

ШКУС П. О.^{1,2✉}, РИМАР С. Ю.^{1,2}, ШУВАЛОВА Н. С.², БУЧЕК П. В.¹¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, e-mail: polinaignatchenko7@gmail.com

² ДУ «Інститут генетичної і регенеративної медицини НАМН України»,

Україна, 04114, м. Київ, вул. Вишгородська, 67

✉ polinaignatchenko7@gmail.com, (093) 591-02-03

МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ВІДНОВЛЕННЯ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ НА МОДЕЛІ ЦИРОЗУ, ІНДУКОВАНОГО CCl₄, ПІСЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ПУПОВИНИ ЛЮДИНИ

Мета. Дослідити процес відновлення печінки щурів на моделі цирозу, який індуковано інтраперитоніальним введенням CCl₄ після трансплантації МСК пуповини людини. На сьогодні в світі у якості альтернативи трансплантації печінки пропонується клітинна терапія, яка призводить до відновлення функцій органу шляхом введення МСК. **Методи.** У роботі використані методи гістології та морфометрії. **Результати.** Було встановлено, що через 13 тижнів після індукції CCl₄ кількість колагену збільшилась у 7 разів, спостерігались атрофічні, склеротичні зміни у архітектоніці печінки щурів та функціональне порушення гепатоцитів. Після трансплантації МСК пуповини людини у кількості 6–7 × 10⁶ кл/кг ваги тіла тварини вже через 3 тижні показник накопичення колагену зменшився, а через 13 тижнів кількість ЕЦМ та інші морфометричні показники майже відповідали негативному контролю. **Висновки.** Одержані результати свідчать про те, що трансплантація МСК пуповини людини призводить до практично повного відновлення печінки щурів, у яких було викликано експериментальний цироз печінки шляхом інтраперитоніального введення CCl₄.

Ключові слова: МСК пуповини людини, екстрацелюлярний матрикс, гепатоцити.

Згідно із статистикою ВООЗ, більш ніж 30 % дорослого населення має проблеми з функціонуванням печінки, яка є життєво важливим органом. Смертність від цирозу печінки займає в світі 5-е місце, а для України ця проблема є більш ніж актуальною. Щороку кількість вперше діагностованих пацієнтів зростає. Треба мати на увазі, що в Україні зростає кількість хворих інфікованих гепатитом, що підвищує ризик розвитку цирозу і первинного раку печінки, які провокуються гепатитами В і С [1].

До недавнього часу єдиним шляхом лікування кінцевої стадії цирозу була трансплантація печінки. Але така пересадка органа має обмежене застосування через дефіцит донорських органів, ризик відторгнення трансплантату, неминучих побічних ефектів та високої собівартості супутніх процедур. Тому таке лікування мало доступне широкому колу пацієнтів. В Україні кожного року майже 3,5 тис. пацієнтів потребують трансплантації печінки, а виконується не більше декількох десятків [2]. Ті втрати, які несе країна в зв'язку з лікуванням та смертю громадян, важко переоцінити. Тому на сьогодні в світі в якості альтернативи трансплантації печінки пропонується клітинна терапія, зокрема використання для цих цілей мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), які здатні відновлювати тканини та органи завдяки їх мультипотентності, імуномодуючим та репаративним властивостям [3, 4].

Метою пропонованої роботи було дослідити процес відновлення печінки щурів на моделі цирозу, який індуковано інтраперитоніальним введенням CCl₄ після трансплантації МСК пуповини людини методами гістології та морфометрії.

Матеріали і методи

Досліди проводили на 35 статевозрілих щурах-самцях лінії Wistar віком 3 місяці, вагою 200–250 г. Час проведення дослідження тривав близько 7 міс. Усіх тварин під час експерименту утримували в стандартних умовах, розділивши на негативний контроль (n=5) та експериментальну (n=30) групу.

Індукція ураження печінки лабораторних щурів шляхом введення CCl₄. Ураження печінки викликали шляхом інтраперитонеальних ін'єкцій розчину CCl₄ в оливковій олії у співвідношенні (1:1) двічі на тиждень за 4 години до

годування. Індукцію проводили згідно зі схемою введення (табл. 1).

Через 13 тижнів, коли у тварин було виявлено цироз печінки, їм було введено у хвостову вену МСК пуповини людини 1–2 пасажу в кількості $6-7 \times 10^6$ кл/кг ваги тіла. Відбір матеріалу для дослідження проводився шляхом часткової гепатектомії протягом наступних 13 тижнів.

Виділення та культивування МСК пуповини людини. МСК виділяли з пуповини людини методом експлантів. Клітини культивували у середовищі α -МЕМ, яке містило 10 % ембріональної телячої сироватки, 100 од/мл бензилпеніциліну та 100 од/мл стрептоміцину в CO₂ інкубаторі за 5 % CO₂ і 37⁰С.

Виведення тварин з експерименту здійснювали за допомогою гільйотинової декапітації з подальшим видаленням печінки. Роботу проводили з дотриманням принципів «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» [5].

Виготовлення гістологічних препаратів печінки щурів проводили за стандартною методикою: фрагменти печінки фіксували у 10 % формаліні, зневоднювали, отримані зразки просочували парафіном та виготовляли зрізи завтовшки 5–6 мкм. Забарвлення отриманих зрізів здійснювали оглядовими барвниками гематоксиліном Бемера та еозином. Для візуалізації елементів сполучної тканини застосовували двокольорове забарвлення за Ван-Гізоном.

Морфометричні дослідження виконували на цифрових зображеннях мікропрепаратів за допомогою комп'ютерної програми «IMAGE J». Статистичну обробку даних здійснювали, використовуючи комп'ютерні програми «MS Excel»,

«Statistica 10». Відмінності між групами оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента і рахували статистичні значущі за $P < 0,05$.

На цифрових зображеннях мікропрепаратів печінки здійснювали загальний морфометричний аналіз.

Одним із основних морфометричних показників розвитку фіброзу та цирозу печінки є накопичення колагену. Під час проведення гістоморфометричного дослідження на 20 мікрофотографіях печінки оцінювали відносну площу фіброзу (Sф) таким чином: виміряну площу фіброзу (Sф) ділили на площу паренхіми печінки (Sp. п.) (без урахування судинних елементів та судинного просвіту) [6].

Крім цього, вираховували середні площі гепатоцитів (Sг) та їх ядер (Sя) мкм²; визначали площу цитоплазми (Sц) мкм², кількість гепатоцитів: без'ядерних (БЯ) та двоядерних (ДЯ) клітин, що характеризує функціональний стан печінки, і ЯЦС (ядерно-цитоплазматичні співвідношення) – співвідношення площі ядра до площі гепатоцитів ($ЯЦС = Sя / Sц$, де Sя – площа ядра гепатоцита, Sц – площа цитоплазми, яка вираховується через різницю площі гепатоцитів та їх ядер) [7].

Результати та обговорення

Розвиток фіброзу після індукції CCl₄ зумовлений активацією стелатних клітин і відповіддю печінки на запалення, що призводить до секреції прозапальних цитокінів, хемокинів, які сприяють розростанню колагенових волокон та залученню моноцитів, нейтрофілів і лімфоцитів [8].

Таблиця 1. Схема введення піддослідним тваринам CCl₄

	I етап експерименту		
	Одержання ураження печінки щурів, що індуковане введенням CCl ₄		
	2 тиж.	3-4 тиж.	5-14 тиж
Негативна контрол. гр. (n=5)	0,1 мл оливк. олії/100г ваги тіла	0,075 мл оливк. олії /100г ваги тіла	0,05 мл оливк. олії /100г ваги тіла
Експерим. гр. (n=30)	0,1 мл CCl ₄ +оливк. олії /100г ваги тіла	0,075 мл CCl ₄ +оливк. олії /100г ваги тіла	0,05 мл CCl ₄ +оливк. олії /100г ваги тіла

Примітка. n – кількість щурів, що брали участь у досліді.

У ході дослідження ступінь ураження печінки оцінювали за кількістю колагену, який вимірювали після забарвлення за Ван-Гізоном гістологічних зразків печінки, що періодично відбирали для аналізу.

Було встановлено, що у негативному контролі (суміш оливкової олії і фізіологічного розчину) цей показник морфофункціонального стану печінки складає $0,068 \pm 0,015$ (табл. 2). У щурів експериментальної групи, що зазнавали інтоксикації CCl_4 , на ранніх стадіях розвитку фіброзу (5-му тижні) спостерігається збільшення сполучної тканини у 2,5 раза, далі (на 8-му тижні) кількість екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ) збільшується у 4 рази порівняно з негативним контролем, як показано на рис. 1Б.

Подальше введення CCl_4 призводить до збільшеного накопичення колагену, і через 13 тижнів з початку експерименту у щурів розвиваються ознаки цирозу, основним проявом якого є повне розділення паренхіми печінки на ділянки, що оточені фіброзними септами і розділені одна від одної. Такі ділянки називаються регенеративними циротичними вузликами, або нодулами [9], як показано на рис. 1В. Кількість сполучної тканини виростає у 7 разів, порівнюючи з негативним контролем.

Під час фіброгенезу насамперед відбувається пошкодження ендотеліальних клітин синусоїдів органа та активація стелатних клітин, що в результаті призводить до заповнення простору Діссе колагеновими волокнами. Цей процес називається капіляризацією синусоїдів (наявність великої кількості ЕЦМ навкруги печінкової тріади) [10]. Як показали наші дослідження, частота виявлення синусоїдів у стані капіляризації та неможливість повноцінно вимірювати простір Діссе за індукції CCl_4 зростає зі збільшенням стадії фібротичних змін у печінці та посиленням проявів кінцевої стадії – цирозу печінки (рис. 2А).

Також на зрізах майже неможливо виявити печінкові балки або розпізнати межі печінкових часточок через інтенсивне розростання фіброзної тканини різної товщини та протяжності. Тому, надмірна кількість ЕЦМ призводить до порушення жовчних проток, звуження просвіту центральних та портальних судин. Як наслідок відбувається посилення гіпоксії паренхіматозної тканини, спостерігаються атрофічні, склеротичні зміни в печінці та функціональне порушення гепатоцитів. На рис. 2Б видно, що за рахунок розростання ЕЦМ спостерігається зближення компонентів тріади печінки: жовчного протоку, центральної вени та печінкової артерії.

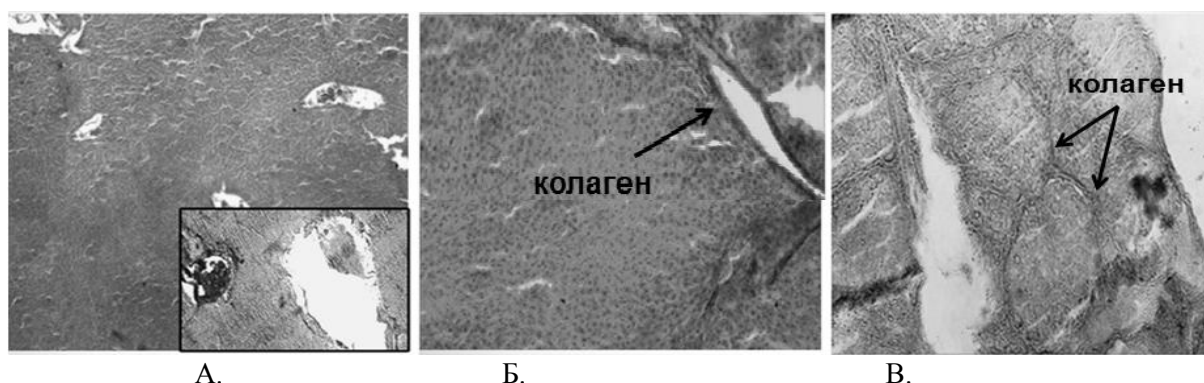


Рис. 1 Гістологічні препарати печінки щурів контрольних та експериментальних груп. А – негативний контроль, Б – фіброз, В – цироз печінки. Збільшення $\times 100$.

Таблиця 2. Морфометричні показники розвитку цирозу печінки щурів

Показник	Негативний контроль	Експеримент	
		Фіброз	Цироз
Накопичення колагену, $\mu\text{м}^2$	$0,06 \pm 0,01$	$0,3 \pm 0,06^*$	$0,48 \pm 0,11^*$
Площа гепатоц., $\mu\text{м}^2$	$159,7 \pm 16,93$	$138,02 \pm 16,4$	$121,31 \pm 11,4^*$
Площа ядер, $\mu\text{м}^2$	$48,36 \pm 5,85$	$32,8 \pm 6,1^*$	$25,11 \pm 6,8^*$
ЯЦС	$0,43 \pm 0,03$	$0,35 \pm 0,03$	$0,26 \pm 0,07^*$
Двоядерні кл.	$10,53 \pm 3,71$	-----	$2,2 \pm 0,89^*$
Без'ядерні кл.	$2,18 \pm 0,5$	-----	$25,0 \pm 0,15^*$

Примітка. * Відмінності в порівнянні з контролем достовірні за $P < 0,05$.

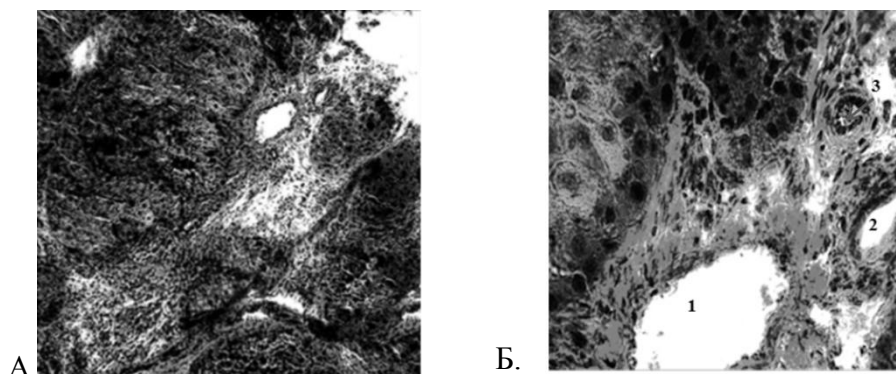


Рис. 2. Печінкова триада печінки шурів експериментальної групи, заповнена ЕЦМ. 1 – просвіт центральної печінкової вени, 2 – просвіт печінкової артерії, 3 – просвіт жовчної протоки (забарвлення за Ван-Гізеном). Збільшення – $\times 100$, $\times 40$.

Під час проведення цитоморфометричного дослідження нами були виміряні середні площі гепатоцитів та їх ядер. Ці параметри є показниками морфологічного стану тканини печінки. Аналіз одержаних даних показав, що середня площа гепатоцитів у негативному контролі становила $425,06 \pm 33,11$ мкм² (табл. 2). Гепатоцити мали одне або два ядра кубічної форми з чітко окресленими краями (рис. 3А). Цитоплазма гомогенна, рівномірно розташована по всій клітині, фарбується оксифільно. Ядра гепатоцитів мали округлу форму, хроматин розподілявся рівномірно, і забарвлення було базифільне. У тварин контрольної групи, яким не вводили CCl₄, середня площа ядра складає $48,36 \pm 5,85$ мкм². Після 6-ти тижнів індукції в експериментальній групі площа гепатоцитів мала тенденцію до зниження на 17 %. Відповідно на 12–14 тижнях площа гепатоцитів зменшується на 29 % ($P < 0,05$) у порівнянні з негативним контролем. Тенденція достовірного зниження площі ядер гепатоцитів зберігалася протягом усього дослідження, і через 13 тижнів вона була майже в два рази менша, ніж у групі негативного контролю (рис. 3Б).

У гепатоцитах, які межують з фіброзною ділянкою тканини печінки, спостерігаються деструктивні зміни, особливо у ядрі: це свідчить про пошкодження структурних елементів цитоскелета й каріоплазми гепатоцитів і є типовою морфологічною ознакою апоптичних клітин. Ймовірно, такі морфологічні порушення пов'язані з утворенням великої кількості міофібробластів (фіброцити), які синтезують ЕЦМ і тим самим сприяють деформації гепатоцитів [11].

Не менш важливе значення має ЯЦС, що дозволяє оцінити рівень метаболізму та прояв компенсаторних реакцій у гепатоцитах у порів-

нянні з патологічним станом печінки. ЯЦС у групі негативного контролю становив $0,434 \pm 0,037$ (табл. 2), а в експериментальній групі цей показник через 13 тижнів знижується в 2 рази. Отже, такі результати свідчать про пригнічення функціональної активності клітин, припинення синтетичних процесів та наявність катаболізму. Ядра та цитоплазма стають більш ущільненими, зниження об'єму ядер гепатоцитів може бути зумовлене послабленням функціонального навантаження на клітини через блокування каналів обміну речовин.

Крім того, виявляються окремі гепатоцити, ядра яких перебувають у стані лізису. На зрізах помітний початковий слабо виражений аутоліз, який характеризується розпадом ядер, про що свідчить надмірна кількість без'ядерних клітин. Доказом цього є відповідно збільшення кількості без'ядерних клітин (БЯ), порівнюючи з негативним контролем, майже в 11 разів; аналогічно, що кількість двоядерних гепатоцитів (ДЯ) зменшилась у 5 разів порівняно з групою негативного контролю.

Після того, як в експериментальній групі тварин був виявлений розвинутий цироз, ін'єкції CCl₄ було припинено. Для вивчення впливу трансплантації МСК на відновлення печінки одній частині експериментальної групи шурів ввели МСК пуповини людини, паралельно тваринам із групи позитивного контролю було введено фізіологічний розчин. Динаміку відновлення печінки вивчали за допомогою тих же методів, які були використані в ході вивчення розвитку ураження.

На наступній серії рисунків (рис. 4 А–Е) представлено динаміку змін паренхіми у тварин, яким не вводили МСК (позитивний контроль), та тих, яким було введено МСК пуповини людини. Як видно, кількість колагену (ЕЦМ) у

печінці щурів, яким було введено МСК, зменшується, в той час як у тварин, які не одержували МСК, такої динаміки не спостерігається.

Аналіз морфометричних даних показав, що вже через 3 тижні показник накопичення колагену зменшився, а через 13 тижнів кількість ЕЦМ майже відповідала негативному контролю (табл. 3). При цьому відновлення печінки у тварин, яким не були введені МСК, відбувалося дуже повільно і до 13-го тижня відновлення практично не спостерігалось. Відомо, що коли зникає токсичний чинник, поступове відновлення печінки принаймні у щурів відбувається від 12 до 24 тижнів [12].

Через 8 тижнів кількість двоядерних гепатоцитів збільшується втричі у порівнянні з моментом введення МСК, тобто з цирозом; кількість без'ядерних клітин вже через 8 тижнів зменшується на 39%. Через 13 тижнів майже всі морфометричні показники повертаються до показників негативного контролю.

Одержані результати свідчать про те, що трансплантація МСК пуповини людини призводить до практично повного відновлення печінки щурів, у яких було викликано експериментальний цироз печінки шляхом інтраперитоніального введення CCl_4 .

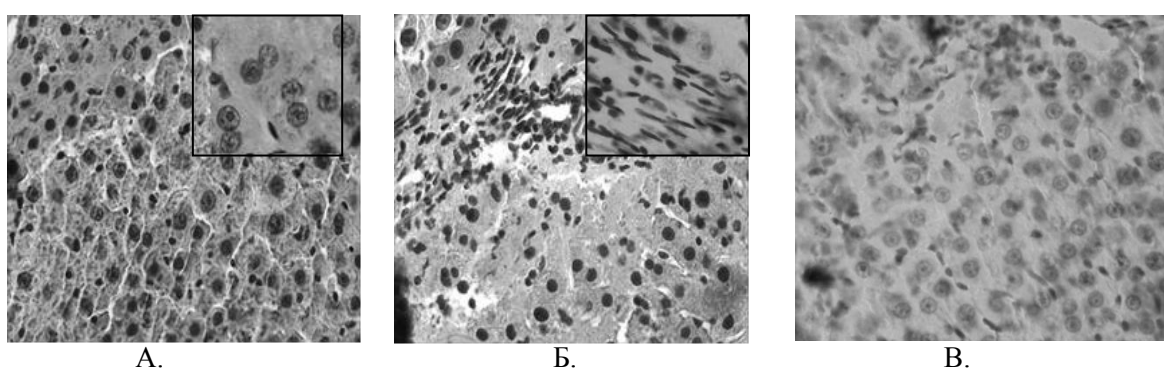


Рис. 3. Гепатоцити печінки щурів у нормі та під час розвитку фіброзу. А – негативний контроль (норма), Б – цироз печінки, В – печінка після введення МСК (забарвлення гематоксилін, еозин). Збільшення x400, x1000.

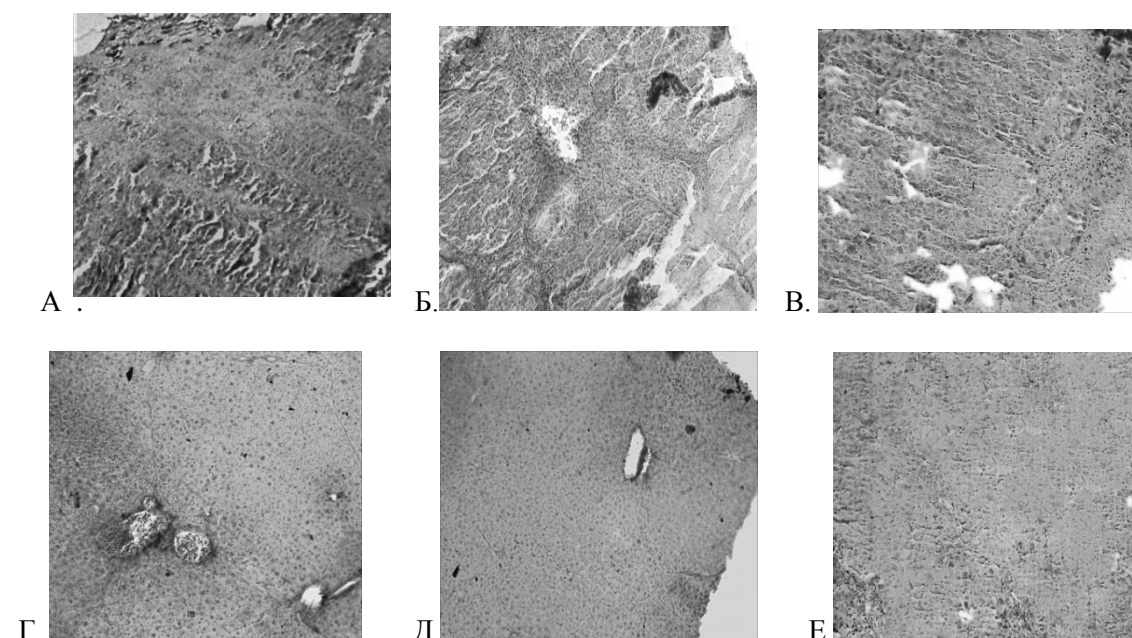


Рис. 4. Гістологічні препарати печінки щурів. А, Б, В – позитивний контроль через 3, 8 і 13 тижнів після введення фіброзчину. Г, Д, Е – експериментальна група через 3, 8, 13 тижнів після введення МСК пуповини людини. Забарвлення за Ван-Гізеном, збільшення x100.

Таблиця 3. Морфометричні показники печінки щурів, індукованої CCl₄, після введення МСК пуповини людини

Показник	Негативний контроль	Цироз	3 тижні після введення МСК		8 тижнів після введення МСК		13 тижнів після введення МСК	
			Позитивний контроль	МСК	Позитивний контроль	МСК	Позитивний контроль	МСК
Площа ядра, мкм ²	48±5,8	25,1±6*	26,4±6,9	29,7±7,8	24,7±6,04	40,4±5,7 [#]	22,4±5,2	45,3±10 [#]
Площа кл., мкм ²	159±16	121±1*	119,6±14,7	130±14 [#]	121,6±12	153±23 [#]	124,5±13	153±28 [#]
ЯЦС	0,4±0,07	0,2±0,04*	0,27±0,05 [#]	0,3±0,04	0,25±0,02	0,3±0,06 [#]	0,22±0,01	0,42±0,09 [#]
Накопич. колагену	0,06±0,01	0,48±0,12*	0,4±0,1	0,32±0,07 [#]	0,39±0,08	0,1±0,06 [#]	0,35±0,09	0,08±0,01 [#]
Без'ядерні кл.	2,18	25	22	24	27	10,4	21	4,2
Двоядерні кл.	10,5	2,2	3	3,6	1,8	6,2	2	6,1

Примітки: * Відмінності в порівнянні з негативним контролем достовірні за P < 0,05. [#] Відмінності в порівнянні з цирозом достовірні за P < 0,05.

Висновки

1. Регулярні інтраперитоніальні ін'єкції масляного розчину CCl₄ щурам протягом 12–13 тижнів призводять до розвитку цирозу, що продемонстровано за допомогою гістологічних та морфометричних методів.

2. Вивчення основних параметрів стану паренхіми печінки після трансплантації МСК показало, що через 13 тижнів як кількість кола-

гену, так і інші морфометричні показники (ЯЦС, площі гепатоцитів та їх ядер, кількість клітин) стану паренхіми печінки повертаються до показників негативного контролю.

3. Введення МСК пуповини людини у хвостову вену щурів призводить до повного відновлення печінки щурів.

References

1. Chepelevska L.A., Dziuba O., Karamzina A. Suchasni problemy smertnosti naselennia Ukrainy vid khvorob orhaniv travlennia. *Zdorov'ia naselennia: tendentsii ta prohnozy*. 2015. T. 33, № 1. S. 21–27. [in Ukrainian] Чепелевська Л.А., Дзюба О., Карамзіна А. Сучасні проблеми смертності населення України від хвороб органів травлення. *Здоров'я населення: тенденції та прогнози*. 2015. Т. 33, № 1. С. 21–27.
2. Ovdin O. Napriamy derzhavnoi polityky shchodo znyzhennia smertnosti naselennia Ukrainy. *Derzhavne upravlinnia ta mistseve samovriaduvannia*. 2013. T. 4, № 19. S. 97–107. [in Ukrainian] Овдін О. Напрями державної політики щодо зниження смертності населення України. *Державне управління та місцеве самоврядування*. 2013. Т. 4, № 19. С. 97–107.
3. Owen A. Mesenchymal stromal cell therapy in liver disease: opportunities and lessons to be learnt? *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology Published*. 2015. Vol. 309. P. 23–29. doi: 10.1152/ajpgi.00036.2015.
4. Squillaro T. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells. An Update. *Cell Transplant*. 2016. Vol. 25, № 5. P. 29–48. doi: 10.3727/096368915X689622.
5. Radzikowski C. Protection of animal research subjects. *Sci Eng Ethics*. 2006. Vol. 12. P. 103–110. doi: 10.1007/s11948-006-0010-2.
6. Luque J. Regression of Fibrosis after Chronic Stimulation of Cannabinoid CB2 Receptor in Cirrhotic Rats. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2008. Vol. 324. P. 10–23. doi: 10.1124/jpet.107.131896.
7. Layfield L. Accuracy and Reproducibility of Nuclear/Cytoplasmic Ratio Assessments in Urinary Cytology Specimens. *J. Diagnostic Cytopathology*. 2017. Vol. 45. P. 107–112. doi: 10.1002/dc.23639.
8. Bedossa P. Liver extracellular matrix in health and disease. *J. Pathol*. 2003. Vol. 200. P. 504–515. doi.org/10.1002/path.1397.
9. Padaki Rao N. Nodule in Liver: Investigations, Differential Diagnosis and Follow-up. *J Clin Exp Hepatol*. 2014. Vol. 23. P. 57–62. doi: 10.1016/j.jceh.2014.06.010.
10. Lee J. Sauchinone attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation through TGF- β . *Chem. Biol. Interact*. 2014. Vol. 224. P. 58–67. doi: 10.1016/j.cbi.2014.10.005.
11. Meyer D. Modulation of hepatic lipocyte proteoglycan synthesis and proliferation by Kupffer cell-derived transforming growth factors type beta 1 and type alpha. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990. Vol. 171. P. 1122–1129. doi: 10.1016/0006-291x(90)90801-s.
12. Constandinou C., Henderson N., Iredale J.P. Modeling liver fibrosis in rodents. *Methods Mol Med*. 2005. Vol. 117. P. 237–250.

PIKUS P.^{1,2}, RYMAR S.^{1,2}, SHUVALOVA N.², BUTSCHEK P.¹

¹ *Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150, e-mail: polinaignatchenko7@gmail.com*

² *State Institution of Genetic and Regenerative Medicine of Natl. Acad. of Med. Sci. of Ukraine, Ukraine, 04114, Kyiv, Vyshhorodska str., 67, e-mail: polinaignatchenko7@gmail.com*

MORPHOLOGICAL FEATURES OF RECOVERY IN MODEL RATS LIVER CIRRHOSIS INDUCED BY CCL₄ AFTER TRANSPLANTATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS FROM HUMAN UMBILICAL CORD

Aim. To study the process of recovery of rat liver in a model of cirrhosis, which was induced by intraperitoneal injection of CCl₄, after transplantation human umbilical cord MSCs. Today in the world as an alternative to liver transplantation is offered cell therapy, which leads to the recovery of organ's functions through the injection of MSCs. The key role of MSCs in the development of fibrosis and its final stage - liver cirrhosis is the inhibitory effect on the proliferation of the extracellular matrix. **Methods.** The methods of histology and morphometry were used in the work. **Results.** It was found, that 13 weeks after CCl₄ induction, the amount of collagen increased 7 times, atrophic, sclerotic changes in the architectonics of rat liver and functional disorders of hepatocytes were observed. After transplantation of human umbilical cord MSCs - $6-7 \times 10^6$ cells / kg body weight of the animal, was shown that after 3 weeks the rate of collagen accumulation decreased and after 13 weeks the amount of ECMs and other morphometric indexes almost corresponded to the negative control. **Conclusions.** Studies have shown that transplantation MSCs from human umbilical cord leads to almost complete regeneration of the rat liver which was caused by experimental liver cirrhosis with intraperitoneal injection of CCl₄.

Keywords: human umbilical cord MSCs, extracellular matrix, hepatocytes.