

**Краткая характеристика
Препарат Мэлсмон в ампулах (2 мл) для
подкожного введения, производство «Мэлсмон
Фармасьютикал Ко., Лтд» (Токио, Япония)**

Лекарственный препарат Мэлсмон представляет собой экстракт, содержащий различные биомолекулы плаценты, производится из плаценты человека и относится к аллогенным плацентарным препаратам, обладает широким диапазоном биологических эффектов. В настоящее время широко используется для снижения усталости, облегчения симптомов менопаузы и устранения алактрии.

Мэлсмон представляет собой прозрачный или с легкой опалесценцией раствор от светло-желтого до желтого с коричневым оттенком цвета со специфическим запахом. Водородный показатель (рН) раствора колеблется в пределах от 6,5 до 7,5; оптическая плотность, определенная спектрофотометрически при длине волны 540 нм не превышает 0,7 и, как правило, колеблется в пределах 0109 – 0301; показатель плотности составляет величину дозванного интервала от 1,051 до 1,055 г/мл. В составе препарата содержатся только низкомолекулярные вещества в виде аминокислот, олигопептидов, минеральных веществ, полностью отсутствуют белки и возбудители опасных инфекций. Раствор апирогенен, стерилен и нетоксичен.

Препарат Мэлсмон производится по оригинальной технологии и выпускается в виде плацентарного экстракта с содержанием активнорействующей природной смеси в количестве 100 мг в каждой ампуле (2 мл). В качестве консервирующей жидкости, гарантирующей стабильные свойства препарата на весь срок годности, выступает бензиловый спирт с содержанием от 12,0 до 18,0 мг/мл.

1.1. Краткая схема технологического процесса производства препарата Мэлсмон и критерии его стандартизации

На всех стадиях от отбора исходного сырья до производства готового лекарственного препарата Мэлсмон в инъекциях соблюдаются международные правила GMP, гарантирующие высокий уровень его безопасности и эффективности (Схема технологического процесса).

Самым критичным этапом производства является отбор и заготовка исходного сырья в виде человеческой плаценты. Производителем была разработана система безопасности, одобренная органами здравоохранения правительства Японии, гарантирующая блокировку инфекционного распространения возбудителей.

При заготовке биологического материала в рамках этой системы по контрактам с медицинскими организациями отслеживаются беременные женщины, которые неоднократно проходят исследования на СПИД, гепатит В, гепатит С, а также другие заболевания, обеспечивая таким образом, отбор исключительно чистых плацент, т.е. свободных от инфекций.

После проведенного скрининга на безопасность, отобранные плаценты замораживаются на определенный период, для чего их помещают в отдельные герметичные пластиковые пакеты сразу после родов женщины в лечебных учреждениях.

Затем, используя процессы расщепления и транспирации ее нагревают в соляной кислоте при температуре 100°C от 15 до 17 часов (в целом) до получения водорастворимого материала, после чего соляная кислота выпаривается и нейтрализуется с помощью гидроксида натрия до рН 6,8-7,0 (рН крови). В процессе кислотного гидролиза происходит гидролиз и денатурирование белков. Водорастворимый концентрат фильтруют и добавляют дистиллированную воду и бензиловый спирт.

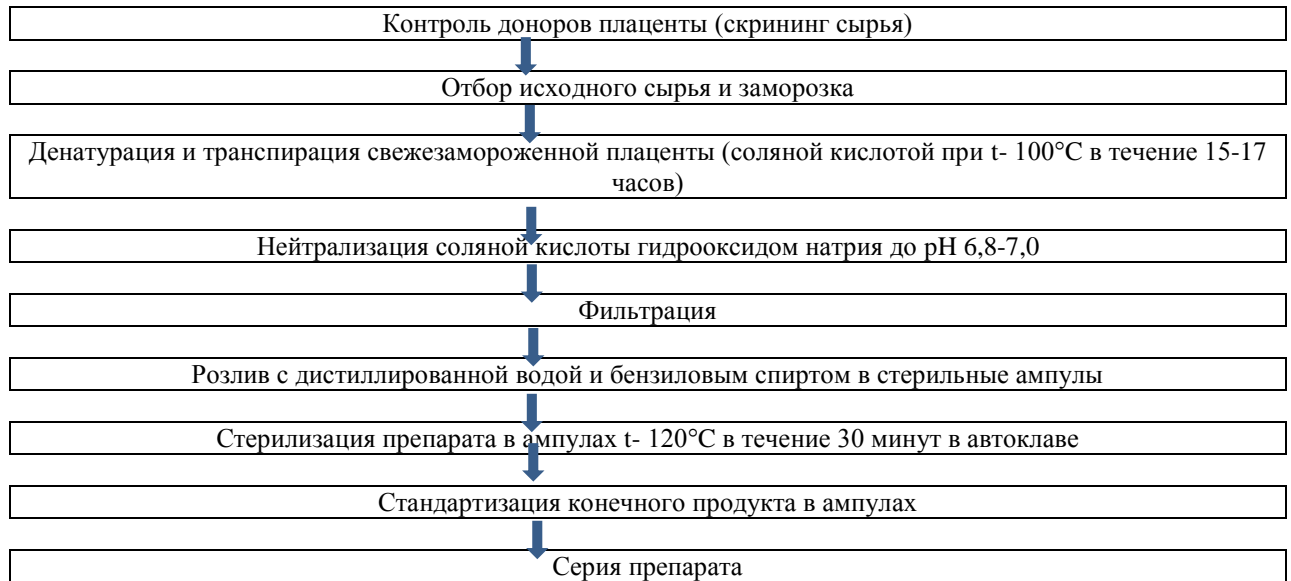
Конечный продукт помещают в стерильную ампулу, после чего проводят окончательную стерилизацию (под высоким давлением) в автоклаве при температуре 120°C в течение 30 минут. В результате данного процесса достигается высокий уровень биологической безопасности.

В процессе этого производства подтверждаются плацентарные составляющие препарата Мэлсмон, содержащего аминокислоты, компоненты нуклеиновых кислот, минеральные веществ, и др. не превышающие размер 5,5 кДа.

Инъекционный плацентарный препарат одобрен Японским правительством в 1956 году. Состав препарата Мэлсмон подтверждает тот факт, что разработанная схема технологического процесса позволяет полностью расщеплять белки на аминокислоты, в связи с чем, вероятность возникновения побочных эффектов минимальна, с другой стороны, применяемый метод автоклавирования конечного продукта, нейтрализующий все бактерии или вирусы, гарантирует его инфекционную безопасность. Поэтому клиническое применение препарата Мэлсмон сопровождается японской медицинской страховкой на 45 лет.

Основные критерии стандартизации отражают его качество и эффективность (Протокол анализа).

Краткая схема технологического процесса плацентарного препарата Мэлсмон



Критерии оценки стандартизации препарата Мэлсмон

№ п/п	Наименование показателей качества по нормативному документу	Требования к качеству по нормативному документу	Результаты испытания
1	Описание	Прозрачный или с легкой опалесценцией раствор от светло-желтого до желтого с коричневым оттенком цвета со специфическим запахом	Желтый с коричневатым оттенком раствор с легкой опалесценцией и специфическим запахом
2	Подлинность – Качественная реакция на аминокислоты – Качественная реакция на ароматические аминокислоты – Реакция Сакагучи – Бензиловый спирт (ГЖХ)	Должно появляться фиолетовое окрашивание Должно появляться желтое окрашивание Должно появляться красное окрашивание Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме стандартного раствора	Соответствует Соответствует Соответствует Соответствует
3	Прозрачность	Препарат должен быть прозрачным или выдерживать сравнение с эталоном	Менее эталона
4	Оптическая плотность	Оптическая плотность препарата при 540 нм должна быть не более 0,7	0,109
5	pH	От 6,5 до 7,5	6,88
6	Белок – Реакция с ТХУ – Биуретовая реакция	Не должно быть помутнения раствора Не должно появиться окрашивание от пурпурного до сине-фиолетового цвета	Соответствует Соответствует
7	Свободные аминокислоты		

	(мг/мл) L-Аспарагиновая кислота L-Треонин L-Серин L-Глутаминовая кислота L-Пролин Глицин L-Аланин L-Валин L-Лейцин L-Лизин L-Аргинин	Не менее 0,36 Не менее 0,17 Не менее 0,22 Не менее 0,59 Не менее 0,27 Не менее 0,40 Не менее 0,25 Не менее 0,17 Не менее 0,31 Не менее 0,29 Не менее 0,30	0,53 0,29 0,32 0,65 0,30 0,45 0,26 0,18 0,38 0,33 0,31
8	Бензиловый спирт	От 12,0 до 18,0 мг/мл (От 80,0 до 120,0 от заявленного количества)	15,3 102,0

1.2. Изучение состава природной смеси препарата Мэлсмон в ампулах (2 мл)

Материалом для исследования является препарат Мэлсмон (каждая ампула содержит 100 мг плацентарного экстракта и 0,03 мл бензилового спирта) и реактивы компании «Сигма Кемикал Ко» (Сент-Луис, Миссури, США).

1.2.1. Изучение аминокислотного состава

1.2.1.1. Анализ аминокислотного состава методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

ВЭЖХ-оборудование, использованное в настоящем исследовании, включало систему Shimadzu (компания «Шимадзу», Киото, Япония), состоящую из насосов Shimadzu LC-10ADVP и флуоресцентного детектора Shimadzu RF-10AXL. С защитными колонками (Shim-pack ISC-30Na, Shimadzu) использовались колонки Shim-pack Amino—Na (6,0 мм x 100 мм). Температура колонок была установлена на уровне 60 С с помощью термостата колонки СТО-10АСVP. Подвижная фаза представляла собой комплект подвижной фазы с натрием для градиентного элюирования (А: буфер натрия цитрата, В: буфер натрия цитрата, содержащий борную кислоту, С: раствор натрия гидроксида). Перед применением подвижная фаза была профильтрована под вакуумом через мембранный фильтр 0,45 мм и дегазирована. Анализ был проведен при скорости потока 0,4—0,6 мл/минута при длине волны детектора, установленной для возбуждения при 254 нм и эмиссии при 450 нм, объем введения составлял 20 мл. Использованная в качестве стандарта смесь аминокислот типа Н была разбавлена до 0,1 моль/мл в растворе натрия цитрата. Пятьдесят микролитров ПЭ были разбавлены 20 раз раствором натрия цитрата перед анализом ВЭЖХ.

1.2.1.2. Содержание аминокислот

Количество аминокислот в препарате рассчитывали на основании данных анализа, полученных методом ВЭЖХ. Первичные аминокислоты были элюированы последовательно из колонок Shim-pack Amino—Na, реагировавшие с непрерывно подаваемым реагентом ОФА (о-фталальдегид) и превращение во флуоресцентные производные. Как показано в таблице 1, глутаминовая кислота, глицин и аспарагиновые кислоты были основными аминокислотами в составе ПЭ, в то время как тирозин и фенилаланин были также обнаружены в концентрациях $0,133 \pm 0,005$, $0,142 \pm 0,004$ мг/мл соответственно.

Таблица 1. Содержание аминокислот в плацентарном экстракте препарата Мэлсмон

Аминокислоты	Содержание (мг/мл)	Аминокислоты	Содержание (мг/мл)
Аспарагиновая кислота	$0,495 \pm 0,008$	Метионин	$0,055 \pm 0,002$
Треонин	$0,232 \pm 0,004$	Изолейцин	$0,130 \pm 0,001$
Серин	$0,283 \pm 0,007$	Лейцин	$0,483 \pm 0,014$
Глутаминовая кислота	$0,965 \pm 0,017$	Тирозин	$0,133 \pm 0,005$
Пролин	$0,275 \pm 0,005$	Фенилаланин	$0,142 \pm 0,004$
Глицин	$0,468 \pm 0,007$	Гистидин	$0,057 \pm 0,002$
Аланин	$0,362 \pm 0,009$	Лизин	$0,312 \pm 0,004$
Валин	$0,205 \pm 0,008$	Аргинин	$0,370 \pm 0,010$

В образцах препарата Мэлсмон было определено 16 аминокислот, в том числе незаменимых для организма человека, что обуславливает эффект их восполнения при пластической функции – синтезе белка и активации физиологических реакций – при коррекции регуляторных механизмов.

1.2.2. Изучение состава моносахаридов

1.2.2.1. Анализ состава моносахаридов

Количество моносахаридов измерялось с помощью прибора Bio-LC (DX-300, компания «Дионекс Корп.», Саннивейл, Калифорния, США), оборудованного колонкой CarboPac PA1 (4 x 250 мм, «Дионекс») с защитной колонкой (4 x 50 мм), согласно опубликованной в других литературных источниках методике [8]. Моносахариды разделяли, используя 16 мМ NaOH при скорости потока 1 мл/минута.

1.2.2.2. Содержание моносахаридов

Сахара в образцах препарата разделяли и обнаруживали при помощи системы Bio-LC DX-300, оборудованной колонкой CarboPac PA1. В результате проведенных исследований N-ацетилнейраминавая кислота, N-ацил производные аminosахаров были обнаружены в наибольших количествах. N-гликолилнейраминавая кислота, глюкозамин, галактозамин и глюкоза были также в препарате (таблица 2).

Таблица 2. Содержание сахаров в плацентарных экстрактах препарата Мэлсмон

Сахара	Содержание (г/100 г)
Глюкоза	0,01 ± 0,000
Галактозамин	0,05 ± 0,015
Глюкозамин	0,10 ± 0,012
N-ацетилнейраминавая кислота	0,23 ± 0,029
N-гликольнейраминавая кислота	0,02 ± 0,006

В составе препарата обнаружены моносахариды, которые выполняют важную функцию не только в биоэнергетических процессах клетки, но и вступают в реакции окисления, приводящие к образованию 3 типов кислот: глюконовой, глюкуроновой и глюкаровой, которые принимают активное участие в обмене информацией между клетками и межклеточным веществом.

1.2.3. Изучение состава липидов и жирных кислот

1.2.3.1. Экстрагирование липидов и анализ жирных кислот методом газовой хроматографии (ГХ) и газовой хроматографии/масс-спектрологии (ГХ/МС)

Вся совокупность липидов была экстрагирована с использованием монофазной нейтральной системы органических растворителей, содержащей 0,01% бутилгидрокситолуола. Метилловые эфиры жирных кислот (FAME) были получены путем нагревания при 60 °С в течение 30 минут с трифторидом бора (BF₃, «Сигма Кемикал Ко.»). FAME анализировали методом ГХ, используя газовый хроматограф серии Hewlett-Packard 6890N («Эджилент Текнолоджи», Уилмингтон, Северная Каролина, США), оборудованный капиллярной колонкой (30 м x 0,25 мм), покрытой пленкой DB-23 («Дж. и В. Саентифик», Фолсом, Калифорния, США). FAME растворяли в гексане, вводили в колонку и разделяли, используя температурную программу от 150 до 250 °С со скоростью 2 °С/минута, температура инжектора и пламенно-ионизационного детектора была установлена на уровне 250 °С. В качестве газа-носителя был использован гелий (ультраочищенный) со скоростью потока 1 мл/минута и соотношением деления потока 50:1. Идентификация жирных кислот в газовой хроматографии была выполнена методом ГХ/МС на ГХ Agilent 6890, оборудованном колонкой HP-5 («Эджилент Текнолоджи»). ГХ был соединен с масс-спектрометром высокого разрешения Agilent 5973. Полученные данные на масс-спектрах были проанализированы с использованием программного обеспечения для масс-спектрологии Agilent G1034. Были идентифицированы жирные кислоты по их элементарному составу, массе их молекулярных ионов и образам фрагментации, сопоставленными с показателями стандартных образцов.

1.2.3.2. Содержание жирных кислот

Большинство насыщенных жирных кислот фракции экстрагируемых липидов в ПЭ составляло 18:0 с небольшими количествами 16:0, в то время как 18:1 является наибольшей ненасыщенной жирной кислотой, присутствующей в ПЭ (таблица 3). 16:1 и 18:1 являются моноеновыми мононенасыщенными жирными кислотами, а 18:2, 20:4 и 22:6 являются полиненасыщенными жирными кислотами, обнаруженными в ПЭ. Среди них 20:4 и 22:6 были сильно ненасыщенными жирными кислотами типа омега-3 в ПЭ. Всего НЖК составляют 78,51 ± 1,240%, в то время как НСЖК составляют 8,95 ± 0,686% суммы экстрагируемых липидов в ПЭ.

Соотношение НЖК/НСЖК составляет 8,77.

Таблица 3. Состав жирных кислот из фракции экстрагированных липидов плацентарных экстрактов.

Жирная кислота	ОВУ	Относительное количество (%)
14:0	0,333	8,24 ± 3,510
16:0	0,549	11,77 ± 1,392
16:1 (9)	0,601	0,69 ± 0,277
18:0	1,000	54,47 ± 2,018
18:1 (9)	1,086	3,27 ± 2,079
18:2 (9,12)	1,224	0,68 ± 0,113
20:0	1,452	0,64 ± 0,009
20:1 (9)	1,487	1,30 ± 0,566
20:4 (5,8,11,14)	1,652	1,53 ± 0,662
22:0	1,858	1,50 ± 0,619
22:6 (4,7,10,13,16,19)	2,450	1,48 ± 0,615
26:0	2,883	1,24 ± 0,552
28:0	3,443	0,64 ± 0,196
Другие ^a		12,54 ± 0,931
НЖК		78,51 ± 1,240
НСЖК		8,95 ± 0,686
НЖК/НСЖК		8,77

^a неидентифицированные жирные кислоты.

В исследуемых образцах препарата Мэлсмон были определены полиненасыщенные жирные кислоты, важнейшими из которых являются стеариновая, пальмитиновая, миристиновая, арахидоновая и т.д.

Вывод: проведенные исследования по изучению состава природной смеси плацентарного экстракта препарата Мэлсмон показывают, что исследуемые образцы содержат различные аминокислоты, моносахариды и жирные кислоты, которые могут оказывать возможные антиоксидантные и иммуномодулирующие свойства. Данные эффекты были подтверждены в доклинических исследованиях на лабораторных животных, которые представлены в соответствующем разделе (см. отчет доклинич. исслед.)

Отчет

доклинических исследований плацентарного препарата Мэлсмон для инъекций в ампулах (2 мл), содержащего 100 мг плацентарного экстракта человеческого происхождения

Исполнители:

С.И. Парк – отделение нанобиомедицинских наук, университет г. Данкук, Южная Корея.
С.Фарк – высшая медицинская школа, Корейский университет, Сеул, Южная Корея.
М. Ли –
Дж.И. Лим – токсико-геномный и противогеномный центр окружающей среды, медицинский колледж, Корейский университет, Сеул, Южная Корея.
Д. Сул –

Дата исследований: 2010 год

1. Изучение эффективности препарата Мэлсмон – раствора для подкожного введения 100 мг плацентарного экстракта в ампулах 2 мл

Плацентарные органопрепараты используются во многих странах мира в течение многих лет для заживления ран и в косметических целях. Установлено, что они могут быть обогащены в зависимости от технологии переработки плаценты ферментами, нуклеиновыми кислотами, витаминами, аминокислотами, стероидами, пептидами, жирными кислотами и минералами. Состав плацентарных препаратов опосредует иммуностропную, антиоксидантную и противовоспалительную реакции.

Целью данного исследования явилось определение биологических эффектов препарата Мэлсмон на лабораторных животных, подверженных воздействию бензопирена. Выбор ксенобиотика был обусловлен тем, что бензопирен (BaP) является хорошо известным канцерогеном, классифицированным как полициклический ароматический углеводород (ПАУ) Международным агентством по исследованию рака (IARC). Он присутствует в пище, на производстве и в окружающей среде. Основным источником употребления BaP с пищей является мясо, приготовленное на гриле, и жареное мясо. BaP подвергается метаболической активации с образованием реактивных промежуточных продуктов, таких как BaP-хиноны. Известно, что данные промежуточные продукты участвуют в образовании активных форм кислорода и связаны с окислительным изменением ДНК, белков и антиоксидантных ферментов. Данные активные промежуточные продукты оказывают мутагенный и канцерогенный эффекты в биологических системах.

В настоящем исследовании оценивали биологические эффекты препарата Мэлсмон на крысах, подверженных воздействию бензопирена и бензопирена на фоне предварительного введенного препарата Мэлсмон. Изучались, прежде всего, защитные эффекты, которые проявляются в стабилизации структур ДНК отдельных клеток. Для чего определяли лимфоциты из крови подопытных животных и анализировали уровень повреждения ДНК методом кометного анализа. Кроме этого степень окислительного стресса и возможного антиоксидантного эффекта препарата определяли по уровню концентрации супероксид дисмутазы (СОД), малонового диальдегида (МДА), карбонила в плазме крыс современными методами биохимического анализа. Противовоспалительный эффект изучали путем изучения концентраций иммуноглобулинов и провоспалительных цитокинов, таких как ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6.

1.1. Определение биологических эффектов препарата Мэлсмон на лабораторных животных

1.1.1. Дизайн эксперимента

В эксперименте использовали мужские особи крыс породы Спраг-Доули (173 ± 5 г) компании «Чарльз Ривер Лабораториз, Инк» (Уилмингтон, Массачусетс, США). В ходе эксперимента их содержали в стандартных лабораторных условиях (температура 24 ± 2 °С; влажность $50 \pm 10\%$, 12-часовые циклы

день/ночь), при этом в течение первой недели им дали возможность акклиматизироваться к данным условиям содержания и кормления, был предоставлен стандартный режим питания и питья *ab libitum*. Восемьдесят крыс (в возрасте 6 недель по 5 в группе) были разделены на следующие четыре группы: 1) контрольная группа (только носитель), 2) группа воздействия Мэлсоном (20 мкл x 3 раза в неделю в течение 2 недель, внутримышечная инъекция), 3) группа воздействия ВаР (200 мг/кг массы тела, интраперитонеальная инъекция) и 4) группа ПЭ (20 мкл x 3 раза в неделю в течение 2 недель, внутримышечная инъекция, затем ВаР в дозе 200 мг/кг массы тела, интраперитонеальная инъекция). Крысам в группах, не получавших ПЭ, и в группах, получавших ПЭ, вводили либо 20 мкл разбавленного бензилового спирта (0,03 мл бензилового спирта разбавлено в 2 мл физиологического раствора), либо 20 мкл ПЭ соответственно. Через 2 недели инъекций вводили ВаР с кукурузным маслом либо только кукурузное масло в группах, получавших ВаР и группах, не получавших ВаР, соответственно. Затем крыс умерщвляли на 1, 2, 4 или 8 день после инъекции ВаР согласно токсикокинетическим результатам.

1.1.2. Приготовление и подготовка образцов крови

Образцы крови (кровь с ЭДТА) были собраны от каждой крысы путем пункции сердца. Для кометного анализа были приготовлены лимфоциты путем удаления эритроцитов из крови (3—5 мл) посредством центрифугирования с раствором фиколл-плак. Для других экспериментов кровь была центрифугирована со скоростью 4 000 оборотов в минуту при 4 °С в течение 20 минут, отбирали аликвоты полученной плазмы и хранили при –70°С до применения.

1.1.3. Проведение кометного анализа

После подготовленных анализов следующим образом для каждой лечебной группы было приготовлено два стекла, на каждое вручную наносили по 50—100 случайно выбранных клеток (всего 100—200 клеток). Параметр, момент хвоста по Оливе [$=(\text{хвост.среднее} - \text{голова.среднее}) \times \text{хвост}\% \text{ДНК}/100$], был автоматически рассчитан с использованием системы визуального анализа Comet 4.0 (компания «Кинетик Имиджинг»; Ливерпуль, Соединенное Королевство).

1.1.4. Определение окислительного повреждения

А) **Активность антиоксидантного фермента СОД** определяли согласно инструкциям, приведенным в наборе («Кайман Кемикал Компани»; Энн-Арбор, Мичиган, США). MDA определяли с использованием тиобарбитуровой кислоты и методом ВЭЖХ. Стандартная кривая была построена по 1,1,3,3-тетраэтоксипропану (ТЕР), поскольку кислотный гидролиз ТЕР приводит к получению стехиометрических количеств MDA.

Б) **Степень окисления белков** была оценена методом вестерн-блоттинга с использованием анти-динитрофенилгидразиновых антител. 10 мкг белков подвергали разделению методом электрофореза и переносили на поливинилидендифторидную (ПВДФ) мембрану. Затем мембрану инкубировали в течение 1 часа с анти-динитрофенилгидразиновыми антителами (1:4 000; «Инвитроген»; Карлсбад, Калифорния, США) и обрабатывали усиленными хемолюминисцентными реагентами («Эмершем Байосденсиз»; Пискатауэй, Нью-Джерси, США). Затем была проведена денситометрия с использованием планшетного сканера Bio-Rad («Херкьюлиз», Калифорния, США) 700 и программного обеспечения Molecular Analyst (Bio-Rad).

1.1.5. Определение белка, электрофорез и иммуноблоттинг

Плазму смешивали с буфером Лэммли и кипятили на кипящей водяной бане в течение 10 минут. Белки отделяли методом электрофореза и переносили на мембраны ПВДФ. Для иммунологического анализа использовали следующие антитела: пероксидаза хрена (HRP), конъюгированная с козлиными антителами IgG1 (1 мкг/мл; «Иммунолоджи Консалтантс Лаборатори», Ньюберг, Орегон, США), HRP, конъюгированная с козлиными антителами IgG2a, козий ФНО-а против крысы (1 мкг/мл; «Р энд Д Системс», Миннеаполис, Миннесота, США), козий ИЛ-1b против крысы (1 мкг/мл; «Р энд Д Системс»), козий ИЛ-6 против крысы (1 мкг/мл; «Р энд Д Системс»), козий а-тубулин против мыши (clone DM1A; 1:20 000; Sigma-Aldrich). Козьи вторичные антитела против крысы и против мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (1:1 000; «Промега»; Мэдисон, Висконсин, США), затем для обнаружения белков-мишеней использовали усиленные хемолюминисцентные реагенты («Эмершем Байосденсиз»). Иммунореактивные связи были изображены с помощью системы ChemiDoc XRS (Bio-Rad). Была проведена денситометрия данных связей с использованием программного обеспечения Quantity One, а значения были нормализованы с использованием а-тубулина в качестве внутреннего контроля нагрузки.

1.1.6. Анализ полученных результатов

Данные в тексте и на рисунках выражаются в форме среднего \pm стандартное отклонение (СО). Сравнения двух групп оценивали методом одностороннего дисперсионного анализа. Различия оценивали как статистически значимые при $p < 0,05$.

1.2. Изучение антиокислительного действия препарата Мэлсмон на экспериментальных животных

Для определения возможного антиоксидантного защитного эффекта препарата оценивали концентрации супероксид дисмутазы (СОД), малонового диальдегида и карбонила, отражающих перекисное окисление липидов и окисление белков. Концентрации СОД у крыс, получавших Мэлсмон в значительной степени не отличались от показателей контрольных животных. Однако концентрации СОД у крыс, получавших ВаР на 1, 2, 4 и 8 день увеличивались по сравнению с контролеми крысами, получавшими только Мэлсмон (рис. 1А). Прием ПЭ перед введением ВаР в значительной степени уменьшал активность СОД на 1, 2 и 8 день у опытных животных по сравнению с крысами, получавшими только ВаР.

Антиоксидантный эффект ПЭ также оценивали путем измерения количества MDA, полученного в плазме крыс, используя тест с тиобарбитуровой кислотой. Как показано на рисунке 1В, продукция MDA у контрольных крыс не отличалась в значительной степени от показателей групп на 1, 2, 4 и 8 день. Применение только препарата Мэлсмон также не увеличивало продукцию MDA. Тем не менее, воздействие ВаР в группах опытных крыс на 1 и 2 день в значительной степени увеличивало концентрации MDA по сравнению с контрольными, в то же время воздействие ВаР на крыс на 8 дней не оказывало влияния на продукцию MDA по сравнению с контрольными крысами. И наоборот, предварительное применение ПЭ в значительной степени уменьшало концентрации MDA на 1 и 2 день по сравнению с крысами, получавшими только ВаР.

Влияние ПЭ на окисление белков, вызванное ВаР (рисунок 1С) оценивали методом вестер-блоттинга, используя анти-динитрофенилгидразиновые антитела. Степень иммунореактивности в отношении анти-динитрофенилгидразиновых антител значительно не изменялась в группах по сравнению с контрольными крысами вне зависимости от введения крысам ПЭ или воздействия ВаР.

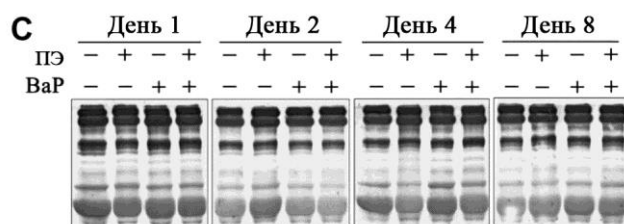
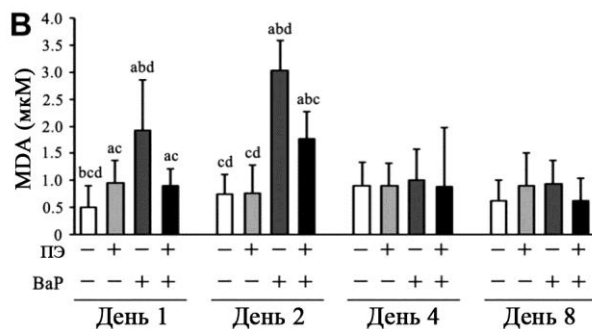
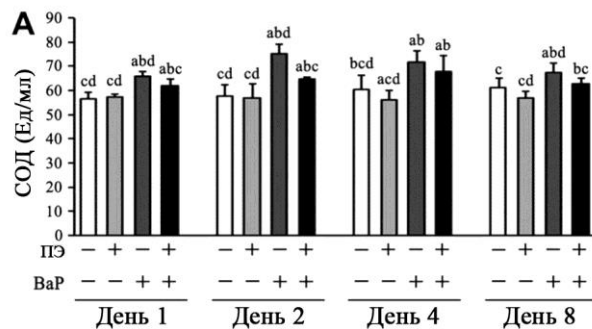


Рисунок 1. Антиоксидантный эффект препарата Мэлсмон на экспериментальных крысах с моделью окислительного стресса, вызванного ВаР. Собранную плазму у крыс оценивали на предмет маркеров окислительного стресса. (А) Определяли фермент СОД. Вызванное ВаР повышение СОД в значительной степени снижалось при предварительном применении ПЭ в группах животных на 1, 2 и 8 день. (В) Доли перекисного окисления липидов оценивали путем определения количества малондиальдегида, используя метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. (С) Степень окисления белка оценивали путем вестерн-блоттинга, используя анти-динитрофенилгидразиновые антитела. Все данные представляют собой среднее \pm СО пяти различных крыс.

^a $p < 0,05$ по сравнению с контрольными крысами, ^b $p < 0,05$ по сравнению с принимавшими ПЭ крысами, ^c $p < 0,05$ по сравнению с принимавшими ВаР крысами, ^d $p < 0,05$ по сравнению с принимавшими ПЭ+ ВаР крысами.

1.3. Изучение защитного эффекта Мэлсмон на уровне окислительных повреждений ДНК клеток

Для оценки уровня защитного эффекта препарата Мэлсмон относительно повреждений ДНК клеток, вызванных у крыс применением бензопирена исследовали лимфоциты, выделенные из крови экспериментальных животных методом кометного анализа. Используя кометный анализ определяли разрывы одноцепочечной ДНК на уровне одной клетки. Момент хвоста по Оливе на 1, 2, 4 и 8 день у крыс, получавших препарат Мэлсмон снижался по сравнению с контролем и с ВаР (рис.2). Напротив, воздействие ВаР в существенной степени увеличивает момент хвоста по Оливе по сравнению с контрольными крысами и получавшими препарат. В отличие от этого, крысы, предварительно получавшие ПЭ в течение 2 недель до воздействия ВаР, демонстрировали существенное снижение момента хвоста по Оливе во всех группах по сравнению с крысами, получавшими только ВаР.

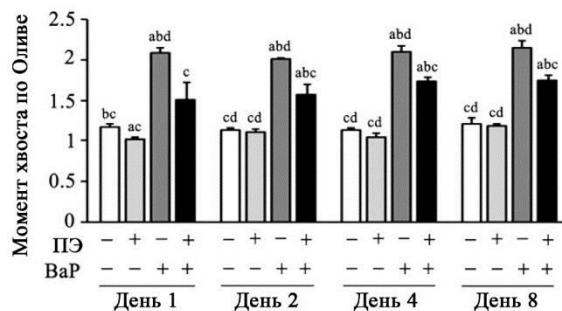


Рисунок 2. Защитный эффект плацентарных экстрактов (ПЭ) в отношении повреждений ДНК, вызванных ВаР у крыс. Влияние ПЭ на повреждение ДНК, вызванное бензопиреном оценивали используя кометный анализ для определения разрывов одноцепочечной ДНК на уровне 1 клетки. Применение ВаР повышало значение момента хвоста по Оливе до уровня выше контрольных значений, в то время как предварительное применение ПЭ до воздействия ВаР в значительной степени снижало момент хвоста по Оливе по сравнению с приемом ВаР. Все данные представляют собой среднее \pm СО пяти различных крыс.

^a $p < 0,05$ по сравнению с контрольными крысами, ^b $p < 0,05$ по сравнению с принимавшими ПЭ крысами, ^c $p < 0,05$ по сравнению с принимавшими ВаР крысами, ^d $p < 0,05$ по сравнению с принимавшими ПЭ+ ВаР крысами.

1.4. Изучение воздействия препарата Мэлсмон на показатели иммуноглобулинов у экспериментальных крыс с моделью окислительного стресса

Концентрации наиболее распространенных иммуноглобулинов IgG1 и IgG2a, измеряли в плазме крыс методом вестерн-блоттинга (рис. 3). Применение препарата Мэлсмон существенно повышало концентрации IgG1 на второй день исключительно в группе с препаратом. Воздействие ВаР не влияет на концентрацию IgG1. Предварительное применение ПЭ перед воздействием ВаР не оказывало существенного влияния на концентрации IgG1. Кроме того, концентрации IgG2a не различаются в группах животных ни в контроле, ни у всех остальных получавших ПЭ, ВаР и получавших препарат + ВаР крыс.

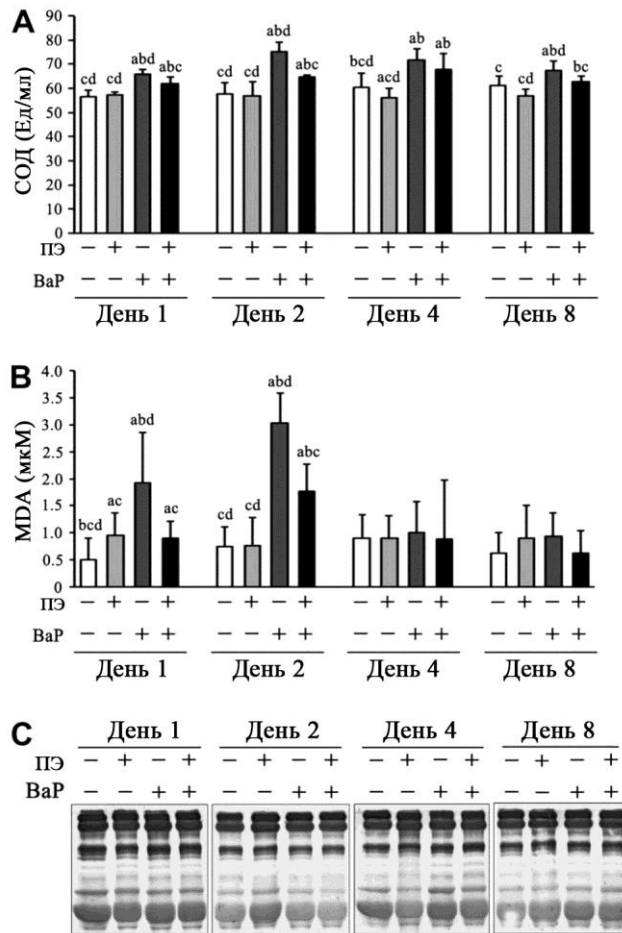


Рисунок 3. Влияние плацентарных экстрактов (ПЭ) на концентрации иммуноглобулинов у крыс, подверженных воздействию бензопирена. (А) Вестер-блоттинг иммуноглобулинов в плазме, собранной у крыс, которые были подвержены воздействию ВаР в течение 1, 2, 4 или 8 дней с предварительным применением ПЭ или без него, с использованием анти-IgG1 и IgG2a антител. Эквивалентное количество белковой фракции загружали на каждую линию. (В, С) Графики, демонстрирующие изменения в концентрациях IgG1 и IgG2a в плазме крыс, которые были подвержены воздействию ВаР с или без ПЭ. Результаты денситометрии были нормализованы с помощью α -тубулина в качестве внутреннего контроля. Значения выражали в качестве процента контрольных крыс в каждой группе. Все данные приводятся как среднее \pm СО пяти различных крыс.

^a $p < 0,05$ по сравнению с контрольными крысами, ^b $p < 0,05$ по сравнению с не принимавшими ПЭ крысами, ^c $p < 0,05$ по сравнению с принимавшими ВаР крысами, ^d $p < 0,05$ по сравнению с принимавшими ПЭ+ ВаР крысами.

1.5. Изучение противовоспалительного эффекта препарата Мэлсмон

Влияние препарата Мэлсмон на развитие воспалительной реакции у животных индуцированных ВаР изучали по динамике показателей концентрации провоспалительных цитокинов ФНО- α . ИЛ-1 β и ИЛ-6 методом вестерн-блоттинга (рис. 4).

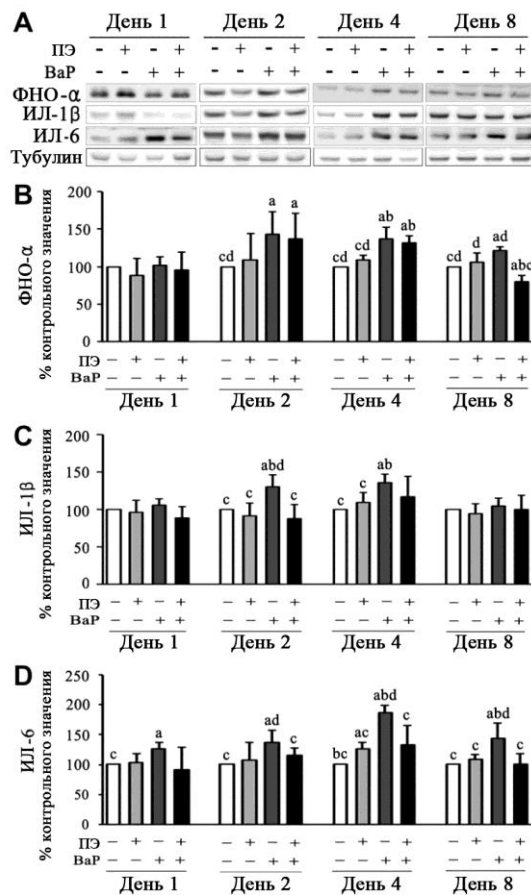


Рисунок 4. Влияние препарата Мэлсмон на концентрацию провоспалительных цитокинов у крыс, подверженных воздействию бензопирена. (А) Вестерн-блоттинг провоспалительных цитокинов в плазме у крыс, подверженных воздействию ВаР в течение 1, 2, 4 или 8 дней с или без ПЭ, с использованием антител анти-ФНО-α, ИЛ-1β и ИЛ-6. Эквивалентное количество белковой фракции загружали на каждую полосу. (В—Д) Графики, демонстрирующие изменение концентраций ФНО-α, ИЛ-1β и ИЛ-6 в плазме крыс, которые были подвержены воздействию ВаР с или без ПЭ. Результаты денситометрии были нормализованы с помощью тубулина в качестве внутреннего контроля. Значения выражали в качестве процента контрольных крыс. Все данные приводятся как среднее ± СО пяти различных крыс.
^a $p < 0,05$ по сравнению с контрольными крысами, ^b $p < 0,05$ по сравнению с не принимавшими ПЭ крысами, ^c $p < 0,05$ по сравнению с принимавшими ВаР крысами, ^d $p < 0,05$ по сравнению с принимавшими ПЭ+ ВаР крысами.

Введение крысам только ПЭ не увеличивало степень экспрессии ФНО-α в любой из групп. Воздействие ВаР также не увеличивало в существенной степени концентрации ФНО-α по сравнению с контрольными крысами на 1 день. Тем не менее воздействие ВаР в группах животных на 2, 4 и 8 день в существенной степени увеличивало концентрации ФНО-α по сравнению с контролем. Повышенные концентрации ФНО-α на 2 и 4 день не снижались в ходе предварительной обработки крыс ПЭ до воздействия ВаР. Единственное значительное понижение концентрации ФНО-α наблюдалось на 8-й день у крыс, предварительно получавших ПЭ до воздействия ВаР.

Введение крысам только ПЭ не оказывало существенного влияния на концентрации ИЛ-1β во всех группах. У крыс, получавших ВаР в течение 2 или 4 дней, отмечалось существенное увеличение концентраций ИЛ-1β по сравнению с контрольными крысами, однако у крыс, получавших ВаР в течение 1 или 8 дней, наблюдалось отсутствие существенных изменений концентраций ИЛ-1β. Повышение концентрации ИЛ-1β у крыс, подверженных воздействию ВаР в течение 2 дней, в значительной степени уменьшалось при предварительном введении ПЭ, однако концентрации у крыс, подверженных воздействию ВаР в течение 4 дней, не изменялись при предварительном введении ПЭ.

Заключение

Представленные результаты проведенных экспериментальных исследований свидетельствуют, что многокомпонентный состав плацентарного экстракта лекарственного препарата Мэлсмон в инъекциях для подкожного применения оказывает антиоксидантный и противовоспалительный эффекты. Основным

преимуществом данного исследования является то, что оно определяет влияние препарата Мэлсмон на окислительный стресс, вызванный компонентом окружающей среды – бензопиреном, который может поступать в организм человека с пищей, а именно при употреблении мясных продуктов, приготовленных на гриле или методом жарки. Известно, что бензопирен, попав в организм человека, подвергается метаболической активации с образованием реактивных промежуточных продуктов, таких как бензопирен – хиноны, которые участвуют в образовании активных форм кислорода и связаны с окислительным изменением ДНК, белков и антиоксидантных ферментов. Метаболическая активация бензопирена изоферментами цитохрома P-450 вызывает образование различных мутагенных или канцерогенных электрофилов. В частности, бензопирен-7,8-диол-9,10-эпоксид (BPDE), который является его метаболитом, связывается ковалентной связью с ДНК, РНК и белками. Показано, что аддукты BPDE-ДНК инициируют образование прото-онкогенного белка *ras* и могут вызывать различные виды рака, например, рак молочной железы. ВаР-хиноны также являются одним из видов метаболитов ВаР, образуемых изоферментами цитохрома P-450. ВаР-хиноны обладают высокой активностью и легко подвергаются одноэлектронному циклу окисления - восстановления, который приводит к образованию АФК, таким как анион супероксид, перекись водорода или гидроксильные радикалы, связанных с повреждением клеток и апоптозом. Поэтому повреждение ДНК и окислительный стресс, вызванные ВаР в данном исследовании, могли быть вызваны метаболитами ВаР, такими как BPDE или ВаР-хиноны, в большей степени, нежели непосредственный эффект ВаР.

Вызванное бензопиреном повреждение ДНК наблюдали специалисты во многих экспериментальных схемах исследования. Было установлено, что такие повреждения ДНК чаще выявляются в периферических лимфоцитах крови крыс. У людей, подверженных хроническому воздействию бензопирена, чаще наблюдается иммунотоксическое действие, проявляющееся снижением концентраций IgG и IgA в сыворотке крови. Установлено, что провоспалительные цитокины, такие как ИЛ-1b и интерферон-гамма, участвуют в воспалительном эффекте клеток, подверженных воздействию ВаР. Также сообщается о повышенных концентрациях ИЛ-6. Тем не менее, получены противоречивые результаты в отношении ФНО-а цитокинов. Воздействие ВаР на первичные макрофаги человека значительно повышало концентрацию ФНО-а и, наоборот, секреция ФНО-а оставалась неизменной в линии клеток макрофагов мышей RAW 264.7 под воздействием ВаР.

В связи с этим, в данной экспериментальной работе для идентификации восстановления повреждений ДНК и антиоксидантного эффекта препарата Мэлсмон оценивалось его влияние на организм животных с моделью окислительного стресса, вызванного введением бензопирена. В работе применялись современные методы исследования, а именно определялись кометным методом разрывы одноцепочных ДНК и через восстановление повреждений ДНК доказывались антиоксидантные эффекты. Кроме этого, оценивалось перекисное окисление липидов (МДА) и степень окислительного повреждения по результатам измерения концентрации активности супероксид дисмутазы (СОД). Применяя метод кометного анализа установили, что Мэлсмон восстанавливал повреждение в ДНК на уровне лимфоцита, потому что воздействие бензопирена на крыс вызывало повышение значения момента хвоста по Оливе, в то время как предварительное применение препарата Мэлсмон у опытных животных до воздействия бензопиреном в значительной степени снижало значение момента хвоста по Оливе.

Этот эффект обусловлен, по-видимому, основными компонентами Мэлсмон – аминокислотами, которые проявляют антиоксидантную активность (тирозин, триптофан, фенилаланин, урацил), а глутаминовая и аспарагиновая аминокислоты, как известно, могут выступать в качестве ловушки свободных радикалов. Содержащиеся в препарате моносахариды проявляют свою антиоксидантную активность посредством восстановления перекисей липидов. Мэлсмон снижал разрушающее действие окислительного стресса, что также подтверждается результатами измерения концентраций СОД и МДА.

Кроме этого моносахара, усиливают не только антиоксидантный эффект, но и способствуют развитию противовоспалительного процесса. Различные жирные кислоты препарата не только снижают окислительный стресс, но и по типу омега-3-жирных кислот увеличивают экспрессию противовоспалительных маркеров.

Установлено, что предварительное применение препарата Мэлсмон в существенной степени снижало концентрации провоспалительных цитокинов, таких как ФНО-2, ИЛ-1 в и ИЛ-6.

Таким образом, результаты проведенных исследований отражают уровень защитного эффекта препарата Мэлсмон на животных, подверженных воздействию бензопирена. Динамика показателей биохимических маркеров – концентрации супероксид дисмутазы, малонового диальдегида и карбанила подтверждает антиоксидантное действие препарата Мэлсмон у крыс, с моделью окислительного стресса, а снижение концентрации провоспалительных цитокинов – противовоспалительный эффект.

Следовательно, важной базовой концепцией биологической активности препарат Мэлсмон может являться защитный эффект от воздействия окислительного стресса.

Использованная литература

- [1] Tonello G, Daglio M, Zaccarelli N, Sottofattori E, Mazzei M, Balbi A. Characterization and quantitation of the active polynucleotide fraction (PDRN) from human placenta, a tissue repair stimulating agent. *J Pharm Biomed Anal* 1996;14:1555—60.
- [2] Biswas TK, Auddy B, Bhattacharya NP, Bhattacharya S, Mukherjee B. Wound healing activity of human placental extracts in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2001;22:1113—6.
- [3] Watanabe S, Togashi S, Takahashi N, Fukui T. L-tryptophan as an antioxidant in human placenta extract. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2002;48:36—9.
- [4] Togashi S, Takahashi N, Iwama M, Watanabe S, Tamagawa K, Fukui T. Anti-oxidative collagen-derived peptides in human-placenta extract. *Placenta* 2002;23:497—502.
- [5] Oh E, Lee E, Im H, Kang HS, Jung WW, Won NH, et al. Evaluation of immuno-and reproductive toxicities and association between immunotoxicological and genotoxicological parameters in waste incineration workers. *Toxicology* 2005;210:65—80.
- [6] Kim KB, Lee BM. Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo(a)pyrene. *Cancer Lett* 1997;113:205-12. [7] Gelboin HV. Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol Rev* 1980;60:1107-66.
- [8] Kim S, Hwang SK, Dwek RA, Rudd PM, Ahn YH, Kim EH, et al. Structural determination of the N-glycans of a lepidopteran arylphorin reveals the presence of a monoglucosylated oligosaccharide in the storage protein. *Glycobiology* 2003;13:147-57.
- [9] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911-7.
- [10] Moir D, Viau A, Chu I, Withey J, McMullen E. Pharmacokinetics of benzo[a] pyrene in the rat. *J Toxicol Environ Health A* 1998;53:507-30.
- [11] Park SY, Kim HS, Cho EK, Kwon BY, Phark S, Hwang KW, et al. Curcumin protected PC12 cells against beta-amyloid-induced toxicity through the inhibition of oxidative damage and tau hyperphosphorylation. *Food Chem Toxicol* 2008;46:2881-7.
- [12] Moore K, Roberts 2nd LJ. Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res* 1998;28(6):659-71.
- [13] Seljeskog E, Hervig T, Mansoor MA. A novel HPLC method for the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). A comparison with a commercially available kit. *Clin Biochem* 2006;39:947-54.
- [14] Nakayama S, Kodama K, Oguchi K. A comparative study of human placenta hydrolysate (Laennec) by intravenous or subcutaneous injection on liver regeneration after partial hepatectomy in normal and CCl4-induced cirrhosis rats. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1989;94:289-97.
- [15] Liu KX, Kato Y, Kaku T, Sugiyama Y. Human placental extract stimulates liver regeneration in rats. *Biol Pharm Bull* 1998;21:44-9.
- [16] Kong MH, Lee EJ, Lee SY, Cho SJ, Hong YS, Park SB. Effect of human placental extract on menopausal symptoms, fatigue, and risk factors for cardiovascular disease in middle-aged Korean women. *Menopause* 2008; 15:296-303.
- [17] Fang XP, Xia WS, Sheng QH, Wang YL. Purification and characterization of an immunomodulatory peptide from bovine placenta water-soluble extract. *Prep Biochem Biotechnol* 2007;37:173-84.
- [18] Chakraborty PD, Bhattacharyya D. Isolation of fibronectin type III like peptide from human placental extract used as wound healer. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005;818:67-73.
- [19] Udintsev NA, Ivanov VV. Antioxidant action of glutamic acid. *Patol Fiziol Eksp Ter* 1984;4:60-2.
- [20] Liu DZ, Lin YS, Hou WC. Monohydroxamates of aspartic acid and glutamic acid exhibit antioxidant and angiotensin converting enzyme inhibitory activities. *J Agric Food Chem* 2004;52:2386-90.
- [21] Rajapakse AG, Ming XF, Carvas JM, Yang Z. O-linked beta-N-acetylglucosamine during hyperglycemia exerts both anti-inflammatory and pro-oxidative properties in the endothelial system. *Oxid Med Cell Longev* 2009;2:172-5.
- [22] Singh S, Khajuria A, Taneja SC, Khajuria RK, Singh J, Qazi GN. Boswellic acids and glucosamine show synergistic effect in preclinical anti-inflammatory study in rats. *Bioorg Med Chem Lett* 2007;17:3706-11.
- [23] Yokoyama T, Yamane K, Minamoto A, Tsukamoto H, Yamashita H, Izumi S, et al. High glucose concentration induces elevated expression of anti-oxidant and proteolytic enzymes in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 2006;83:602-9.
- [24] Oikawa S, Kawanishi S. Distinct mechanisms of site-specific DNA damage induced by endogenous reductants in the presence of iron(III) and copper(II). *Biochim Biophys Acta* 1998;1399:19-30.

- [25] Skouroliakou M, Konstantinou D, Koutri K, Kakavelaki C, Stathopoulou M, Antoniadis M, et al. A double-blind, randomized clinical trial of the effect of omega-3 fatty acids on the oxidative stress of preterm neonates fed through parenteral nutrition. *Eur J Clin Nutr*, in press, [doi:10.1038/ejen.2100.98](https://doi.org/10.1038/ejen.2100.98).
- [26] Tiesset H, Pierre M, Desseyn JL, Guery B, Beermann C, Galabert C, et al. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids affect the kinetics of pro- and anti-inflammatory responses in mice with *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *J Nutr* 2009;139:82-9.
- [27] Kim JH, Stansbury KH, Walker NJ, Trush MA, Strickland PT, Sutter TR. Metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-diol by human cytochrome P450 1B1. *Carcinogenesis* 1998;19:1847-53.
- [28] Marshall CJ, Vousden KH, Phillips DH. Activation of c-Ha-ras-1 protooncogene by in vitro modification with a chemical carcinogen, benzo(a)pyrene diol-epoxide. *Nature* 1984;310:586-9.
- [29] Rundle A, Tang D, Hibshoosh H, Estabrook A, Schnabel F, Cao W, et al. The relationship between genetic damage from polycyclic aromatic hydrocarbons in breast tissue and breast cancer. *Carcinogenesis* 2000;21:1281-9.
- [30] Conney AH. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G.H.A. Clowes Memorial lecture. *Cancer Res* 1982;42:4875-917. [31] Lorentzen RJ, Ts'o PO. Benzo[a]yrenedione/benzo[a]pyrenediol oxidation-reduction couples and the generation of reactive reduced molecular oxygen. *Biochemistry* 1977;16:1467-73.
- [32] Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ. Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol* 2000;13:135-60. [33] Yusuf AT, Vian L, Sabatier R, Cano JP. In vitro detection of indirect-acting genotoxins in the comet assay using Hep G2 cells. *Mutat Res* 2000;468:227-34.
- [34] Binelli A, Riva C, Cogni D, Provini A. Assessment of the genotoxic potential of benzo(a)pyrene and pp'-dichlorodiphenyldichloroethylene in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Mutat Res* 2008;649:135-45.
- [35] Nwagbara O, Darling-Reed SF, Tucker A, Harris C, Abazinge M, Thomas RD, et al. Induction of cell death, DNA strand breaks, and cell cycle arrest in DU145 human prostate carcinoma cell line by benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide. *Int J Environ Res Public Health* 2007;4:10-4.
- [36] Garry S, Nesslany F, Aliouat E, Haguenoer JM, Marzin D. Assessment of genotoxic effect of benzo[a]pyrene in endotracheally treated rat using the comet assay. *Mutat Res* 2003;534:33-43.
- [37] Szczeklik A, Szczeklik J, Galuszka Z, Musial J, Kolarzyk E, Targosz D. Humoral immunosuppression in men exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and related carcinogens in polluted environments. *Environ Health Perspect* 1994;102:302-4.
- [38] Winker N, Tuschl H, Kovac R, Weber E. Immunological investigations in a group of workers exposed to various levels of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Appl Toxicol* 1997;17:23-9.
- [39] Lyte M, Bick PH. Modulation of interleukin-1 production by macrophages following benzo(a)pyrene exposure. *Int J Immunopharmacol* 1986;8:377-81.
- [40] Garcon G, Campion J, Hannotiaux MH, Boutin AC, Venembre P, Balduyck M, et al. Modification of the proteinase/anti-proteinase balance in the respiratory tract of Sprague-Dawley rats after single intratracheal instillation of benzo[A] pyrene-coated onto Fe(2)O(3) particles. *J Appl Toxicol* 2000;20:265-71.
- [41] Lecureur V, Ferrec EL, N'Diaye M, Vee ML, Gardyn C, Gilot D, et al. ERK-dependent induction of TNFalpha expression by the environmental contaminant benzo(a)pyrene in primary human macrophages. *FEBS Lett* 2005;579:1904-10.
- [42] Chin BY, Choi ME, Burdick MD, Strieter RM, Risby TH, Choi AM. Induction of apoptosis by particulate matter: role of TNF-alpha and MAPK. *Am J Physiol* 1998;275:L942-9.
- [43] Kankofer M. Antioxidative defence mechanisms against reactive oxygen species in bovine retained and not-retained placenta: activity of glutathione peroxidase, glutathione transferase, catalase and superoxide dismutase. *Placenta* 2001;22:466-72.
- [44] Mochizuki H, Kada T. Antimutagenic action of mammalian placental extracts on mutations induced in *Escherichia coli* by UV radiation, gamma-rays and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Mutat Res* 1982;95:457-74.
- [45] Sur TK, Biswas TK, Ali L, Mukherjee B. Anti-inflammatory and anti-platelet aggregation activity of human placental extract. *Acta Pharmacol Sin* 2003;24:187-92.