

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ОСТРОМ ТОКСИЧЕСКОМ
ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ**

¹Трапезникова Е.Г., ¹Попов В.Б., ¹Радилов А.С., ²Шилов В.В.

¹ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмолровский, корп.93, Россия, 8-812-449-61-77, niigpech@rihophe.ru

²ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова Минздрава России, 191015, г. Санкт-Петербург, Кирочная улица д. 41, 8-812-303-50-01, rectorat@szgmu.ru

Резюме. В структуре заболеваний, ассоциированных с воздействием токсических факторов на организм человека, острые токсические гепатиты занимают одну из лидирующих позиций. В связи с несовершенством применяемой базисной терапии при лечении заболеваний печени, в настоящее время ведется поиск новых средств и методов для восстановления структуры и функций поврежденной печени, а так же профилактики возможной хронизации патологического процесса. Применение методов регенеративной медицины является перспективным направлением для терапии многих заболеваний, в том числе возникших при воздействии токсических факторов. Данное экспериментальное исследование было направлено на изучение влияния культуры мезенхимальных стволовых клеток, имеющих эмбриональное происхождение, на динамику патоморфологических процессов в ткани печени лабораторных животных после индуцированного острого токсического гепатита. Для моделирования острого токсического гепатита у крыс проведена серия опытов с целью поиска оптимального гепатотоксического химического соединения. В качестве химического агента был выбран четыреххлористый углерод, внутрижелудочное введение которого, в дозе 1500 мг/кг, лабораторным животным вызывало стойкие патоморфологические признаки токсического поражения печени. Культура мезенхимальных стволовых клеток для трансплантации была получена из ЭСК мыши и соответствовала общепринятым фенотипическим и генотипическим критериям. Гистологический анализ показал, что трансплантация мезенхимальных стволовых клеток на 3-е и 5-е сутки исследования уменьшала интенсивность проявления некротических, инфильтративных и воспалительных процессов в ткани печени после воздействия четыреххлористого углерода, на 7-е сутки уменьшала дистрофические признаки поражения паренхимы печени, по сравнению с группой

позитивного контроля. Таким образом, применение мезенхимальных стволовых клеток, имеющих эмбриональное происхождение в качестве клеточного трансплантата, приводило к ускорению процессов восстановления в ткани печени, начиная с 3-х суток и на протяжении всего исследования.

Ключевые слова: острый токсический гепатит; четыреххлористый углерод; трансплантация; регенеративная медицина; мезенхимальные стволовые клетки.

EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF THE USE OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN ACUTE TOXIC LIVER DAMAGE IN LABORATORY ANIMALS

¹Trapeznikova E.G., ¹Popov V.B., ¹Radilov A.S., ²Shilov V.V.

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

– North-Western State Medical University named after I.I.

Mechnikov, 191015, Sankt-Petersburg, Russian Federation;

– Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology Federal State Unitary Enterprise, Federal Medical Biological Agency, G/P Kuzmolovsky, Vsevolozhsky District, Leningrad Region, 188663, Russian Federation.

Abstract. In the structure of diseases associated with the effects of toxic factors on the human body, acute toxic hepatitis occupies one of the leading positions. Due to the imperfection of the basic therapy used in the treatment of liver diseases, a search is currently underway for new tools and methods to restore the structure and functions of the damaged liver, as well as the prevention of a possible chronicity of the pathological process. The use of methods of regenerative medicine is a promising direction for the treatment of many diseases, including those arising from exposure to toxic factors. This experimental study was aimed at assessing the influence of a culture of mesenchymal stem cells of embryonic origin on the dynamics of pathomorphological processes in the liver tissue of laboratory animals after induced acute toxic hepatitis. To simulate acute toxic hepatitis in rats, a series of experiments was carried out with the aim of finding the optimal hepatotoxic chemical compound. Tetrachloromethane was chosen as a chemical agent, intragastric administration of which at a dose of 1500 mg/kg to laboratory animals caused persistent pathomorphological signs of toxic liver damage. A mesenchymal stem cell culture for transplantation was obtained from mouse ESCs and met generally accepted

phenotypic and genotypic criteria. Histological analysis showed that transplantation of mesenchymal stem cells on the 3rd and 5th day of the study reduced the intensity of manifestations of necrotic, infiltrative and inflammatory processes in the liver tissue after exposure to carbon tetrachloride, on the 7th day reduced the dystrophic signs of damage to the liver parenchyma, compared with a positive control group. Thus, the use of mesenchymal stem cells having an embryonic origin as a cell transplant led to an acceleration of the recovery processes in the liver tissue, starting from the 3rd day and throughout the study.

Key words: acute toxic hepatitis, tetrachloromethane, transplantation, regenerative medicine, mesenchymal stem cells.

Введение.

Тенденция последних десятилетий показывает, что темпы производства химических веществ и их соединений неуклонно увеличиваются для того, чтобы обеспечить все возрастающие потребности человека. Интенсивная промышленная деятельность предприятий химического комплекса в большинстве своем сопровождается ухудшением санитарно-гигиенического состояния окружающей среды [10]. В связи с этим количество случаев интоксикаций среди населения приняло повсеместный характер. Существует несколько сотен тысяч наименований химических веществ, большая часть из которых способна оказывать негативное влияние на организм человека [3].

Основные причины возникновения токсических поражений связаны с профессиональной деятельностью человека на производствах с использованием химических компонентов, а так же случаями возникновения аварийных ситуаций на них. По данным государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году» число зарегистрированных случаев профессиональных заболеваний (отравлений) составило 4147 [4]. Нельзя не упомянуть вклад в формирование дополнительных случаев заболеваемости, ассоциированной с влиянием токсических факторов на организм человека, частных случаев интоксикаций, развившихся по причине нерационального использования лекарственных средств, приема наркотических веществ, спиртосодержащих напитков, ядовитых грибов и др.

В структуре токсических поражений органов и тканей, острые гепатиты, наиболее часто встречающиеся виды отравлений. Это обусловлено тем, что печень является физиологическим фильтром, способным задерживать токсические вещества попавшие в кровь. Ценной этого является повреждение и гибель собственных клеток с нарушением

функционирования всего органа. В результате биотрансформации химических веществ, протекающей в ткани печени, нередко образуются соединения, которые превосходят по токсичности основное вещество, тем самым происходит запуск целого каскада патологических процессов, приводящих к гибели гепатоцитов. Острые гепатиты, как правило, возникают при однократном высокодозированном воздействии химического соединения. Патологические проявления в печени характеризуются развитием массивного некроза гепатоцитов с последующим развитием острой печеночной недостаточности или же развитием дегенеративных изменений в органе с возможной хронизацией патологического процесса [11, 8].

Базисная терапия при токсических гепатитах направлена на устранение токсического фактора, уменьшение его влияния на ткань печени, купирование клинических симптомов и снижение общей интоксикации [2]. Для коррекции метаболических нарушений в ткани печени часто используются гепатопротекторные препараты. Они представляют собой широкую группу лекарственных средств, способных оказывать противовоспалительное, антигипоксическое, иммуномодулирующее действие, замедлять синтез коллагена, с целью предотвращения фибротического перерождения органа в ответ на воспалительную реакцию [6]. К ним относятся эссенциальные фосфолипиды, растительные флавоноиды, производные аминокислот, препараты урсодезоксихолевой кислоты и др. [9]. Не смотря на огромный арсенал имеющихся препаратов эффективность большинства для терапии заболеваний печени не доказана. Это связано с тем, что результаты многочисленных испытаний этих препаратов основываются на малоубедительной базе, построенной на косвенных причинно-следственных критериях оценки эффективности (общее самочувствие добровольцев, их биохимические показатели и др.), отсутствием единых стандартизированных критериев, а так же полноценных контролируемых рандомизированных клинических исследований [13].

В связи с этим поиск современных методов лечения заболеваний печени, в том числе возникших по причине воздействия токсических факторов, является в настоящее время актуальной задачей.

В последнее время с развитием клеточной биологии появилась возможность использовать в качестве терапевтического агента стволовые клетки и их производные. Популярность применения клеточных трансплантатов, для коррекции многих заболеваний, напрямую связана с их функциональными характеристиками. Считается, что терапевтическое действие клеточных трансплантатов реализуется за счет следующих механизмов: замещение поврежденных клеток и восстановление естественных

функциональных процессов в органе; активации собственных процессов регенерации в поврежденном органе, за счет продуцирования клетками большого количества цитокинов, ростовых факторов и биологически активных веществ, которые способствуют уменьшению воспалительной реакции в зонах их миграции [7].

Применение методов регенеративной медицины позволяет решить ряд проблем, связанных с недостатками существующей стандартной терапии, ведь ни один лекарственный препарат не в состоянии восполнить клеточный состав поврежденного органа, этим и объясняется огромный интерес и многочисленные исследования в этой области.

Метод клеточной трансплантации широко используется для лечения многих терминальных стадий болезней, но остается актуальным вопросом о возможности применения клеточных технологий в терапии острых форм заболеваний с целью восстановления структуры поврежденных органов и их нормального функционирования, а так же для профилактики возможной хронизации патологических процессов [12, 14].

Наиболее привлекательной моделью для использования в качестве клеточного трансплантата в регенеративной медицине являются эмбриональные стволовые клетки (ЭСК). ЭСК впервые были выделены из внутренней массы бластоцисты [20]. Их уникальными свойствами являются неограниченный пролиферативный потенциал, а так же возможность дифференцироваться в дериваты всех клеточных линий [19, 15]. Для ЭСК характерно наличие слабой экспрессии генов гистосовместимости, что позволяет закрыть целый ряд вопросов, связанных с реакцией отторжения донорской ткани реципиентом, возникающих в случае трансплантации органов [16]. Тем не менее, использование чистой линии ЭСК в качестве клеточного трансплантата имеет ряд ограничений. Это связано с тем, что для выделения данной клеточной линии необходимо проведение работ с эмбриональными тканями человека, на которые в настоящее время в России наложен мораторий. В виду неограниченного пролиферативного потенциала ЭСК существует высокая вероятность образования эмбриональных опухолей при трансплантации (тератома, тератокарцинома) [1].

Решение возможных проблем, обусловленных применением чистой культуры ЭСК для целей трансплантации, возможно с помощью проведения предварительной направленной дифференциации ЭСК *in vitro* в другой клеточный тип и полной элиминации недифференцированных форм клеток [18]. При определенных условиях культивирования происходит трансформация ЭСК в клетки более низкого дифференциального ранга, но данная процедура позволяет частично сохранить

«полезные» свойства характерные для линии ЭСК, а так же купировать возможные побочные эффекты при их трансплантации, с сохранением высокого пролиферативного потенциала полученных клеток.

Дифференцировка ЭСК возможна в направлении клеток трех зародышевых листков – мезодермальном, эктодермальном и энтодермальном. Использование линии мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в клинической практике для терапии многих заболеваний уже давно стало рутинным. Применение МСК обусловлено иммуномодулирующими, противовоспалительными свойствами. В настоящее время широко распространен метод совместной аутологичной трансплантации культур МСК и ГСК при онкогематологических заболеваниях. Ко-трансплантация позволяет увеличить процент приживаемости ГСК, что способствует ускорению процессов кроветворения у данных больных [17]. Как правило, основным источником МСК для целей трансплантации в клинической практике является костный мозг.

Применение же культуры МСК, полученных из эмбриональных тканей, в рамках экспериментальных исследований позволит расширить знания об эффективности их трансплантации для коррекции различных заболеваний, в том числе вызванных воздействием токсических факторов.

Цель исследования - экспериментальная оценка эффективности применения внутривенной трансплантации МСК, имеющей эмбриональное происхождение, для коррекции патологических процессов при остром токсическом гепатите у лабораторных животных.

Материалы и методы. В работе использовали половозрелых аутбредных самцов крыс линии «Wistar», полученных из питомника «Пушино» (г. Пушино, Московская область). Всех животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде. Опыты были выполнены в соответствии с международными биоэтическими нормами (Директива Европейского Сообщества от 24 ноября 1986 г. - 86/609/ЕЕС).

Для создания экспериментальной модели острого токсического гепатита у крыс проводили серию опытов с целью поиска наиболее оптимального химического соединения, при однократном воздействии которого морфологически были бы подтверждены признаки острого токсического поражения печени без ярко выраженных патологических проявлений в остальных органах и тканях.

В качестве химических агентов использовали вещества, обладающие выраженным гепатотоксическим действием на организм подопытных животных. В 1-ой серии опытов

использовали однократное внутривенное введение циклофосфида крысам в дозе 20 мг/кг; во 2-ой серии - внутривенное введение несимметричного диметилгидрозиона (НДМГ) в дозах 80 и 100 мг/кг; в 3-ей - внутривенное введение масляного раствора CCl_4 в дозах 250, 1300, 1500 мг/кг.

По результатам гистологического исследования, для дальнейшего моделирования острого токсического гепатита у лабораторных животных был выбран четыреххлористый углерод в дозе 1500 мг/кг.

Для проведения эксперимента по оценке эффективности МСК было сформировано 2 группы лабораторных животных: экспериментальная группа (внутрижелудочное введение масляного раствора CCl_4 в дозе 1500 мг/кг и последующая внутривенная инъекция МСК в количестве 1,5 млн.); группа позитивного контроля (внутрижелудочное введение масляного раствора CCl_4 в дозе 1500 мг/кг).

Эвтаназию животных проводили под эфирным наркозом, путем декапитации. Вскрытие осуществляли через 1-ые, 3-ие, 5-ые и 7-ые сутки после начала эксперимента. Для патоморфологического исследования изымалась ткань печени. Орган фиксировали в 10 %-ном формалине, проводку, заливку в парафин, приготовление срезов осуществляли по стандартным методикам. Для изучения структуры печени методом световой микроскопией полученные гистологические срезы, толщиной 4 мкм, окрашивали гематоксилином-эозином. Для обнаружения жировых включений, фиксированную в формалине печень замораживали и изготавливали срезы толщиной 8 мкм с использованием криостата и последующей окраской суданом-3.

МСК были продуцированы из ЭСК мыши, для этого получали эмбрионные тельца (сферические конгломераты состоящие из ЭСК) которые выращивали в состоянии «подвешенной капли». Количество клеток в каждой капле было стандартным - 500 кл/30 мкл. Культивирование проводили в бесфидерной системе - в чашках Петри 60 мм, покрытых 0,1 % желатиной в течение 5-6 дней, при отсутствии фактора LIF. После чего эмбрионные тельца собирали и культивировали в ростовой среде на подложке с желатиной, в течение суток. Далее проводили смену ростовой среды на индукционную RPMI 1640 с добавлением 15 % фетальной сыворотки. Дальнейшее культивирование проводилось в среде RPMI 1640 в течение нескольких пассажей до получения клеток с характерной веретеноподобной морфологией, свойственной мезенхимальным клеткам.

Экспрессию антигенов мезенхимальных клеток оценивали на проточном цитофлуориметре (Beckman Coulter, США). Клетки трипсинизировали и окрашивали в

течение 30 мин при температуре +4°C связанными с FITC или PE антителами против CD73, CD90, CD105, CD34, CD45, CD14.

Для подтверждения дифференцировки ЭСК в МСК проводили окрашивание культуры с помощью моноклональных антител к специфическому белку, окрашивающим цитоскелет мезенхимальных клеток – Vimentin (BD Pharmingen, США, 1:100). Оценку пролиферативной активности полученной культуры МСК подтверждали при окрашивании клеток моноклональными антителами к ядерному белку делящихся клеток – PCNA (Millipore, 1:100), по стандартным методикам фирм производителей.

Для последующей детекции трансплантированных МСК на гистологических препаратах печени крыс перед трансплантацией проводили витальное окрашивание культуры клеток с помощью флуоресцентного красителя PKH-26 (Sigma, США), согласно рекомендациям производителя. Детекцию свечения определяли на флуоресцентном микроскопе Axioskop 40 (Carl Zeiss, Германия) при длине волны 567 нм.

Детектирование МСК мыши в биоптатах печени лабораторных крыс проводили методом ПЦР. Идентификация МСК мыши проводилась с помощью амплификации видоспецифичных (для *Mus musculus* и *Rattus norvegicus*) локусов субъединицы I цитохромоксидазы с (COI) по модифицированному методу [5].

Результаты. Проведенные опыты по поиску оптимального гепатотоксического вещества для создания модели острого токсического гепатита у лабораторных животных показали, что внутриорганный (внутрипеченочный) инъекция с использованием циклофосфида в дозе 20 мг/кг и НДМГ в дозах 80 и 100 мг/кг по данным патоморфологического анализа приводила к локальным патологическим проявлениям в месте инъекции. В результате чего преимущество было отдано системному введению химического соединения с целью создания диффузного характера поражения печени.

Согласно гистологическому исследованию внутрижелудочное введение CCl₄ лабораторным животным в дозах 250 и 1300 мг/кг выявило признаки нарушения обмена в гепатоцитах (белковая, жировая, углеводная дистрофии) и их преобладание над некротическими процессами. При повышении дозы CCl₄ до 1500 мг/кг были выявлены патоморфологические признаки острого диффузного токсического гепатита у лабораторных животных. На 1-е сутки исследования признаки острого токсического гепатита характеризовались наличием массивных централобулярных некрозов с выраженными периваскулярными отеками. На 3-е и 5-е сутки после воздействия CCl₄ в дозе 1500 мг/кг в ткани печени преобладали обширные воспалительные инфильтраты, состоящие из клеток лимфогистиоцитарного ряда. Обращало на себя внимание наличие

выраженных воспалительных, инфильтративных процессов в сосудах печени. На 7-е сутки интенсивность патоморфологических проявлений токсического поражения печени уменьшалась, наблюдались единичные воспалительные инфильтраты и диффузная жировая дистрофия органа. При гистологической оценке остальных органов и тканей (почки, легкие, головной мозг, сердце др.) были выявлены незначительные дистрофические изменения в ткани почек без некротических изменений.

Таким образом, однократное внутрижелудочное введение CCl_4 в дозе 1500 мг/кг лабораторным животным позволило создать оптимальную модель острого токсического гепатита для проведения дальнейших экспериментов по его коррекции с использованием культуры МСК.

Морфология дифференцированных клеток соответствовала характерным признакам мезенхимных клеток. С помощью проточной цитометрии была выявлена экспрессия основных маркеров мезенхимальных клеток, таких как CD-90, CD-73, CD-105 и отсутствие маркеров гемопоэтических клеток CD-34, CD-45, CD-14. Клетки положительно окрашивались моноклональными антителами к маркеру мезенхимных клеток Vimentin, имели высокий пролиферативный потенциал, что подтверждалось окрашиванием ядерных структур моноклональными антителами к белку PCNA. Таким образом, для целей трансплантации из ЭСК мыши была получена однородная культура МСК, которая соответствовала международным критериям, установленным для данной клеточной линии.

При сравнительном анализе гистологических срезов печени крыс, выявленные патоморфологические изменения на 1-е сутки исследования имели сходный характер и степень проявления во всех подопытных группах и характеризовались наличием обширных центролобулярных некрозов с нарушением балочно-радиарного строения органа, паренхиматозными дистрофическими изменениями в гепатоцитах (жировая, гидропическая, белковая) и периваскулярными отеками (Рисунок 1).

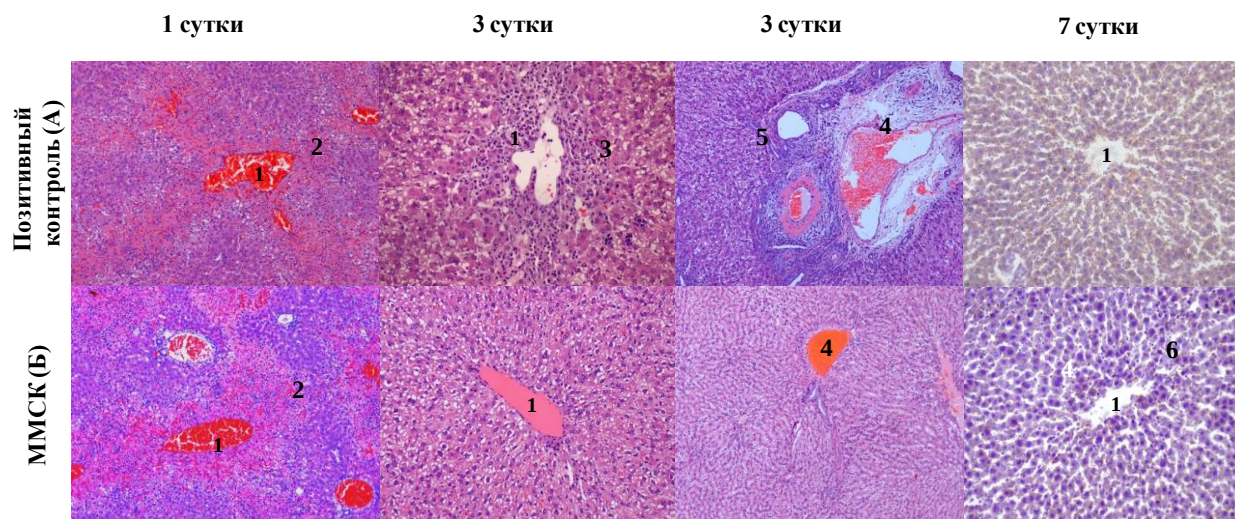


Рисунок 1 - Динамика патоморфологических процессов в ткани печени лабораторных животных после воздействия CCl_4 в дозе 1500 мг/кг (А) и внутривенной трансплантации МСК (Б): 1 – центролобулярная зона печени; 2 - обширный некроз гепатоцитов; 3 – обширный лимфогистиоцитарный инфильтрат; 4 – портальная зона печени; 5 - воспалительный инфильтрат сосудов триады печени; 6 – дистрофические нарушения паренхимы печени.

Примечание: Окраска-гематоксилин-эозин. Ув.: $\times 10$, $\times 20$.

На 3-е сутки после воздействия CCl_4 , по данным проведенного морфологического анализа, в группе животных позитивного контроля в печени выявлены инфильтративные и дистрофические процессы, признаки васкулитов. В группе животных, которым инъецировали суспензию МСК, на данный срок исследования сосудистые расстройства не были выявлены ни в одном случае наблюдения, отмечалось так же уменьшение интенсивности инфильтративных и дистрофических процессов в печени по сравнению с группой позитивного контроля.

На 5-е сутки исследования площадь воспалительных инфильтратов значительно уменьшалась во всех подопытных группах, у части животных после трансплантации МСК признаки инфильтративных изменений в печени выявлены не были.

На 7-е сутки патологические процессы в печени во всех подопытных группах проявлялись наличием признаков диффузной жировой дистрофии. Степень дистрофических процессов у животных трансплантированным МСК, была меньше и соответствовала мелко-среднекапельной, тогда как у группы позитивного контроля - средне-крупнокапельной стадии внутриклеточного ожирения.

Флуоресцентная микроскопия позволила определить наличие и распределение трансплантированных МСК в ткани печени крыс. Начиная с 3-х суток исследования, МСК окрашенные РКН-26 определялись в ткани печени крыс и локализовались

преимущественно в центролобулярных отделах печени, т.е. в наиболее поврежденных зонах печени.

Методом ПЦР видоспецифические локусы ДНК мыши обнаруживались в биоптате печени крыс, начиная с 3-х суток и на все последующие сроки исследования, именно тогда, когда по данным морфологического анализа наблюдалась положительная динамика патологических процессов после воздействия CCl_4 (Рисунок 2).

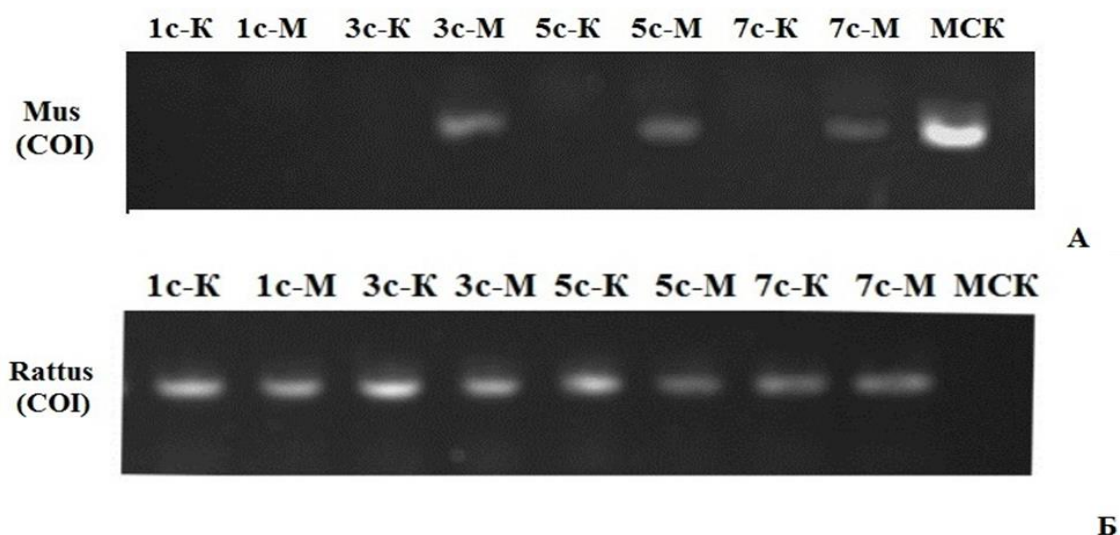


Рисунок 2 - Идентификация видоспецифичных локусов ДНК мыши (А) и крысы (Б) в культуре МСК и тканях печени крыс на 1-ые, 3-и, 5-ые, 7-ые сутки после воздействия CCl_4 и трансплантации МСК; К – позитивный контроль, воздействие CCl_4 без трансплантации, М – воздействие CCl_4 с последующей трансплантацией МСК, МСК – культура МСК.

Таким образом, по данным патоморфологического анализа, возможно заключить, что внутривенная трансплантация культуры МСК способствовала ускорению процессов регенерации в печени при ее остром токсическом поражении, что проявлялось в уменьшении степени выраженности инфильтративных, воспалительных и дистрофических признаков.

Выводы:

1. Наиболее оптимальным гепатотоксическим веществом для создания модели острого токсического гепатита у лабораторных животных является CCl_4 . Однократное внутрижелудочное введение CCl_4 в дозе 1500 мг/кг вызывает стойкие патоморфологические признаки острого поражения печени, проявляющиеся на ранних

сроках исследования наличием обширных центрлобулярных некрозов, на более поздних сроках инфильтративными и дистрофическими изменениями ткани органа.

2. С помощью молекулярно-генетического анализа (ПЦР) было доказано, что внутривенно введенные МСК мигрировали в наиболее поврежденный орган крыс после воздействия CCl_4 , при этом наибольшее количество МСК локализовалось в поврежденных зонах печени (центрлобулярные отделы) начиная с 3-х суток и на все последующие сроки наблюдения.

3. По данным патоморфологического анализа трансплантация МСК приводила к ускорению собственных регенераторных процессов в ткани печени после воздействия CCl_4 , что проявлялось в уменьшении инфильтративных, воспалительных и дистрофических проявлений.

4. Применение МСК имеющих эмбриональное происхождение имеет большой потенциал, для дальнейшего изучения их эффективности как при острых, так и хронических патологиях, в том числе возникших по причине воздействия токсических химических веществ.

Литература

1. Акопян А.С., Белоусов Д.Ю., Рысулы М.Р., Куликов А.В. Некоторые актуальные проблемы клинических исследований стволовых клеток. / Качественная клиническая практика. 2010. Т. 1, С. 22-28.
2. Афанасьев В.В. Руководство по неотложной токсикологии. / Руководство для врачей. 2012. С. 231-235.
3. Григорьев А.И. Экология человека. 2-е изд. ГЭОТАР-Медиа; 2013.
4. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году». URL: http://www.rosпотреbnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=12053
5. Кулешов К.В. Разработка молекулярно-генетических методов видовой идентификации клеточных культур. / Цитология. 2008. Т.50. № 9. С. 812.
6. Мараховский, Ю.Х. Гепатопротекторы: потенциальные возможности и ограничения защиты печени. 2004. Т. 1. С. 9-13.
7. Мезен Н. И. Стволовые клетки: учеб.-метод. пособие. 2-е изд. Минск: БГМУ; 2014.
8. Мышкин В.А. Поражение печени химическими веществами. Функционально-метаболические нарушения, фармакологическая коррекция. Гилем; 2007.
9. Новиков В.Е.; Климкина Е.И. Фармакология гепатопротекторов. / Обз. клин. фармакол. лек. тер. 2005. Т. 4. № 1. С. 2-20.
10. Онищенко Г.Г. Влияние факторов внешней среды на здоровье человека. / Иммунология. 2006. Т. 6 С. 352-356.
11. Павлов Ч.С., Шульпекова Ю.О., Золотаревский В.Б. и др. Современные представления о патогенезе, диагностике и лечении фиброза печени. / Рос. журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2005. Т. 2. С. 13-20.
12. Расулов М. Ф., Васильченков А.В., Онищенко Н. А., Крашенинников М. Е., Кравченко В. И., Горшенин Т. Л., Пидцан Р. Е., Потапов И. В. / Клеточ. технологии в биологии и медицине. 2005. Т. 1. С. 42-46.
13. Ушкалова Е.А. Проблемы применения гепатопротекторов. / Фарматека. 2004. Т. 4. С. 45-55.
14. Burns, C. J. Stem cell therapy for diabetes: do we need to make beta cells. / J. Endocrinol. 2004. Т. 183. 437–443 p.
15. Gilbert SF. Developmental Biology. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc. Publishers; 2006.

16. Heins N, Englund MC, Sjöblom C, Dahl U, Tønning A, Bergh C, Lindahl, et al. Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. / *Stem Cells*. 2004. T. 22. № 3. 367–376 p.
17. Introna M, Rambaldi A. Mesenchymal stromal cells for prevention and treatment of graft-versus-host disease: successes and hurdles. / *Curr Opin Organ Transplant*. 2015. T. 20. № 1. 72–78 p.
18. Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, et al. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. / *Nat Biotechnol*. 2006. T. 24. № 2. 185–187 p.
19. Semb Henrik. Human embryonic stem cells: Origin, properties and applications. *APMIS: / Acta pathol., microbiol. et immunol. scand*. 2005. T. 11. № 12, 743-750 p.
20. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. / *Science*. 1998. T. 23. 1145-1154 p.

References

1. Akopyan A.S., Belousov D.Yu., Rysuli M.R., Kulikov A.V. Some topical problems in clinical stem cell research. / *Qualitative clinical practice*. 2010. Vol 1. P. 22-28. (in Russian).
2. Afanasiev V.V. A Guide to Emergency Toxicology. / A guide for doctors. 2012. P/ 231-235 (in Russian).
3. Grigoriev A.I. Human ecology. 2th ed. GEOTAR-MEDIA; 2013 (in Russian).
4. State Report «On the State of Sanitary and Epidemiological Well-Being of the Population in the Russian Federation in 2018». URL: http://www.rosпотребнадзор.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=12053
5. Kuleshov K.V. Development of molecular genetic methods for species identification of cell cultures. / *Cytology*. 2008. Vol. 50. № 9. 812 p. (in Russian).
6. Marakhovsky, Yu.H. Hepatoprotectors: Potentials and limitations of liver protection. 2004. Vol. 1. P. 9-13 (in Russian).
7. Mezen N.I. Stem cells: a training method. allowance. 2nd ed. Minsk: BSU; 2014 (in Russian).
8. Myshkin V.A. Liver damage by chemicals. Functional-metabolic disorders, pharmacological correction. Helem; 2007 (in Russian).
9. Novikov V.E., Klimkina E.I. Pharmacology of hepatoprotectors. / *Obzor klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoj terapii*. 2005. Vol. 4. № 1. P. 2-20 (in Russian).

10. Onishchenko G.G. Influence of environmental factors on human health. / *Immunologiya*. 2006. Vol. 6. P. 352-356 (in Russian).
11. Pavlov C.S., Shulpekova Yu.O., Zolotarevsky V.B. and others. Modern ideas about the pathogenesis, diagnosis and treatment of liver fibrosis. / *Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2005. Vol. 2. P. 13-20 (in Russian).
12. Rasulov M.F., Vasilchenkov A.V., Onishchenko N.A., Krashennnikov M.E., Kravchenko V.I., Gorshenin T.L., Pidtsan R.E., Potapov I.V. / *Cell technologies in biology and medicine*. 2005. Vol. 1. P. 42-46 (in Russian).
13. Ushkalova E.A. Problems with the use of hepatoprotectors. / *Pharmacy*. 2004. Vol. 4. P. 45-55 (in Russian).
14. Burns, C. J. Stem cell therapy for diabetes: do we need to make beta cells. / *J. Endocrinol*. 2004. Vol.183. P. 437–443.
15. Gilbert S.F. *Developmental Biology* Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc. Publishers; 2006.
16. Heins N, Englund MC, Sjöblom C, Dahl U, Tonning A, Bergh C, Lindahl, et al. Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. / *Stem Cells*. 2004. Vol. 22. № 3. P. 367–376.
17. Introna M, Rambaldi A. Mesenchymal stromal cells for prevention and treatment of graft-versus-host disease: successes and hurdles. / *Curr Opin Organ Transplant*. 2015. Vol. 20. № 1. P. 72–78.
18. Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, et al. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. / *Nat Biotechnol*. 2006. Vol. 24. № 2. P.185–187.
19. Semb Henrik. Human embryonic stem cells: Origin, properties and applications. *APMIS: Acta pathol., microbiol. et immunol. scand*. 2005. Vol. 11. № 12. P. 743-750.
20. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. / *Science*. 1998. Vol 23. P. 1145-1154.