворена пластинчата кістка займає всього $8,75 \pm 0,74\%$ від загальної площі регенерату, що на 16,38% ($p \leq 0,05$) менше за контрольні показники. Також значно зменшується відсоток грубоволокнистої кісткової тканини – в середньому на 17,90% ($p \leq 0,05$) (рис. 7). Кісткові трабекули значно витончені, різниця з контролем складає в периферійних ділянках 19,62% ($p \leq 0,05$), в центральних – 24,79% ($p \leq 0,05$). На їх поверхні зустрічаються поодинокі остеобласти, міжбалочний простір виповнений фіброретикулярною та грануляційною тканинами і острівцями червоного кісткового мозку. Судини регенерату повнокровні, зустрічаються стази та крововиливи, площа судинного русла зменшена на 17,66% ($p \leq 0,05$).

Через 24 доби після травми спостерігаються явища дисрегенерації. Тканинний склад представлений грубоволокнистою та пластинчастою кістковою тканиною і значними залишками фіброретикулярної, що не спостерігається при легкому та середньому ступенях гіпергідрії. Серед тканин переважає пластинчата кісткова, але її площа менша за контроль у середньому на 22,54% ($p \leq 0,05$). Вперше в даний термін спостерігається зменшення вмісту грубоволокнистої кісткової тканини на 8,77% ($p \leq 0,05$), що свідчить про значну затримку остеогенезу. Новоутворені тканини мозаїчно забарвлені з незначною кількістю клітин на їх поверхні. Остеонні структури здебільшого овальної чи неправильної форми, що утворені 2 – 3 пластинками. Товщина кісткових трабекул зменшена на 15,08% ($p \leq 0,05$) в периферійних відділах регенерату та на 18,15% ($p \leq 0,05$) – в центральних. Площа судин менша за контроль в середньому на 12,44% ($p \leq 0,05$).

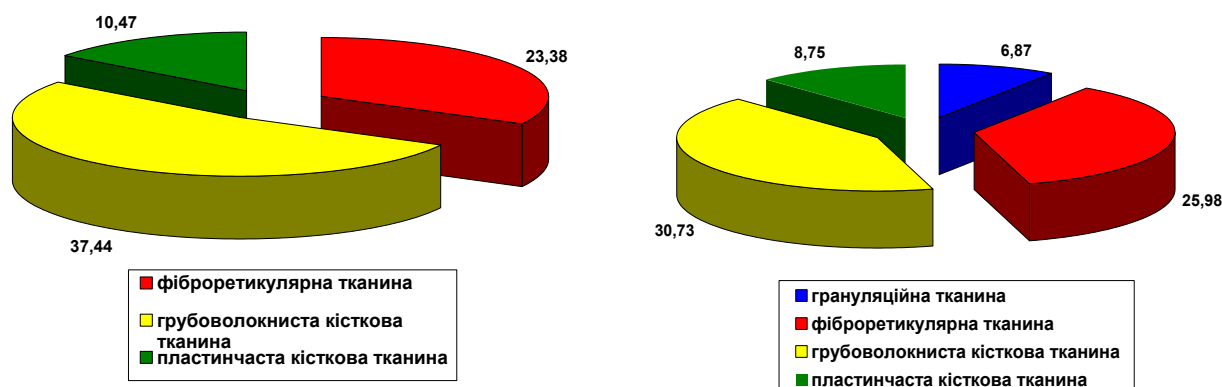


Рисунок 7. Відсоткове співвідношення тканинного складу регенерату великогомілкової кістки щура молодого віку через 15 діб після нанесення дефекту за умов важкого ступеня гіпергідрії (А – контроль, В – за умов гіпоосмолярної гіпергідрії важкого ступеню)

Висновки та перспективи подальших досліджень. Таким чином, гіпоосмолярна гіпергідрія викликає порушення репаративного остеогенезу, що виявляється в уповільненні формування тканинспецифічних структур мозолі та погіршенні морфометричних показників структур регенерату. Ступінь виявлених змін залежить від важкості порушень водно-сольового балансу та найбільш виражені при важкому ступеню гіпоосмолярної гіпергідрії.

В подальшому планується вивчення змін мінеральної складової кісток щурів за умов гіпергідратації та пошук механізмів корекції виявлених змін.

Література.

1. Бумейстер В.І. Структурно-метаболична характеристика кісткового регенерату в умовах впливу загального зневоднення важкого ступеню/ В.І. Бумейстер //Вісник морфології.-2008.-№14 (2).- С. 329-332.
2. Гололобов В.Г. Скелетные ткани. Посттравматическая регенерация [D/U/ Гололобов]// Руководство по гистологии. Т1.-СПб.:СпецЛит, 2001.-С. 328-336.

3. Данилов Р.К. Экспериментально-гистологический анализ гистогенеза и репаративной регенерации тканей (некоторые итоги XX века и перспективы дальнейших исследований) [Р.К. Данилов, Т.Г. Боровая, Н.Д. Клочков]// Морфология.-2000.-Т.118, №4.- С. 7-16.
4. Корж Н.А. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Локальные факторы, влияющие на заживление перелома [Н.А. Корж, Л.Д. Горидова, К.К. Романенко]// Ортопедия, травматология и протезирование.-2006.-№2.-С. 99-105.
5. Корж Н.А. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Стадии регенерации [Н.А. Корж, Н.В. Дедух]// Ортопедия, травматология и протезирование. - 2006. - №1. - С. 76-84.
6. Корж Н.А. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Системные факторы, влияющие на заживление перелома [Н.А. Корж, Н.В. Дедух, О.А. Никольченко]// Ортопедия, травматология и протезирование.-2006.-№2.-С. 93-99.
7. Сікора В.З. Гістологічні перетворення кісткового регенерату довгої кістки в умовах позаклітинної дегідратації/ В.З. Сікора, В.І. Полякова, Г.Ф. Ткач //Вісник морфології. – Вип.12 (2). – 2006. – С. 199-201.
8. Физиология. Основы и функциональные системы: Курс лекций / Под ред. К.В.Судакова. - М.: Медицина, 2000. - С.256-264.
9. Avasthi G. Acute renal failure in medical and surgical intensive care units--a one year prospective study/ G. Avasthi , J. S. Sandhu, K. Mohindra // Ren Fail. – 2003. - Jan;25(1). P. 105-13.
10. de Sa D. D. The role of natriuretic peptides in heart failure / de Sa D. D., H. H. Chen // Curr. Cardiol. Rep.- 2008. - № 10(3). - P. 182-189.
11. Born Again Bone: Tissue Engineering for Bone Repair [Martin Braddock, Parul Houston, Callum Campbell et all]// News Physiol. Sci. – 2001 – V. 16. – P. 208 - 216
12. Karin A. Hing Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? Phil. Trans. R. Soc. Lond. A. - 2004. – №362. – P. 2821–2850
13. Prolonged Prenatal Hypernatremia Alters Neuroendocrine and Electrolyte Homeostasis in Neonatal Sheep [S. Wang, J. Chen, N. Kallichnda et all] // Exp Biol Med. – 2003. – V. 228. – P. 41–45