

УДК 611-018.4:616.716.4-001.5:616-08

О.О. Ліхницький^{1*}, А.М. Гольцев²

Вплив кріоконсервованої тканини плаценти людини на репаративний остеогенез у щурів із відкритим переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу

UDC 611-018.4:616.716.4-001.5:616-08

О.О. Likhitskiy^{1*}, A. M. Goltsev²

Influence of Cryopreserved Human Placental Tissue on Reparative Bone Formation in Rats with the Lower Jaw Open Fracture on Osteoporosis Background

Реферат: У роботі вивчали вплив імплантації кріоконсервованої тканини плаценти людини на репаративний остеогенез у щурів із відкритим переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу. Дослідження проводили на трьох групах ($n = 35$ у кожній) статевозрілих щурів-самців лінії Вістар (масою 180–200 г): щури з модельованим відкритим переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу, щури з модельованою патологією, яким проводили імплантацію кріоконсервованої тканини плаценти людини та щури з модельованою патологією, яким крім імплантації кріоконсервованої тканини плаценти людини додатково вводили цитрат кальцію. Експериментальний остеопороз у щурів викликали введенням протягом 60-ти діб 2,5%-го розчину гідрокортизону ацетату, після відтворювали травматичне ушкодження нижньої щелепи. На моделі показано, що кріоконсервована тканина плаценти має остеопротекторний ефект, який виявляється в посиленні процесів колагенотворення (максимум на 30-ту добу), мінералізації кісткової тканини, депривуючому впливі на остеодеструктивні процеси та катаболізму колагену (максимум на 14-ту добу). Комбіноване застосування кріоконсервованої тканини плаценти людини та цитрату кальцію має потужну остеопротекторну дію, яка спостерігається на ранніх термінах експерименту, ніж за умов монотерапії.

Ключові слова: кріоконсервована тканина, плацента людини, цитрат кальцію, репаративний остеогенез, перелом нижньої щелепи, метаболізм кісткової тканини, щури.

Реферат: В работе изучали влияние имплантации криоконсервированной ткани плаценты человека на репаративный остеогенез у крыс с открытым переломом нижней челюсти на фоне остеопороза. Исследования проводили в трех группах ($n = 35$ в каждой) половозрелых крыс-самцов линии Вистар (массой 180–200 г): крысы с моделируемым открытым переломом нижней челюсти на фоне остеопороза, крысы с моделируемой патологией, которым проводили имплантацию криоконсервированной ткани плаценты человека, и крысы с моделируемой патологией, которым кроме имплантации криоконсервированной ткани плаценты человека дополнительно вводили цитрат кальция. Экспериментальный остеопороз у крыс вызывали введением в течение 60 суток 2,5%-го раствора гидрокортизон ацетата, после воспроизводили травматическое повреждение нижней челюсти. На модели показано, что криоконсервированная ткань плаценты имеет остеопротекторный эффект, который проявляется в усилении процессов коллагенообразования (максимум на 30-е сутки), минерализации костной ткани, депривующем влиянии на остеодеструктивные процессы и катаболизме коллагена (максимум на 14-е сутки). Комбинированное применение криоконсервированной ткани плаценты человека и цитрата кальция имеет мощное остеопротекторное действие, которое наблюдается на более ранних сроках эксперимента, чем при монотерапии.

Ключевые слова: криоконсервированная ткань, плацента человека, цитрат кальция, репаративный остеогенез, перелом нижней челюсти, метаболізм костной ткани, крысы.

Abstract: The influence of calcium citrate and cryopreserved human placental tissue reparative osteogenesis in rats with an open fracture of the lower jaw on the background of osteoporosis was investigated. The studies were performed in three groups ($n = 35$ each) of mature Wistar male rats (180–200 g weight): the rats with a simulated open mandibular fracture on the osteoporosis background, rats with simulated pathology, which implanted with the cryopreserved human placental tissue and the rats with a simulated pathology, which in addition to an implantation of the cryopreserved human placental tissue were also injected with calcium citrate. Experimental osteoporosis in rats was induced by injecting of 60% solution of hydrocortisone acetate for 60 days, afterwards traumatic damage to the lower jaw was simulated. The model showed that cryopreserved placental tissue had an osteoprotective effect, which was manifested in enhancing the collagen formation processes (maximum to day 30), as well as bone mineralization, depriving the effect on osteodestructive processes and collagen catabolism (maximum to day 14). The combined use of cryopreserved human placenta and calcium citrate had a powerful osteoprotective effect, which also developed at the early stages of experiment if compared with monotherapy.

Key words: cryopreserved tissue, human placenta, calcium citrate, reparative osteogenesis, mandible fracture, bone tissue metabolism, rats.

¹Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, м. Вінниця

²Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

¹National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Ukraine

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна 21018;
тел.: (+38 0432) 57-03-60, факс: (+38 0432) 35-05-63
електронна пошта: oleksiilikhitskiy@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

56, Pyrohova str., Vinnytsia, Ukraine 21018;
tel.: +380 0432 5703 60, fax: +380 0432 3505 63
e-mail: oleksiilikhitskiy@gmail.com

Надійшла 10.10.2018

Прийнята до друку 13.05.2019

Received October, 10, 2018

Accepted May, 13, 2019

© 2019 O.O. Likhitskiy, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Сучасні кріотехнології дозволяють отримувати продукти з тканини плаценти людини і довготривало зберігати їх властивості [14]. Після деконсервування зберігається повноцінність, знижується імуногенність [19] та підвищується біологічна активність клітин, які містяться в тканині плаценти. Завдяки високому вмісту гормонів, цитокінів, факторів росту, стовбурових клітин плацентарні екстракти, суспензії клітин і фрагменти тканини мають різноманітний фармакологічний ефект (імунорегулюючий, антиоксидантний, регенеративний, гемостатичний, нейропротекторний, протизапальний тощо) [19]. Крім того, введення таких сполук впливає на метаболічні процеси в організмі та на клітини, які здатні виконувати замісну функцію [21].

На підставі вищевикладеного ми вважаємо, що одним із шляхів стимуляції репаративного остеогенезу при переломах нижньої щелепи на тлі остеопорозу є використання кріоконсервованої тканини плаценти людини.

Відомо, що найчастіше ушкодження лицьового скелета – це переломи нижньої щелепи, які за даними різних авторів складають 70–85% від усіх переломів кісток щелепно-лищевої ділянки [15]. Лікування таких пацієнтів набуває не лише медичного, а й соціального значення [16], оскільки переважну їх більшість складають особи працездатного віку. Основними задачами лікування цієї категорії хворих є відновлення анатомічної цілісності нижньої щелепи, яка забезпечує мовну, жувальну, ковтальну функції, а також закріплення зубів на альвеолярному відростку нижньої щелепи [20].

Слід зазначити, що сучасні хірургічні методи лікування переломів нижньої щелепи не дозволяють провести адекватну та якісну репозицію, зафіксувати відламки кісток та виключити післятравматичні та післяопераційні ускладнення [4], оскільки вони застосовуються для фіксації переломів кістки без проявів остеопорозу. За даними статистики у пацієнтів середнього та літнього віку обох статей із переломами нижньої щелепи, які виникли внаслідок порушення репарації та низького рівня кальцію, було встановлено високі показники інвалідності [15].

Для збільшення щільності та відновлення структури кісткової тканини в умовах остеопорозу (постклімактеричного, старечого, глюкокортикоїдного, вторинного, аліментарного), основними причинами розвитку якого є активація резорбції кісткової тканини та ослаблення процесів кісткоутворення, необхідна стимуляція процесів остеорегенерації [23] фармпрепаратами, які впли-

Novel cryotechniques enable the obtaining of the products derived from the placenta tissue and keeping for a long time their viability [17]. After warming of cryopreserved products the integrity is preserved as well as immunogenicity is reduced [12], and biological activity of the cells, composing the placenta tissue is increased. Due to a high level of hormones, cytokines, growth factors, stem cells, placental extracts, the cell suspensions and tissue fragments have a diverse pharmacological effect (immune regulating, antioxidant, regenerative, hemostatic, neuroprotective, anti-inflammatory, *etc.*) [12]. In addition, the administration of these compounds influences the metabolic processes in the body and the cells, capable of performing the substitution function [19].

Based on the foregoing, we consider that one of the ways to stimulate the reparative osteogenesis in the mandible fractures on the osteoporosis background is the use of cryopreserved placental tissue.

The most common injury to a facial skeleton is known to be mandible fractures (MF), which according to the data of various authors make up 70–85% of all the fractures of maxillofacial bones [1]. Treatment of such patients acquires not only medical but also social importance [3], as the overwhelming majority of them are the individuals of an active working age. The main tasks of the treatment of this category of patients is the restoration of anatomical integrity of mandible, which provides speech, chewing, swallowing functions, as well as fixing the teeth on the alveolar branch of the mandible [15].

It should be noted that current surgical approaches to treat the fractures of mandible do not allow the adequate and qualitative reposition, fixation of bone fragments and elimination of post-traumatic and post-surgery complications [8], since they are used for the fixation of bone fractures without osteoporosis manifestations. According to the statistics, morbidity and disability data for both sexes, stipulated by the disordered reparation and low calcium levels, in the patients of middle and older age the mandible fractures are predominant [1].

In order to increase the density and restore the structure of bone tissue under osteoporosis conditions (post-menopausal, aging, glucocorticoid, secondary, alimentary), the main causes of those are an activation of resorption of bone tissue and the weakening of bone formation, stimulation of osteoregeneration is needed [23] by the pharmaceuticals, affecting the mechanisms of remodeling of bone tissue, on the mass and quality of cortical bone tissue, which ensures its adhesion and ability to withstand the mechanical influences [22].



вають на механізми ремоделювання кісткової тканини, на масу і якість кортикальної кісткової тканини, що забезпечує її зрощення та здатність протистояти механічним впливам [22].

Для визначення оптимальної швидкості проліферативних процесів, диференціювання остеогенних клітинних елементів в остеобласти і фібриноутворення у роботі проводили комбіноване лікування кріоконсервованою тканиною плаценти людини і цитратом кальцієм (препарат «Кальцію цитрат» ВАТ «Фармак», Україна) [20]. Важливим є той факт, що репаративний ефект вказаних препаратів досліджувався у хворих із різною хірургічною та терапевтичною патологією, але при переломах нижньої щелепи їх дія практично не вивчалася. Тому вважаємо доцільним визначити лікувальний ефект комбінованого застосування кріоконсервованих фрагментів тканини плаценти та цитрату кальцію, який на відміну від інших препаратів не впливає на шлункову секрецію та не викликає каменеутворення [2].

Мета дослідження – оцінити вплив кріоконсервованої тканини плаценти людини і цитрату кальцію на метаболізм кісткової тканини в різні терміни репаративного остеогенезу у щурів із відкритим переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу.

Матеріали та методи

Експерименти проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006) із дотриманням вимог комітету з біоетики Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова (протокол № 14 від 25.11.2010), узгоджених із положеннями «Європейської Конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986). Плаценту отримували за письмовою інформованою згодою породіллі.

Досліди проводили на 3–4-місячних статево-зрілих щурах-самцях лінії Вістар ($n = 105$, маса 180–200 г), яких розподілили за такими групами ($n = 35$): 1 (контроль) – модельований відкритий перелом нижньої щелепи на тлі остеопорозу (ПНЩ + ОП); 2 – модельована патологія з імплантацією кріоконсервованої тканини плаценти людини (ПНЩ + ОП + КП); 3 – модельована патологія з імплантацією кріоконсервованої тканини плаценти людини та додатковим введенням цитрату кальцію (ПНЩ + ОП + КП + Ca). Дослідження виконували на 7, 14, 21, 30 та 45-ту доби після імплантації кріоконсервованих фрагментів плаценти. На кожному терміні дослід-

In order to determine the optimal rate of proliferative processes, the differentiation of osteogenic cell elements into osteoblasts and fibrin formation, the combined treatment with cryopreserved human placenta tissue and calcium citrate (drug 'Calcium citrate' JSC 'Farmak', Ukraine) was performed [15]. It is important that the reparative effect of these drugs has been studied in the patients with different surgical and therapeutic pathologies, but in the mandible fractures, their effect was virtually not studied. Therefore, we consider it expedient to determine a therapeutic effect of combined use of cryopreserved placental tissue fragments and calcium citrate, which, unlike other drugs, does not affect gastric secretion and does not cause stone formation [4].

The purpose of the study was to evaluate the effect of cryopreserved tissue of human placenta and calcium citrate on bone tissue metabolism at different terms of reparative osteogenesis in rats with an open fracture of the mandible on the osteoporosis background.

Materials and methods

Experiments were carried out in accordance with the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals against Cruelty' (№ 3447-IV of February 21, 2006) in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of the National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya (protocol № 14 dated of November 25th, 2010), agreed with the provisions of the 'European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes' (Strasbourg, 1986). The placenta was obtained with a written informed consent of the woman.

Experiments were performed in sexually mature male Wistar rats of 3–4 months age ($n = 105$, weight 180–200 g), which were divided into the following groups ($n = 35$): 1 (control) – a simulated open fracture of the mandible on an osteoporosis background (MF + OP); 2 – simulated pathology, with implantation of cryopreserved human placenta tissue (MF + OP + PT); 3 – simulated pathology with implantation of cryopreserved tissue of human placenta and an additional introduction of calcium citrate (MF + OP + PT + Ca). The studies were performed at 7, 14, 21, 30 and 45 days after the implantation of cryopreserved placental fragments. At each study term, from each group, the same number of animals was removed ($n = 7$).

Experimental osteoporosis in rats was induced by administration of 60% of a 2.5% solution of hydrocortisone acetate daily in a dose of 50 mg/kg body weight [20]. Subsequently, the drug was with-

ження із кожної групи виводили однакову кількість тварин ($n = 7$).

Експериментальний остеопороз у щурів викликали введенням протягом 60 днів 2,5%-го розчину гідрокортизон ацетату через добу у дозі 50 мг/кг маси тіла [11]. Після цього препарат відміняли і відтворювали травматичне ушкодження нижньої щелепи [1]: щура фіксували на станку на спині; під тіопенталовим наркозом [5] (0,1 мл 10 %-го розчину препарату «Тіопентал» (Корпорація «Артеріум», Україна)), на 100 г маси тіла у правій підщелепній зоні проводили розріз шкіри довжиною 10–12 мм паралельно нижньому краю нижньої щелепи у медіальному напрямку; м'язи розсікали та скелетували нижню щелепу; сепарувальним диском розсікали зовнішню кортикальну пластину і долотом моделювали повний перелом кістки по лінії з'єднання тіла та гілки щелепи в ретромолярній ділянці. Операційну рану з'єднували з ротовою порожниною, м'язи та шкіру ушивали кетгуттом. Через добу тваринам хірургічним шляхом імплантували кріоконсервовані фрагменти плаценти людини: на спині (в зоні лопатки) під інфільтраційною анестезією 0,5%-го розчину новокаїну робили підшкірну кишеньку, в яку вносили стерильний фрагмент кріоконсервованої плаценти масою 20 мг на одну тварину. Розріз зашивали та обробляли антисептиками.

Тканину плаценти кріоконсервували за методикою, розробленою в ІПКіК НАН України [3]. Після заморожування контейнери зі зразками доставляли в низькотемпературний банк, в якому вони зберігалися в рідкому азоті при -196°C . Зразки перевіряли на наявність інфекційних агентів і оцінювали життєздатність кріоконсервованих фрагментів плаценти. Перед імплантацією фрагментів плаценти визначали герметичність і цілісність упаковки, відповідність паспортизації та термінам зберігання. Фрагменти плаценти перед імплантацією розморожували на водяній бані при температурі 38°C з дотриманням всіх умов асептики і антисептики. Частині тварин поряд з імплантацією кріоконсервованих фрагментів плаценти раз на добу вводили цитрат кальцію у терапевтичній дозі 26 мг [12].

На регуляцію репаративного остеогенезу у щурів із переломами кісток впливають запалення, дисбаланс ростових факторів, оксидативний та нітрозативний стрес, порушення обміну кальцію тощо [10]. Тому нами були обрані засоби, які здатні коригувати біохімічні та імунологічні порушення – кріоконсервовану тканину плаценти людини та цитрат кальцію. Використання препаратів кальцію є патогенетично обґрунтованим,

drawn and a traumatic damage to the mandible was simulated [2]: the rat was fixed on a back; under the thiopental anesthesia [9] (0.1 ml of a 10% solution of 'Thiopentalum' (Arterium, Ukraine) per 100 g of body weight) into the right submandibular zone, a cut of skin of 10–12 mm length in parallel to the lower edge of the mandible in a medial direction was performed; the muscles were cut and the lower jaw was skeletoned; separating the external cortical plate with a separating disk and simulating a complete fracture of the bone along the joint of the jaw body and branches in retro-molar area. The surgical wound was joined with an oral cavity, the muscles and skin were catgut sutured. In a day the animals were surgically implanted with cryopreserved fragments of human placenta: on the back (in the area of shoulder blade), under infiltration anesthesia, a 0.5% solution of novocaine there was made a subcutaneous pocket, wherein a sterile fragment of the cryopreserved placenta (20 mg per animal) was injected. The cut was sutured and treated with antiseptics.

The placenta tissue was cryopreserved according to the methods, developed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine [5]. After freezing, the containers with the samples were delivered to a low-temperature bank, where they were stored in a liquid nitrogen at -196°C . The specimens were tested for the presence of infectious agents and there was evaluated the viability of cryopreserved fragments of the placenta. Prior to implantation of the placental fragments, the insulation and integrity of the package, compliance with the certification and storage terms were examined. The placenta fragment before the implantation was thawed on a water bath at 38°C , keeping all the septic and antiseptic conditions. Some animals, along with the implantation of cryopreserved placenta fragments once a day were injected with calcium citrate in a therapeutic dose of 26 mg [21].

The regulation of reparative osteogenesis in rats with bone fractures is affected by inflammation, imbalance of growth factors, oxidative and nitrosative stress, calcium metabolism disturbances, etc. [18]. Therefore, we have chosen the means that can correct biochemical and immunological disorders, *i. e.* the cryopreserved tissue of human placenta and calcium citrate. The use of calcium preparations is pathogenetically grounded, since the disordered metabolism was found at various stages of reparative osteogenesis in the rats with bone fractures on the osteoporosis background.

Biochemical studies were performed in blood serum, which was isolated according to the standard method [14]. The serum was obtained by 30-min



оскільки порушення його обміну було виявлено на різних етапах репаративного остеогенезу у щурів із переломами кісток на тлі остеопорозу.

Біохімічні дослідження проводили на сироватці крові, яку виділяли за стандартною методикою [9]. Сироватку отримували шляхом 30-хвилинного центрифугування крові при 600g та 18–22°C. Аліквоти сироватки крові відбирали в мікропробірки «Erpendorf» («Erpendorf», Австрія) і до проведення аналізу зберігали при –20°C. Вміст вільного та пептидозв'язаного оксипроліну в сироватці крові визначали за реакцією з парадиметиламінобензальдегідом [13], активність кислоти (КФ 3.1.3.2) та лужної (КФ 3.1.3.1) фосфатаз – спектрофотометричним методом за реакцією з паранітрофенілфосфатом при рН 4,8 і 10,5 відповідно [6]. Індекс мінералізації в сироватці крові розраховували як відношення активності лужної та кислоти фосфатаз. Оптичну щільність вимірювали на спектрофотометрі «СФ-26» («ЛЮМО», Росія). Для біохімічних досліджень використовували парадиметиламінобензальдегід, паранітрофенілфосфат («Sigma», США).

Статистичну обробку результатів дослідження проводили в програмах «MS Excel XP» та «SPSS-10.0.5 for Windows» (SPSS, США). Міжгрупову різницю оцінювали за непараметричним U-критерієм Манна-Уїтні.

Результати та обговорення

Встановлено, що застосування кріоконсервованої тканини плаценти та цитрату кальцію протидіє надмірному катаболізму колагену у щурів за умов перелому нижньої щелепи на тлі остеопорозу. Вільна фракція оксипроліну, яка утворюється внаслідок розпаду колагену, повторно не залучається до метаболічних процесів, на відміну від інших амінокислот. За відхиленням концентрації вільної фракції оксипроліну від нормальних величин можна визначити катаболізм колагену, ступінь резорбції кісткової тканини, оскільки колаген є основним білком, який приймає участь у її формуванні [8].

На 7-му добу після імплантації кріоконсервованої плаценти рівень вільного оксипроліну у тварин груп 2 та 3 був значуще менше (на 15,6 та 28,5% відповідно) порівняно з контролем, причому в групі 3 значуще менше (на 15,2%), ніж у групі 2. Більш тривала дія препаратів мала більш виражену дію на катаболізм колагену: на 14-ту та 21-шу доби у щурів групи 2 він був меншим на 41,8 та 23,6% відповідно, а в групі 3 – на 51,8 та 29,5% відповідно порівняно з контролем. Отже, підвищення рівня вільного оксипроліну у щурів контрольної групи порівняно з групами 2 та

blood centrifugation at 600g at 18–22°C. Blood serum aliquots were taken into Erpendorf (Erpendorf, Austria) microtubes and stored at –20°C prior to the analysis. The content of free and peptidoblast oxyproline in serum was determined by reaction with paradimethylaminobenzaldehyde [16], activity of acidic (EC 3.1.3.2) and alkaline phosphatases (EC 3.1.3.1) was done with spectrophotometric method by the reaction with paranytrophenyl phosphate at pH 4, 8 and 10.5, respectively [10]. The index of mineralization in serum was calculated as the ratio of activity of alkaline and acidic phosphatases. The optical density was measured with a spectrophotometer SF-26 (LOMO, Russia). For biochemical studies, paradimethylaminobenzaldehyde, paranytrophenyl phosphate (Sigma, USA) were used.

The research findings were statistical processed by means of MS Excel XP and SPSS-10.0.5 for Windows (SPSS, USA, license number 305147890). The intergroup difference was estimated by non-parametric U-criterion Mann-Whitney.

Results and discussion

It has been established that the use of cryopreserved placenta tissue and calcium citrate counteracts the excessive catabolism of collagen in rats with the fracture of the mandible on the osteoporosis background. The free fraction of oxyproline, which is formed by collagen collapse, is not re-involved in metabolic processes, unlike other amino acids. Deviation of the concentration of the free fraction of oxyproline from normal values can determine the collagen catabolism, degree of resorption of bone tissue, since collagen is the main protein that participates in its formation [13].

To day 7 after implantation of cryopreserved placenta, the level of free hydroxyproline in the animals of groups 2 and 3 was significantly lower (15.6 and 28.5%, respectively) if compared to the control, while in group 3 that was significantly lower (15.2%) than in group 2. Longer effect of drugs had a more pronounced influence on collagen catabolism: to day 14 and 21 in the rats of group 2, it was lower by 41.8 and 23.6%, respectively, while in group 3 it was by 51.8 and 29.5%, respectively, versus the control. Consequently, the increase of free oxyproline in rats in the control group compared with groups 2 and 3 indicates an enhanced catabolic phase of metabolism of the main components of the bone tissue organic basis. In addition, within these terms, significant differences in the level of free oxyproline are noted: in group 3 to day 14 it was lower by 17.3%, and to 21 day it made 7.7%, as for the animals of group 2 (Table 1).



Таблиця 1. Вміст вільного оксипроліну у сироватці крові щурів у різні терміни репаративного остеогенезу після імплантації кріоконсервованих фрагментів плаценти людини і введення цитрату кальцію ($M \pm \sigma$)
Table 1. Content of free oxypoline in blood serum of rats in different terms of reparative osteogenesis after implantation of cryopreserved human placenta fragments and introduction of calcium citrate ($M \pm \sigma$)

Строки дослідження, доба Terms of study, days	Вміст вільного оксипроліну, мкмоль/л Content of free oxypoline, $\mu\text{m}/\text{l}$		
	ПНЩ+ОП MF+ OP	ПНЩ+ОП+КП MF + OP + PT	ПНЩ+ОП+КП+Ca MF + OP + PT + Ca
7	35,8 \pm 0,61	30,2 \pm 0,69*	25,6 \pm 0,63**
14	48,8 \pm 0,67#	28,4 \pm 0,71*	23,5 \pm 0,64**#
21	32,2 \pm 0,12#&	24,6 \pm 0,64*#&	22,7 \pm 0,57**#
30	26,8 \pm 0,50#&	23,1 \pm 0,66*#&	22,1 \pm 0,69#
45	23,2 \pm 0,54#&	22,4 \pm 0,61#&^	21,1 \pm 0,56#&

Примітки: Різниця статистично значуща відносно показників: * – тварин групи 1 відповідного строку дослідження; # – на 7-му добу; & – на 14-ту добу; ^ – на 21-шу добу; \$ – між показниками груп 2 та 3 відповідного строку дослідження ($p < 0,05$).

Notes: Difference is statistically significant versus the indices of: * – animals of group 1 of the corresponding study period; # – to day 7; & – to day 14; ^ – to day 21; \$ – between groups 2 and 3 of the corresponding study period ($p < 0.05$).

З свідчить про посилену катаболічну фазу метаболізму основних компонентів органічної основи кісткової тканини. Крім того, в ці строки відмічаються значущі відмінності рівня вільного оксипроліну: у групі 3 на 14-ту добу він менше на 17,3%, а на 21-шу добу – на 7,7% відносно групи 2 (табл. 1).

Таким чином, комбіноване застосування кріоконсервованої тканини плаценти людини і цитрату кальцію, який посилює біосинтез колагену, тваринам із відкритим переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу мало найбільший ефект.

Поряд зі збільшенням концентрації вільної фракції оксипроліну (біохімічного маркера резорбції кісткової тканини) знижується вміст протеїн-зв'язаної фракції цієї амінокислоти – пептидозв'язаного оксипроліну (біохімічний маркер синтетичної фази метаболізму колагену) [10]. На 7-му добу після комбінованого застосування кріоконсервованої тканини плаценти людини та цитрату кальцію значущих змін у процесі колагеноутворення виявлено не було, однак на 14-ту добу лише після поєднаного застосування досліджуваних препаратів посилювався біосинтез колагену: рівень пептидозв'язаного оксипроліну в сироватці крові значуще перевищив (на 28,1 та 29,0% відповідно) показники тварин груп 1 та 2. На 21-шу добу від початку фармакотерапії відмічався найбільш потужний вплив вказаних препаратів на синтез колагену: вміст у сироватці пептидозв'язаного оксипроліну в групах 2

Thus, the combined use of cryopreserved human placenta tissue and calcium citrate, which enhances the biosynthesis of collagen, to animals with an open fracture of the mandible on the osteoporosis background, has had the strongest effect.

Along with an increased concentration of free fraction of oxypoline (a biochemical marker of bone resorption), the content of the protein-bound fraction of this amino acid, *i. e.* peptide-bound oxypoline (a biochemical marker of the synthetic phase of collagen metabolism) was reduced [18]. To day 7 after the combined application of cryopreserved tissue of human placenta and calcium citrate, no significant changes were observed in the process of collagen formation, however, on the 14th day only after the combined application of the studied drugs the biosynthesis of collagen was intensified: the level of peptidoblast oxypoline in serum significantly exceeded (by 28.1 and 29.0% respectively), the indices for the animals of groups 1 and 2. To day 21 from the pharmacotherapy beginning there was the most potent effect of these drugs on the collagen synthesis: the serum content of peptide-bound oxypoline in groups 2 and 3 significantly exceeded (by 21.4 and 35.2%, respectively) the control values. Under these conditions, in this group, the level of this metabolite in serum was significantly higher (11.4%) than in group 2. At day 30 after the pharmacotherapy in the animals of groups 2 and 3, the level of peptide-bound oxypoline in serum was lower than within the previous observation period



та 3 значуще перевищив (на 21,4 та 35,2% відповідно) показники контролю. За цих умов у групі 3 рівень цього метаболіту в сироватці крові був значуще вище (на 11,4 %), ніж у групі 2. На 30-ту добу після фармакотерапії у тварин груп 2 та 3 рівень пептидозв'язаного оксипроліну в сироватці крові був менше, ніж на попередньому терміні спостереження (13,0 та 19,1% відповідно) відносно контрольної групи. Одержані дані свідчать про стабілізацію метаболізму в кістковій тканині, що проявляється зниженням негативних наслідків перелому на тлі остеопорозу (табл. 2).

Відомо, що внаслідок посилення активності остеобластів при переломах кісток в крові підвищується рівень лужної фосфатази [7], яка сприяє відщепленню фосфату від органічних речовин і приймає важливу участь у мінералізації кістки, формуванні апатитів і органічного матриксу. Дослідження динаміки показників лужної фосфатази необхідне для прогнозування перебігу переломів кісток лицьового скелета [10].

Після проведеної фармакотерапії спостерігалось посилення остеогенезу у щурів із змодельованою патологією, при чому комбіноване застосування кріоконсервованої тканини плаценти та цитрату кальцію мало більший протективний ефект. На 7-му добу було виявлено, що остеогенез у тварин дослідних груп значуще не відрізнявся від такого в контрольній групі. Найбільш

(13.0% and 19.1%, respectively) versus the control group. The obtained data testify to the stabilization of metabolism in bone tissue, which is manifested with a decrease in negative effects of the fracture on the osteoporosis background (Table 2).

It is known that due to an increased osteoblast activity, bone fractures in the blood increase the level of alkaline phosphatase [11], which contributes to the depletion of phosphate from organic matter and takes an important part in bone mineralization, the formation of apatites and organic matrix. Investigation of the dynamics of indices of alkaline phosphatase is necessary for prediction of the course of the facial skeleton bone fractures [18].

After the pharmacotherapy, there was an increase in osteogenesis in the rats with a simulated pathology, moreover the combined use of cryopreserved tissue of placenta and calcium citrate had a much greater protective effect. At day 7 it was found that osteogenesis in the animals of experimental groups did not differ significantly from that in the control group. The most potent effect of cryopreserved placental tissue and calcium citrate on osteo-reparation processes was recorded to day 14: in serum blood of the animals of groups 2 and 3, the activity of alkaline phosphatase significantly exceeded (by 15.3 and 19.8%, respectively) the indices for the animals of the control group. In group 3, it was significantly higher than in group 2. In a later study period (21 days), alkaline phosphatase activity in

Таблиця 2. Вміст пептидозв'язаного оксипроліну у сироватці крові щурів із відкритим переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу після імплантації кріоконсервованих фрагментів плаценти людини і введення цитрату кальцію ($M \pm \sigma$)

Table 2. Content of peptide-bound oxyproline in blood serum of rats with an open fracture of mandible on osteoporosis background in different terms of reparative osteogenesis after implantation of cryopreserved human placenta fragments and introduction of calcium citrate ($M \pm \sigma$)

Строки дослідження, доба Terms of study, days	Вміст пептидозв'язаного оксипроліну, мкмоль/л Content of peptide-bound oxyproline, $\mu\text{m}/\text{l}$		
	ПНЩ + ОП MF + OP	ПНЩ + ОП + КП MF + OP + PT	ПНЩ + ОП + КП + Ca MF + OP + PT + Ca
14	28,8 \pm 1,27	28,6 \pm 1,31	36,9 \pm 1,35 ^{**§}
21	33,2 \pm 1,47 ^{#&}	40,3 \pm 1,45 ^{**§}	44,9 \pm 1,13 ^{**§§}
30	39,2 \pm 1,58 ^{#&}	44,3 \pm 0,96 ^{#&}	46,7 \pm 1,41 ^{#&}
45	28,1 \pm 1,23	28,5 \pm 1,31	29,3 \pm 1,18 ^{&}
45	23,2 \pm 0,54 ^{#&}	22,4 \pm 0,61 ^{#&^}	21,1 \pm 0,56 ^{#&}

Примітки: Різниця статистично значуща відносно показників: * – тварин групи 1 відповідного строку дослідження; # – на 7-му добу; & – на 14-ту добу; ^ – на 21-шу добу; § – між показниками груп 2 та 3 відповідного строку дослідження ($p < 0,05$).

Notes: Difference is statistically significant versus the indices of: * – animals of group 1 of the corresponding study period; # – to day 7; & – to day 14; ^ – to day 21; § – between groups 2 and 3 of the corresponding study period ($p < 0.05$).

потужний вплив фрагментів кріоконсервованої тканини плаценти та цитрату кальцію на процеси остеорепації реєструвався саме на 14-ту добу: в сироватці крові щурів груп 2 та 3 активність лужної фосфатази значуще перевищувала (на 15,3 та 19,8% відповідно) показник тварин контрольної групи. При цьому у групі 3 він був значуще вищим, ніж у групі 2. У більш пізній термін дослідження (21-ша доба) активність лужної фосфатази в групах 2 та 3 була значуще вищою (на 11,0 та 11,2% відповідно), ніж у тварин контрольної групи (табл. 3).

Підвищення активності лужної фосфатази можна вважати позитивною прогностичною ознакою клінічного перебігу та консолідації уламків кістки. Даний показник підвищується відразу після травми (в результаті пошкодження кістки) і залишається таким протягом усього періоду зрощення перелому (за рахунок активізації остеобластів), у процесі репарації він поступово наближається до нормальних значень [10]. Так, на 30-ту добу у щурів груп 2 та 3 активність цього ферменту була значуще менше (на 16,8 та 19,3% відповідно), ніж на 21-шу добу та на 14,0 та 16,4% порівняно з контролем. На 45-ту добу активність лужної фосфатази в дослідних групах тварин відповідала контрольним значенням.

Використання кріоконсервованої тканини плаценти людини й особливо в комбінації з цитра-

groups 2 and 3 was significantly higher (11.0 and 11.2% respectively), than in the animals of the control group. (Table 3)

Increased activity of alkaline phosphatase can be considered as a positive predictor of clinical course and consolidation of bone debris. This index rises immediately after the injury (as a result of bone damage) and remains the same throughout the fracture fusion period (due to the activation of osteoblasts); in the process of repair, it gradually decreases to normal values [18]. Thus, to day 30 in groups 2 and 3, the activity of this enzyme was significantly lower (by 16.8% and 19.3%, respectively) if compared to day 21 and by 14.0% and 16.4%, respectively the control. To day 45, the activity of alkaline phosphatase in experimental groups of animals was in line with the control value.

The use of cryopreserved human placental tissue, especially in combination with calcium citrate, has had a depressive effect on the processes of bone tissue destruction under experimental pathology (Table 4). Osteoclasts contain a large amount of acid phosphatase and, during resorption, secrete it into extracellular medium. Since the activity of this enzyme in serum increases as bone resorption intensifies, and there is a correlation between its activity and histomorphometric data, this index is used to determine the severity of destructive bone processes [7].

Таблиця 3. Активність лужної фосфатази у сироватці крові щурів із відкритим переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу після імплантації кріоконсервованих фрагментів плаценти людини і введення цитрату кальцію ($M \pm \sigma$)

Table 3. Activity of alkaline phosphatase in blood serum of rats with open fracture of mandible on steoporosis background in different terms of reparative osteogenesis after implantation of cryopreserved human placenta fragments and introduction of calcium citrate ($M \pm \sigma$)

Строки дослідження, доба Terms of study, days	Активність лужної фосфатази, Од/л Activity of alkaline phosphatase, Units/l		
	ПНЦ + ОП MF + OP	ПНЦ + ОП + КП MF + OP + PT	ПНЦ + ОП + КП + Ca MF + OP + PT + Ca
7	460 ± 8,28	454 ± 8,44	462 ± 7,93
14	464 ± 5,85	535 ± 7,02**	556 ± 6,80**§
21	535 ± 6,25*^	594 ± 8,10*^§	595 ± 6,99*^§
30	574 ± 8,54*^	494 ± 8,96*^§	480 ± 6,55*^§
45	465 ± 9,02	453 ± 8,44*^	448 ± 8,22*^

Примітки: Різниця статистично значуща відносно показників: * – тварин групи 1 відповідного строку дослідження; # – на 7-му добу; & – на 14-ту добу; ^ – на 21-шу добу; § – між показниками груп 2 та 3 відповідного строку дослідження ($p < 0,05$).

Notes: Difference is statistically significant versus the indices of: * – animals of group 1 of the corresponding study period; # – to day 7; & – to day 14; ^ – to day 21; § – between groups 2 and 3 of the corresponding study period ($p < 0.05$).

том кальцію викликало депримуєчий ефект на процеси деструкції кісткової тканини за умов експериментальної патології (табл. 4). Остеокласти вміщують велику кількість кислоти фосфатази і під час резорбції секретують її у позаклітинне середовище. Активність даного ферменту в сироватці крові зростає, коли посилюється резорбція кістки. Тому цей показник використовують для визначення вираженості деструктивних і репаративних процесів у кістці [18].

Підвищення активності кислоти фосфатази може бути зумовлено розвитком запального процесу внаслідок перелому і посиленням активності остеобластів за рахунок посттравматичного стресу [8]. Так, на 7-му добу після проведення комбінованої терапії активність кислоти фосфатази, як маркера кісткової резорбції, була значуще менше (на 11,3%) відносно контролю, проявляючи протекторну дію. Найбільша протекторна дія вказаних препаратів реалізувалася на 14-ту добу: в групах 2 та 3 активність кислоти фосфатази в сироватці крові була значуще менше (на 12,7 та 22,8% відповідно) порівняно з контролем. Важливо, що саме в цей термін активність кислоти фосфатази в сироватці крові тварин групи 3 була значуще менше (на 11,5%), ніж у тварин групи 2, найменша її активність – на 30–45-ту добу. Так, на 30-ту добу у тварин груп 2 та 3 активність даного ферменту була значуще менше (на 19,7 та 25,9% відповідно) порівняно з 21-ю добою, що свідчить про позитивну динаміку кісткової репарації – переважання процесів формування над резорбцією після застосування досліджуваних препаратів.

Запропонована терапія, особливо комбінована, сприяла посиленню процесів мінералізації кісткової тканини щурів (табл. 5). Ранній вплив відмічався на 7-му добу і був значуще вищим (на 13,4%) відносно контролю. У тварин із моделюваною нижньощелепною травмою без застосування кріоконсервованої тканини плаценти і цитрату кальцію спостерігалось зниження індексу мінералізації кісткової тканини, що зумовлено активацією остеобластів та посиленням процесів

Таблиця 4. Активність кислоти фосфатази у сироватці крові щурів із відкритим переломом нижньої щелепи на тлі остеопорозу в різні терміни репаративного остеогенезу після імплантації кріоконсервованих фрагментів плаценти людини і введення цитрату кальцію ($M \pm \sigma$)

Table 4. Activity of acid serum phosphatase in blood serum of rats with open fracture of mandible on osteoporosis background in different terms of reparative osteogenesis after implantation of cryopreserved human placenta fragments and calcium citrate ($M \pm \sigma$)

Строки дослідження, доба Terms of study, days	Активність лужної фосфатази, Од/л Activity of alkaline phosphatase, Units/l		
	ПНЩ + ОП MF + OP	ПНЩ + ОП + КП MF + OP + PT	ПНЩ + ОП + КП + Ca MF + OP + PT + Ca
7	16,8 ± 0,43	15,9 ± 0,49	14,9 ± 0,65*
14	18,9 ± 0,57 [#]	16,5 ± 0,42*	14,6 ± 0,47**
21	16,5 ± 0,69 [§]	14,8 ± 0,43 ^{##}	14,7 ± 0,37*
30	15,0 ± 0,22 ^{##^}	12,2 ± 0,23 ^{##^}	11,8 ± 0,36 ^{##^}
45	11,9 ± 0,54 ^{##^}	11,1 ± 0,49 ^{##^}	10,9 ± 0,57 ^{##^}

Примітки: Різниця статистично значуща відносно показників: * – тварин групи 1 відповідного строку дослідження; # – на 7-му добу; § – на 14-ту добу; ^ – на 21-шу добу; § – між показниками груп 2 та 3 відповідного строку дослідження ($p < 0,05$).

Notes: Difference is statistically significant versus the indices of: * – animals of group 1 of the corresponding study period; # – to day 7; § – to day 14; ^ – to day 21; § – between groups 2 and 3 of the corresponding study period ($p < 0.05$).

Increased activity of acid phosphatase may result from the development of inflammation because of the fracture and increased osteoblast activity as a result of post-traumatic stress [13]. Thus, to day 7 after the combined therapy, the activity of acid phosphatase, as a marker of bone resorption, was significantly lower (by 11.3%) versus the control, showing a protective effect. The highest protective effect of these drugs was implemented to day 14: in groups 2 and 3, the activity of acid phosphatase in serum was significantly lower (by 12.7 and 22.8%, respectively) if compared to control. It is important that during this period, the activity of acid phosphatase in blood serum of the animals of group 3 was significantly less (11.5%) than in the animals of group 2, its lowest activity was observed to days 30–45. Thus, to day 30 in the animals of groups 2 and 3, the activity of this enzyme was significantly lower (19.7 and 25.9%, respectively) if compared to day 21, indicating a positive dynamics of bone repair, *i. e.* the predominance of the formation processes over a resorption after application of the studied drugs.

The proposed therapy, especially combined, contributed to an increase in the processes of mineralization of bone tissue in rats (Table 5).

резорбції кісткової тканини [17]. Можливо, що ці порушення викликані виробкою прозапальних цитокінів внаслідок травми [2].

Найбільш виражена дія кріоконсервованої тканини плаценти та цитрату кальцію реєструвалася саме на 14-ту добу дослідження: у тварин груп 2 та 3 індекс мінералізації був значуще вище (на 31,7 та 55,3%), ніж у контрольній групі, у тварин групи 3 він був значуще більше (на 17,9%), ніж у групі 2. Одержані дані підтверджують терапевтичну ефективність комбінованого застосування кріоконсервованих фрагментів плаценти та цитрату кальцію. На 21-шу добу в групах 2 та 3 індекс мінералізації був значуще вище, ніж після імплантації кріоконсервованих фрагментів тканини плаценти (на 23,2 та 24,2% відповідно) відносно контролю.

Отже, отримані результати свідчать про остеопротекторну дію кріоконсервованої тканини плаценти людини за умов модельованої патології, яка виявляється в посиленні процесів колагеноутворення (максимум на 30-ту добу), мінералізації кісткової тканини (максимум на 14-ту добу), а також депривуючому впливі на остеодеструктивні процеси (максимум на 14-ту добу) та катаболізм колагену (максимум на 14-ту добу).

Висновки

1. Застосування кріоконсервованої тканини плаценти щурам за умов відкритого перелому нижньої щелепи на тлі остеопорузу має високу остеопротекторну дію, яка виявляється у нормалізації метаболічних процесів у кістковій тканині. На 21-шу добу експерименту визначався найбільш виражений стимулюючий вплив кріоконсервованої тканини плаценти на остеогенез та біосинтез колагену (активність лужної фосфатази та вміст пептидозв'язаного оксипроліну на 11,0 та 21,4% відповідно перевищували контрольні показники).

2. Комбіноване застосування кріоконсервованої тканини плаценти та цитрату кальцію виявляло потужну остеопротекторну дію вже на 7–14-ту добу експерименту, ніж після монотерапії.

Таблиця 5. Індекс мінералізації кісткової тканини щурів із відкритим переломом нижньої щелепи на тлі остеопорузу в різні терміни репаративного остеогенезу після імплантації кріоконсервованих фрагментів плаценти людини і введення цитрату кальцію ($M \pm \sigma$)

Table 5. Index of mineralization of bone tissue of open mandible fractures on osteoporosis background in different terms of reparative osteogenesis after implantation of cryopreserved human placenta fragments and introduction of calcium citrate ($M \pm \sigma$)

Строки дослідження, доба Terms of study, days	Індекс мінералізації кісткової тканини Index of mineralization of bone tissue		
	ПНЩ+ОП MF+OP	ПНЩ+ОП+КП MF+OP+PT	ПНЩ+ОП+КП+Ca MF+OP+PT+Ca
7	27,6 ± 0,88	28,8 ± 1,03	31,3 ± 1,18*
14	24,6 ± 0,55 [†]	32,4 ± 0,77 ^{##}	38,2 ± 1,39 ^{##*}
21	32,7 ± 1,12 ^{##}	40,3 ± 1,13 ^{##*}	40,6 ± 1,42 ^{##}
30	38,3 ± 0,79 ^{##^}	40,5 ± 0,95 ^{##}	40,9 ± 2,19 [†]
45	39,4 ± 1,46 ^{##^}	41,3 ± 1,60 ^{##}	41,6 ± 1,68 [†]

Примітки: Різниця статистично значуща відносно показників: * – тварин групи 1 відповідного строку дослідження; # – на 7-му добу; & – на 14-ту добу; ^ – на 21-шу добу; \$ – між показниками груп 2 та 3 відповідного строку дослідження ($p < 0,05$).

Notes: Difference is statistically significant versus the indices of: * – animals of group 1 of the corresponding study period; # – to day 7; & – to day 14; ^ – to day 21; \$ – between groups 2 and 3 of the corresponding study period ($p < 0.05$).

Early impact was noted on the 7th day and was significantly stronger (by 13.4%) as for the control. In the animals with simulated lower limb trauma without using the cryopreserved placental tissue and calcium citrate, there was a decrease in the mineralization index of bone tissue due to osteoblast activation and increased bone tissue resorption [6]. These disorders are likely to be caused by the development of proinflammatory cytokines as a result of an injury [4].

The most pronounced effect of cryopreserved tissue of the placenta and calcium citrate was recorded on the 14th day of the study: in animals of groups 2 and 3, the mineralization index was significantly higher (by 31.7 and 55.3%) than in the control group, in animals of group 3 it was significantly higher (17.9%) than in group 2. The obtained data confirm the therapeutic efficiency of the combined application of cryopreserved placental fragments and calcium citrate. To day 21 in groups 2 and 3, the mineralization index was significantly higher than after implantation of cryopreserved tissue fragments of the placenta (23.2 and 24.2% respectively) relative to the control.

Thus, the obtained results testify to the osteoprotective effect of cryopreserved human placental



На 14-ту добу експерименту зафіксовано максимальний активуючий вплив комбінованої терапії на остеогенез та біосинтез колагену (активність лужної фосфатази та вміст пептидозв'язаного оксипроліну на 20,0 та 28,1% відповідно перевищували контрольні показники).

Подальші дослідження в цьому напрямку дозволять розкрити молекулярні механізми, через які реалізується остеопротекторна дія криоконсервованої тканини плаценти людини при відкритому переломі нижньої щелепи на тлі остеопорозу.

Література

1. Бедик ОВ, Поліщук СС, Шувалов СМ, винахідники; Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, патентовласник. Спосіб моделювання стандартизованих переломів нижньої щелепи в експерименті. Патент України № 63813U. 25.10.2011.
2. Галицкая АК, Борткевич ОП. Применение препаратов кальция для профилактики и лечения остеопороза. Український ревматологічний журнал. 2002; 10(4): 37–40.
3. Гольцев АН, Юрченко ТН, редакторы. Плацента: криоконсервирование, клиническое применение. Харьков: 2013. 318 с.
4. Копчак АВ. Безпосередні та віддаленні результати хірургічного лікування хворих з приводу травматичного перелому нижньої щелепи. Клінічна хірургія. 2014; (1): 56–60.
5. Криворучко ІА, Гольцев КА, Грищенко ВИ, и др. Комплексное лечение острого гнойного перитонита с применением криоконсервированной кордовой крови. Харківська хірургічна школа. 2011; 51(6): 47–52.
6. Левицкий АП, Макаренко ОА, Деньга ОВ. Экспериментальные методы исследования стимуляторов остеогенеза: методические рекомендации. Киев: ГФЦ, 2005. 30 с.
7. Левицкий АП, Макаренко ОА, Ходаков ІВ, та ін. Ферментативный метод оцінки стану кісткової тканини. Одеський медичний журнал. 2006; (3): 17–21.
8. Мамонов РО, Ілленко НА. Біохімічні зміни у сироватці крові хворих на переломи нижньої щелепи. Український науково-медичний молодіжний журнал. 2013; 2(2): 264.
9. Меньшикова ВВ. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник. Москва: Медицина, 1987. 368 с.
10. Сікора ВЗ, Погорелов МВ, Бумейстер ВІ, та ін. Біохімічні показники крові в різні терміни репаративного остеогенеза. Проблемы достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения. Труды Крымского государственного медицинского университета им. С.И. Георгиевского. 2007; 143 (Част. 4): 84–6.
11. Сорокін БВ, Костенко ВО. Зміни компонентів органічного матриксу кісткової тканини щурів при відтворенні експериментального остеопорозу за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію. Вісник ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія». 2013; 42(2): 220–4.
12. Стефанов ОВ. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекомендації. Київ: Авіцена, 2001. 528 с.
13. Шараев ПН, Сахабутдинова ЕП, Лекомцева ОІ, и др. Определение свободного и пептидно-связанного гидроксипролина в сыворотке крови. Клиническая лабораторная диагностика. 2009; (1): 7–9.
14. Шевченко НО, Сомова КВ, Воліна ВВ, и др. Динаміка активності та тривалості функціонування криоконсервованих крио-

tissue under the conditions of the simulated pathology, which is manifested in the strengthening of collagen formation processes (maximum for day 30), mineralization of bone tissue (maximum for day 14), as well as the deprivation effect on osteodestructive processes (maximum to day 14) and catabolism of collagen (maximum for to day 14).

Conclusions

1. The use of cryopreserved placental tissue in rats during an open fracture of the mandible on an osteoporosis background had a high osteoprotective effect, which was manifested in the normalization of metabolic processes in bone tissue. To day 21 of the experiment, the most pronounced stimulating effect of the cryopreserved placental tissue on osteogenesis and collagen biosynthesis was determined (alkaline phosphatase activity and peptide-bound oxyproline content by 11.0 and 21.4% respectively exceeded the control values).

2. Combined use of cryopreserved placental tissue and calcium citrate demonstrated a strong osteoprotective effect already to days 7–14 of the experiment if compared with that after monotherapy. At day 14 of the experiment, the maximum activating effect of combined therapy on osteogenesis and collagen biosynthesis was recorded (alkaline phosphatase activity and peptide-bound oxyproline content by 20.0 and 28.1%, respectively, exceeded the control values).

Further research in this direction will reveal the molecular mechanisms through which the osteoprotective effect of the cryopreserved human placenta tissue during an open fracture of the mandible on the osteoporosis background is implemented.

References

1. Arosarena O, Ducic Y, Tollefson TT. Mandible fractures: discussion and debate. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2012; 20(3): 347–63.
2. Bedyk OV, Polishchuk SS, Shuvalov SM, inventors; National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, assignee. [Method of modeling of standardized fractures of the mandible in the experiment.] Patent of Ukraine 63813U. 2011 October 25. Ukrainian.
3. Dillon JK, Christensen B, McDonald T, et al. The financial burden of mandibular trauma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012; 70(9): 2124–34.
4. Galytska AK, Bortkevich OP. [Application of calcium medications for prophylaxis and treatment of osteoporosis]. *Ukrayins'kyi revmatolohichnyy zhurnal.* 2002; 10(4): 37–40. Russian
5. Goltsev AN, Yurchenko TN, editors. [Placenta: cryopreservation, clinical use. Kharkiv: Brovin AV, 2013. 318 p. Russian.
6. Grimm WD, Ploger M, Schau I. et al. Implex, three-dimensional reconstruction of critical size defects following delayed implant placement using stem cell-containing subepithelial connective

- екстракту, клітин та фрагментів плаценти в організмі експериментальних тварин. *Morphologia* [Internet]. 2016; 10(2): 93-8. [Cited 01.01.2019] Available from: <http://morphology.dma.dp.ua/article/view/139666/136647>.
15. Arosarena O, Ducic Y, Tollefson TT. Mandible fractures: discussion and debate. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2012; 20(3): 347–63.
 16. Dillon JK, Christensen B, McDonald T, et al. The financial burden of mandibular trauma. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012; 70(9): 2124–34.
 17. Grimm WD., Ploger M, Schau I, et al. Implex, three-dimensional reconstruction of critical size defects following delayed implant placement using stem cell-containing subepithelial connective tissue graft and allogenic human bone blocks for horizontal alveolar bone augmentations case report as proof of clinical study principles. *Медицинський вестник Северного Кавказа*. 2014; 9 (2): 131–3.
 18. Ibrahim N, Mohamad S, Mohamed N, et al. Experimental fracture protocols in assessments of potential agents for osteoporotic fracture healing using rodent models. *Curr Drug Targets*. 2013; (14): 1642–50.
 19. Liu W, Morschauser A, Zhang X, et al. Human placenta-derived adherent cells induce tolerogenic immune responses. *Clin Transl Immunology*. 2014; 3(5): 14.
 20. Robbins JA, Aragaki A, Crandall CJ, et al. Women's Health Initiative clinical trials: interaction of calcium and vitamin D with hormone therapy. *Menopause*. 2014; (21): 116–23.
 21. Silini AR, Cargnoni A, Magatti M, et al. The long path of human placenta, and its derivatives, in regenerative medicine. *Biotechnology*, 2015; 19(3): 162.
 22. Tai V, Leung W, Grey A, et al. Calcium intake and bone mineral density: systematic review and meta-analysis. *BMJ* [Internet]. 2015; (351): 4183. [Cited 01.01.2019] Available from: <https://www.bmj.com/content/351/bmj.h4183>.
 23. Tu KN, Lie JD, Wan CKV, et al. Osteoporosis: A Review of Treatment Options. *PMC*. 2018; 43(2): 92–104.
 - tissue graft and allogenic human bone blocks for horizontal alveolar bone augmentations case report as proof of clinical study principles. *Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza*. 2014; 9 (2): 131–3.
 7. Ibrahim N, Mohamad S, Mohamed N, et al. Experimental fracture protocols in assessments of potential agents for osteoporotic fracture healing using rodent models. *Curr Drug Targets*. 2013; (14): 1642–50.
 8. Kopchak AV. [Direct and distant results of surgical treatment of patients with traumatic fracture of the mandible]. *Klinicheskaia khirurgiia*. 2014; (1): 56–60. Ukrainian.
 9. Krivoruchko IA, Goltsev KA, Grishchenko VI, et al. [Combined treatment of acute purulent peritonitis with cryopreserved cord blood]. *Kharkiv surgical school*. 2011; 51(6): 47–52. Russian
 10. Levitsky AP, Makarenko OA, Denga OV. [Experimental methods for the study of osteogenesis stimulants: method. recommendations]. Kyiv: GFTs, 2005. 30 p. Russian.
 11. Levitsky AP, Makarenko OA, Khodakov IV, et al. [An enzymatic method for assessing the state of bone tissue]. *The Odessa Medical Journal*. 2006; (3): 17–21. Ukrainian.
 12. Liu W, Morschauser A, Zhang X, et al. Human placenta-derived adherent cells induce tolerogenic immune responses. *Clin Transl Immunology*. 2014; 3(5): 14.
 13. Mamonov RO, Illienko NA. [Biochemical changes in serum of patients with fractures of the mandible]. *Ukrayins'kyi naukovomedychnyy molodizhnyy zhurnal* 2013; 2(2): 264. Ukrainian
 14. Menshikova VV. [Laboratory research methods in the clinic: a Handbook]. Moscow: Meditsina, 1987. 368 p. Russian
 15. Robbins JA, Aragaki A, Crandall CJ, et al. Women's Health Initiative clinical trials: interaction of calcium and vitamin D with hormone therapy. *Menopause*. 2014; (21): 116–23.
 16. Sharaev PN, Sakhabutdinova EP, Lekomtseva OI, et al. [Determination of free and peptide-bound hydroxyproline in serum]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2009; (1): 7–9. Russian.
 17. Shevchenko NO, Somova KV, Volina VV, et al. [Dynamics of activity and duration of functioning of cryopreserved cryoextract, cells and fragments of placenta in the organism of experimental animals]. *Morphologia* [Internet]. 2016; 10(2): 93-8. [Cited 01.01.2019] Available from: <http://morphology.dma.dp.ua/article/view/139666/136647>.
 18. Sikora VZ, Pogorelov MV, Bumeister VI, et al. [Biochemical parameters of blood in different terms of reparative osteogenesis]. *Problemy, dostizheniya i perspektivy razvitiya medikobiologicheskikh nauk i prakticheskogo zdravookhraneniya Trudy Krymskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta im SI Georgiyevskogo*. 2007; 143(Pt.4): 84–6. Ukrainian.
 19. Silini AR, Cargnoni A, Magatti M, et al. The long path of human placenta, and its derivatives, in regenerative medicine. *Biotechnology*. 2015; 19(3): 162.
 20. Sorokin BV, Kostenko VO. [Alterations of components of organic bone matrix in rats under modeled osteoporosis and chronic sodium nitrate intoxication]. *Actual Problems of the Modern Medicine: Bulletin of Ukrainian Medical Stomatological Academy*. 2013; 42(2): 220–4. Ukrainian.
 21. Stefanov OV. [Preclinical research of drugs: method. recommendations]. Kyiv: Avitsenna, 2001. 528 p. Ukrainian.
 22. Tai V, Leung W, Grey A, et al. Calcium intake and bone mineral density: systematic review and meta-analysis. *BMJ* [Internet]. 2015; (351): 4183. [Cited 01.01.2019] Available from: <https://www.bmj.com/content/351/bmj.h4183>.
 23. Tu KN, Lie JD, Wan CKV, et al. Osteoporosis: A Review of Treatment Options. *PMC*. 2018; 43(2): 92–104.