

## КОНКУРС НАУЧНЫХ РАБОТ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ И СПЕЦИАЛИСТОВ

### ЛУЧШАЯ РАБОТА В ОБЛАСТИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТОКСИКОЛОГИИ

УДК 615.076.9:615.91

# ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ АМИНОФТАЛГИДРАЗИДА НА КЛЕТКИ ПЕЧЕНИ ПРИ ДИФФУЗНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ

З.А. Шафигуллина<sup>1,2</sup>, И.Г. Данилова<sup>1,2</sup>,  
И.Ф. Гетте<sup>1,2</sup>, В.Г. Сенцов<sup>3</sup>, М.Т. Абидов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Институт естественных наук и математики, Департамент биологический факультет, кафедра медицинской биохимии и биофизики, 620002, г. Екатеринбург, Российская Федерация

<sup>2</sup>ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук», лаборатория морфологии и биохимии, 620049, г. Екатеринбург, Российская Федерация

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, 620014, г. Екатеринбург, Российская Федерация

**Н**а модели диффузного токсического повреждения печени тетрахлорметаном (CCl<sub>4</sub>) и его коррекции аминокфталгидразидом (АФГ) проведена комплексная оценка роли стромальных клеток в регенераторных процессах. Установлено, что иммуномодулирующее действие аминокфталгидразида проявляется в снижении лейкоцитарной инфильтрации, происходит резкое уменьшение уровня CD45<sup>+</sup> до значений интактных животных на 7, 14 сутки эксперимента. Снижается также и количество CD3<sup>+</sup> лимфоцитов, тучных клеток (ТК) и площади, занимаемой коллагеном. Поскольку введение АФГ способствует снижению CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, но при этом количество синусоидальных клеток (СК) возрастает по сравнению с группами животных, получавших только CCl<sub>4</sub>, можно предположить, что снижение токсического действия CCl<sub>4</sub> связано с изменением числа и функциональной активности СК, которая направлена на снятие воспалительной реакции и восстановление печеночной ткани после токсического повреждения.

**Ключевые слова:** тетрахлорметан, печень, лимфоциты, синусоидальные клетки, тучные клетки, коллаген.

**Введение.** Высокая распространенность заболеваний печени (токсические, вирусные гепатиты, печеночная недостаточность, цирроз) делает актуальным поиск новых методов лечения заболеваний гепатобилиарной системы. CCl<sub>4</sub> – высокотоксичный химический агент, самый извест-

ный препарат, используемый для моделирования экспериментального токсического гепатита. Известно, что CCl<sub>4</sub> индуцирует фиброз, цирроз и гепатокарциному [1, 2]. Токсическое действие CCl<sub>4</sub> связано с трихлорметильным радикалом, образующимся во время окислительного стресса [3].

**Шафигуллина Злата Александровна (Shafigullina Zlata Aleksandrovna)**, аспирант Уральского федерального университета имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Институт естественных наук и математики; младший научный сотрудник Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, zлата\_pyankova@mail.ru

**Данилова Ирина Георгиевна (Danilova Irina Georgievna)**, доктор биологических наук, доцент, заведующая лабораторией морфологии и биохимии Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН; заведующая кафедрой медицинской биохимии и медицинской биофизики Уральского федерального университета имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, ig-danilova@yandex.ru

**Гетте Ирина Федоровна (Gette Irina Fedorovna)**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории морфологии и биохимии Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, i.goette@yandex.ru;

**Сенцов Валентин Геннадьевич (Sencov Valentin Gennadievich)**, доктор медицинских наук, профессор кафедры анестезиологии, реаниматологии, токсикологии и трансфузиологии УрГМА, 620014, г. Екатеринбург, sencov-tox@yandex.ru;

**Абидов Муса Тажудинович (Abidov Musa Tazhudinovich)**, доктор медицинских наук, профессор, ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», alina144@mail.ru

Гибель гепатоцитов приводит к высвобождению связанных с повреждением молекулярных паттернов (DAMP), которые запускают врожденный иммунный ответ.

Токсическое повреждение печени сопровождается развитием воспалительной реакции. Одним из проявлений воспаления является активация клеточных элементов, синтезирующих коллаген и гликозаминогликаны. Известно, что в регуляции восстановительных процессов при повреждении печени участвуют клеточные элементы соединительной ткани, в частности, тучные клетки (мастоциты). ТК являются биологическими регуляторами, поскольку могут синтезировать цитокины, молекулы адгезии, гликозаминогликаны, участвуют во всех фазах воспаления, регулируют репаративные процессы в различных органах [4]. Неадекватное количество и (или) функциональная активность ТК может сопровождаться нарушением соотношения фаз воспалительного процесса и проявляться в виде увеличения некротизированных клеток, развития цирроза и как следствие, угнетением регенераторных процессов в печени.

Врожденный иммунный ответ сопровождается привлечением эффекторных клеток в поврежденную печень [5]. Показано, что количество инфильтрирующих ткань нейтрофилов, макрофагов, лимфоцитов, тучных клеток увеличивается после повреждения печени, вызванного введением гепатотоксиканта, такого как  $CCl_4$  [6]. Привлечение и расширение популяции тканевых макрофагов в месте повреждения обеспечивает эффективный фагоцитоз и способствует регенерации гепатоцитов [7].

Экспериментальные модели на животных показывают, что моноциты / макрофаги важны не только для прогрессирования фиброза, но и для регрессии фиброза, поскольку макрофаги также могут разрушать белки внеклеточного матрикса и оказывать противовоспалительное действие [8]. Принимая во внимание тот факт, что макрофаги обладают высокой пластичностью, при которой одни и те же клетки могут участвовать как в развитии повреждения гепатоцитов при токсическом воздействии, так и в разрешении воспаления, направленное воздействие на макрофаги может являться перспективной терапевтической стратегией в лечении токсического гепатита. [8,9]. В связи с этим, *цель настоящего исследования* – оценить состояние клеточного компонента печени и его участие в регенераторных процессах при токсическом повреждении и на фоне коррекции АФГ.

**Материалы и методы исследования.** Эксперимент по моделированию диффузного токсического повреждения печени был выполнен на 60 крысах-самцах линии Wistar массой  $180 \pm 10$  г,

одобрен локальным этическим комитетом Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН (г. Екатеринбург, Россия) и соответствует принципам, сформулированным в Директиве 2010/63/ЕС Европейского парламента и Европейского Совета от 22 сентября 2010 года о защите животных, используемых в научных целях (Официальный журнал Европейского союза, 2010 г.). Животные, используемые в исследовании, содержались в одинаковых условиях по 5 крыс в клетке на обычном рационе вивария со свободным доступом к пище и воде и температурным режимом  $20 \pm 2^\circ C$ .

Были сформированы следующие экспериментальные группы животных: интактная,  $CCl_4$  3 сутки,  $CCl_4$  7 сутки,  $CCl_4$ , 14 сутки,  $CCl_4$  + АФГ 3 сутки,  $CCl_4$  + АФГ 7 сутки,  $CCl_4$  + АФГ 14 сутки. Для создания модели диффузного токсического повреждения печени использовали масляный раствор  $CCl_4$ , который вводили животным экспериментальных групп однократно внутривентриально в дозе 50 мг/100 г массы тела. Инъекции аминоталгидразида экспериментальным животным осуществлялись в течении всего эксперимента внутримышечно из расчета 2 мг/кг. АФГ обладает противовоспалительными, иммуномодулирующими и антиоксидантными свойствами. Его основные фармакологические эффекты обусловлены способностью воздействовать на функционально-метаболическую активность макрофагов и восстанавливать их антигенпрезентирующую и секреторную функции [10]. К группам с  $CCl_4$ -воздействием и с применением АФГ были сформированы контрольные группы животных, которым вводили аналогичные дозы масляного раствора и 0,85% раствора хлорида натрия соответственно. Интактную группу составляли здоровые животные. Животных опытных групп выводили из эксперимента на 3, 7 и 14 сутки передозировкой диэтилового эфира.

Образцы ткани печени погружали в 10% нейтральный формалин на 24 часа при комнатной температуре. Подготовку образцов для гистологического исследования осуществляли с использованием автоматического процессора Leica EG 1160 с последующей заливкой в парафин [11]. Со срезов толщиной 3-4 мкм удаляли парафин, для этого стекла помещались последовательно в ксилол, в 100% спирт и в растворы с постепенным снижением концентрации спирта до полностью водного раствора [12]. Срезы печени окрашивали гематоксилином и эозином. Микроскопическое исследование проводили на микроскопе Leica DM 2500, анализ изображений выполняли в программе Leica Application Suite (V4).

Морфометрические исследования печени включали: определение индекса альтерации %, митотического индекса %, количества двуядер-

ных гепатоцитов в 1 мм<sup>2</sup> среза. Подсчет количества СК осуществляли в единице площади в 20-ти полях зрения при увеличении микроскопа x400. Данный показатель позволяет охарактеризовать вклад СК в регенерацию печени при токсическом повреждении.

Тучные клетки выявляли при окраске препаратов толуидиновым синим, подсчитывали их количество в единице площади в 20-ти полях зрения при увеличении x1000. Для оценки функциональной активности тучных клеток измеряли интенсивность окрашивания толуидиновым синим сульфатированных гликозаминогликанов в составе секреторных гранул цитоплазмы с помощью программы Leica Application Suite (V4), показатель выражали в единицах оптической плотности.

Иммуногистохимическое исследование печени выполняли в соответствии со стандартным протоколом, используя Autostainer DAKO для фиксированных формалином, залитых парафином срезов. Демаскирование антигенов проводили высокотемпературной обработкой в цитратном буфере (pH 6) с использованием Pascal DAKO [11]. Для ИГХ исследования печени применяли моноклональные антитела purified mouse antihuman Ki-67, mouse antirat CD3 clone G 4.18, CD45 clone OX-1, которые в разведении 1:30 инкубировали в течение 60 минут при комнатной температуре, а затем вторичные антитела biotin goat antimouse в разведении 1:50. Антигенреактивные клетки выявляли при помощи тест-системы Novolink™ Polymer Detection System (Novocastra Lab., Ltd), контрастируя их хромогенным субстратом (3,3-диаминобензидин в буферном растворе). DAB-позитивные клетки идентифицировали по коричневому гранулярному окрашиванию цитоплазмы клеток. Количественную оценку Ki-67<sup>+</sup> гепатоцитов, CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> производили в единице площади в 20 полях зрения при увеличении микроскопа x1000 в пересчете на 1 мм<sup>2</sup> среза.

Для выявления коллагена в ткани печени проводили окрашивание гистологических срезов пикросириусом красным. С использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 710 (ZEISS) получали изображения в формате jpg [13]. Далее с помощью программы ImageJ проводили подсчет площади коллагена и выражали в процентах от общей площади ткани.

Статистическая обработка результатов эксперимента выполнена с применением Statistica 10.0. Для сравнения двух независимых групп использован непараметрический критерий Манна-Уитни. При проверке статистических гипотез использовался уровень значимости 5% ( $P < 0.05$ ).

**Результаты и обсуждение.** В связи с тем, что в ходе морфометрического исследования тка-

ней печени различий между группой интактных и контрольных животных не было установлено, в дальнейшем представлены результаты только интактной группы.

Результаты морфометрического анализа показали, что на 3 сутки после воздействия токсиканта резко возрастает индекс альтерации, отмечается существенное увеличение количества двуядерных гепатоцитов, Ki-67<sup>+</sup> клеток, митотического индекса и СК (рис. 1, 2).

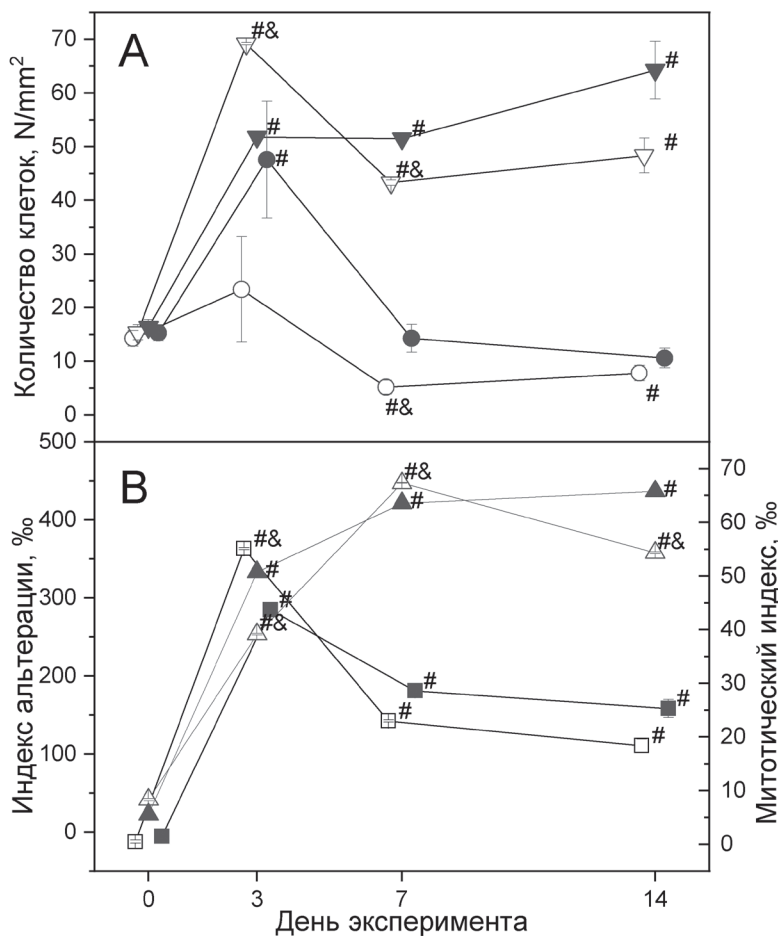
В ранние сроки токсического воздействия CCl<sub>4</sub> ответная реакция организма выражается в виде усиления клеточной (увеличение количества двуядерных гепатоцитов) и внутриклеточной регенерации (увеличение митотического индекса и Ki-67<sup>+</sup> гепатоцитов), которая направлена на повышение метаболической активности и увеличение количества гепатоцитов. На 7 и 14 сутки после введения CCl<sub>4</sub> на фоне высокого индекса альтерации, возрастает количество двуядерных гепатоцитов в ткани печени, но при этом уменьшается количество Ki-67<sup>+</sup> гепатоцитов и в 15-18 раз снижается митотический индекс, количество СК уменьшается не только относительно группы CCl<sub>4</sub> 3 сутки, но и по сравнению с интактной (рис. 1, 2).

В воспалительном процессе при токсическом повреждении печени принимают участие, в том числе, и клеточные элементы соединительной ткани к числу которых относятся тучные клетки. На фоне действия токсиканта во все сроки эксперимента в разы увеличивается количество ТК в печени. При этом содержание в них секреторных гранул значительно ниже, чем у интактных животных, что свидетельствует об активной дегрануляции ТК (рис. 2).

Увеличение количества тучных клеток может быть обусловлено их миграцией в место повреждения. Пополнение популяции тучных клеток за счет мигрирующих происходит в регенерирующей печени, чтобы компенсировать возможную потерю резидентных печеночных тучных клеток. Резкое снижение содержания секреторных гранул в ТК может свидетельствовать об усиленной дегрануляции, характеризующейся высвобождением медиаторов, которые повышают проницаемость сосудов, усиливают ангиогенез и участвуют в воспалении [14, 15].

При оценке степени фиброза в ткани печени на фоне токсического воздействия CCl<sub>4</sub> на 3 и 7 сутки отмечается незначительное увеличение средней площади, занимаемой коллагеном (рис. 3). На 14 сутки площадь коллагена возрастает в 5 раз по сравнению с показателями интактных животных.

В ходе ИГХ исследования установлено, что токсическое действие CCl<sub>4</sub> приводит к резкому увеличению лейкоцитов CD45<sup>+</sup> и Т-лимфоцитов



**Рис. 1.** Показатели регенерации печени крыс в динамике диффузного токсического повреждения печени  $CCl_4$  (черные символы) и при его коррекции АФГ (белые символы). Примечание: (● ○) – Ki-67+ клетки (N/mm<sup>2</sup>), (▼ ▽) – двуядерные гепатоциты (N/mm<sup>2</sup>), (■ □) – митотический индекс (%), (★ ☆) – индекс альтерации (%); результаты статистически значимы ( $p < 0,05$ ) по сравнению с интактной группой (#) и токсическим воздействием  $CCl_4$  (+).

$CD3^+$  в ткани печени, как в паренхиме органа, так и периваскулярно. Усиление лимфо-лейкоцитарной инфильтрации паренхимы печени и периваскулярных областей при интоксикации  $CCl_4$  свидетельствует об активном ответе клеточного звена иммунитета на действие токсиканта и позволяет судить об интенсивности воспалительного процесса в поврежденном органе. К 7 и 14 суткам уменьшается количество  $CD45^+$  и  $CD3^+$  клеток (рис. 2).

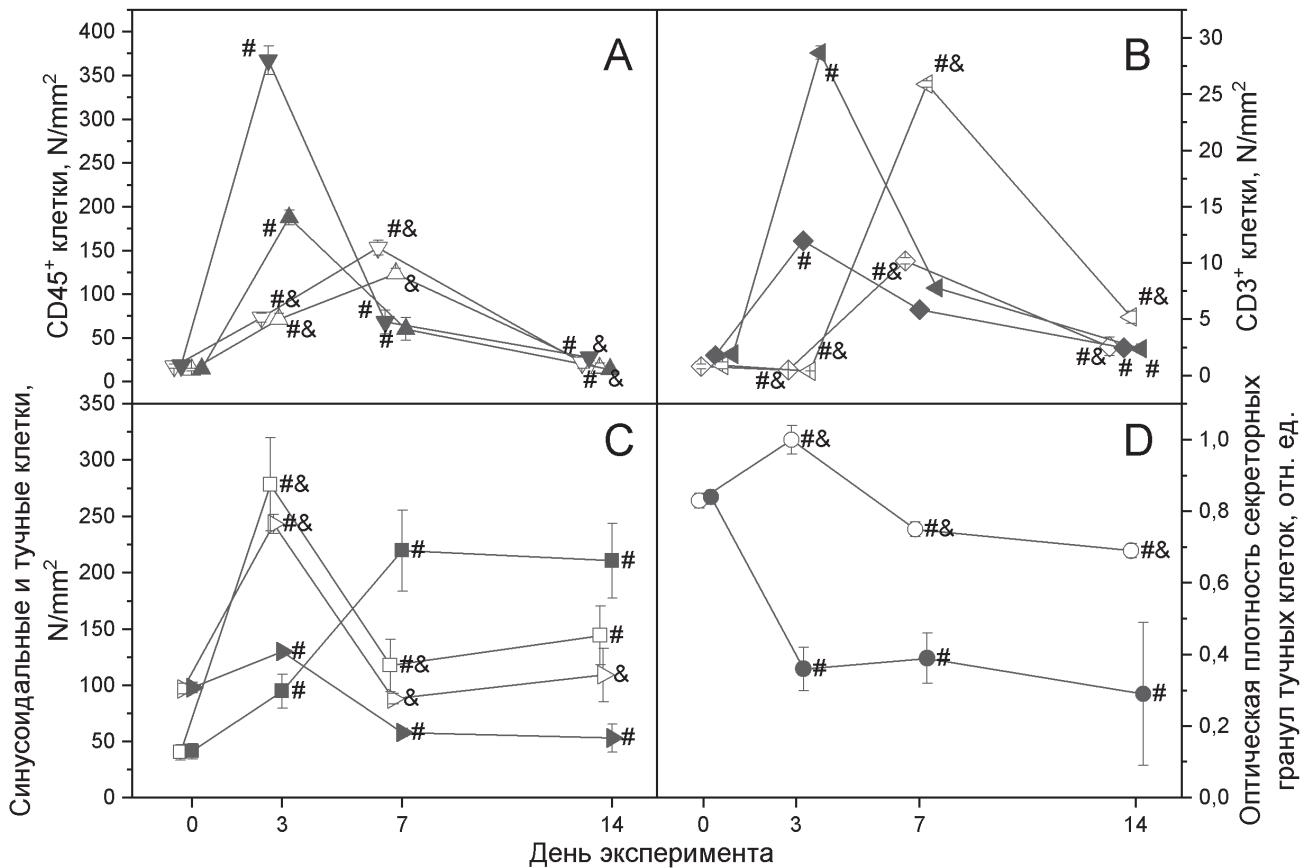
Применение АФГ на 3 и 14 сутки приводит к снижению индекса альтерации относительно соответствующих групп без лечения, но при этом данный показатель значительно выше, чем у интактных животных (рис. 1). Также на 3 сутки отмечается увеличение количества двуядерных гепатоцитов, СК (рис. 1, 2) и возрастает митотический индекс. На 7 и 14 сутки, напротив, умень-

шается число Ki-67+ и двуядерных гепатоцитов, снижается митотический индекс (рис. 1), но при этом количество СК остается выше, чем в группах соответствующего срока без лечения. Увеличение количества СК печени, может быть одним из центральных событий, приводящих к частичной регенерации печени после ее токсического повреждения. Результаты проведенного нами исследования подтверждают тот факт, что в ранние сроки токсического воздействия в ткани печени, особенно при введении АФГ возрастает количество синусоидальных клеток, в том числе за счет притока моноцитов крови или за счет зрелых макрофагов перитонеальной полости, поступающих через мезотелий непосредственно к месту повреждения [16].

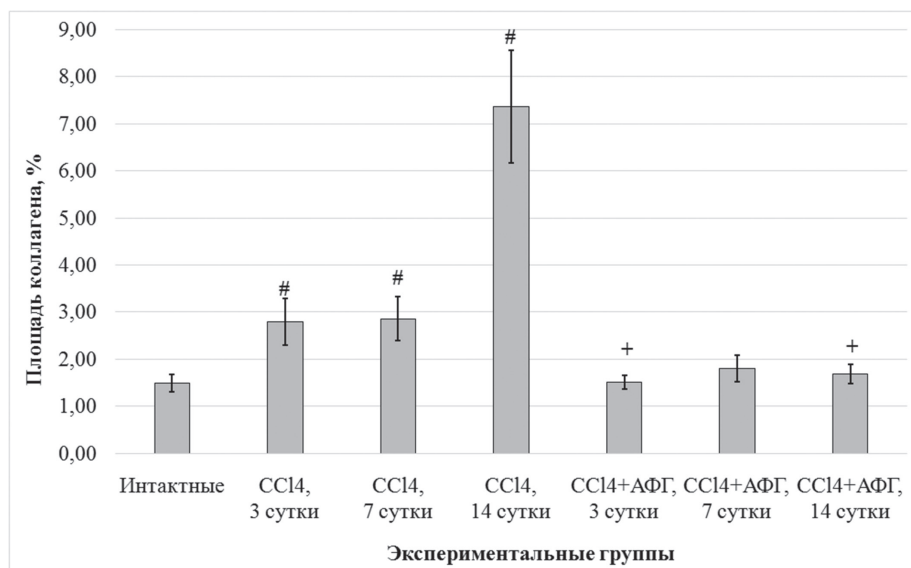
На фоне применения АФГ на 3 и 14 сутки отмечается уменьшение площади коллагена в печени по сравнению с группами животных, получавших только  $CCl_4$ .

Введение АФГ при воздействии  $CCl_4$  на организм, на поздних сроках эксперимента, приводит к уменьшению количества тучных клеток в ткани печени, задерживает их дегрануляцию, тем самым препятствует высвобождению медиаторов воспаления [14]. АФГ способствует уменьшению выраженности воспалительной реакции в ответ на действие гепатотропного яда, что подтверждается снижением количества  $CD45^+$  и  $CD3^+$  клеток на 7 и 14 сутки исследования (рис. 2).

**Заключение.** Модель токсического гепатита, индуцированная  $CCl_4$  широко известна, но несмотря на это именно экспериментальные модели позволяют дать комплексную оценку и разработать методы адекватной коррекции нарушений печени, что не всегда возможно в клинической практике. Результаты проведенного исследования показали, что иммуномодулирующее действие АФГ проявляется в снижении лейкоцитарной инфильтрации, происходит резкое уменьшение уровня  $CD45^+$  до значений интактных животных на 7, 14 сутки эксперимента. Снижается также и количество  $CD3^+$  лимфоцитов, тучных клеток и площади, занимаемой коллагеном. Введение АФГ способствует снижению  $CD45^+$ ,  $CD3^+$ , но при этом количество синусоидальных клеток возрастает. На основании этого можно предполо-



**Рис. 2.** Клетки стромы печени экспериментальных животных в динамике диффузного токсического повреждения печени  $CCl_4$  (черные символы) и при его коррекции АФГ (белые символы). Примечание: (▲ △) - CD45+ клетки в паренхиме печени ( $N/mm^2$ ), (▼ ▽) - CD45+ клетки, расположенные периваскулярно ( $N/mm^2$ ), (◆ ◇) - CD3+ клетки в паренхиме печени ( $N/mm^2$ ), (◀ ◁) - CD3+ клетки, расположенные периваскулярно ( $N/mm^2$ ), (■ □) - тучные клетки ( $N/mm^2$ ), (★ ☆) - синусоидальные клетки ( $N/mm^2$ ), (● ○) - оптическая плотность секреторных гранул в тучных клетках (отн. ед.); результаты статистически значимы ( $p < 0,05$ ) по сравнению с интактной группой (#) и токсическим воздействием  $CCl_4$  (+).



**Рис. 3.** Изменение площади коллагена в ткани печени при токсическом повреждении и его коррекции. Примечание: результаты статистически значимы ( $p < 0,05$ ) по сравнению с интактной группой (#) и токсическим воздействием  $CCl_4$  (+).

жить, что применения АФГ позволяет регулировать количество и функциональную активность клеток стромы, снижать воспалительную реакцию и обеспечивать восстановление ткани печени после токсического повреждения.

Исследование проведено в рамках бюджетной программы «Изучение механизмов реге-

нераторных процессов в органах и тканях с использованием экспериментальных моделей экстремальных факторов и токсического воздействия на организм», № Гос. регистрации – АААА-А18-118020590107-0. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Junnila M., Rahko T., Sukura A., Lindberg L. A. Reduction of carbon tetrachloride-induced hepatotoxic effects by oral administration of betaine in male Han-wistar rats: a morphometric histological study. *Vet Pathol.* 2000; 37: 231-238.
2. Karakus E., Karadeniz A., Simsek N., Can I., Kara A., Yildirim S. et al. Protective effect of Panax ginseng against serum biochemical changes and apoptosis in liver of rats treated with carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>). *J Hazard Mater.* 2011; 195: 208-213.
3. Stoyanovsky D., Cederbaum A.I. Metabolism of carbon tetrachloride to trichloromethyl radical: an ESR and HPLC-EC study. *Chem Res Toxicol.* 1999; 12: 730-736.
4. Юшков Б. Г., Черешнев В. А., Климин В. Г., Арташян О. С. Тучные клетки: физиология и патофизиология. Москва: Медицина; 2011
5. Antoniadis C.G., Quaglia A., Taams L.S., Mitry R.R., Hussain M., Abeles R. et al. Source and characterization of hepatic macrophages in acetaminophen-induced acute liver failure in humans. *Hepatology.* 2012; 56: 735-746.
6. Ramadori G, Saile B. Portal tract fibrogenesis in the liver. *Lab Invest.* 2004; 84: 153-159
7. Woolbright B.L., Jaeschke H. Mechanisms of Inflammatory Liver Injury and Drug-Induced Hepatotoxicity *Curr Pharmacol Rep.* 2018; 4(5): 346-357.
8. Tacke F. Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases. *J Hepatol.* 2017; 66(6): 1300-1312.
9. Triantafyllou E., Woollard K. J., McPhail M.J. W., Antoniadis C. G., Possamai L. A. The Role of Monocytes and Macrophages in Acute and Acute-on-Chronic Liver Failure. *Front Immunol.* 2018; 9: 2948.
10. Abidov A. M., Danilova I. G. Method for obtaining 5-amino 2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione alkali metal salts and their use in medicine. Patent US, US009101629B2; 2015.
11. Kumar G. L., Rudbeck L. Education guide. Immunohistochemical (IHC) staining methods. 2009. Dako North America, Carpinteria, California. 160 p.
12. Yakovleva G. E. The Enzymes in Clinical Biochemistry, Bector-Best, Novosibirsk. 2005.
13. Vogel B., Siebert H., Hofmann U., Frantz S. Determination of collagen content within picrosirius red stained paraffin-embedded tissue sections using fluorescence microscopy. *MethodsX.* 2015; 2: 124-134.
14. Francis H., Meininger C. J. A review of mast cells and liver disease: What have we learned? *Digestive and Liver Disease.* 2010; 42: 529-536.
15. Zweifel M., Breu K., Matozan K., Renner E., Welle M., Schaffner T. et al. Restoration of hepatic mast cells and expression of a different mast cell protease phenotype in regenerating rat liver after 70%-hepatectomy. *Immunol Cell Biol.* 2005; 83: 587-95.
16. Rehermann B. Mature peritoneal macrophages take an avascular route into the injured liver and promote tissue repair. *Hepatology.* 2017; 65(1): 376-379.

## REFERENCES:

1. Junnila M., Rahko T., Sukura A., Lindberg L. A. Reduction of carbon tetrachloride-induced hepatotoxic effects by oral administration of betaine in male Han-wistar rats: a morphometric histological study. *Vet Pathol.* 2000; 37: 231-238.
2. Karakus E., Karadeniz A., Simsek N., Can I., Kara A., Yildirim S. et al. Protective effect of Panax ginseng against serum biochemical changes and apoptosis in liver of rats treated with carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>). *J Hazard Mater.* 2011; 195: 208-213.
3. Stoyanovsky D., Cederbaum A.I. Metabolism of carbon tetrachloride to trichloromethyl radical: an ESR and HPLC-EC study. *Chem Res Toxicol.* 1999; 12: 730-736.
4. Yushkov B. G., Chereshev V. A., Klimin V. G., Artashyan O. S. Mast cells: physiology and pathophysiology. Moscow: The medicine; 2011(in Russian).
5. Antoniadis C.G., Quaglia A., Taams L.S., Mitry R.R., Hussain M., Abeles R., et al. Source and characterization of hepatic macrophages in acetaminophen-induced acute liver failure in humans. *Hepatology.* 2012; 56: 735-746.
6. Ramadori G, Saile B. Portal tract fibrogenesis in the liver. *Lab Invest.* 2004; 84: 153-159
7. Woolbright B.L., Jaeschke H. Mechanisms of Inflammatory Liver Injury and Drug-Induced Hepatotoxicity *Curr Pharmacol Rep.* 2018; 4(5): 346-357.
8. Tacke F. Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases. *J Hepatol.* 2017; 66(6): 1300-1312.
9. Triantafyllou E., Woollard K. J., McPhail M.J. W., Antoniadis C. G., Possamai L. A. The Role of Monocytes and Macrophages in Acute and Acute-on-Chronic Liver Failure. *Front Immunol.* 2018; 9: 2948.
10. Abidov A. M., Danilova I. G. Method for obtaining 5-amino 2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione alkali metal salts and their use in medicine. Patent US, US009101629B2; 2015.
11. Kumar G. L., Rudbeck L. Education guide. Immunohistochemical (IHC) staining methods. 2009. Dako North America, Carpinteria, California. 160 p.
12. Yakovleva G. E. The Enzymes in Clinical Biochemistry, Bector-Best, Novosibirsk. 2005.
13. Vogel B., Siebert H., Hofmann U., Frantz S. Determination of collagen content within picrosirius red stained paraffin-embedded tissue sections using fluorescence microscopy. *MethodsX.* 2015; 2: 124-134.
14. Francis H., Meininger C. J. A review of mast cells and liver disease: What have we learned? *Digestive and Liver Disease.* 2010; 42: 529-536.
15. Zweifel M., Breu K., Matozan K., Renner E., Welle M., Schaffner T. et al. Restoration of hepatic mast cells and expression of a different mast cell protease phenotype in regenerating rat liver after 70%-hepatectomy. *Immunol Cell Biol.* 2005; 83: 587-95.
16. Rehermann B. Mature peritoneal macrophages take an avascular route into the injured liver and promote tissue repair. *Hepatology.* 2017; 65(1): 376-379.

Z.A. Shafigullina<sup>1,2</sup>, I.G. Danilova<sup>1,2</sup>, I.F. Gette<sup>1,2</sup>, V.G. Sencov<sup>3</sup>, M.T. Abidov<sup>1</sup>

## IMMUNOMODULATING EFFECT OF AMINOPHTHALHYDRAZIDE ON LIVER CELLS WITH DIFFUSE TOXIC DAMAGE

<sup>1</sup>Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin, Institute of Natural Sciences and Mathematics, 620002, Ekaterinburg, Russian Federation

<sup>2</sup>Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of Russian Academy of Science, 620049, Yekaterinburg, Russian Federation

<sup>3</sup>Ural State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, 620014, Ekaterinburg, Russian Federation

A comprehensive assessment of the role of stromal cells in regenerative processes has been carried out on the model of diffuse toxic liver damage with carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) and its correction with aminophthalhydrazide. It has been found that the immunomodulating effect of aminophthalhydrazide is manifested in a decrease in leukocyte infiltration, there is a sharp decrease in the level of CD45<sup>+</sup> to the values of intact animals on the 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> days of the experiment. The number of CD3<sup>+</sup> lymphocytes, mast cells and the area occupied by collagen are also reduced. Since the introduction of aminophthalhydrazide reduces the number of CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> lymphocytes, but the number of sinusoidal cells increases compared to group of animals treated only with CCl<sub>4</sub>, it can be assumed that the decrease in the toxic effect of CCl<sub>4</sub> is associated with the change in the number and functional activity of sinusoidal cells, which is aimed at removing the inflammatory response and restoring hepatic tissue after toxic damage.

**Keywords:** carbon tetrachloride, liver, lymphocytes, sinusoidal cells, mast cells, collagen.

Материал поступил в редакцию 14.06.2019 г.