

МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ОСТРОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ И ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Е.Г. Трапезникова¹, В.Б. Попов¹,
А.С. Радиллов¹, В.В. Шилов²

¹ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмолковский, Российская Федерация

²ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, 191015, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

Проведено экспериментальное моделирование острого токсического гепатита у лабораторных животных (половозрелых крыс-самцов линии «Wistar») с помощью однократного внутрижелудочного введения масляного раствора четыреххлористого углерода (CCl₄) в дозе 1500 мг/кг. Гистологически подтверждено, что CCl₄ вызывает обширные центрлобулярные некротические изменения паренхимы печени, нарушение углеводного и белкового обмена в гепатоцитах, с последующим развитием жировой дистрофии органа.

С целью изучения терапевтического потенциала клеточных культур для терапии поражений при остром токсическом гепатите использовали линию мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) дифференцированных из эмбриональных тканей мышей. Животные были разделены на две экспериментальные группы: 1-я группа (контроль) – введение CCl₄ в дозе 1500 мг/кг; 2-я группа – введение CCl₄ в дозе 1500 мг/кг, через 8 часов внутривенная инъекция суспензии содержащей ММСК в количестве 1,5 млн. на животного.

В ходе исследования была доказана миграция трансплантированных ММСК мышши в пораженную ткань печени крыс. Выявлено положительное действие трансплантированных ММСК на основные патофизиологические процессы при остром токсическом гепатите у крыс, проявляющиеся в уменьшении некротических, воспалительных и дистрофических процессов в паренхиме печени. По данным морфометрического анализа, инъекция суспензии ММСК приводила к статистически значимому уменьшению площади воспалительных инфильтратов на 3-е и 5-е сутки, уменьшению проявлений жировой дистрофии на 7-е сутки после воздействия CCl₄. Полученные результаты свидетельствуют о высоком терапевтическом потенциале ММСК для коррекции состояний при острых токсических поражениях печени.

Ключевые слова: морфометрическое исследование, четыреххлористый углерод, острый токсический гепатит, мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки, лечение токсического поражения.

Цит: Е.Г. Трапезникова, В.Б. Попов, А.С. Радиллов, В.В. Шилов. Морфометрическая оценка регенеративных процессов в печени крыс при остром токсическом гепатите и трансплантации мезенхимальных стволовых клеток. Токсикологический вестник. 2021; 1:14-19.

Введение. Согласно данным Роспотребнадзора, в 2019 году в Российской Федерации наблюдалась тенденция, связанная с уменьшением комплексной химической нагрузки на население страны (на 14,1 %, по сравнению с 2012 годом) [1]. Несмотря

на выявленную положительную динамику, частота заболеваний, ассоциированных с воздействием химических факторов, продолжает оставаться на прежнем, достаточно высоком уровне [2]. Данная ситуация, прежде всего, обусловлена

Трапезникова Елена Геннадьевна (Trapeznikova Elena Gennad'evna), научный сотрудник лаборатории спортивной гигиены ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, г. Санкт-Петербург, pishite22@mail.ru;

Попов Вадим Борисович (Popov Vadim Borisovich), доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории общей токсикологии и гигиенического нормирования ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, г. Санкт-Петербург, vpopov1@mail.ru;

Радиллов Андрей Станиславович (Radilov Andrej Stanislavovich), доктор медицинских наук, профессор, и.о. директора ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, г. Санкт-Петербург, a.radilov@icloud.com;

Шилов Виктор Васильевич (Shilov Viktor Vasil'evich), доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой токсикологии, экстремальной и водолазной медицины ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, vshilov@inbox.ru

увеличением бытовых случаев отравлений. Так, в 2018 году в РФ был зарегистрирован самый высокий показатель острых отравлений связанный с приемом спиртосодержащей продукции.

В структуре заболеваемости токсической этиологии острые гепатиты занимают лидирующее положение, и, как правило, затрагивают группу взрослого, трудоспособного населения. Высокий риск развития неблагоприятных последствий острого токсического гепатита в виде острой печеночной недостаточности или фибротического перерождения органа с развитием цирроза органа в значительной степени определяют показатели заболеваемости и смертности среди населения и обуславливают актуальность лечения данных состояний [4].

Несмотря на высокие достижения в области клинической токсикологии и фармакологии, применение стандартных дезинтоксикационных, симптоматических мероприятий для лечения острых гепатитов не всегда эффективно [3]. В связи с этим, поиск и внедрение новых средств и методов лечения заболеваний печени токсической этиологии является важной и актуальной задачей.

Перспективным направлением для терапии многих заболеваний в настоящее время является регенеративная медицина. Результаты значительного числа экспериментальных исследований, проведенных в России и за рубежом, свидетельствует об эффективности применения дериватов стволовых клеток для коррекции многих хронических заболеваний у лабораторных животных [5, 6, 7, 8]. В клинической практике применение стволовых клеток уже стало рутинным методом лечения многих заболеваний. Трансплантация мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) совместно с аллогенной пересадкой костного мозга успешно решает проблему возможного развития «реакции трансплантат против хозяина» в терапии онкогематологических заболеваний [9, 10]. Накоплен большой опыт использования стволовых клеток и их производных для лечения нейродегенеративных болезней [11], заболеваний опорно-двигательного аппарата [12, 13], а также для устранения косметических дефектов кожи, ожогов и трофических язв [14] и др.

Несмотря на то, что методы регенеративной медицины нашли широкое применение для лечения целого ряда хронических заболеваний, остается открытым вопрос о возможности их использования для терапии острых форм заболеваний, в том числе возникших при воздействии токсических факторов. Предполагается, что применение стволовых клеток на начальных стадиях заболеваний позволит предотвратить возникновение хронического течения болезней, а также мини-

мизировать вероятность развития осложнений, угрожающих жизни больного [15].

Таким образом, целью настоящего экспериментального исследования было изучение морфометрических показателей, отражающих регенеративные процессы в печени крыс при остром токсическом гепатите на фоне трансплантации мезенхимальных стволовых клеток.

Материалы и методы исследования. *Получение культуры ММСК и ее характеристики.* Культуру ММСК получали путем направленной дифференцировки из эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мышей линии C57Bl/СВА. Из недифференцированных ЭСК методом «висячей капли» были получены 5-6 дневные эмбрионидные тельца (ЭТ). Ранние ЭТ (5-6 дней) сажали на чашки Петри, покрытые 0,1 % желатиной, культивировали в ростовой среде, лишенной ростового фактора LIF, после чего переводили на индукционную ростовую среду RPMI-1640 [16]. Выделенные клетки культивировали до 5 пассажа. В процессе культивирования из ЭТ формировалась культура мезенхимоподобных клеток.

Оценку фенотипических особенностей полученной культуры проводили, руководствуясь минимальными критериями, установленными Международным обществом клеточной терапии (ISCT) для клеток мезенхимальной природы, а именно [17]:

1. Способность ММСК к адгезии к пластику при культивировании.

2. Экспрессия поверхностных антигенов (CD-90, CD-73, CD-105), отсутствие маркеров гемопоэтических клеток (CD-34, CD-45, CD-14). Оценку экспрессии осуществляли с помощью проточного цитофлуориметра (Beckman Coulter, США). Клетки трипсинизировали и окрашивали в течение 30 мин при +4°C связанными с FITC или PE антителами против CD-73, CD-90, CD-105, CD-34, CD-45, CD-14.

3. Способность к дифференциации *in vitro* в пределах одного гистологического листка при химической индукции (в хондро-, остео- и адипогенном направлении).

Моделирование острого токсического гепатита у крыс. Эксперимент выполнен на половозрелых крысах-самцах линии «Wistar», массой 170-240 г. Всех животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде. Опыты были выполнены в соответствии с Директивой Европейского Парламента и Совета Европейского союза – 2010/63/EU от 22.09.2010 г. Экспериментальное исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России и СЗГМУ им. И.И. Мечникова.

Моделирование острого токсического гепатита у крыс проводили путем однократного внутри-

желудочного введения масляного раствора CCl_4 в дозе 1500 мг/кг. Животные были разделены на две группы: 1-я группа (контроль) – введение CCl_4 в дозе 1500 мг/кг; 2-я группа (экспериментальная) – введение CCl_4 в дозе 1500 мг/кг с последующей внутривенной инъекцией (через 8 часов) суспензии содержащей ММСК в количестве 1,5 млн. на животного.

Эвтаназию животных осуществляли на 1-е, 3-е, 5-е и 7-е сутки после воздействия CCl_4 , для исследования изымалась печень. Гистологическую обработку образцов печени проводили по стандартным протоколам с последующей окраской готовых срезов гематоксилином-эозином [18].

Степень выраженности патоморфологических изменений в двух группах оценивали с помощью морфометрического исследования гистологических срезов печени крыс.

Гистологические срезы печени анализировали с помощью микроскопа Axioskop-40 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$. Морфометрический анализ проводился с помощью программного обеспечения «ВидеоТест-4», Россия. В зависимости от гистологической картины острого токсического гепатита на разных сроках исследования оценивали следующие морфометрические параметры: на 1-е сутки – Сабс. центролобулярных некрозов (мм²), соотношение S_n/S_p , где S_n – площадь некрозов, S_p – площадь неизменной паренхимы (%); на 3-е и 5-е сутки исследования – Сабс. инфильтратов (мм²), S ядер (мкм²), количество ядрышек в ядре гепатоцитов (ед. в п/зр.), количество двуядерных гепатоцитов (ед. в п/зр.). Ядерно-цитоплазматическое отношение гепатоцитов (ЯЦО) рассчитывали по формуле – $S_{\text{ядра}}/S_{\text{цитоплазмы}}$ (усл. ед.). Митотический индекс (МИ) вычисляли, как среднее количество фигур митозов в визуализируемых полях зрения (ед. в п/зр.). В связи с диффузным поражением печени жировой дистрофией на 7-е сутки после воздействия CCl_4 морфометрическое исследование не проводилось.

Статистическую обработку полученных данных выполняли с помощью компьютерных программ Prizm 5, Microsoft Excel. Нормальность распределения выборки оценивали с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Для сравнения средних значений морфометрических показателей в независимых группах использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Методы детекции ММСК в печени крыс. Непосредственно перед внутривенной трансплантацией проводили витальное окрашивание культуры ММСК флуоресцентным красителем РКН-26 (Sigma, США), позволяющим идентифицировать клетки в гистологических срезах печени крыс.

Исследования проводили с помощью флуоресцентного микроскопа (Nicon, Япония), при длине волны 567 нм.

Для обнаружения ДНК мышцы (ММСК) в биоптатах печени крыс использовали метод ПЦР. Идентификация ММСК мышцы проводилась с помощью амплификации видоспецифичных (для *Mus musculus* и *Rattus norvegicus*) локусов субъединицы I цитохромоксидазы (COI) по модифицированному методу [19].

Результаты и обсуждение. Полученная культура ММСК из ЭСК мышцы соответствовала общепринятым иммунофенотипическим критериям: подтверждена адгезия клеток к культуральному пластику; анализ поверхностного фенотипа культуры ММСК подтвердил наличие большинства основных маркеров мезенхимальных клеток (CD-90, CD-73, CD-105) и отсутствие маркеров кроветворных клеток (CD-34, CD-45, CD-14); подтверждена дифференциация ММСК *in vitro* в остео- и хондрогенном направлении, в присутствии индуцирующих факторов.

По данным иммунофлуоресцентного анализа, ММСК, содержащие флуоресцентную метку (РКН-26), обнаруживались в ткани печени крыс на 3 сутки после воздействия CCl_4 и во все последующие сроки исследования (5-е, 7-е сутки). Наибольшая концентрация меченых ММСК была выявлена в поврежденных зонах печени (центролобулярные отделы).

По данным ПЦР, ДНК мышцы в биоптатах печени крыс была обнаружена на 3-и, 5-е и 7-е сутки после воздействия CCl_4 . Полученные данные позволяют предположить, что миграция ММСК в поврежденный орган после внутривенной трансплантации происходила не позднее 3-х суток после трансплантации.

Гистологическая картина острого токсического гепатита после воздействия CCl_4 в дозе 1500 мг/кг у животных обеих групп характеризовалась стадийностью течения патологических проявлений в зависимости от сроков наблюдения. CCl_4 инициировал развитие некротических, инфильтративных и дистрофических изменений диффузного характера в паренхиме печени.

Морфометрический анализ гистологических срезов печени. На 1-е сутки исследования, статистически значимых различий в площади центролобулярных некрозов после воздействия CCl_4 и трансплантации ММСК между животными двух групп выявлено не было. Доля некротически измененной ткани относительно неизменной ткани печени составила 39,10 % у контрольной и 37,25 % у экспериментальной группы животных (табл. 1).

Морфометрический анализ печени на 3 сутки исследования в группе животных, которым трансплантировали ММСК, выявил следующие

Таблица 1

Морфометрические показатели печени крыс на 1 сутки после воздействия CCl_4 и трансплантации ММСК, $M \pm m$

Группа животных	Исследуемые параметры морфометрии	
	$S_{\text{абс.}} \text{ центролобулярных некрозов, мм}^2$	Sn./Sp., %
Контроль	0,125±0,022	39,10
ММСК	0,119±0,023	37,25

изменения по сравнению с контрольной группой: уменьшение площади воспалительных инфильтратов на 28,33 % ($p < 0,0001$); увеличение средней площади ядер гепатоцитов и количества ядрышек в ядре на 6,33 % ($p = 0,0013$) и 17,41 % ($p = 0,0018$) соответственно; увеличение митотического индекса на 38,03 % ($p = 0,02$) (табл. 2).

Выявленная динамика морфометрических изменений в печени крыс на 3-е сутки после однократного воздействия CCl_4 и трансплантации суспензии ММСК свидетельствовала об интенсивных структурных перестройках в клетках печени крыс, которые отражали высокую функциональную (белково-синтетическую) и пролиферативную активность по сравнению с контрольной группой. Активация собственных регенеративных процессов в печени после инъекции ММСК приводила к уменьшению морфологических проявлений токсического поражения, что проявлялось в статистически значимом уменьшении площади воспалительных инфильтратов.

На 5-е сутки исследования у животных на фоне трансплантации ММСК выявлено статистически значимое уменьшение площади центролобулярных инфильтратов (на 18,75 % ($p = 0,0173$), при этом наблюдалось снижение морфометрических показателей, отвечающих за активность регенеративных процессов по сравнению с показателями в контрольной группе.

Так, после однократного введения CCl_4 на фоне трансплантации ММСК наблюдалось уменьшение количества ядрышек в ядрах гепатоцитов на 12,05 % ($p = 0,04$), уменьшение количества полиплоидных гепатоцитов на 29,96 % ($p = 0,03$), а также митотического индекса на 42,24 % ($p = 0,02$) (табл. 2).

Анализируя динамику морфометрических показателей на 3-е и 5-е сутки исследования, стоит отметить, что у животных, которым в качестве терапевтического агента была трансплантирована суспензия ММСК морфометрические изменения свидетельствующие о внутриклеточной регенерации и пролиферативных процессах в печени, наблюдались на более раннем сроке исследования – на 3-и сутки после воздействия CCl_4 . Тогда, как у контрольной группы пик регенеративной активности по морфометрическим данным приходился на 5-е сутки, т.е. на 2-ое суток позже, чем в экспериментальной группе.

На 7-е сутки исследования наблюдалось восстановление балочно-радиарного строения печени у животных обеих групп. Выявлена незначительная очаговая инфильтрация печени круглоклеточными элементами, преимущественно в зонах повреждения. Основная патологическая картина острого токсического гепатита после воздействия CCl_4 на 7-е сутки была представлена диффузной жировой дистрофией органа разной

Таблица 2

Морфометрические показатели печени крыс на 3 и 5 сутки после воздействия CCl_4 и трансплантации ММСК, $M \pm m$

Группа животных	Исследуемые параметры морфометрии					
	$S_{\text{абс.}} \text{ инфильтратов, мм}^2$	$S \text{ ядер, мкм}^2$	ЯЦО, усл.ед.	Кол-во ядрышек, ед. в п/зр.	МИ, ед. в п/зр.	Кол-во двуядерных гепатоцитов, ед. в п/зр.
3 сутки						
Контроль	0,060±0,001	37,9±0,56	0,19±0,004	3,10±0,13	1,42±0,2	14,2±1,05
ММСК	0,043±0,001*	40,3±0,58*	0,20±0,002	3,64±0,11*	1,96±0,2*	16,9±2,3
5 сутки						
Контроль	0,016±0,008	39,58±1,7	0,17±0,007	3,07±0,1	1,16±0,14	24,7±2,3
ММСК	0,013±0,006*	36,75±1,5	0,20±0,01	2,7±0,1*	0,67±0,09*	17,3±2,6*

Примечание: * - достоверность различий $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

степени выраженности (от мелко- до крупнопельной). При качественной оценке, проявление жировой дистрофии в группе животных трансплантированным ММСК были менее выражены, по сравнению с гистологической картиной, наблюдаемой в контрольной группе.

Заключение. В ходе проведенного исследования была доказана миграция трансплантированных ММСК в ткань печени крыс, после воздействия CCl_4 . Начиная с 3-х суток и на все последующие сроки наблюдения, трансплантированные ММСК мыши, обнаруживались в ткани печени крыс и располагались преимущественно в поврежденных зонах печени (центролобулярные отделы).

Проведенный анализ морфометрических показателей печени выявил, что у животных на фоне трансплантации ММСК на 3-е сутки после воздействия CCl_4 в печени наблюдалась наибольшая активность регенеративных процессов. В контрольной группе показатели, отражающие активность естественного механизма восстановления после токсического повреждения печени, были выявлены в более поздние сроки исследования – на 5-е сутки эксперимента. Терапевтическое действие ММСК при остром токсическом гепатите у крыс проявлялось в более ранней активации процессов регенерации, а также статистически значимом увеличении показателей, характеризующих функциональную активность гепатоцитов, что, в свою очередь, приводило к до-

стоверному уменьшению инфильтративно-воспалительных и дистрофических процессов в ткани печени после воздействия CCl_4 .

Основываясь на механизмах, лежащих в основе регенеративной медицины, можно предположить, что, помимо заместительного потенциала, важным свойством ММСК является их гуморальное воздействие на клеточную нишу, в которой они оказались. Посредством продуцирования большого количества ростовых факторов, противовоспалительных цитокинов, хемокинов ММСК способны инициировать процессы внутриклеточной регенерации, пролиферации и ангиогенеза в поврежденном органе [20, 21]. Активация механизмов регенерации в значительной степени приводит к сокращению сроков заболевания и способствует предотвращению возможного персистирующего течения патологических процессов. Усиление процессов ангиогенеза в органах при их токсических повреждениях способствует уменьшению гипоксии, которые являются одними из основных патофизиологических механизмов при воздействии токсических факторов.

Таким образом, методы регенеративной медицины могут быть рассмотрены в качестве перспективного направления для терапии не только хронических, но и острых токсических поражений различных органов и тканей, прежде всего, в качестве средства, направленного на интенсификацию собственных регенеративных процессов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году: Государственный доклад. – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2020; 299.
2. Официальный сайт Росстата // URL: <https://gks.ru/folder/13721>
3. Антоненко О.М. Токсические поражения печени: пути фармакологической коррекции. Поликлиника МС. 2013; 6(2): 45-51.
4. Stravitz R.T., Lee W.M. Acute liver failure. *Lancet*. 2019; 394: 869-881.
5. Esquer F., Esquer M., Parrau D., Carpio D., Yañez A., Cong P. Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type I diabetic mice. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2008; 14: 631-40.
6. Wang J., Wan H. Mesenchymal stromal cells as a therapeutic treatment for ischemic stroke. *Neuroscience bull*. 2014; 30: 524-35.
7. Протасова Г.А., Шабашева Л.В., Попов В.Б. Коррекция токсического поражения печени стволовыми клетками. Токсикологический вестник. 2020; (4): 21-26. <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2020-4-21-26>.
8. Айрапетов Г.А., Загородий Н.В., Воронников А.А. Экспериментальный метод замещения костно-хрящевых дефектов суставов (ранние результаты). Медицинский вестник Юга России. 2019; 10(2): 71-76.
9. Ball L.M., Bernardo M.E., Roelofs H., Lankester A., Cometa A., Egeler M.R., et al. Co-transplantation of ex vivo-expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocytes recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2007; 10: 2764-2767.
10. Le Blanc K., Samuelsson H., Gustafsson B., Remberger M., Sundberg B., Arvidson J., et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2007; 21(8): 1733-1738.
11. Wyse R.D. Use of genetically modified mesenchymal stem cells to treat neurodegeneration diseases. *Int. J. Mol. Sci*. 2014; 15: 1719-1745.
12. Jo C.H., Lee Y.G., Shin W.H., Kim H., Chai J.W., Jeong E.C., et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells*. 2014; 32: 1254-1266.
13. Huebner K., Frank R.M., Getgood A. Ortho-Biologics for Osteoarthritis. *Clinics in Sports Medicine*. 2019; 38(1): 123-141.
14. Golchin A., Tahereh Z. F., Khojasteh A., Soleimani F., Ardeshirylajimi A. The Clinical Trials of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Skin Diseases: An Update and Concise Review. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 2019; 14(1): 22-33.
15. Li M., Ma J., Gao Y., Yang L. Cell sheet technology: a promising strategy in regenerative medicine. *Cytotherapy*. 2019; 21(1): 3-16.
16. Konno T., Akito K., Kurita K., Ito Y. Formation of embryoid bodies by mouse embryonic stem cells on plastic surfaces. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2005; 100(1): 88 - 93.
17. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini Fc., Krause Ds., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-317.
18. Мужикян А.А., Макарова М.Н., Гушин Я.А. Особенности гистологической обработки органов и тканей лабораторных животных. СПб: Международный вестник ветеринарии. 2014; 2: 103-9.
19. Kinnaird T., Stabile E., Burnett M.S., Lee C.W., Barr S., Fuchs S., Epstein S.E. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res*. 2004; 94: 678-685.
20. Stagg J., Galipeau J. Mechanisms of Immune Modulation by Mesenchymal Stromal Cells and Clinical Translation. *Curr. Mol. Med*. 2013; 13(5): 856-867.
21. Praveen K.L., Kandoi S., Misra R., Vijayalakshmi S., Rajagopal K., Verma R.S. The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2019; 46: 1-9. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2019.04.002.
1. On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2019: State report. – M.: Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare. 299 ;2020 (in Russian).
2. Official website of Russian statistics. URL: <https://gks.ru/folder/13721> (in Russian).
3. Antonenko O.M. Toxic liver damage: ways of pharmacological correction. *Polyclinic MC*. 51-45 ;(2):6 ;2013 (in Russian).
4. Stravitz R.T., Lee W.M. Acute liver failure. *Lancet*. 881-869 ;394 ;2019.
5. Esquer F., Esquer M., Parrau D., Carpio D., Yañez A., Cong P. Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type I diabetic

- mice. *Biol. Blood Marrow Transplant.* ;2008 40-631 :14.
6. Wang J., Wan H. Mesenchymal stromal cells as a therapeutic treatment for ischemic stroke. *Neuroscience bull.* ;2014 35-524 :30.
7. Protasova G.A., Shabasheva L.V., Popov V.B. Stem cell correction of toxic liver lesions. *Toxicological Review.* ;(4) ;2020 26-21. <https://doi.org/10.36946/26-21-4-2020-7922> (in Russian).
8. Airapetov G.A., Zagorodiy N.V., Vorotnikov A.A. An experimental method for the replacement of osteochondral defects of the joints (early results). *Medical Bulletin of the South of Russia.* 76-71 :(2)10 ;2019 (in Russian).
9. Ball L.M., Bernardo M.E., Roelofs H., Lankester A., Cometa A., Egeler M.R., et al. Co-transplantation of ex vivo-expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocytes recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2767-2764 :10 ;2007.
10. Le Blanc K., Samuelsson H., Gustafsson B., Remberger M., Sundberg B., Arvidson J., et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia.* 1738-1733 :(8)21 ;2007.
11. Wyse R.D. Use of genetically modified mesenchymal stem cells to treat neurodegeneration diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 1745-1719 :15 ;2014.
12. Jo C.H., Lee Y.G., Shin W.H., Kim H., Chai J.W., Jeong E.C., et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells.* 1266-1254 :32 ;2014.
13. Huebner K., Frank R.M., Getgood A. Ortho-Biologics for Osteoarthritis. *Clinics in Sports Medicine.* 141-123 :(1)38 ;2019.
14. Golchin A., Tahereh Z. F., Khojasteh A., Soleimanifar F., Ardeshirylajimi A. The Clinical Trials of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Skin Diseases: An Update and Concise Review. *Current Stem Cell Research & Therapy.* 33-22:(1)14 ;2019.
15. Li M., Ma J., Gao Y., Yang L. Cell sheet technology: a promising strategy in regenerative medicine. *Cytotherapy.* ;2019 16-3:(1)21.
16. Konno T., Akito K., Kurita K., Ito Y. Formation of embryoid bodies by mouse embryonic stem cells on plastic surfaces. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 93 - 88 :(1)100 ;2005.
17. Dominić M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini Fc., Krause Ds., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 317-315 :(4)8 ;2006.
18. Muzhikyan A.A., Makarova M.N., Gushchin Ya.A. Features of histological processing of organs and tissues of laboratory animals. *SPb: International Veterinary Bulletin.* 9-103 :2 ;2014 (in Russian).
19. Kinnaird T., Stabile E., Burnett M.S., Lee C.W., Barr S., Fuchs S., Epstein S.E. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res.* ;2004 685-678 :94.
20. Stagg J., Galipeau J. Mechanisms of Immune Modulation by Mesenchymal Stromal Cells and Clinical Translation. *Curr. Mol. Med.* 867-856 :(5)13 ;2013.
21. Praveen K.L., Kandoi S., Misra R., Vijayalakshmi S., Rajagopal K., Verma R.S. The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 9-1 :46 ;2019. DOI: 10.1016/j.cytogr.2019.04.002.

E.G. Trapeznikova¹, V.B. Popov¹, A.S. Radilov¹, V.V. Shilov²

MORPHOMETRIC ASSESSMENT OF REGENERATIVE PROCESSES IN THE LIVER OF RATS IN ACUTE TOXIC HEPATITIS AND MESENCHYMAL STEM CELL TRANSPLANTATION

¹Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Federal Medical Biological Agency, 188663, G/P Kuzmolovsky, Vsevolozhsky District, Leningrad Region, Russian Federation

²North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, 191015, Sankt Petersburg, Russian Federation

An experimental simulation of acute toxic hepatitis in laboratory animals (sexually mature male «Wistar» rats) was carried out using a single intragastric administration of an oil solution of carbon tetrachloride (CCl₄) at a dose of 1500 mg/kg. It is histologically confirmed that CCl₄ causes extensive centrilobular necrotic changes in the liver parenchyma, impaired carbohydrate and protein metabolism in hepatocytes, followed by the development of fatty degeneration of the organ.

In order to study the therapeutic potential of cell cultures for the correction of lesions in acute toxic hepatitis, a line of multipotent mesenchymal stem cells (MMSCs) differentiated from mouse embryonic tissues was used. The animals were divided into 2 experimental groups: 1st group (control) – the introduction of CCl₄ at a dose of 1500 mg/kg; 2nd group – the introduction of CCl₄ at a dose of 1500 mg/kg, after 8 hours, an intravenous injection of a suspension containing MMSC in the amount of 1,5 million per animal.

In the course of the study, the migration of transplanted MMSCs of the mouse into the affected tissue of rat liver was proved. The positive therapeutic effect of transplanted MMSCs in acute toxic hepatitis was revealed, manifested in a decrease in necrotic, inflammatory and dystrophic processes in the liver parenchyma. According to morphometric analysis, the injection of MMSC suspension led to a statistically significant decrease in the area of inflammatory infiltrates on days 3 and 5 and a decrease in the degree of fatty degeneration on day 7 after exposure to CCl₄. The results obtained indicate the high therapeutic potential of MMSCs for the correction of acute toxic liver lesions.

Keywords: morphometric research, tetrachloromethane, acute toxic hepatitis, multipotent mesenchymal stem cells, toxic damage therapy.

Quote: E.G. Trapeznikova, V.B. Popov, A.S. Radilov, V.V. Shilov. Morphometric assessment of regenerative processes in the liver of rats in acute toxic hepatitis and mesenchymal stem cell transplantation. *Toxicological Review.* 2021; 1:14-19.

Переработанный материал поступил в редакцию 20.01.2021 г.

