

УДК 615.361:615.451.1:618.46]:57.086.13:616-003.9

О.М. Боброва<sup>1\*</sup>, Є.Й. Науменко<sup>1</sup>, М.І. Щетинський<sup>1</sup>,  
С.В. Нарожний<sup>1</sup>, О.А. Нардід<sup>1,2</sup>, М.М. Калашникова<sup>1</sup>, І.І. Щетинська<sup>3</sup>

## Вплив низькотемпературного зберігання плаценти на протизапальні та ранозагоювальні властивості її екстрактів

UDC 615.361:615.451.1:618.46]:57.086.13:616-003.9

О.М. Bobrova<sup>1\*</sup>, Ye.Yo. Naumenko<sup>1</sup>, M.I. Shchetinskyi<sup>1</sup>,  
S.V. Narozhnyi<sup>1</sup>, O.A. Nardid<sup>1,2</sup>, M.M. Kalashnykova<sup>1</sup>, I.I. Shchetinska<sup>3</sup>

## Low-Temperature Storage of Placenta Affects Anti-Inflammatory and Wound Healing Properties of Its Extracts

**Реферат:** У роботі досліджено вплив низькотемпературного зберігання плаценти за різних температур на протизапальну активність її екстрактів на клітинних моделях термогемолізу еритроцитів і аденозин-5' дифосфат-індукованої агрегації тромбоцитів. Проведено оцінку ранозагоювальної дії екстрактів з кріоконсервованої плаценти на моделі термічного опіку у щурів. Показано, що під час зберігання плаценти строком до місяця температура кріоконсервування значуще не впливала на відсоток інгібування екстрактами термогемолізу еритроцитів і агрегації тромбоцитів. Зберігання плаценти протягом 3-х місяців при  $-20^{\circ}\text{C}$  призводило до зниження протизапальної активності екстрактів з неї, а протягом 6 місяців — до повної втрати. Кріоконсервування плаценти при  $-196^{\circ}\text{C}$  дозволяло зберегти її протизапальну і ранозагоювальну активність протягом всього терміну. Виявлено виражений позитивний ефект екстрактів із кріоконсервованої плаценти на репаративний процес за умов опікового uszkodження шкіри III-Б ступеня у щурів.

**Ключові слова:** низькотемпературне зберігання, плацента людини, водно-сольові екстракти, термогемоліз еритроцитів, агрегація тромбоцитів, опікові рани, ранозагоювальна дія.

**Abstract:** Here we have studied the effect of low-temperature storage of the placenta at different temperatures on anti-inflammatory activity of its extracts in cell models of erythrocyte thermohemolysis and adenosine-5'-diphosphate-induced platelet aggregation. The wound-healing effect of cryopreserved placental extracts was also evaluated in rat thermal burn model. When preserving placenta for up to a month, the temperature of storage was shown to cause no significant impact on the percentage of inhibition of erythrocyte thermohemolysis and platelet aggregation by the extracts. Placental storage for three months at  $-20^{\circ}\text{C}$  decreased anti-inflammatory activity of its extracts, and led to its complete loss during 6 months. Placental cryopreservation at  $-196^{\circ}\text{C}$  enabled to preserve the anti-inflammatory and wound-healing activity. The cryopreserved placenta-derived extracts showed a pronounced positive effect on reparative process at third-degree (B) skin burn injury in rats.

**Key words:** low-temperature preservation, human placenta, aqueous-saline extracts, erythrocyte thermohemolysis, platelet aggregation, burns, wound healing effect.

Плацента — унікальний орган з активним метаболізмом, який містить широкий спектр біологічно активних речовин [28, 29, 35, 39]. Завдяки наявності великої кількості нуклеїнових кислот, амінокислот, вітамінів, мікроелементів, пептидів, цитокінів і факторів росту екстракт плаценти людини (ЕПЛ) має протизапальні, знеболювальні, регенеративні, противірусні, імунорегулювальні та протиалергенні властивості [14, 20, 22, 35, 36]. Виражена антимікробна та ранозагоювальна активність екстрактів плаценти дозволила використовувати їх під час лікування опікових, післяопераційних і хронічних ран, дефектів шкіри тощо [11, 14, 19, 23, 32].

The placenta as a unique organ with an active metabolism contains a wide range of biologically active substances [24, 25, 32, 39]. Human placenta extracts (HPEs) possess the anti-inflammatory, analgesic, regenerative, antiviral, immunoregulatory and antiallergic properties due to a large number of nucleic acids, amino acids, vitamins, microelements, peptides, cytokines and growth factors, [10, 16, 18, 32, 33]. The pronounced antimicrobial and wound-healing activities of placental extracts enabled using them in therapy of burn, postoperative and chronic wounds, skin defects, *etc.* [7, 10, 15, 19, 29].

The human placenta-derived products ensure a favourable microenvironment for cell growth

<sup>1</sup> Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

<sup>2</sup> Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, м. Харків

<sup>3</sup> Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут», м. Харків

<sup>1</sup> Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

<sup>2</sup> V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

<sup>3</sup> National Technical University 'Kharkiv Polytechnic Institute', Kharkiv, Ukraine

**\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52  
електронна пошта: helen.bobrova.77@gmail.com

**\*To whom correspondence should be addressed:**

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: helen.bobrova.77@gmail.com

Надійшла 12.07.2021

Прийнята до друку 18.05.2022

Received 12, July, 2021

Accepted 18, May, 2022

© 2022 O.M. Bobrova, *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.

Отримані з плаценти людини препарати забезпечують мікросередовище, сприятливе для росту та диференціації клітин, і позитивно модулюють загоєння ран повної товщини шкіри [16]. У результаті лікування ран екстрактами плаценти виявлено значне зменшення розміру, індексу рани та скорочення необхідного для повного загоєння часу, а також суттєвий приріст міцності на розрив, помітне збільшення тканинної ДНК, загального білка та колагенезу [11]. Гелі на основі ЕПЛ мають протизапальну та знеболювальну дію, що підтверджено комфортним станом пацієнтів і швидшим загоєнням під час парадонтальної хірургії депігментованих ділянок ясен [23].

Основним обмеженням для широкого терапевтичного застосування ЕПЛ у клінічній практиці є малий термін їх зберігання. Перспективним методом збереження біологічної активності препаратів є кріоконсервування. Раніше було показано [2], що зберігання тканин плаценти при  $-196^{\circ}\text{C}$  протягом року дозволяє отримувати ЕПЛ, у яких залишається здатність здійснювати стабілізуючий вплив на клітини: підвищувати осмотичну стійкість еритроцитів й активізувати процеси клітинного дихання. Встановлено також, що кріоконсервування тканини плаценти за температури  $-80^{\circ}\text{C}$  не впливає на її антимікробну дію [26].

Для *in vitro* вивчення впливу різних фізико-хімічних і біологічних факторів широко застосовуються клітинні тест-системи, зокрема і для оцінки потенційної протизапальної активності екстрактів різного походження [10, 12, 30]. Протизапальна активність лікарських препаратів часто корелює з їх здатністю знижувати термогемоліз еритроцитів [6, 38]. Деякі автори [7, 8] показали, що попередня обробка еритроцитів екстрактом плаценти людини інгібує термогемоліз еритроцитів, і цей процес залежить від концентрації препарату. Отримані результати свідчать про стабілізуючу дію екстракту плаценти на мембрани. Показано взаємозв'язок досліджених параметрів з протизапальною дією екстрактів на рівні організму.

Важливим патогенним маркером запалення є агрегація тромбоцитів. У зв'язку з цим протизапальну дію препаратів досліджують разом з їхніми антиагрегаційними властивостями [37], а для експрес-оцінки *in vitro* на протизапальну активність нових препаратів використовують клітинну тест-систему на основі індукованої агрегації тромбоцитів [5, 27].

Мета дослідження — вивчення впливу умов низькотемпературного зберігання плаценти на протизапальні та ранозагоювальні властивості її екстрактів.

and differentiation, and positively modulate the full-thickness skin wound healing [12]. The wound therapy with placental extracts revealed a significant decrease in wound size and index, as well as the shortening of time required for complete healing, and a significant rise in tensile strength, a pronounced increase in tissue DNA, total protein and collagenesis [7]. The HPE-based gels have the anti-inflammatory and analgesic effects, as evidenced by a patient's comfort and faster healing in periodontal surgery of depigmented gingival areas [19].

The short storage time of HPEs is the main limitation for its wide therapeutic application. Cryopreservation is a promising way to preserve the biological activity of the specimens. As previously reported [34], the storage of placental tissue at  $-196^{\circ}\text{C}$  for one year enabled obtaining the HPEs with retained ability to have a stabilizing impact on cells, *i. e.* to increase the erythrocyte osmotic stability and activate a cell respiration. The cryopreservation of placental tissue at  $-80^{\circ}\text{C}$  was also established to cause no effect on its antimicrobial activity [22].

Cellular test systems are widely used for *in vitro* study of the effect of different physico-chemical and biological factors, including the evaluation of potential anti-inflammatory activity of the extracts of various origins [6, 8, 26]. Anti-inflammatory activity of drugs often correlates with their ability to reduce thermohemolysis of erythrocytes [2, 38]. Some reports [3, 4] showed the erythrocyte pre-treatment with human placental extract to inhibit the erythrocyte thermohemolysis, and this process was dependent on drug concentration. The obtained results testified to a stabilizing effect of placental extract on membranes. The relationship of the studied parameters with an anti-inflammatory effect of extracts at a body's level was shown.

Platelet aggregation is an important pathogenic marker of inflammation. In this regard, an anti-inflammatory effect of drugs is studied together with their anti-aggregation properties [37], and for rapid *in vitro* assessment of new drugs for anti-inflammatory activity one uses the cell test system based on induced platelet aggregation [1, 23].

We here aimed to study the impact of conditions for low-temperature placenta storage on the anti-inflammatory and wound-healing properties of its extracts.

## Materials and methods

Human placentas were procured from healthy parturients with their informed consent (40 weeks

## Матеріали і методи

Плаценту людини отримували у здорових породіль за їх інформованої згоди (термін вагітності 40 тижнів). Фрагменти свіжоотриманих плацент охолоджували у пластикових пакетах до  $-20$ ,  $-80$  та  $-196^{\circ}\text{C}$  і зберігали строком до 6 місяців [1]. Відігрівання проводили на водяній бані при  $37^{\circ}\text{C}$ . Водно-сольові екстракти отримували екстрагуванням гомогенізату свіжоотриманої та кріоконсервованої плаценти у фосфатно-сольовому буфері (рН 7,4) [1]. У якості контролю використовували екстракти зі свіжоотриманої плаценти.

Ступінь агрегації тромбоцитів визначали спектрофотометричним методом [24]. Для дослідження впливу ЕПЛ на ступінь агрегації тромбоцитів збагачену тромбоцитами плазму інкубували протягом 15 хв з ЕПЛ за температури  $37^{\circ}\text{C}$ . У якості індуктора агрегації тромбоцитів використовували аденозин-5' дифосфат (АДФ; Sigma-Aldrich, США) у концентрації  $10^{-5}$  моль/л. Додавання розчину АДФ до суспензії тромбоцитів здійснювали за температури  $37^{\circ}\text{C}$  [13]. Результати агрегації визначали через 5 хвилин після додавання АДФ [5]. За зміною оптичної густини на довжині хвилі 700 нм було розраховано відсоток агрегації у контролі та зразках із ЕПЛ. Відсоток інгібування агрегації тромбоцитів з ЕПЛ розраховували за формулою:

$$\text{Відсоток інгібування агрегації} = (1 - (\text{агрегація}_{\text{зразок}}) / (\text{агрегація}_{\text{контроль}})) \times 100.$$

Для дослідження термогемолізу відмиті еритроцити ресуспендували 1:1 за об'ємом у фосфатно-сольовому буфері (Medicago Uppsala, Швеція), інкубували з ЕПЛ протягом години. Далі еритроцити ресуспендували і піддавали гіпертермії (20 хв у регульованому водному термостаті при  $55^{\circ}\text{C}$ ) [33]. Гемоліз оцінювали за виходом гемоглобіну шляхом вимірювання оптичної щільності в надосаді при 540 нм [10] і виражали у відсотках відносно 100 % гемолізованих клітин. Також розраховували відсоток інгібування гемолізу за формулою:

$$\text{Відсоток інгібування гемолізу} = (\text{гемоліз}_{\text{контроль}} - (\text{гемоліз}_{\text{зразок}}) / (\text{гемоліз}_{\text{контроль}})) \times 100.$$

Збереженість ранозагоювальної дії ЕПЛ після кріоконсервування плаценти вивчали на моделі термічного опіку III-Б ступеня [17].

Експерименти виконували на білих щурах-самцях лінії Вістар масою 150–170 г, відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорсто-

pregnancy period). Fragments of fresh placentas were cooled in plastic bags down to  $-20$ ,  $-80$  and  $-196^{\circ}\text{C}$  and stored for up to 6 months [28]. Thawing was carried out in a water bath at  $37^{\circ}\text{C}$ . Aqueous-saline extracts were obtained by extracting the homogenate of fresh and cryopreserved placenta in phosphate-buffered saline (pH 7.4) [28]. Fresh placenta extracts were used as a control.

The degree of platelet aggregation was determined by spectrophotometry [20]. To study the HPEs impact on the degree of platelet aggregation, the platelet-enriched plasma was incubated for 15 min with HPEs at  $37^{\circ}\text{C}$ . The adenosine-5' diphosphate (ADP; Sigma-Aldrich, USA) at a concentration of  $10^{-5}$  mol/l was used as platelet aggregation inducer. The ADP solution was added in platelet suspension at  $37^{\circ}\text{C}$  [9]. Aggregation results were determined in 5 min after ADP supplement [1]. The percentage of aggregation in the control and specimens with HPEs was calculated by the change in optical density at 700 nm wavelength. The percentage of inhibition of platelet aggregation with HPEs was calculated by the formula:

$$\text{The percentage of aggregation inhibition} = (1 - (\text{aggregation}_{\text{sample}}) / (\text{aggregation}_{\text{control}})) \times 100.$$

To study the thermohemolysis, the washed erythrocytes were re-suspended in 1:1 ratio (v/v) in phosphate-buffered saline (Medicago Uppsala, Sweden), and incubated with HPEs for one hour. Then the erythrocytes were re-suspended and subjected to hyperthermia (20 min in a regulated water thermostat at  $55^{\circ}\text{C}$ ) [30]. Hemolysis was assessed by haemoglobin yield via measuring the optical density in supernatant at 540 nm [6] and expressed as a percentage relative to 100% of hemolyzed cells. The percentage of hemolysis inhibition was also calculated by the formula:

$$\text{The percentage of hemolysis inhibition} = (\text{hemolysis}_{\text{control}} - (\text{hemolysis}_{\text{sample}}) / (\text{hemolysis}_{\text{control}})) \times 100.$$

Preservation of wound-healing effect of HPEs after placental cryopreservation was studied in the III-B degree thermal burn model [13].

The experiments were performed in white male Wistar rats weighing 150–170 g, in accordance with the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty' (No. 3447-IV of February 21, 2006) in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of



кого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006) з дотриманням вимог комітету з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, узгоджених із положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Термічний опік моделювали під поверхневим наркозом на зовнішній поверхні стегна. У результаті термічного впливу в щурів виникав опік шкіри стегна площею близько 3,0–3,3 см<sup>2</sup>, що становило ≈1,2–1,3% від загальної площі тварин. Для розрахунку площі поверхні тіла у щурів використовували формулу К. Меех у модифікації D.A. Giplin [18]:

$$S = kW^{2/3},$$

де  $S$  — площа поверхні тіла, см<sup>2</sup>;  $k$  — константа Міха (9,46),  $W$  — маса тіла тварини, кг.

Для оцінки перебігу процесу загоювання рани фотографували [15] на 1, 3, 7, 14, 21 і 28-у доби після нанесення травми. Отримані фотографії аналізували з використанням комп'ютерної програми «ImageJ 1.52a» (NIH, США).

Для оцінки регенеративної активності використовували абсолютні та відносні показники. Відсоток ураженої ділянки розраховували за формулою:

$$S\% = S_n/S_1 \times 100,$$

де  $S_n$  — площа рани на досліджувану добу;  $S_1$  — площа рани на першу добу.

Відношення площі опікової рани до поверхні тіла тварин розраховували за формулою:

$$A = S_n/S \times 100,$$

де  $S_n$  — площа рани на досліджувану добу;  $S$  — площа поверхні тіла.

Усі експериментальні тварини було розділено на 3 групи ( $n = 8$  у кожній): 1 (контрольна група) — термічний опік без лікування; 2 — термічний опік з використанням ЕПЛ у процесі лікування; 3 — термічний опік з використанням у процесі лікування мазі «Левомеколь» («Фармак», Україна).

Лікування здійснювали нанесенням екстракту (0,5 мл) на рану щодня, 2 рази на добу протягом усього експерименту (28 діб). Для порівняльної оцінки ранозагоювальної дії лікарських препаратів використовували мазь «Левомеколь» [9]. Мазь наносили щодня тонким шаром на уражену поверхню. Ранову поверхню не ізолювали від зовнішнього середовища.

the NAS of Ukraine, consistent with the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

A thermal burn was simulated under superficial anesthesia on the outer thigh surface. As a result of thermal exposure, the rats had a burn of the thigh skin with an area of about 3.0–3.3 cm<sup>2</sup>, which was ≈1.2–1.3% of the total surface area of animals. To calculate the body surface area in rats, we used the Meeh formula, modified by D.A. Giplin [14]:

$$S = kW^{2/3},$$

where  $S$  is body surface area, cm<sup>2</sup>;  $k$  is Meeh constant (9.46),  $W$  is body weight of animal, kg.

To assess the healing course, the wounds were photographed [11] to days 1, 3, 7, 14, 21, and 28 after injury. The obtained photos were analyzed using the 'ImageJ 1.52a' software (NIH, USA).

Absolute and relative indices were used to assess the regenerative activity. The percentage of affected area was calculated according to the formula:

$$S\% = S_n/S_1 \times 100,$$

where  $S_n$  is wound area to the studied day;  $S_1$  is wound area to day 1.

The ratio of burn wound area to animal body surface was calculated by the formula:

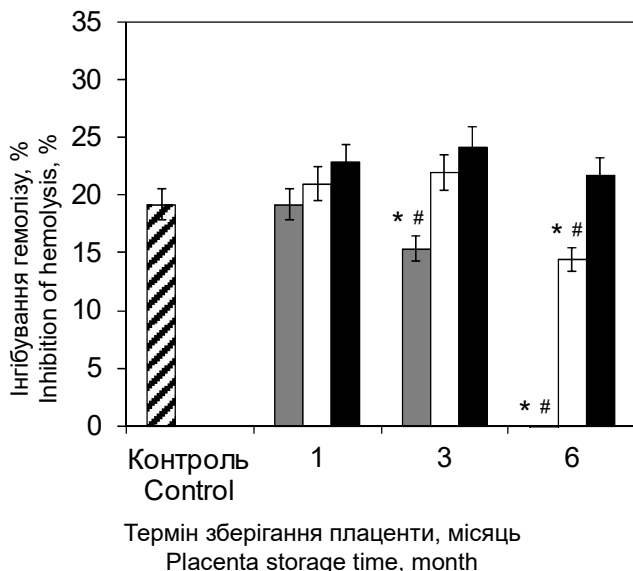
$$A = S_n/S \times 100,$$

where  $S_n$  is wound area to the studied day;  $S$  is body surface area.

All experimental animals were divided into 3 groups ( $n = 8$  each): group 1 (control group) – thermal burn without treatment; group 2 – thermal burn with HPEs application in therapy; group 3 – thermal burn using Levomekol ointment (Farmak, Ukraine) in treatment.

The therapy was carried out by applying the extract (0.5 ml) twice daily to the wound throughout the experiment (28 days). 'Levomekol' ointment [5] was used to comparatively assess the wound-healing effect of drugs. The ointment was applied daily with a thin layer to the affected surface. The wound surface was not isolated from the external environment.

Data were presented as mean ± standard error. The obtained results were statistically processed with one-way ANOVA, and the posteriori



**Рис. 1.** Процент інгибування термогемолізу еритроцитів ЕПЛ в залежності від часу зберігання плаценти за різних температур:  $-20$  (■),  $-80$  (□),  $-196^{\circ}\text{C}$  (■); \* – відмінності значущі відносно контролю, # – відмінності значущі відносно місяця зберігання при відповідній температурі,  $p = 0,05$ .

**Fig. 1.** Percentage of inhibition of erythrocyte thermohemolysis by HPEs depending on time of placenta storage at different temperatures:  $-20$  (■),  $-80$  (□),  $-196^{\circ}\text{C}$  (■); \* – differences are significant relative to the control; # – differences are significant relative to the month storage at corresponding temperature,  $p = 0.05$ .

Дані наведено як середнє значення  $\pm$  стандартна помилка. Для статистичної обробки експериментальних результатів використовували однофакторний дисперсійний аналіз, апостеріорні порівняння проводили за критерієм Манна-Вітні з поправкою Бонферроні за допомогою програми «Statgraphics Plus» (Manugistic, США).

### Результати та обговорення

Для визначення оптимальної температури зберігання плаценти, яка дозволяє зберігати її протиzapальні властивості щонайменше протягом 6 місяців, було проведено дослідження впливу ЕПЛ з плаценти після її зберігання за температури  $-20$ ,  $-80$  та  $-196^{\circ}\text{C}$  на термогемоліз еритроцитів та індуковану агрегацію тромбоцитів (рис. 1, 2). Екстракт зі свіжоотриманої плаценти (контроль) дозволяє інгибувати близько 40% АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів (рис. 2) і 20% термогемолізу еритроцитів (див. рис. 1). Протягом низькотемпературного зберігання плаценти до місяця значуще не змінюється здатність ЕПЛ впливати на термостабільність еритроцитів і агрегацію тромбоцитів.

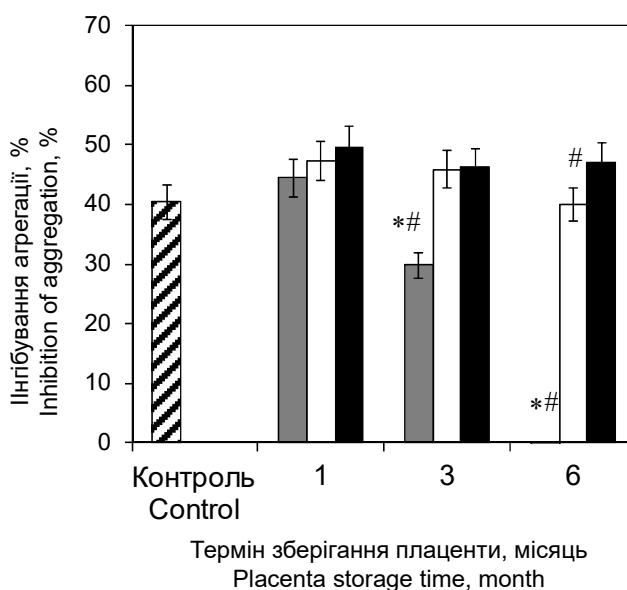
Кріоконсервування плаценти протягом 3-х місяців за температури  $-20^{\circ}\text{C}$  призводить до зниження біологічної активності ЕПЛ щодо дос-

comparisons were performed using the Mann-Whitney test with Bonferroni correction using 'Statgraphics Plus' software (Manugistics, USA).

### Results and discussion

To determine the optimal temperature for placenta storage, which enables preservation of its anti-inflammatory properties for at least 6 months, the impact of HPEs on erythrocyte thermohemolysis and induced platelet aggregation after placenta storage at  $-20$ ,  $-80$  and  $-196^{\circ}\text{C}$  has been studied (Fig. 1, 2). The extract derived from fresh placenta (control) enabled the inhibition of about 40% of ADP-induced platelet aggregation (Fig. 2) and 20% of erythrocyte thermohemolysis (see Fig. 1). During low-temperature placental storage for a period of up to a month, the ability of HPEs to affect the erythrocyte thermal stability and platelet aggregation was not significantly changed.

Placenta cryopreservation for 3 months at  $-20^{\circ}\text{C}$  resulted in a decreased biological activity of HPEs in terms of the studied cell models, however, the inhibition percentage of platelet aggregation and erythrocyte thermohemolysis remained quite a high (Figs. 1, 2). After placenta storage for 3 months



**Рис. 2.** Процент інгибування АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів ЕПЛ в залежності від часу зберігання плаценти за різних температур:  $-20$  (■),  $-80$  (□),  $-196^{\circ}\text{C}$  (■); \* – відмінності значущі відносно контролю, # – відмінності значущі відносно місяця зберігання при відповідній температурі,  $p = 0,05$ .

**Fig. 2.** Percentage of inhibition of ADP-induced platelet aggregation by HPEs depending on time of placenta storage at different temperatures:  $-20$  (■),  $-80$  (□),  $-196^{\circ}\text{C}$  (■); \* – differences are significant relative to the control; # – differences are significant relative to the month storage at corresponding temperature,  $p = 0.05$ .



ліджених клітинних моделей, однак відсоток ігнібування агрегації тромбоцитів і термогемолізу еритроцитів залишається досить високим (див. рис. 1, 2). Після зберігання плаценти протягом 3-х місяців за температур  $-80$  і  $-196^{\circ}\text{C}$  значущих змін зареєстровано не було. Після 6 місяців зберігання плаценти за температури  $-20^{\circ}\text{C}$  ЕПЛ повністю втрачали здатність підвищувати термостабільність еритроцитів і знижувати рівень АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів, що може свідчити про зникнення протизапальних властивостей екстрактів. Відсоток ігнібування термогемолізу еритроцитів і агрегації тромбоцитів значуще знижувався після 6 місяців зберігання плаценти за температури  $-80^{\circ}\text{C}$  порівняно з місяцем зберігання, однак біологічна активність ЕПЛ залишалася досить високою. Повну збереженість властивостей ЕПЛ щодо досліджених клітинних моделей за умов зберігання плаценти протягом 6 місяців виявлено тільки за температури  $-196^{\circ}\text{C}$ . Це свідчить про наявність протизапальних властивостей ЕПЛ після зберігання плаценти при  $-196^{\circ}\text{C}$  щонайменше протягом 6 місяців.

У попередніх дослідженнях нами було показано, що зберігання плаценти при  $-196^{\circ}\text{C}$  не впливає на захисну дію ЕПЛ щодо стійкості еритроцитів до низького рН, у той час як при  $-20^{\circ}\text{C}$  змінювалися властивості ЕПЛ [31]. Виявлено високий рівень антиоксидантних властивостей ЕПЛ за умов зберігання плаценти людини за температури  $-196^{\circ}\text{C}$  [3], при цьому за інших температур тривалого зберігання плаценти знижувалася антиоксидантна ефективність ЕПЛ [2].

У нашій роботі на клітинних моделях термогемолізу еритроцитів і агрегації тромбоцитів, а також антиоксидантних властивостях [3, 4], було показано високу протизапальну дію ЕПЛ за умов зберігання плаценти при  $-196^{\circ}\text{C}$  строком до 6 місяців, що свідчить про перспективи для ефективного загоювання ран. У зв'язку з цим на моделі термічного опіку у щурів було досліджено ранозагоювальну ефективність екстракту з кріоконсервованої ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) плаценти.

Проведене дослідження показало, що в перші години після термічної дії на шкірі щурів формувалася струпа білувато-жовтого кольору, тонкий і досить м'який. До кінця першої доби зазначалося потовщення і ущільнення струпа, колір якого у 40% тварин змінювався від білувато-жовтого до червоно-коричневого, відмічалася набряклість травмованої ділянки з наявністю крайової гіперемії. У 30% тварин на місці ураження спостерігалися тріщини, з яких виділявся серозний ексудат. Шкірні покриви зони паранекрозу

at  $-80$  and  $-196^{\circ}\text{C}$ , no significant changes were recorded. After 6-month placenta storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ , the HPEs completely lost the ability to augment the thermal stability of erythrocytes and reduce the level of ADP-induced platelet aggregation, which might indicate the disappearance of anti-inflammatory properties of the extracts. The percentage of inhibition of erythrocyte thermohemolysis and platelet aggregation significantly decreased after 6 months of placenta storage at  $-80^{\circ}\text{C}$  as compared with one-month storage, however, the biological activity of HPEs remained quite a high. A complete preservation of HPE properties in terms of the studied cell models under placenta storage for 6 months was found only at  $-196^{\circ}\text{C}$ . This testified to the presence of anti-inflammatory properties of HPEs after placenta storage at  $-196^{\circ}\text{C}$  for at least 6 months.

As previously reported [27], the placenta storage at  $-196^{\circ}\text{C}$  caused no impact on protective effect of HPEs relative to erythrocyte resistance to low pH, while at  $-20^{\circ}\text{C}$  the properties of HPEs were changed. Under conditions of human placenta storage at  $-196^{\circ}\text{C}$ , a high level of antioxidant properties of HPEs was revealed [35], whereas the other temperatures of long-term placenta storage led to a decreased antioxidant efficiency of HPEs [34].

Here, a high anti-inflammatory effect of HPEs under placenta storage at  $-196^{\circ}\text{C}$  for up to 6 months was demonstrated in cell models of erythrocyte thermohemolysis, platelet aggregation and antioxidant properties [35, 36], suggesting thereby the prospects for efficient wound healing. In this context, the wound-healing efficiency of the extract derived from cryopreserved ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) placenta was studied in a rat thermal burn model.

Our study showed the formation of whitish-yellow, thin and quite a soft scab on rat skin in the first hours after thermal exposure. By the end of the first day, the thickening and densification of the scab, the colour of which was changed from whitish-yellow to red-brown in 40% of animals, were observed. There was a swelling of the injured area with the presence of marginal hyperaemia. In 30% of animals, the cracks with released serous exudate were noted at the injury site. Skin of paranecrotic area in animals from groups 1 and 2 acquired a greyish-bluish colour, that was a sign of impaired blood circulation. This zone can also become necrotic, *i. e.* the burn wound area can increase even when the exposure to traumatic factor is finished. For example, when observing the dynamics of burn wound regeneration to day 3, the groups 1





у тварин груп 1 та 2 набували сірувато-синюшого кольору, що є ознакою порушення кровообігу. Ця зона може також стати зоною некрозу, тобто площа опікової рани може збільшуватися вже після припинення впливу травмуючого фактора. Так, під час спостереження за динамікою регенерації опікової рани на 3-ю добу в групах 1 та 2 було зареєстровано збільшення площі поверхні на 6,3 і 4,6% відповідно, площа поверхні рани у щурів групи 3 не змінилася (рис. 3).

Візуальні спостереження на 7-у добу після нанесення травми щурам показали, що загоєння ран проходить за секвестраційним типом: на поверхні рани утворився щільний фібрино-тканинний струп. Він виконує роль «біологічної пробки», захищає рану від забруднень і пошкоджень. Загоєння ран під струпом відбувається за типом первинного і вторинного натягу, тобто проходять усі фази раневого процесу, і після епіталізації струп відторгається. До відторгнення струпа про зміну площі поверхні рани можна судити тільки за швидкістю зменшення його розмірів у результаті підсихання і часткової резорбції. Це пояснює, чому у тварин всіх груп до 7-ї доби не виявлялися статистичні відмінності у площі рани (рис. 3). У групі 2 на 7-у добу після нанесення травми спостерігався початок відторгнення струпа, а на 11-ту добу відбувалося його повне відторгнення.

and 2 showed an increase in surface area by 6.3 and 4.6%, respectively, and the surface area in group 3 remained unchanged (Fig. 3).

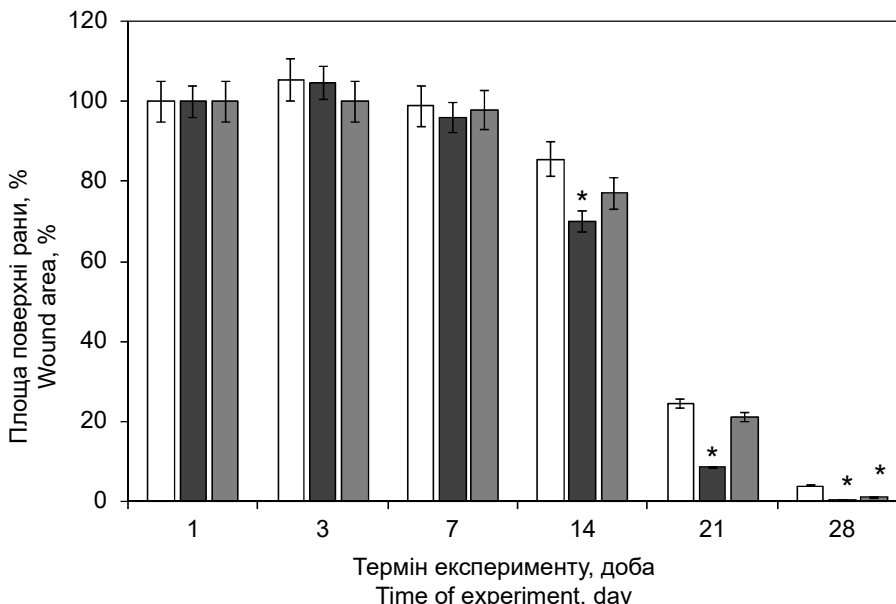
To day 7 after injury, the visual observations in rats revealed the wound healing to proceed by sequestration type, *i. e.* a dense fibrin-tissue scab was formed on the wound surface. It acted as a 'biological plug' and protected the wound from contamination and injury. The wound healing under the scab occurred by primary and secondary intensions, *i. e.* all the phases of wound process took place, and the scab rejected after epithelialization. Before rejection, the change in the wound surface area could be judged only by the rate of scab size reduction resulted from drying and partial resorption. This explains the fact why no statistical differences in wound area were revealed until day 7 in animals of all the groups (Fig. 3). To day 7 after injury, the group 2 showed the beginning of scab rejection, and it was completely rejected to day 11.

To day 14 after injury, the differences in burn wound healing between groups 1–3 were more pronounced (Fig. 4). The wound size decreased, and a thick scab remained somewhere. Analysis of macrophotos showed that 60% of control animals had a thick scab with protruding hair shafts at the lesion site. The scab, raised above the

wound was preserved in animals of group 3, but its shedding was observed in 50% of animals. After scab rejection, a wet wound surface of pink and bright red colour was seen in 50% of animals from group 2. The cell migration across the wound surface was facilitated due to absence of hard and thick scab.

When determining the change in the burn surface area using the planimetric method, to day 14 after a burn injury the area of damaged site in the group 1 animals was found to be  $(85.6 \pm 5.2)\%$ ; it significantly decreased and made  $(70.0 \pm 1.2)\%$  in group 2; it was  $(80.2 \pm 4.2)\%$  in group 3 (see Fig. 3).

In group 1 of rats, the burn wound self-cleaning from



**Рис. 3.** Динаміка регенерації опікової рани: □ — контроль, ■ — лікування ЕПЛ з кріоконсервованої плаценти, ■ — лікування маззю «Левомеколь»; \* — відмінності значущі відносно контролю,  $p = 0,05$ .

**Fig. 3.** Dynamics of burn wound regeneration: □ – control, ■ – therapy with cryopreserved placenta-derived HPEs, ■ – treatment with Levomekol ointment. \* – differences are significant relative to the control,  $p = 0.05$ .





**Рис. 4.** Поверхня опікової рани на 14-у добу після опіку: **А** — контрольна група, **В** — після лікування ЕПЛ з кріоконсервованої плаценти, **С** — після лікування маззю «Левомеколь». Лінія масштабу — 1 см.

**Fig. 4.** Burn wound surface to day 14 after a burn injury: **A** – control group, **B** – after therapy with cryopreserved placenta-derived HPEs, **C** – after treatment with Levomekol ointment. Scale bar is 1 cm.

На 14-у добу після нанесення травми відмінності в загоєнні опікових ран між групами 1–3 були більш виражені (рис. 4). Розміри ран зменшилися, місцями зберігався товстий струп. Аналіз макрофотографій показав, що у 60% контрольних тварин на місці ураження залишався товстий струп з виступаючими волосяними стрижнями. У тварин групи 3 зберігався піднятий над ранною струп, а у 50% тварин спостерігалось його відпадиння. У 50% тварин групи 2 після відторгнення струпа відкривалася ранова мокнуча поверхня рожевого і яскраво-червоного кольору. У відсутності твердого й товстого струпа міграція клітин по поверхні ран була полегшена.

За результатами визначення зміни площі опікової поверхні планіметричним способом встановлено, що на 14-ту добу після нанесення опіку площа травмованої ділянки тварин групи 1 складала ( $85,6 \pm 5,2$ )%; групи 2 — значуще зменшилася і становила ( $70,0 \pm 1,2$ )%; групи 3 — ( $80,2 \pm 4,2$ )% (див. рис. 3).

У щурів групи 1 самостійне очищення опікової рани від некротичних тканин відбувалося на 20–21 добу. На цих строках секвестрація рани спостерігалася і в групі 3. Грануляційна тканина була темно-червоного і темно-коричневого кольору, нерівна по краях і бугриста. На стегні у 50% щурів виявлялося утворення сіро-синюшних рубців різного розміру. У щурів групи 2 грануляційна тканина була суха, гладка, від світло-коричневого до червоного кольору, в деяких місцях піднімалася над рівнем шкіри, а по краях з'явилися ознаки епітелізації рани і утворення рубців різного розміру та кольору (від рожевого до синюшного) (рис. 5).

Під час дослідження зміни поверхні рани велике значення має не абсолютна, а відносна площа травми (виражена у відсотках до всієї площі поверхні тіла). Результати аналізу даних показали, що співвідношення площі рани до

necrotic tissues occurred to days 20–21. During these periods, the group 3 demonstrated the sequestration as well. Granulation tissue was dark red and dark brown, uneven at edges and bumpy. Grey-bluish scars of various sizes were observed on the thigh in 50% of rats. In group 2 of rats, the granulation tissue was dry, smooth, from light brown to red in colour, somewhere elevated from the skin, and the signs of wound epithelization and scar formation of different sizes and colours (from pink to bluish) appeared at the edges (Fig. 5).

When studying the changes in wound surface, not the absolute, but relative area of the injury (expressed as a percentage of the entire body surface area) is of great importance. Results of data analysis showed that to day 21 the ratio of wound area to the total body surface area in animals of group 2 was 3 times lower than in group 1 (Table).

By day 28 after burn injury in groups 1 and 3, the wounds were oval and elongated, with granulation tissue and exfoliating edges, and with the scar formation. In group 2, 60% of animals had restoration of hair cover and complete healing of burn wound due to marginal epithelization with formation of a soft, narrow, oblong scar of pink colour, which preceded the regeneration processes of group 1 (see Fig. 3).

To day 28 after a burn injury, the hair cover restored in 60% of group 2 rats and a burn wound was completely healed due to marginal epithelization with formation of a soft, narrow, elongated scar of pink colour, which preceded regenerative processes in other groups (Fig. 6).

After injury, skin regeneration is affected by various growth factors such as: transforming growth factor  $\beta$ , platelet-derived, connective tissue, epidermal, and vascular endothelial growth factors [17]. They are involved in formation of granulation tissue, *i. e.* proliferation, chemotaxis, collagen synthesis, transdifferentiation and angioge-





**Рис. 5.** Поверхня опікової рани на 21-у добу після опіку: **A** — контрольна група, **B** — після лікування ЕПЛ з кріоконсервованої плаценти, **C** — після лікування маззю «Левомеколь». Лінія масштабу — 1 см.

**Fig. 5.** Burn wound surface to day 21 after a burn injury: **A** – control group, **B** – after therapy with cryopreserved placenta-derived HPEs, **C** – after treatment with Levomekol ointment. Scale bar is 1 cm.

загальної площі поверхні тіла тварин групи 2 на 21-у добу було в 3 рази менше порівняно з групою 1 (таблиця).

До 28-ї доби після нанесення опікової травми в групах 1 і 3 рани мали овальну і видовжену форму, з грануляційною тканиною та краями, які відлущувалися, та з утворенням рубця. У шурів групи 2 (60%) відбувалося відновлення волосяного покриву і повне загоєння опікової рани за рахунок крайової епіталізації з утворенням м'якого, вузького, довгастого рубця рожевого кольору, що випереджає регенераційні процеси групи 1 (див. рис. 3).

На 28-у добу після опіку у 60% шурів групи 2 відбувалося відновлення волосяного покриву і повне загоєння опікової рани за рахунок крайової епіталізації, з утворюванням м'якого, вузького, продовгуватого рубця рожевого кольору, що випереджає регенераційні процеси в інших групах (рис. 6).

nesis/neovascularization. Human placenta extract has a wide range of growth factors [18, 32], that may be crucial in their wound-healing effect. When using the placenta extracts in therapy of a full-thickness skin defect of 8 mm diameter, made on the back of the mouse using a pinch biopsy, an accelerated reduction in wound size as compared with the control group was found from day 3 to day 9 [15]. As concluded by J.W. Hong *et al.* [15], the mechanism of accelerated healing was associated with an increase in transforming growth factor- $\beta$  in the early phase of wound healing and vascular endothelial growth factor in the late phase.

Reactive oxygen species play an important role in wound healing not only in the inflammatory phase for disinfection, but also during other phases, including migration, proliferation and angiogenesis. However, their excess may

Динаміка зміни площі опікової рани по відношенню до площі всієї поверхні тіла тварин, %  
Dynamics of changes in burn wound area with respect to that of entire animal body surface, %

Група тварин (n = 8) Group of animals (n = 8)	Термін спостереження, доби Observation terms, days				
	1	7	14	21	28
Контроль Control	1,213 ± 0,061	1,134 ± 0,057	0,890 ± 0,045	0,242 ± 0,012	0,032 ± 0,002
ЕПЛ з кріоконсервованої плаценти Cryopreserved placenta-derived HPEs	1,171 ± 0,054	1,084 ± 0,053	0,723 ± 0,041	0,085 ± 0,009	0,003 ± 0,001*
Левомеколь Levomekol	1,073 ± 0,059	1,062 ± 0,054	0,814 ± 0,036	0,194 ± 0,004	0,016 ± 0,002

**Примітка:** \* — відмінності значущі відносно контролю,  $\alpha = 0,05$ .

**Note:** \* – differences are significant relative to the control,  $\alpha = 0.05$ .



Після поранення на процес відновлення шкіри впливають різні фактори росту: трансформуючий фактор росту- $\beta$ , похідний від тромбоцитів, сполучнотканинний, епідермальний та фактор росту судинного ендотелію [21]. Ці фактори беруть участь у формуванні грануляційної тканини, тобто у проліферації, хемотаксисі, синтезі колагену, трансдиференціації та ангиогенезі / неоваскуляризації. Екстракт плаценти людини має широкий спектр факторів росту [22, 35], що може відігравати важливу роль в їх ранозагоювальній дії. Під час лікування екстрактами плаценти дефекту шкіри повної товщини діаметром 8 мм, який було зроблено на спині миші за допомогою щипкової біопсії, прискорення

induce oxidative stress, resulting in cell apoptosis in surrounding tissues and disrupted redox signaling [21]. A high level of preserved antioxidant properties of HPEs after placenta storage at  $-196^{\circ}\text{C}$  for 6 months [35, 36] can significantly promote the wound healing acceleration. In addition, as reported by N.D. Palanker *et al.* [31] the placental material, in particular HPEs, exerts antimicrobial activity via bacterial biofilm destruction.

C. Mukherjee *et al.* [24] discovered the laminin in HPEs, which was purified and tested for its role in cell migration, differentiation, and wound healing. In the model of wounds, obtained by sterile forceps biopsy (5 mm diameter), the induction of



**Рис. 6.** Поверхня опікової рани на 28-у добу після опіку: **А** — контрольна група, **В** — після лікування ЕПЛ з кріоконсервованої плаценти, **С** — після лікування маззю «Левомеколь». Лінія масштабу — 1 см.

**Fig. 6.** Burn wound surface to day 28 after a burn injury: **A** – control group, **B** – after therapy with cryopreserved placenta-derived HPEs, **C** – after treatment with Levomekol ointment. Scale bar is 1 cm.

зменшення розміру рани порівняно з контрольною групою виявлено з 3–9-ї доби [19]. За висновком J.W. Hong та співавт. [19], механізм прискорення загоювання пов'язаний зі збільшенням трансформуючого фактора росту- $\beta$  на ранній фазі загоєння ран та фактора росту судинного ендотелію на пізній фазі.

Активні форми кисню відіграють важливу роль у ранозагоювальному процесі не тільки під час запальної фази для дезінфекції, але і протягом інших фаз з урахуванням міграції, проліферації та ангиогенезу. Однак їх надлишок викликає окиснювальний стрес, що призводить до апоптозу клітин у прилеглих тканинах і порушення окисно-відновної сигналізації [25]. Високий рівень збереженості антиоксидантних властивостей ЕПЛ після зберігання плаценти при  $-196^{\circ}\text{C}$  протягом 6 місяців [3, 4] може значно сприяти прискоренню загоєння ран. Крім того, у роботі N.D. Palanker та співавт. [34] відмічається, що плацентарний матеріал, зокрема й ЕПЛ, чинить антимікробну дію, руйнуючи бактеріальну біоплівку.

cell migration and rat fibroblast motility were shown as enhanced by placental laminin. Induction of re-epithelialization and angiogenesis via cell proliferation and adhesion was observed in the wound area. The rate of wound healing in the presence of placental laminin was accelerated [24].

Thus, the biologically active substances within the cryopreserved placenta-derived extract positively affect the reparative process in the III-B degree skin burn experiment in laboratory animals. In particular, the use of HPEs prevents the formation of pronounced inflammatory oedema and purulent exudate at the injury site. During comparative study of wound healing rates with no therapy and with administering HPEs, even to day 7 after injury, the differences in the form of accelerated rejection of necrotic scab were observed. The application of HPEs resulted in early terms of granulation tissue formation, an increased rate of marginal epithelialization, and a complete healing of affected animal skin area with a soft and elastic scar, thus testifying to a sti-

У роботі С. Mukherjee та співавт. [28] було виявлено ламінін в ЕПЛ, який очищували і визначали його роль у клітинній міграції, диференціації та загоєнні ран. На моделі отриманих стерильною щипковою біопсією (діаметр 5 мм) ран показано, що індукція клітинної міграції та рухливість фібробластів щурів посилювалася плацентарним ламініном. На ділянці рани спостерігали індукцію реепітелізації та ангіогенезу шляхом клітинної проліферації та адгезії. Швидкість загоєння ран у присутності плацентарного ламініну була прискорена [28].

Таким чином, біологічно активні речовини, що містяться в екстракті з кріоконсервованої плаценти, позитивно впливають на репаративний процес в експерименті опікового ушкодження шкіри III-Б ступеня у лабораторних тварин. Зокрема, використання ЕПЛ перешкоджає формуванню вираженого запального набряку на місці травми та гнійного ексудату. Під час порівняльного дослідження темпів загоєння ран за відсутності терапії і за умов введення ЕПЛ відзначено відмінності у вигляді прискорення відторгнення некротичного струпа вже на 7-у добу після нанесення травми. Застосування ЕПЛ приводить до ранніх термінів формування грануляційної тканини, прискорення темпів крайової епітелізації та повного загоєння ураженої ділянки шкіри тварин з м'яким і еластичним рубцем, що свідчить про стимулюючий вплив екстракту з кріоконсервованої плаценти на репарацію шкіри.

### Висновки

Таким чином, зберігання плаценти протягом 6 місяців при  $-20^{\circ}\text{C}$  призводить до повної втрати протизапальної активності екстрактів, що показано на клітинних моделях термогемолізу еритроцитів і агрегації тромбоцитів, а при  $-80^{\circ}\text{C}$  — до часткової. Завдяки кріоконсервуванню ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) протягом усього терміну зберігається біологічна активність плаценти, і екстракти з неї мають високу протизапальну та ранозагоювальну ефективність. Після лікування екстрактом з кріоконсервованої плаценти площа опікових ран на 14-у добу була значуще нижчою, ніж при традиційному терапевтичному лікуванні. Швидкість загоєння опікового ушкодження шкіри на 21-у добу була у 3 рази вища ніж у контролі за умов лікування екстрактом, отриманим після зберігання плаценти за температури  $-196^{\circ}\text{C}$  протягом 6 місяців.

mulating effect of the cryopreserved placenta-derived extract on skin repair.

### Conclusions

Thus, the placenta storage for 6 months at  $-20^{\circ}\text{C}$  led to a complete loss of anti-inflammatory activity of the extracts, but to a partial one at  $-80^{\circ}\text{C}$ , as shown in cell models of erythrocyte thermohemolysis and platelet aggregation. Due to cryopreservation ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), the placental biological activity was preserved within the entire term, and its extracts had the high anti-inflammatory and wound-healing efficiency. To day 14 of therapy with cryopreserved placenta extract, the area of burn wounds was significantly lower than during traditional therapy. To day 21, the healing rate of skin burn injury was 3 times higher if treated with the extract obtained after placenta storage at  $-196^{\circ}\text{C}$  for 6 months than in the control.

### References

1. Alkadi KAA, Adam A, Muhammadtaha MH, et al. Antiplatelet aggregation activity of 5-hydroxyflavone, 2'-hydroxyflavanone, paeonol and bergenin isolated from stem bark of *Garcinia malaccensis* in human whole blood. *Orient J Chem.* 2013; 29(3): 871–5.
2. Anosike CA, Obidoa O, Ezeanyika LU. Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of methanol extract of garden egg (*Solanum aethiopicum*). *DARU J Pharm Sci.* 2012 Nov 14 [cited June 15 2021]; 20(1): 76. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3556049/>
3. Banerjee KK, Bishayee A, Chatterjee M. Anti-inflammatory effect of human placental extract: a biochemical mechanistic approach. *Riv Eur Sci Med Farmacol.* 1992; 14(6): 361–6.
4. Banerjee KK, Bishayee A, Chatterjee M. Role of human placental extract on succinic dehydrogenase activity in carrageenin-induced edema in rats *in vivo* and its effect on erythrocyte lysis, platelet aggregation and trypsin activity *in vitro*. *Indian J Physiol Pharmacol.* 1994; 38(2): 121–4.
5. Bezhin AI, Pankrusheva TA, Grigoryan AY, et al. Miramistin and metronidazole in the local treatment of the experimental purulent wounds. *RJPBCS.* 2014; 5(4): 1677–85.
6. Bhadoriya SS, Mishra V, Raut S, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of a hydroethanolic extract of *Tamarindus indica* leaves. *Sci Pharm.* 2012; 80(3): 685–700.
7. Biswas TK, Auddy B, Bhattacharya NP, et al. Wound healing activity of human placental extract in rats.



## Література

1. Нарожний СВ, Розанова КД, Боброва ОМ, Нардід ОА. Антиоксидантна та антирадикальна дія екстрактів із кріоконсервованої плаценти людини. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2018; 28(4): 323–32.
2. Погожих ДН, Розанова ЕД, Нардід ОА. Изменение свойств водно-солевых экстрактов плаценты человека в процессе низкотемпературного хранения. Проблеми кріобіології. 2008; 18(1): 22–6.
3. Розанова СЛ, Науменко ЄЙ, Нардід ЕО. Вплив низькотемпературного зберігання та обробки ультразвуком плаценти на антиоксидантні властивості її екстрактів. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2015; 25(3): 255–66.
4. Розанова СЛ, Розанова ЕД, Нардід ОА, Карпенко ВГ. Антиоксидантная активность экстрактов плаценты после низкотемпературного и гипотермического хранения. Проблеми кріобіології. 2011; 21(3): 291–300.
5. Alkadi KAA, Adam A, Muhammadtaha MH, et al. Antiplatelet aggregation activity of 5-hydroxyflavone, 2'-hydroxyflavanone, paeonol and bergenin isolated from stem bark of *Garcinia malaccensis* in human whole blood. Orient J Chem. 2013; 29(3): 871–5.
6. Anosike CA, Obidoa O, Ezeanyika LU. Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of methanol extract of garden egg (*Solanum aethiopicum*). DARU J Pharm Sci. 2012 Nov 14 [cited June 15 2021]; 20(1): 76. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3556049/>
7. Banerjee KK, Bishayee A, Chatterjee M. Role of human placental extract on succinic dehydrogenase activity in carrageenin-induced edema in rats in vivo and its effect on erythrocyte lysis, platelet aggregation and trypsin activity in vitro. Indian J Physiol Pharmacol. 1994; 38(2): 121–4.
8. Banerjee KK, Bishayee A, Chatterjee M. Anti-inflammatory effect of human placental extract: a biochemical mechanistic approach. Riv Eur Sci Med Farmacol. 1992; 14(6): 361–6.
9. Bezhin AI, Pankrusheva TA, Grigoryan AY, et al. Miramistinum and metronidazole in the local treatment of the experimental purulent wounds. RJPCBS. 2014; 5(4): 1677–85.
10. Bhadoriya SS, Mishra V, Raut S, et al. Anti-Inflammatory and antinociceptive activities of a hydroethanolic extract of *Tamarindus indica* leaves. Sci Pharm. 2012; 80(3): 685–700.
11. Biswas TK, Auddy B, Bhattacharya NP, et al. Wound healing activity of human placental extract in rats. Acta Pharmacologica Sinica. 2001; 22(12): 1113–6.
12. Bougandoura A, D'Abrosca B, Ameddah S, et al. Chemical constituents and *in vitro* anti-inflammatory activity of *Cistanche violacea* Desf. (Orobanchaceae) extract. Fitoterapia. 2016; 109(2): 248–53.
13. Bynum JA, Taylor AS, Peltier GC, et al. Evaluation of adenosine, lidocaine, and magnesium for enhancement of platelet function during storage. J Trauma Acute Care Surg. 2017; 83(1): S9–S15.
14. Chakraborty PD, De D, Bandyopadhyay S, Bhattacharyya D. Human aqueous placental extract as a wound healer. J Wound Care. 2009; 18(11): 462–7.
15. Chang AC, Dearman B, Greenwood JE. A comparison of wound area measurement techniques: visitrak versus photography. Eplasty. [Internet]. 2011 Apr 18; [cited June 15 2021]; 11: e18. Available from: <https://www.hmpgloballlearningnetwork.com/site/eplasty/comparison-wound-area-measurement-techniques-visitrak-versus-photography>
16. Choi JS, Kim JD, Yoon HS, Cho YW. Full-thickness skin wound healing using human placenta-derived extracellular matrix containing bioactive molecules. Tissue Eng. Part A. 2013; 19(3-4): 329–39.
17. Ding F, Deng H, Du Y, et al. Emerging chitin and chitosan nanofibrous materials for biomedical applications. Nanoscale. 2014; 6: 9477–93.
18. Gilpin DA. Calculation of a new Meeh constant and experimental determination of burn size. Burns. 1996; 22(8): 607–11.
19. Acta Pharmacologica Sinica. 2001; 22(12): 1113–6.
20. Bougandoura A, D'Abrosca B, Ameddah S, et al. Chemical constituents and *in vitro* anti-inflammatory activity of *Cistanche violacea* Desf. (Orobanchaceae) extract. Fitoterapia. 2016; 109(2): 248–53.
21. Bynum JA, Taylor AS, Peltier GC, et al. Evaluation of adenosine, lidocaine, and magnesium for enhancement of platelet function during storage. J Trauma Acute Care Surg. 2017; 83(1): S9–S15.
22. Chakraborty PD, De D, Bandyopadhyay S, Bhattacharyya D. Human aqueous placental extract as a wound healer. J Wound Care. 2009; 18(11): 462–7.
23. Chang AC, Dearman B, Greenwood JE. A comparison of wound area measurement techniques: visitrak versus photography. Eplasty. [Internet]. 2011 Apr 18; [cited June 15 2021]; 11: e18. Available from: <https://www.hmpgloballlearningnetwork.com/site/eplasty/comparison-wound-area-measurement-techniques-visitrak-versus-photography>
24. Choi JS, Kim JD, Yoon HS, Cho YW. Full-thickness skin wound healing using human placenta-derived extracellular matrix containing bioactive molecules. Tissue Eng. Part A. 2013; 19(3-4): 329–39.
25. Ding F, Deng H, Du Y, et al. Emerging chitin and chitosan nanofibrous materials for biomedical applications. Nanoscale. 2014; 6: 9477–93.
26. Gilpin DA. Calculation of a new Meeh constant and experimental determination of burn size. Burns. 1996; 22(8): 607–11.
27. Hong JW, Lee WJ, Hahn SB, et al. The effect of human placenta extract in a wound healing model. Ann Plast Surg. 2010; 65(1): 96–100.
28. Jazayeri MH, Barzaman K, Nedaeinia R, et al. Human placental extract attenuates neurological symptoms in the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis – a putative approach in MS disease? Auto Immun Highlights. [Internet]. 2020 Oct 4 [cited June 15 2021]; 11(1): 14. Available from: <https://autoimmunhighlights.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13317-020-00137-x>
29. Jimi S, Kimura M, Francesco FD, et al. Acceleration mechanisms of skin wound healing by autologous micrograft in mice. Int J Mol Sci. [Internet]. 2017 Aug 2 [cited June 10 2021]; 18(8): 1675. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/18/8/1675/htm>
30. Joshi MG, Kshersagar J, Desai SR, Sharma S. Antiviral properties of placental growth factors: A novel therapeutic approach for COVID-19 treatment. Placenta. 2020; 99: 117–30.
31. Katkurwar A, Chaudhari D, Mahale S, et al. Human placental extract a miracle that heals the wound faster. J Oral Res Rev. 2021; 13(1): 1–5.
32. Kottke-Marchant K, Corcoran G. The laboratory diagnosis of platelet disorders: an algorithmic approach. Arch Pathol Lab Med. 2002. 126: 133–46.
33. Kurahashi T, Fujii J. Roles of antioxidative enzymes in wound healing. J Dev Biol. 2015; 3: 57–70.
34. Mao Y, Singh-Varma A, Hoffman T, et al. The effect of cryopreserved human placental tissues on biofilm formation of wound-associated pathogen. J Funct Biomater. [Internet]. 2018 Jan 8 [cited June 14 2021]; 9(1): 3. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-4983/9/1/3/htm>
35. Meijer K, Vonk RJ, Priebe MG, Roelofsen H. Cell-based screening assay for anti-inflammatory activity of bioactive compounds. Food Chem. 2015; 166: 158–64.
36. Mukherjee C, Saleem S, Das S, et al. Human placental laminin: Role in neuronal differentiation, cell adhesion and

19. Hong JW, Lee WJ, Hahn SB, et al. The effect of human placenta extract in a wound healing model. *Ann Plast Surg.* 2010; 65(1): 96–100.
20. Jazayeri MH, Barzaman K, Nedaeinia R, et al. Human placental extract attenuates neurological symptoms in the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis – a putative approach in MS disease? *Auto Immun Highlights.* [Internet]. 2020 Oct 4 [cited June 15 2021]; 11(1): 14. Available from: <https://autoimmunhighlights.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13317-020-00137-x>
21. Jimi S, Kimura M, Francesco FD, et al. Acceleration mechanisms of skin wound healing by autologous micrograft in mice. *Int J Mol Sci.* [Internet]. 2017 Aug 2 [cited June 10 2021]; 18(8): 1675. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/18/8/1675/htm>
22. Joshi MG, Kshersagar J, Desai SR, Sharma S. Antiviral properties of placental growth factors: A novel therapeutic approach for COVID-19 treatment. *Placenta.* 2020; 99: 117–30.
23. Katkurwar A, Chaudhari D, Mahale S, et al. Human placental extract a miracle that heals the wound faster. *J Oral Res Rev.* 2021; 13(1): 1–5.
24. Kottke-Marchant K, Corcoran G. The laboratory diagnosis of platelet disorders: an algorithmic approach. *Arch Pathol Lab Med.* 2002. 126: 133–46.
25. Kurahashi T, Fujii J. Roles of antioxidative enzymes in wound healing. *J Dev Biol.* 2015; 3: 57–70.
26. Mao Y, Singh-Varma A, Hoffman T, et al. The effect of cryopreserved human placental tissues on biofilm formation of wound-associated pathogen. *J Funct Biomater.* [Internet]. 2018 Jan 8 [cited June 14 2021]; 9(1): 3. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-4983/9/1/3/htm>
27. Meijer K, Vonk RJ, Priebe MG, Roelofsen H. Cell-based screening assay for anti-inflammatory activity of bioactive compounds. *Food Chem.* 2015: 166: 158–64.
28. Mukherjee C, Saleem S, Das S, et al. Human placental laminin: Role in neuronal differentiation, cell adhesion and proliferation. *J Biosci.* [Internet]. 2020 July 2 [cited June 14 2021]; 45: 93. Available from: <https://www.ias.ac.in/article/fulltext/jbsc/045/0093>
29. Nagae M, Nagata M, Teramoto M, et al. Effect of porcine placenta extract supplement on skin condition in healthy adult women: a randomized, double-blind placebo-controlled study. *Nutrients.* [Internet]. 2020 June 4 [cited June 10 2021]; 12(6): 1671. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6643/12/6/1671/htm>
30. Nakamura H, Yokoyama Y, Motoyoshi S, et al. Effect of a nonsteroidal anti-inflammatory agent, tolmetin sodium on exudative inflammation in experimental animals. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 1979; 75(5): 447–58.
31. Nardid OA, Repina SV, Rozanova ED, et al. Properties of aqueous-saline human placental extracts and their fractions after storage of placenta at various subzero temperatures. *J Exp Integr Med.* 2015; 5(4): 172–7.
32. Nath S, Bhattacharyya D. Cell adhesion by aqueous extract of human placenta used as wound healer. *Indian J Exp Biol.* 2007; 45(8): 732–8.
33. Okoli CO, Akah PA, Onuoha NJ, et al. *Acanthus montanus*: an experimental evaluation of the antimicrobial, anti-inflammatory and immunological properties of a traditional remedy for furuncles. *BMC Complement Altern Med.* [Internet]. 2008 June 6 [cited June 11 2021]; 8: 27. Available from: <https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6882-8-27>
34. Palanker ND, Lee CT, Weltman RL, et al. Antimicrobial efficacy assessment of human derived composite amnion-chorion membrane. *Sci Rep.* [Internet]. 2019 Oct 30 [cited June 8 2021]; 9: 15600. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-52150-4>
35. Pan SY, Chan MKS, Wong MBF, et al. Placental therapy: an insight to their biological and therapeutic properties. *J Med Therap.* 2017; 1(3): 1–6.
36. Pan SY, Chan MKS, Wong MBF, et al. Placental therapy: an insight to their biological and therapeutic properties. *J Med Therap.* 2017; 1(3): 1–6.
37. Park H-J, Shim HS, Lee S, et al. Anti-stress effects of human placenta extract: possible involvement of the oxidative stress system in rats. *BMC Complement Altern Med.* [Internet]. 2018 May 08 [cited June 7 2021]; 18: 149. Available from: <https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-018-2193-x>
38. Pogozykh DN, Rozanova ED, Nardid OA. Change of properties of human placenta aqueous-saline extracts during low temperature storage. *Problems of Cryobiology.* 2008; 18(1): 22–6.
39. Rozanova SL, Naumenko Yel, Nardid EO. Influence of low temperature storage and ultrasonic treatment of placenta on its extracts antioxidant properties. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2015; 25(3): 255–66.
40. Rozanova SL, Rozanova ED, Nardid OA, Karpenko VG. Antioxidant activity of placenta extracts after low temperature and hypothermic storage. *Problems of Cryobiology.* 2011; 21(3): 291–300.
41. Sur TK, Biswas TK, Ali L, Mukherjee B. Anti-inflammatory and anti-platelet aggregation activity of human placental extract. *Acta Pharmacol Sin.* 2003; 24(2): 187–92.
42. Yesmin S, Paul A, Naz T, et al. Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of ethanolic root extract of Choi (*Piper chaba*). *Clin Phytosci.* 2020 Aug 27 2020 [cited June 7 2021]; 6: 59. Available from: <https://clinphytoscience.springeropen.com/articles/10.1186/s40816-020-00207-7>





36. Park H-J, Shim HS, Lee S, et al. Anti-stress effects of human placenta extract: possible involvement of the oxidative stress system in rats. *BMC Complement Altern Med.* [Internet]. 2018 May 08 [cited June 7 2021]; 18: 149. Available from: <https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-018-2193-x>
37. Sur TK, Biswas TK, Ali L, Mukherjee B. Anti-inflammatory and anti-platelet aggregation activity of human placental extract. *Acta Pharmacol Sin.* 2003; 24(2): 187–92.
38. Yesmin S, Paul A, Naz T, et al. Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of ethanolic root extract of Choi (*Piper chaba*). *Clin Phytosci.* 2020 Aug 27 [cited June 7 2021]; 6: 59. Available from: <https://clinphytoscience.springeropen.com/articles/10.1186/s40816-020-00207-7>
39. Zhang D, Lijuan G, Jingjie L, et al. Cow placenta extract promotes murine hair growth through enhancing the insulin-like growth factor-1. *Indian J Dermatol.* 2011; 56(1): 14–8.