

УДК 615.361.013.85.014.41:611.013.85

О.С. Прокопюк^{1*}, М.В. Шевченко¹, В.Ю. Прокопюк^{1,2}
І.Б. Мусатова¹, Р.А. Сафонов², О.В. Прокопюк³

Виділення та кріоконсервування клітин плацент: пошук ефективних біотехнологій для експериментальної та регенеративної медицини

UDC 615.361.013.85.014.41:611.013.85

O.S. Prokopiuk^{1*}, M.V. Shevchenko¹, V.Yu. Prokopiuk^{1,2}
I.B. Musatova¹, R.A. Safonov², O.V. Prokopiuk³

Isolation and Cryopreservation of Placental Cells: Search for Optimal Biotechniques in Experimental and Regenerative Medicine

Реферат: Висока терапевтична ефективність клітин плаценти людини в корекції ряду патологічних процесів обґрунтовує проведення подальших доклінічних досліджень щодо їх використання у лікуванні інших соціально значущих та малокурабельних захворювань. Це обумовлює необхідність вдосконалення методів отримання, стандартизації та зберігання клітин плацент експериментальних тварин. Клітини виділяли з плацент щурів та мишей різними ферментативними методами та методом із застосуванням експлантів. Клітини кріоконсервували під захистом диметилсульфоксиду у середовищі DMEM методом двоетапного заморожування. Оцінювали кількість, морфологічні, культуральні, метаболічні характеристики клітин після отримання та зберігання. Максимальну кількість життєздатних клітин із плацент мишей та щурів було отримано за допомогою методу експлантів та методик із використанням трипсину та ЕТДА. Встановлено, що збереженість деконсервованих клітин плацент щурів за методом виключення барвника становить (92,3 ± 1,6)%, за адгезивним тестом – (81,3 ± 5,8)%, для клітин плацент мишей – (86,7 ± 3,7) та (79,2 ± 8,1)% відповідно. Отримані результати дозволили визначити ефективні біотехнології отримання кріоконсервованих плацентарних клітин щурів і мишей для проведення доклінічних досліджень їх біологічної дії в моделях ало- і ауто трансплантації.

Ключові слова: плацента, виділення клітин, експланти, культура клітин, кріоконсервування, миші, щури.

Abstract: A high efficacy of placental cells application necessitates their investigation. Preclinical studies require an improvement of the methods for obtaining, standardizing and storage of placental cells of experimental animals. Cells were isolated from rats and mice placentas by means of different enzymatic methods and the one of explants. Cells were cryopreserved with DMSO in DMEM using two-stage freezing. The number, morphological, cultural, metabolic features of cells were studied after isolation and storage. The maximum number of viable cells from the placentas of mice and rats was found to be obtained using the explant method or trypsin with ETDA. Cell cultures from mice and rats placentas after the third passage had stable morphofunctional characteristics. Viability of warmed rat placental cells according to dye exclusion was (92.3 ± 1.6)%, according to the adhesive test this was (81.3 ± 5.8)%. For mice placental cells, these values were (86.7 ± 3.7)% and (79.2 ± 8.1)%, correspondingly. The research results enabled the determining of effective biotechniques for obtaining the cryopreserved placental cells of rats and mice to perform preclinical studies of their biological effect in models of allo- and autotransplantations.

Key words: placenta, cell isolation, explants, cell culture, cryopreservation, mice, rats.

Плацента – перспективне джерело отримання клітин, зокрема прогеніторних, стовбурових, імункомпетентних, гормонопродуруючих тощо, для використання в регенеративній медицині [4, 8, 9, 11, 18, 19]. Донація плацент є безпечною, вона не пов'язана з етичними проблемами та забезпечує значну кількість ало- та аутоматеріалу [5–7, 17]. Експериментально доведено терапевтичну ефективність похідних плаценти людини в репродуктології, лікуванні неврологічних, ендокринних,

The placenta is a promising source of cells, including progenitor, stem, immunocompetent, hormone-producing ones, *etc.*, to be used in regenerative medicine [2, 6, 7, 9, 18, 19]. Placental donation is safe, unrelated to ethical issues, and provides a significant amount of allo- and autologous cells [3–5, 17]. Therapeutic efficiency of human placental derivatives in reproductive medicine, treatment of neurological, endocrine, cardiovascular and oncological diseases has been

¹ Відділ кріобіології системи репродукції, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків

² Харківський національний медичний університет

³ Харківська академія післядипломної освіти

¹ Department of Cryobiology of Reproductive System, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv

² Kharkiv National Medical University

³ Kharkiv Academy of Postgraduate Education

*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: o.s.prokopiuk@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: o.s.prokopiuk@gmail.com

Надійшла 13.01.2020

Прийнята до друку 08.02.2021

Received January, 13, 2020

Accepted February, 08, 2021

© 2021 O.S. Prokopiuk, 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.

серцево-судинних та онкологічних захворювань [1, 2, 15, 16, 19, 20], що обґрунтовує проведення подальших доклінічних досліджень щодо застосування плацентарних клітин у лікуванні інших соціально значущих та малокурабельних захворювань. На стадії доклінічних випробувань використовуються клітини плаценти людини, що фактично відтворює модель ксенотрансплантації. Проте у клінічній практиці клітини плаценти людини передбачено використовувати в ало- та аутосистемах, що обумовлює необхідність проведення відповідних доклінічних досліджень та верифікації біобезпеки і потреби наявності ефективних біотехнологій отримання кріоконсервованих плацентарних клітин експериментальних тварин.

У зв'язку з вищевикладеним метою даного дослідження були пошук і визначення ефективних методів виділення з плацент лабораторних тварин клітин для кріоконсервування, низькотемпературного зберігання і подальшого експериментального використання в моделях ало- та ауто-трансплантації.

Матеріали та методи

Експерименти проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорсткого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) із дотриманням вимог комітету з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, узгоджених із положенням «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

Дослідження проводили на 63 плацентах 6-місячних щурів лінії Вістар та 180 плацентах 6-місячних мишей лінії BALB/c. Плаценти отримували на 20-й день гестації. Клітини плаценти зазвичай виділяють ферментативним методом [3–5, 7, 10] та методом з використанням експлантів [6, 9, 12, 18]. У цьому дослідженні гетерогенну популяцію клітин отримували з ворсин плацент вищевказаними методами із застосуванням 1 мг/мл колагенази типу А; 0,25% трипсину; 0,25% трипсину та 0,1 мг/мл ДНКазі; 0,2 г/л ЕДТА без трипсину; 0,25% трипсину з 0,2 г/л ЕДТА та методу експлантів. Отриману клітинну суспензію кріоконсервували з додаванням 10% диметилсульфоксиду в середовище культивування та охолодженням зі швидкістю 1 °С/хв до –80°С і подальшим зануренням у рідкий азот [13]. Клітинну суспензію розморожували на водяній бані при температурі 40°С.

Ефективність методів виділення клітин із плацент визначали за кількістю отриманих клітин,

experimentally proven [13–16, 19, 20], that justifies further preclinical studies, use of placental cells for treatment of other socially significant and incurable diseases., Human placental cells are used At the stage of preclinical trials human placental cells are used, that actually reproduces the model of xenotransplantation. However, in clinical practice, human placental cells are intended to be used in allo- and autotransplants, which necessitates appropriate preclinical studies and verification of biosafety and requires the availability of effective biotechnologies for cryopreserved placental cells of experimental animals.

In this regard, the aim of this study was to search for and determine the effective methods of cell isolation from the placentas of laboratory animals for cryopreservation, low-temperature storage and subsequent experimental use in allo- and autotransplantation models.

Materials and methods

The experiments were performed in accordance with the Law of Ukraine ‘On Protection of Animals Against Cruel Treatment’ (№ 3447-IV of February 21st, 2006) in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, consistent with the European Convention on Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes (Strasbourg, 1986).

The studies were performed in 63 placentas of 6-month-old Wistar rats and 180 placentas of 6-month-old BALB/c mice. Placentas were obtained on day 20 of gestation. Placental cells are usually isolated by the enzymatic method [1–3, 5, 8] and by the explant one [4, 7, 10, 18]. In this study, a heterogeneous cell population was obtained from placental villi by the above methods using 1 mg/ml collagenase type A; 0.25% trypsin; 0.25% trypsin and 0.1 mg/ml DNase; 0.2 g/l EDTA without trypsin; 0.25% trypsin with 0.2 g/l EDTA and the explant method. The resulted cell suspension was cryopreserved by adding 10% dimethyl sulfoxide to the culture medium and cooling at a rate of 1°C/min to –80°C with subsequent immersion into liquid nitrogen [11]. The cell suspension was thawed in a water bath at 40°C.

The effectiveness of methods for isolating cells from the placenta was determined by the number of cells obtained, percentage of living cells (trypan blue exclusion method), indices of viability and functional activity (evaluation of cell adhesion properties, metabolic activity on MTT test, resazurin reduction and the one of glucose uptake by cells

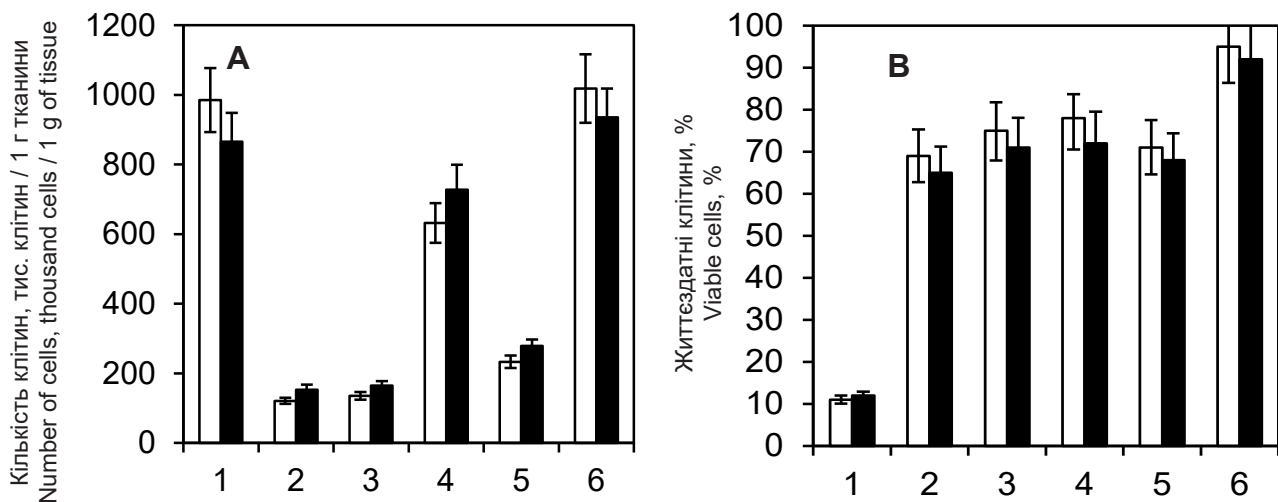


Рис. 1. Кількість (А) та життєздатність (В) клітин плацент мишей (□) і щурів (■), виділених із використанням колагенази типу А (1), трипсину (2), трипсину та ДНКази (3), ЕДТА (4), трипсину з ЕДТА (5) та методом експлантів (6).

Fig. 1. Number (A) and viability (B) of placental cells of mice (□) and rats (■) isolated using collagenase type A (1), trypsin (2), trypsin and DNase (3), EDTA (4), trypsin with EDTA (5) and method of explants (6).

відсотком живих клітин (метод виключення трипанового синього), показниками життєздатності та функціональної активності (оцінка адгезивних властивостей клітин, активності метаболізму за даними МТТ-тесту, тесту відновлення резаурину та тесту поглинання клітинами глюкози з середовища культивування) [1, 13]. Дослідження плацентарних клітин проводили безпосередньо після їх отримання, в процесі культивування та після розморожування.

Для статистичної обробки результатів використовували U-критерій Манна-Уїтні та критерій Краскела-Уоліса. Значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Результати проведених досліджень показали, що найбільшу кількість клітин із плацент щурів та мишей можна отримати культуральним методом із використанням експлантів і методами ферментативної дезагрегації за допомогою трипсину з ЕДТА чи колагенази (рис. 1, А). Розмір клітин, виділених із плацент мишей та щурів, незалежно від використовуваного методу становив $(23,36 \pm 2,33)$ та $(18,26 \pm 1,81)$ мкм відповідно, що обумовлено видоспецифічністю. Максимальний відсоток життєздатних клітин отримано методом експлантів, мінімальний – виділенням за допомогою колагенази (рис. 1, В). Наші дані щодо ефективності методів виділення клітин із плацент щурів і мишей узгоджуються з літературними, відносно методик отримання клітин з плаценти людини [7, 9]. Так, виділення клітин із плаценти людини методом експлантів є

відсотком живих клітин (метод виключення трипанового синього) [11, 13]. Studies of placental cells were performed immediately after their obtaining, during cultivation and after thawing.

Mann-Whitney U-test and Kruskal-Wallis test were used for statistical processing of the results. Significant differences were considered at $p < 0.05$.

Results and discussion

The findings demonstrated that the largest number of cells from the placentas of rats and mice can be obtained by explants and enzymatic disaggregation by trypsin with ETDA or collagenase (Fig. 1A). The size of cells isolated from the mice and rats placentas, regardless of the method used was (23.36 ± 2.33) and (18.26 ± 1.81) μm , respectively, due to their species specificity. The maximum percentage of viable cells was obtained by the explant culture, the minimum was done by selection with collagenase (Fig. 1B). Our data on the effectiveness of methods for to isolate the cells from the placenta of rats and mice are consistent with the published reports on the methods of obtaining cells from human placenta [5, 7]. Thus, the isolation of cells from the human placenta by the explant culture is more effective than enzymatic methods, due to the likely negative effect of enzymes, primarily collagenase, on the integrity of cell membranes. The percentage of living cells according to the trypan blue exclusion test was significantly higher than those on the results of adhesive test. The last test characterizes the viability, functional activity of cells, so we consider it prognostically more important for assessing the preservation rate of the obtained cells.

більш ефективним порівняно з ферментативними методами, що пояснюється вірогідним негативним впливом ферментів, в першу чергу колагенази, на цілісність мембран клітин. Відсоток живих клітин за даними тесту виключення трипанового синього був значно вищим, ніж за результатами адгезивного тесту. Останній тест характеризує життєздатність, функціональну активність клітин, тому вважаємо його прогностично більш вагомим для оцінки збереженості отриманих клітин.

На підставі наведених результатів досліджень у подальшій роботі ми використовували культури клітин плаценти мишей та щурів, отримані

Based on the research results, the mice and rats placental cells cultures obtained from explants and enzymatic method using trypsin and EDTA were used in the further investigations, as much less viable cells can be isolated by other methods. The study under culture revealed that after reseeding in 1:2 ratio of the rat placental cells restore the confluent monolayer for 3–4 days, in contrast to the culture of placental cells of mice, which restore the monolayer on days 4–5. In the 3rd passage, the cultures acquire morphofunctional homogeneity: almost all cells are fibroblast-like and actively divide (Fig. 2). The obtained results indicate

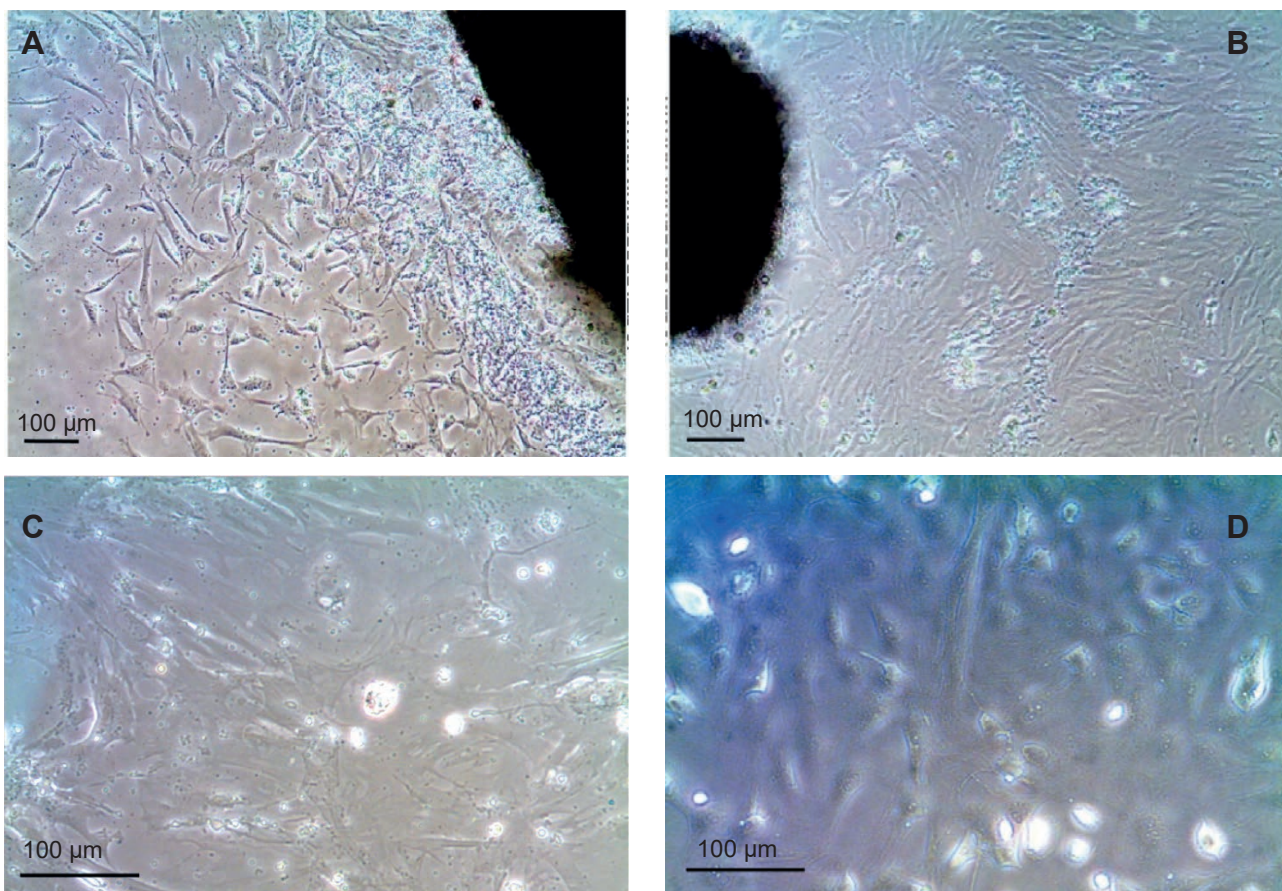


Рис. 2. Культури клітин, отримані методом експлантів із плацент: **A, B** – миші, **C, D** – щура. Первинна культура – **A, C**; 3-й пасаж – **B, D**.

Fig. 2. Cell cultures obtained by the method of explants from the placenta: **A, B** – mice, **C, D** – rats. Primary culture – **A, C**; 3rd passage – **B, D**.

методом експлантів та ферментативним методом із застосуванням трипсину й ЕДТА, оскільки за допомогою інших методів можна виділити значно меншу кількість життєздатних клітин. Дослідження в умовах культивування виявило, що після пересіву у співвідношенні 1:2 клітини плацент щурів відновлюють конфлюентний моношар протягом 3–4-х діб на відміну від культури клітин плаценти мишей, які відновлюють моношар

a high proliferative activity and plasticity of placental cells of rats and mice, which coincides with the corresponding properties of cells isolated from human placentas [5, 17].

A study of the functional characteristics of cells isolated from the placentas of mice and rats using the MTT test and resazurin reduction test showed that the metabolic activity of primary culture cells increases from the 1st to the 2nd passage



на 4–5-ту добу. У 3-му пасажі культури набувають морфофункціональної однорідності: практично всі клітини є фібробластоподібними та активно діляться (рис. 2). Отримані результати свідчать про високу проліферативну активність і пластичність плацентарних клітин щурів і мишей, що співпадає з відповідними властивостями клітин, виділених із плацент людини [7, 17].

Дослідження функціональних характеристик клітин, виділених із плацент мишей та щурів,

and remains almost the same after the 3rd one (Fig. 3).

The rate of glucose uptake by cells from the culture medium varies slightly, which may be due to both the low sensitivity of the method and the peculiarities of the functioning of placental cells in the selected model *in vitro*.

The results of cryopreservation showed that the number of rats' placental cells isolated by explants, after thawing, probably does not decrease,

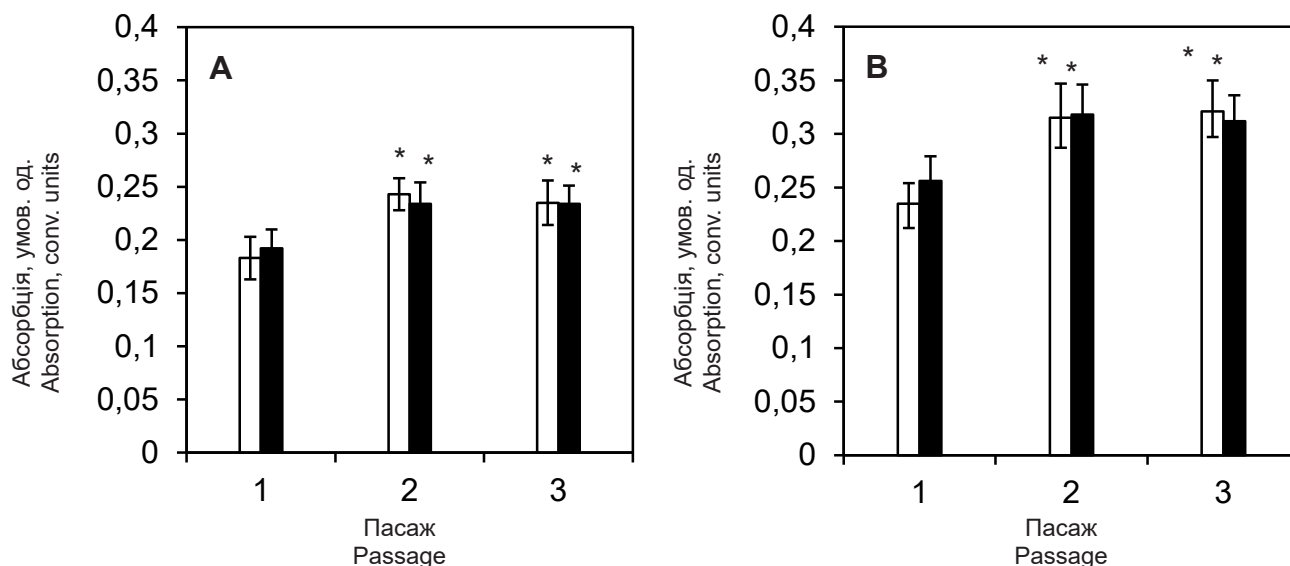


Рис. 3. Метаболічна активність клітин плаценти мишей (А) та щурів (В) за даними МТТ-тесту: □ – клітини, виділені з застосуванням трипсину з ЕДТА; ■ – клітини, виділені методом експлантів. * – відмінності значущі відносно клітин 1-го пасажу ($p < 0,05$).

Fig. 3. Metabolic activity of placental cells of mice (A) and rats (B) according to MTT test: □ – cells isolated using trypsin from EDTA; ■ – cells isolated by explants. * – differences are relative to the 1st passage cells ($p < 0.05$).

за допомогою МТТ-тесту та тесту відновлення резаурину показали, що метаболічна активність клітин первинної культури підвищується від 1-до 2-го пасажу та залишається практично на такому самому рівні після 3-го пасажу (рис. 3).

Показник поглинання глюкози клітинами з середовища культивування змінюється незначно, що може бути пов'язане як із низькою чутливістю методу, так і з особливостями функціонування клітин плаценти в обраній моделі *in vitro*.

Результати кріоконсервування довели, що кількість клітин плацент щурів, виділених методом культивування експлантів, після розморожування вірогідно не зменшується, а збереженість клітин, встановлена за методом виключення трипанового синього, становить ($92,3 \pm 1,6$)%, за адгезивним тестом – ($81,3 \pm 5,8$)%. Для клітин плацент мишей ці показники дорівнюють ($86,7 \pm 3,7$) та ($79,2 \pm 8,1$)% відповідно. Метаболічна активність незначно підвищується на 1-шу добу після

and the preservation of cells, established by the method of trypan blue, is (92.3 ± 1.6)%, by adhesive test – ($81, 3 \pm 5.8$)%. For mouse placental cells, these values are (86.7 ± 3.7) and (79.2 ± 8.1)%, respectively. Metabolic activity slightly increases on the 1st day after warming and decreases to control values on day 3.

These data illustrate a high morphofunctional preservation of mice and rats placental cells. Thus, the selected methods of isolation and cryopreservation of placental cells of experimental animals constitute an effective biotechnology for their production for appropriate preclinical studies.

Conclusions

The largest number of viable cells from the placentas of mice and rats can be isolated by means of enzymatic method using trypsin with ETDA and the one of explants. Stable morpholo-



деконсервування та знижується до контрольних показників на 3-тю добу.

Наведені дані свідчать про високу морфофункціональну збереженість плацентарних клітин мишей і щурів. Таким чином, обрані методи виділення та кріоконсервування плацентарних клітин експериментальних тварин складають ефективну біотехнологію отримання для проведення відповідних доклінічних досліджень.

Висновки

Найбільша кількість життєздатних клітин із плацент мишей та щурів може бути виділена ферментативним методом із використанням трипсину з ЕТДА та методом культивування експлантів. Стабільних морфологічних і метаболічних характеристик культури клітин із плацент мишей та щурів набувають на 3-му пасажі. Кріоконсервування клітин плаценти під захистом 10% диметилсульфоксиду в середовищі культивування методом двоетапного заморожування дозволяє забезпечити збереженість більше 80%, що достатньо для використання в експериментальній медицині з метою визначення біологічної дії, верифікації біобезпеки та терапевтичної ефективності в ауто- та алосистемах.

Література

1. Прокопюк ВЮ. Вплив середовищ, кондиційованих кріоконсервованими та свіжовиділеними експлантами та клітинами плаценти, на органотипові культури маток та яєчників мишей. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2018;28(2): 139–50.
2. Прокопюк ОС, Прокопюк ВЮ, Пасієшвілі НМ, та ін. Імплантація кріоконсервованих фрагментів плаценти людини відновлює прооксидантно-антиоксидантний баланс у експериментальних тварин пізнього онтогенезу. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2017;27(1):61–70.
3. Araujo AB, Furlan JM, Salton GD, et al. Isolation of human mesenchymal stem cells from amnion, chorion, placental decidua and umbilical cord: comparison of four enzymatic protocols. *Biotechnol Lett*. 2018;40(6):989–98.
4. Beeravolu N, McKee C, Alamri A, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human umbilical cord and fetal placenta. *J Vis Exp [Internet]*. 2017 Apr 3 [cited 2019 Dec 10];(122):55224. Available from: <https://www.jove.com/pdf/55224/jove-protocol-55224-isolation-characterization-mesenchymal-stromal-cells-from-human>.
5. Choi YS, Park YB, Ha CW, et al. Different characteristics of mesenchymal stem cells isolated from different layers of full term placenta. *PLoS ONE [Internet]*. 2017 Feb 22 [cited 2019 Dec 10];12(2):e0172642. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0172642>.
6. Huang Q, Yang Y, Luo C, et al. An efficient protocol to generate placental chorionic plate-derived mesenchymal stem cells with superior proliferative and immunomodulatory properties. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10:301–16.

gical and metabolic characteristics of the placental cell culture of mice and rats are acquired on the 3rd passage. Cryopreservation of placental cells with 10% dimethyl sulfoxide in the culture medium by two-stage freezing allows the preservation of more than 80%, that is sufficient to be used in experimental medicine to determine biological action, verify biosafety and therapeutic efficiency in auto- and allosystems.

References

1. Araujo AB, Furlan JM, Salton GD, et al. Isolation of human mesenchymal stem cells from amnion, chorion, placental decidua and umbilical cord: comparison of four enzymatic protocols. *Biotechnol Lett*. 2018;40(6):989–98.
2. Beeravolu N, McKee C, Alamri A, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human umbilical cord and fetal placenta. *J Vis Exp [Internet]*. 2017 Apr 3 [cited 2019 Dec 10];(122):55224. Available from: <https://www.jove.com/pdf/55224/jove-protocol-55224-isolation-characterization-mesenchymal-stromal-cells-from-human>.
3. Choi YS, Park YB, Ha CW, et al. Different characteristics of mesenchymal stem cells isolated from different layers of full term placenta. *PLoS ONE [Internet]*. 2017 Feb 22 [cited 2019 Dec 10];12(2):e0172642. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0172642>.
4. Huang Q, Yang Y, Luo C, et al. An efficient protocol to generate placental chorionic plate-derived mesenchymal stem cells with superior proliferative and immunomodulatory properties. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10:301–16.
5. James JL, Hurley DG, Gamage TKJB, et al. Isolation and characterization of a novel trophoblast side-population from first trimester placenta. *Reproduction*. 2015;150(5):449–62.
6. Kozub MM, Prokopyuk VYu, Skibina KP, et al. Comparison of various of tissue and cell therapy approaches when restoring ovarian, hepatic and kidney's function after chemotherapy-induced ovarian failure. *Exp Oncol [Internet]*. 2017 Sep [cited 2019 Dec 10];39(3):181–5. Available from: <https://exp-oncology.com.ua/article/10137>.
7. Lobo SE, Leonel LC, Miranda CM, et al. The placenta as an organ and a source of stem cells and extracellular matrix: a review. *Cells Tissues Organs*. 2016; 201(4):239–52.
8. Miki T, Marongiu F, Ellis E, Strom SC. Isolation of amniotic epithelial stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol [Internet]*. 2010 Jan 15 [cited 2019 Dec 10]; Chapter 1:Unit 1E.3. Available from: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470151808.sc01e03s3>.
9. Naji A, Eitoku M, Favier B, et al. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(17):3323–48.
10. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international workshop on placenta derived stem cells. *Stem Cells*. 2008;6(2):300–11.
11. Pogozhykh D, Pogozhykh O, Prokopyuk V, et al. Influence of temperature fluctuations during cryopreservation on vital parameters, differentiation potential, and transgene expression of placental multipotent stromal cells. *Stem Cell Res Ther [Internet]*. 2017 Mar 11 [cited 2019 Dec 10];8(1):66. Available from: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-017-0512-7>



7. James JL, Hurley DG, Gamage TKJB, et al. Isolation and characterization of a novel trophoblast side-population from first trimester placenta. *Reproduction*. 2015;150(5):449–62.
8. Kozub MM, Prokopyuk VYu, Skibina KP, et al. Comparison of various of tissue and cell therapy approaches when restoring ovarian, hepatic and kidney's function after chemotherapy-induced ovarian failure. *Exp Oncol* [Internet]. 2017 Sep [cited 2019 Dec 10];39(3):181–5. Available from: <https://exp-oncology.com.ua/article/10137>.
9. Lobo SE, Leonel LC, Miranda CM, et al. The placenta as an organ and a source of stem cells and extracellular matrix: a review. *Cells Tissues Organs*. 2016; 201(4):239–52.
10. Miki T, Marongiu F, Ellis E, Strom SC. Isolation of amniotic epithelial stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol* [Internet]. 2010 Jan 15 [cited 2019 Dec 10]; Chapter 1:Unit 1E.3. Available from: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470151808.sc01e03s3>.
11. Naji A, Eitoku M, Favier B, et al. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(17):3323–48.
12. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international workshop on placenta derived stem cells. *Stem Cells*. 2008;6(2):300–11.
13. Pogozhykh D, Pogozhykh O, Prokopyuk V, et al. Influence of temperature fluctuations during cryopreservation on vital parameters, differentiation potential, and transgene expression of placental multipotent stromal cells. *Stem Cell Res Ther*. [Internet]. 2017 Mar 11 [cited 2019 Dec 10];8(1):66. Available from: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-017-0512-7>.
14. Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, et al. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;194(3):664–73.
15. Prokopyuk VYu, Karpenko VG, Shevchenko MV, et al. Experience in clinical application of cryopreserved placental derivatives: cells, tissue, membranes, extract, and cord blood serum. *Innov Biosyst Bioeng*. 2020; 4 (3): 160–8.
16. Silini AR, Cancelli S, Signoroni PB, et al. The dichotomy of placenta-derived cells in cancer growth. *Placenta*. 2017;59:154–62.
17. Silini AR, Masserdotti A, Papait A, Parolini O. Shaping the future of perinatal cells: lessons from the past and interpretations of the present. *Front Bioeng Biotechnol*. [Internet]. 2019 Apr 10 [cited 2019 Dec 10];7:75. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2019.00075/full>.
18. Soncini M, Vertua E, Gibelli L, et al. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007;1(4):296–305.
19. Svitina H, Kyryk V, Skrypkina I, et al. Placenta-derived multipotent cells have no effect on the size and number of DMH-induced colon tumors in rats. *Exp Ther Med*. 2017;14(3):2135–47.
20. Zhang X, Mitsuru A, Igura K, et al. Mesenchymal progenitor cells derived from chorionic villi of human placenta for cartilage tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;340(3):944–52.
12. Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, et al. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;194(3):664–73.
13. Prokopyuk VYu. Influence of media conditioned by cryopreserved and fresh placental explants and cells on murine uterine and ovarian organotypic cultures. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2018;28(2):139–50.
14. Prokopyuk OS, Prokopyuk VYu, Pasiesshvilii NM, et al. Implantation of cryopreserved human placental fragments restores prooxidant-antioxidant balance in experimental animals of late ontogeny. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2017;27(1):61–70.
15. Prokopyuk VYu, Karpenko VG, Shevchenko MV, et al. Experience in clinical application of cryopreserved placental derivatives: cells, tissue, membranes, extract, and cord blood serum. *Innov Biosyst Bioeng*. 2020; 4 (3): 160–8.
16. Silini AR, Cancelli S, Signoroni PB, et al. The dichotomy of placenta-derived cells in cancer growth. *Placenta*. 2017;59:154–62.
17. Silini AR, Masserdotti A, Papait A, Parolini O. Shaping the future of perinatal cells: lessons from the past and interpretations of the present. *Front Bioeng Biotechnol*. [Internet]. 2019 Apr 10 [cited 2019 Dec 10];7:75. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2019.00075/full>.
18. Soncini M, Vertua E, Gibelli L, et al. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007;1(4):296–305.
19. Svitina H, Kyryk V, Skrypkina I, et al. Placenta-derived multipotent cells have no effect on the size and number of DMH-induced colon tumors in rats. *Exp Ther Med*. 2017;14(3):2135–47.
20. Zhang X, Mitsuru A, Igura K, et al. Mesenchymal progenitor cells derived from chorionic villi of human placenta for cartilage tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;340(3):944–52.

