

УДК 576

## Влияние 3D-условий культивирования на дифференцировку энтодермальных клеток

О. С. Петракова<sup>1,2\*</sup>, В. В. Ашапкин<sup>3,4</sup>, Е. А. Воротеляк<sup>1</sup>, Е. Ю. Брагин<sup>4</sup>, В. Ю. Штратникова<sup>4</sup>, Е. С. Черниогло<sup>1</sup>, Ю. В. Суханов<sup>1</sup>, В. В. Терских<sup>1</sup>, А. В. Васильев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26

<sup>2</sup>Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

<sup>4</sup>Инновационно-технологический центр «Биологически активные соединения и их применение» РАН, 117312, Москва, ул. Губкина, 3, стр. 2

\*E-mail: PetrakovaOl@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.10.2012

**РЕФЕРАТ** Клеточная терапия органов энтодермального происхождения представляет собой одну из важных задач современной клеточной биологии и биотехнологии. Наиболее перспективным направлением в этой области является изучение возможностей трансдифференцировки клеток в пределах одного зародышевого листка. На примере анализа дифференцировочного потенциала энтодермальных протоковых клеток слюнной железы мыши в коллагеновом геле рассматривается один из подходов к изучению пластичности клеточного фенотипа *in vitro* – культивирование клеток в трехмерном матриксе (3D). Получены культуры постнатальных клеток подчелюстной слюнной железы и постнатальных прогениторных клеток печени мыши и проведена их сравнительная характеристика в 2D- и 3D-условиях культивирования. Показано, что оба типа клеток активно пролиферируют в 2D-условиях и проходят более 20 пассажей. В 2D-условиях культивирования клетки находятся в малодифференцированном состоянии. При переходе в 3D-условия клетки подвергаются дифференцировке, о чем свидетельствует замедление их пролиферации и увеличение экспрессии дифференцировочных маркеров. Клетки слюнной железы способны к трансдифференцировке в гепатоцитарном и панкреатическом направлениях. При культивировании в коллагеновом геле для клеток слюнной железы характерно снижение экспрессии протоковых маркеров и увеличение экспрессии гепатоцитарных маркеров. Прогениторные клетки печени при культивировании в 3D-условиях также приобретают способность к дифференцировке в панкреатическом направлении. Таким образом, постнатальные клетки слюнной железы проявляют значительную фенотипическую пластичность в пределах энтодермального зародышевого листка, они могут служить перспективным источником энтодермальных клеток для заместительной клеточной терапии заболеваний печени. Культивирование клеток в 3D-условиях является удобной моделью *in vitro*-анализа дифференцировочного потенциала клеток.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** дифференцировка, коллагеновый гель, 3D-условия культивирования, клетки подчелюстной слюнной железы, прогениторные клетки печени, энтодерма.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** 2D-условия – двумерные условия (2-dimensional); 3D-условия – трехмерные условия (3-dimensional); ОТ-ПЦР – обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией; ПКСЖ – постнатальные клетки слюнной железы; ППКП – постнатальные прогениторные клетки печени; ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени; BrdU – 5-bromo-2'-deoxyuridine (5-бром-2'-дезоксинуридин); DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole (4',6-диамин-2-фенилиндол); EGF – Epidermal Growth Factor (эпидермальный фактор роста); ITS – Insulin-Transferrin-Selenium (инсулин-трансферрин-селенит натрия).

**ВВЕДЕНИЕ**

Актуальной проблемой современной клеточной биологии является изучение пластичности клеточного фенотипа и возможностей трансдифференцировки клеток в пределах одного зародышевого листка. Это может не только помочь в решении таких фундаментальных задач, как понимание путей дифференцировки клеток в процессе эмбриогенеза, установление гистогенетического родства клеток различного типа, но и обозначить новые подходы в регенеративной медицине.

Возможности клеточной терапии патологий печени активно изучаются. Несмотря на некоторые успехи, полученные в опытах на лабораторных животных, безопасный и достаточно эффективный подход еще не найден [1, 2]. Основную задачу представляет поиск легкодоступных клеток, способных с достаточной эффективностью дифференцироваться в гепатоцитарном направлении. Наиболее хорошо изучены на данный момент с точки зрения экспериментальных и клинических испытаний эмбриональные стволовые клетки [3–6], мезенхимные клетки костного мозга [7–9] и жировой ткани [10–12], клетки амниотической жидкости [13, 14]. Однако во всех работах показана лишь частичная трансдифференцировка, и не достигнуто функционально активное состояние. Таким образом, работы по поиску оптимального источника клеток для терапии патологий печени остаются актуальными.

Слюнная железа является относительно мало изученным источником энтодермальных клеток. Однако доступность клеточного материала слюнной железы, возможность применять ее клетки в аутологичном и аллогенном вариантах, а также относительно малая травматичность процедуры взятия биоптата делают этот источник энтодермальных клеток перспективным для дальнейшего изучения.

На данный момент накоплено достаточно сведений о культивировании *in vitro* клеток слюнной железы человека и различных животных. Культивируемые *in vitro* клетки слюнной железы представляют собой активно пролиферирующую культуру, способную проходить значительное число пассажей [15]. Для клеток слюнной железы человека и животных (мышь, крыса, свинья) характерна экспрессия цитокератинов 18 и 19 и зачастую  $\alpha$ -фетопротеина [16, 17]. При определенных условиях культивирования эти клетки приобретают способность к синтезу глюкагона, альбумина либо инсулина [18].

В представленной работе мы рассматриваем один из подходов к изучению пластичности клеточного фенотипа *in vitro* – культивирование клеток в трехмерном матриксе (3D-условия) на примере геля из коллагена типа I. Культивирование клеток в кол-

лагеновом геле применяют для изучения морфогенетического потенциала клеток [19, 20], клеточной миграции [21] и оценки дифференцировочного потенциала [22]. Помимо этого, культивирование  $\beta$ -клеток поджелудочной железы в 4% геле из коллагена типа I способствует их лучшей выживаемости и повышает их функциональную активность [23]. Что касается клеток слюнной железы, то при культивировании в 3D-условиях (матригель) постнатальные клетки слюнной железы (ПКСЖ) мыши приобретают способность к экспрессии  $\alpha$ -фетопротеина и альбумина, что характерно для гепатоцитарной дифференцировки [16]. Как известно, коллаген типа I наряду с фибронектином является одним из основных компонентов внеклеточного матрикса печени. Таким образом, данная работа может не только помочь в изучении дифференцировочных свойств энтодермальных клеток, но и позволит оценить способность коллагенового матрикса инициировать и поддерживать гепатоцитарную дифференцировку клеток *in vitro*.

Цель нашей работы состояла в изучении способности клеток слюнной железы мыши дифференцироваться в гепатоцитарном направлении при культивировании в коллагеновом геле.

Нами проведен сравнительный анализ свойств клеток подчелюстной слюнной железы мыши и прогениторных клеток, выделенных из печени. Сравнение морфологических, иммунофенотипических и биохимических характеристик культур клеток проведено в 2D- и 3D-условиях культивирования, проанализирован также профиль экспрессии генов этих клеток с помощью ПЦР.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ****Животные**

В работе использовали самцов мышей линии C57BL/6 в возрасте 8–20 нед. Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к пище и воде. Все процедуры были проведены согласно правилам, установленным комиссией по биоэтике Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

**Выделение и культивирование постнатальных клеток подчелюстной слюнной железы мыши и прогениторных клеток печени**

Для получения культур клеток печени и подчелюстной слюнной железы мыши животных препарировали после наркотизации хлороформом. Шею и живот протирали спиртом, кожу разрезали стерильными ножницами и извлекали пинцетом обе подчелюстные слюнные железы и печень. Органы переносили в стерильные пробирки со средой DMEM/F12 1 : 1 («Gibco») и 40 мкг/мл гентамицина. После измельче-

ния органов и удаления кровеносных сосудов и мезенхимных тканей гомогенат слюнной железы и печени дважды промывали фосфатно-солевым буфером. Затем обрабатывали раствором коллагеназы типа IV (4 мг/мл, «Sigma») в среде DMEM/F12 1 : 1 в течение 30–40 мин при 37°C. Суспензии клеток пипетировали и пропускали через фильтр с диаметром пор 40 мкм, чтобы отделить мелкие клетки от более крупных полиплоидных. Клетки дважды промывали средой культивирования. При этом использовали «мягкое» центрифугирование в течение 2 мин при 100 g. В этих условиях происходило удаление эритроцитов и осаждение преимущественно мелких клеток, обладающих большей удельной плотностью. После удаления супернатанта клетки ресуспендировали в полной среде культивирования, содержащей DMEM/F12 1 : 1, 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота («HyClone»), 2 mM глутамин («Gibco»), 1× ITS («Invitrogen») и 10 нг/мл EGF («Invitrogen»). Клетки высаживали на покрытые коллагеном типа I культуральные чашки («Corning») из расчета  $5 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup> и культивировали в стандартных условиях при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. В течение первых 5 дней среду заменяли каждый день, а в дальнейшем – 1 раз в 3 дня. При пассировании клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером и инкубировали с 0.25% трипсином в течение 5 мин при 37°C. Рассаживали на покрытые коллагеном типа I культуральные чашки, разводя в соотношении 1 : 3.

#### **Приготовление коллагенового геля, культивирование клеток в 3D-условиях, контракция коллагенового геля**

Коллагеновый гель готовили по стандартной методике: коллаген типа I получали из хвостов крыс по описанной ранее методике [20], растворяли в стерильной 0.1% уксусной кислоте в концентрации 5 мг/мл. Клетки на первом пассаже снимали трипсином и разводили в фосфатно-солевом буфере, исходя из расчета, что конечная концентрация клеток составляет  $1 \times 10^6$  клеток/мл геля. Перед приготовлением геля все материалы охлаждали до +4°C, последующие операции выполняли на холоду. В отдельную пробирку добавляли стерильные компоненты в следующей очередности: 0.34 M NaOH («Sigma») до конечной концентрации 0.023 mM, 7.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> («ПанЭко») до конечной концентрации 0.26%, 10× DMEM («Sigma») до конечной концентрации 1×, 100× глутамин («Gibco») до конечной концентрации 2 mM, 100× HEPES («Gibco») до конечной концентрации 1×, эмбриональную сыворотку крупного рогатого скота («HyClone») до конечной концентрации 10%. Затем добавляли раствор коллагена в уксусной кислоте до конечной концентрации коллагена 4%. После этого 2–3 раза пере-

мешивали и добавляли клетки в фосфатно-солевом буфере, перемешивали еще 1–2 раза и помещали гель в 35-мм чашки Петри по 2 мл на чашку. Гель инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C в течение 30 мин до полного застывания. После полимеризации геля в чашки добавляли по 2 мл полной ростовой среды, гель отделяли от стенок чашки наконечником пипетки. Помещали гель в CO<sub>2</sub>-инкубатор, это время считали нулевым часом приготовления геля. Далее клетки в геле культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в стандартных условиях, среду меняли каждые 2 дня. Для определения степени контракции геля, измеряли его диаметр каждые 24 ч, считая от времени приготовления. В качестве отрицательного контроля контракции использовали гель без клеток.

#### **Иммуногистохимия**

Коллагеновый гель инкубировали с 4% параформальдегидом в течение 30 мин при комнатной температуре, затем заключали в парафин по стандартной методике и готовили парафиновые срезы толщиной 40 мкм. Срезы окрашивали азур-эозином.

#### **Иммуноцитохимия**

Для иммуноцитохимического окрашивания клетки рассаживали на покрытые коллагеном типа I чашки за 48 ч до фиксации. Фиксировали 4% параформальдегидом в течение 10 мин при комнатной температуре, промывали фосфатно-солевым буфером с 0.1% Тритоном X-100 и проводили блокировку 1% бычьим сывороточным альбумином в фосфатно-солевом буфере в течение 30 мин при комнатной температуре. Инкубировали с первичными антителами в фосфатно-солевом буфере в течение 60 мин при 37°C (или при +4°C в течение ночи) в разведении, рекомендованном производителем (обычно 1 : 200–1 : 500). Отмывали 3 раза по 10 мин в фосфатно-солевом буфере при 37°C, после чего инкубировали с вторичными антителами в фосфатно-солевом буфере (разведение 1 : 1000) в течение 40 мин при 37°C. Снова отмывали 3 раза по 10 мин в фосфатно-солевом буфере при 37°C, добавляя во время последней отмывки DAPI («Sigma»). Анализировали под флуоресцентным микроскопом. Список использованных антител представлен в *табл. 1*.

При анализе клеток после 10 дней культивирования в 3D-условиях гель промывали фосфатно-солевым буфером, измельчали и инкубировали с 0.075% коллагеназой типа II («Sigma») в течение 60 мин при 37°C. После растворения геля клетки отмывали фосфатно-солевым буфером, высаживали на покрытые коллагеном типа I чашки и культивировали в стандартных условиях (CO<sub>2</sub>-инкубатор, 48 ч). Затем проводили стандартную процедуру окрашивания (см. выше).

Таблица 1. Антитела, использованные в работе

Антитело	Антиген	Фирма, каталожный номер
Первичные антитела		
СК19	Цитокератин 19	«AbCam», # ab15463-1
ALB	Альбумин	«R & D», # MAB1455
СУР Р450	Цитохром Р450 1А1	«Millipore», # AB1258
BrdU	Бромдезоксисуридин	«AbCam», # ab8152
Вторичные антитела		
Alexa Fluor® 488 donkey anti-rabbit IgG (H + L)		«Invitrogen», # A-21206
Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H + L)		«Invitrogen», # A-11029

### Определение пролиферативной активности клеток с помощью бромдезоксисуридина

Пролиферативную активность клеток при культивировании в 2D- и 3D-условиях определяли по способности клеток включать бромдезоксисуридин (BrdU). За 15 ч до фиксации к клеткам добавляли BrdU («Sigma») до конечной концентрации 10 мкМ. Затем при культивировании в 2D-условиях клетки промывали фосфатно-солевым буфером, фиксировали в 70% этаноле (30 мин, +4°C). Добавляли эквивалентный объем 4 н. HCl, инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Промывали клетки фосфатно-солевым буфером до достижения нейтральных значений pH, инкубировали с первичными антителами к BrdU в фосфатно-солевом буфере (разведение 1 : 1000) в течение 60 мин при 37°C. Отмывали 3 раза по 10 мин в фосфатно-солевом буфере при 37°C, затем инкубировали клетки с вторичными антителами (разведение 1 : 1000) в течение 60 мин при 37°C. Отмывали 3 раза по 10 мин в фосфатно-солевом буфере при 37°C, во время последней отмывки добавляли DAPI («Sigma»). Анализировали клетки под флуоресцентным микроскопом, для статистического анализа подсчитывали 5000 клеток.

Для подсчета доли пролиферирующих клеток после 10 дней культивирования в 3D-условиях клетки инкубировали с 10 мкМ BrdU в течение 15 ч, затем промывали фосфатно-солевым буфером, измельчали и инкубировали с коллагеназой типа II («Sigma») в течение 60 мин при 37°C. После растворения геля клетки отмывали фосфатно-солевым буфером, высаживали на покрытые коллагеном типа I чашки и культивировали в стандартных условиях в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. После прикрепления клеток проводили такую же процедуру окраски, как для 2D-условий (см. выше).

Для анализа особенностей роста клеток и выявления закономерностей морфогенеза в 3D-условиях окрашивали гель антителами к BrdU. После 10 дней культивирования клеток в геле добавляли в среду 10 мкМ BrdU на 15 ч, затем гель фиксировали 4% параформальдегидом в течение 10 мин при комнатной температуре. Гель инкубировали в 70% этаноле (30 мин, +4°C), добавляли эквивалентный объем 4 н. HCl, инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Промывали гель фосфатно-солевым буфером до нейтральных значений pH, инкубировали с первичными антителами к BrdU в фосфатно-солевом буфере (разведение 1 : 1000) в течение 16 ч на шейкере при комнатной температуре. Отмывали 3 раза по 10 мин в фосфатно-солевом буфере на шейкере при комнатной температуре, затем инкубировали клетки с вторичными антителами (разведение 1 : 1000) в течение 2 ч на шейкере при комнатной температуре. Отмывали 3 раза по 10 мин в фосфатно-солевом буфере при 37°C, во время последней отмывки добавляли DAPI («Sigma»). Анализировали клетки под флуоресцентным микроскопом.

### Выделение суммарной РНК из клеток

Суммарную РНК выделяли из клеток на первом пассаже в случае культивирования в 2D-условиях и после 10 дней инкубации в геле при культивировании клеток в 3D-условиях. Для выделения РНК из клеток, культивируемых в 3D-условиях, гель растворяли коллагеназой типа II, клетки осаждали центрифугированием. РНК выделяли при помощи набора AllPrep DNA/RNA Mini Kit («Qiagen») по инструкции производителя. Концентрацию РНК определяли на мини-флуориметре Qubit с помощью RNA Assay Kit («Invitrogen»). Для обратной транскрипции использовали обратную транскриптазу Superscript II («Invitrogen») со случайными праймерами. В реакцию брали 500 нг суммарной РНК.

### Анализ клеток слюнной железы и прогениторных клеток печени мыши методом ОТ-ПЦР

ОТ-ПЦР проводили при помощи набора ScreenMix («Евроген») по инструкциям производителя. Условия реакции: предварительная инкубация при 95°C в течение 5 мин для активации ДНК-полимеразы, затем 25–30 циклов: денатурация – 95°C, 15 с; отжиг – 57–59°C, 15 с; элонгация – 72°C, 1 мин. Перечень использованных маркеров и температура плавления праймеров представлены в табл. 2.

### Электрофорез в агарозном геле

Электрофорез проводили в 1.5% агарозном геле («Helicon») и буфере TAE («ПанЭко») при напряжении 80 В. В качестве маркеров молекулярного веса ис-

Таблица 2. Праймеры, использованные в ОТ-ПЦР

Праймер	Ген	Нуклеотидная последовательность	Ампликон, п.н.	T <sub>пл.</sub> , °C
mGAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа)	5'-AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG-3' 5'-GGG GTC GTT GAT GGC AAC A-3'	95	62.6 62.6
mKRT8	Keratin 8 (кератин 8)	5'-TCC ATC AGG GTG ACT CAG AAA-3' 5'-AAG GGG CTC AAC AGG CTC T-3'	242	60.1 60.0
mKRT14	Keratin 14 (кератин 14)	5'-GGC TGG AGC AGG AGA TCG CCA-3' 5'-AGG ACC TGC TCG TGG GTG GAG ACCA-3'	90	61.0 62.0
mKRT19	Keratin 19 (кератин 19)	5'-GGG GGT TCA GTA CGC ATT GG-3' 5'-GAG GAC GAG GTC ACG AAG C-3'	113	62.9 62.1
mAFP	Alpha fetoprotein (α-фетопротеин)	5'-CCA TCA CCT TTA CCC AGT TTG T-3' 5'-CCC ATC GCC AGA GTT TTT CTT-3'	101	60.2 60.6
m1AAT	Alpha-1-antitrypsin (α-1-антитрипсин)	5'-CTC GTC CGC TCA CTA AAC AAG-3' 5'-GCT GTC TGA GAG TCA AGG TCT T-3'	248	60.7 61.3
mTAT	Tyrosine aminotransferase (тирозин-аминотрансфераза)	5'-AGC CGA ATC CGA ACA AAA CC-3' 5'-GCC GAT AGA TGG GGC ATA GC-3'	146	60.9 61.3
mPEPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (фосфоенолпируват-карбоксикиназа 1)	5'-TGA CAG ACT CGC CCT ATG TG-3' 5'-CCC AGT TGT TGA CCA AAG GC-3'	153	61.0 61.4
mALB	Albumin (альбумин)	5'-TGC TTT TTC CAG GGG TGT GTT-3' 5'-TTA CTT CCT GCA CTA ATT TGG CA-3'	167	62.4 60.2
mCYP 3A13	Cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 13 (цитохром P450 семейства 3, подсемейство a, полипептид 13)	5'-ATG AGG CAG GGA TTA GGA GAA G-3' 5'-TGA GAG GAA CAG TGG ATC AAA GA-3'	189	60.7 60.7
mIns2	Insulin-2 preproprotein (инсулин 2 белок-предшественник)	5'-GCT TCT TCT ACA CAC CCA TGT C-3' 5'-AGC ACT GAT CTA CAA TGC CAC-3'	147	60.6 60.1
mAmy	Amylase (амилаза)	5'-AAC GAA AGA GAA ATT GAA ACC-3' 5'-GCC CCC ACT CCA CAC ATG TGG-3'	213	60.0 62.0

пользовали DNA Ladder («Promega») с шагом 1 т.п.н. и 100 п.н. Наносили по 6 мкл пробы, полученной после ОТ-ПЦР, на лунку. Гель анализировали в ультрафиолете (360 нм) после окрашивания бромистым этидием («Sigma»).

### Количественная ПЦР

Количественную ПЦР с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили с помощью набора для ПЦР-РВ с красителем EVA Green («Синтол») на приборе CFX96 («BioRad»). Условия реакции: предварительная инкубация при 95°C в течение 5 мин для активации ДНК-полимеразы, затем 40 циклов: денатурация – 95°C, 30 с; отжиг – 57–59°C, 30 с; элонгация – 72°C, 45 с. Температура отжига слегка варьировала для разных генов в соответствии с температурой плавления праймеров (табл. 3). Флуоресценцию определяли в канале Fam, первичную обработку результатов осуществляли в автоматическом режиме при помощи программного обеспечения, поставляемого с прибором. В качестве внутреннего стандарта, относительно которого вычисляли концентрацию всех остальных мРНК, использовали мРНК GAPDH. Образцы кДНК каждого изучаемого гена анализи-

ровали по возможности одновременно и параллельно в соседних лунках прибора, в строго идентичных условиях.

### Определение уровня синтеза мочевины клетками

Уровень синтеза мочевины клетками определяли с помощью набора Urea Assay Kit фирмы «BioVision» по инструкции производителя. Количество мочевины измеряли в среде культивирования, за 24 ч до взятия пробы среду меняли на свежую. Клетки, культивируемые в 2D-условиях, анализировали на первом пассаже, пробы клеток, культивируемых в 3D-условиях, отбирали на 1, 5 и 10-й день инкубации в геле.

### Статистическая обработка данных

Все эксперименты проводили в трех повторах на культурах клеток, полученных от трех разных животных. Каждую процедуру проводили в одинаковых условиях в трех технических повторностях. Статистическую обработку осуществляли по *t*-критерию Стьюдента при уровне доверительной вероятности 95% для биологических повторов и 99% – для технических.

Таблица 3. Праймеры, использованные при проведении ПЦР в реальном времени

Праймер	Ген	Нуклеотидная последовательность	Ампли- кон, п.н.	T <sub>пл</sub> , °C
mGAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа)	5'-AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG-3' 5'-GGG GTC GTT GAT GGC AAC A-3'	95	62.6 62.6
mKRT19	Keratin 19 (кератин 19)	5'-GGG GGT TCA GTA CGC ATT GG-3' 5'-GAG GAC GAG GTC ACG AAG C-3'	113	62.9 62.1
mAFP	Alpha fetoprotein (α-фетопротеин)	5'-CCA TCA CCT TTA CCC AGT TTG T-3' 5'-CCC ATC GCC AGA GTT TTT CTT-3'	101	60.2 60.6
m1AAT	Alpha-1-antitrypsin (α-1-антитрипсин)	5'-CTC GTC CGC TCA CTA AAC AAG-3' 5'-GCT GTC TGA GAG TCA AGG TCT T-3'	248	60.7 61.3
mTAT	Tyrosine aminotransferase (тирозин-аминотрансфераза)	5'-AGC CGA ATC CGA ACA AAA CC-3' 5'-GCC GAT AGA TGG GGC ATA GC-3'	146	60.9 61.3
mPEPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (фосфоенолпируват-карбоксикиназа 1)	5'-TGA CAG ACT CGC CCT ATG TG-3' 5'-CCC AGT TGT TGA CCA AAG GC-3'	153	61.0 61.4

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Морфологическая характеристика культур клеток печени и слюнной железы мыши, культивируемых в 2D- и 3D-условиях

После выделения ППКП прикреплялись к покрытому коллагеном типа I пластику на 1–2 день; ПКСЖ – на 2–3 день. Клетки были полигональными, одноядерными, имели небольшой размер и высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение. Затем происходило формирование плотных колоний. Монослой ПКСЖ формировался на 5 день, ППКП – на 7 день (рис. 1А,Б). На данном этапе клетки, полученные из печени и слюнной железы, визуально практически не отличались. Время удвоения клеточной популяции было максимальным на нулевом пассаже – около 35 ч для ПКСЖ и 50 ч для ППКП. После образования монослоя и при дальнейшем культивировании время удвоения клеточной популяции стабилизировалось, составляя примерно 42 ч у ПКСЖ и 63 ч у ППКП. Обе культуры клеток были способны проходить более 20 пассажей, что свидетельствует о том, что они имеют высокий пролиферативный потенциал и состоят в основном из малодифференцированных клеток.

На первом пассаже ПКСЖ и ППКП были заключены в 4% коллагеновый гель в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл геля. Морфологические изменения наблюдали в течение последующих 10 дней инкубации клеток в геле. ПКСЖ приобретали вытянутую форму, образовывали скопления, которые со временем увеличивались в размерах. От скоплений отходили тяжи, состоящие из нескольких десятков клеток (рис. 1В). На парафиновых срезах видно, что тяжи клеток ПКСЖ в геле имеют тубулярную структуру (рис. 1Д). ППКП также образуют скопления в виде небольших тяжей, однако появление крупных скоплений менее выражено (рис. 1Г). На срезах видно,

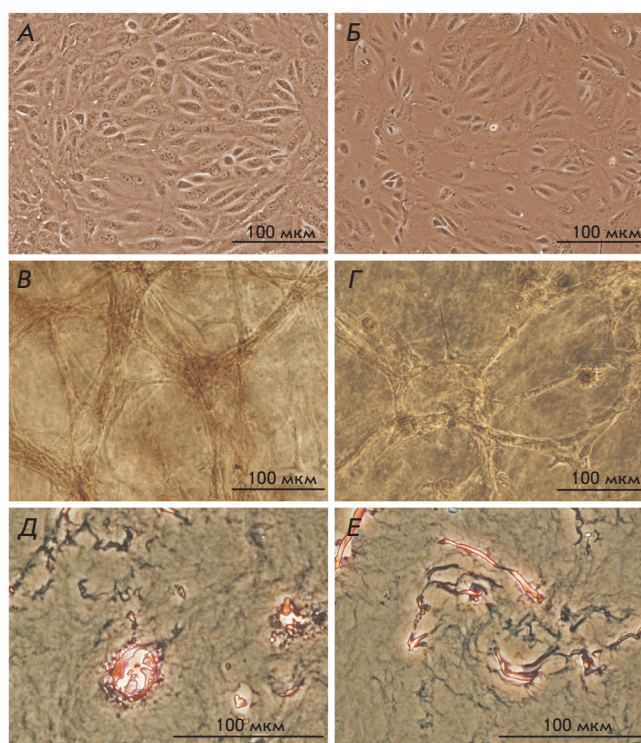
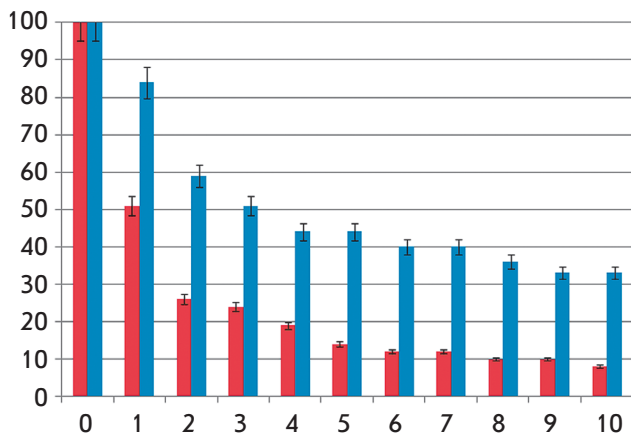


Рис. 1. Морфология клеток слюнной железы и прогениторных клеток печени мыши в 2D- и 3D-условиях культивирования, фазовый контраст. А – ПКСЖ – монослойная культура, 0 пассаж; Б – ППКП – монослойная культура, 0 пассаж; В – ПКСЖ – 10-й день культивирования в 4% коллагеновом геле, 1 пассаж; Г – ППКП – 10-й день культивирования в 4% коллагеновом геле, 1 пассаж; Д – ПКСЖ, гистологический срез коллагенового геля, 10-й день культивирования, окраска азур-эозином; Е – ППКП, гистологический срез коллагенового геля, 10-й день культивирования, окраска азур-эозином



**Рис. 2.** Контракция 4% коллагенового геля клетками печени и слюнной железы мыши. Концентрация клеток  $1 \times 10^6$  клеток/мл геля, 1 пассаж. По оси X – время контракции (дни), по оси Y – площадь геля по отношению к первоначальной площади в %. Красным выделены столбики, относящиеся к ПКСЖ, синим – к ППКП

что эти структуры не являются полыми (рис. 1Е). Часть ППКП в 3D-условиях остаются округлыми, увеличиваются в размерах и содержат множество гранул.

По мере разрастания клеточных тяжей происходит уменьшение размеров коллагенового геля (контракция). Известно, что степень контракции геля зависит от цитоскелета клеток и отражает их сократительные способности [19]. Изучаемые клетки приобретают сократительные способности при дифференцировке в миоэпителий. Таким образом, по степени контракции коллагенового геля можно судить о потенциале дифференцировки ПКСЖ и ППКП в миоэпителиальном направлении.

В течение всего периода инкубации ПКСЖ и ППКП в 3D-условиях наблюдается контракция коллагенового геля. ПКСЖ вызывают значительную контракцию, уже после 5 дней инкубации клеток в геле его площадь сокращается до 14% от первоначальной (рис. 2). В то же время ППКП контрактируют гель в меньшей степени, к 10-му дню инкубации площадь геля составляет более 30% от первоначальной (рис. 2). Таким образом, у ПКСЖ более выражена способность к дифференцировке в миоэпителиальном направлении, что согласуется с опубликованными данными [24].

Полученные нами данные говорят о сходстве морфологических характеристик ПКСЖ и ППКП при культивировании в 2D-условиях. Однако в 3D-условиях морфогенетические свойства клеток значительно различаются.

### Иммуноцитохимическая характеристика культур клеток печени и слюнной железы мышцы в 2D-условиях и после культивирования в коллагеновом геле

Для определения влияния 3D-условий культивирования на экспрессию гепатоцитарных маркеров провели иммунофенотипирование ПКСЖ и ППКП, культивированных на пластике и после 10 дней инкубации в коллагеновом геле. Иммунофенотипирование энтодермальных клеток проводили на первом пассаже с использованием маркеров, указанных в табл. 1.

Клетки обеих культур при культивировании в 2D-условиях являются слабо позитивными по альбумину и характерному для клеток печени цитохрому P450 1A1 (рис. 3А,Б,Г,Д). Для обеих культур характерно окрашивание на цитокератин 19 (рис. 3В,Е), однако локализация цитокератина в ПКСЖ и ППКП различается. В ПКСЖ цитокератин 19 находится в перинуклеарном пространстве, а также под плазматической мембраной, что, по всей видимости, связано с развитой системой плотных контактов в этих клетках в связи с выполняемой ими барьерной функцией. В ППКП цитокератин 19 локализуется в основном в перинуклеарном пространстве. В обеих культурах присутствует небольшое число клеток, в которых цитокератин 19 распределен по всей цитоплазме.

При анализе клеток, культивируемых в течение 10 дней в 3D-условиях, гель растворяли коллагеназой типа II, клетки высаживали на покрытые коллагеном типа I чашки и культивировали в стандартных условиях ( $CO_2$ -инкубатор, 48 ч), а затем проводили иммунофенотипирование клеток. После культивирования в коллагеновом геле, в ПКСЖ повысился уровень экспрессии цитохрома P450 1A1 (рис. 3З), уровень экспрессии альбумина не изменился. Экспрессия цитокератина 19 снизилась, изменилась его локализация: в большей части клеток цитокератин 19 находился в перинуклеарном пространстве (рис. 3И). После инкубации в коллагеновом геле в ППКП повысилась экспрессия альбумина и цитохрома P450, снизилась экспрессия цитокератина 19 (рис. 3К–М).

Таким образом, изучаемые культуры клеток характеризуются сходной экспрессией гепатоцитарных маркеров при культивировании в 2D-условиях. Данные иммуноцитохимического анализа свидетельствуют о том, что маркеры гепатоцитов экспрессируются в обеих культурах. Однако в изучаемых энтодермальных клетках уровень их экспрессии низок, что может говорить о том, что ПКСЖ и ППКП находятся в малодифференцированном состоянии. Как ПКСЖ, так и ППКП экспрессируют маркеры, характерные для протокового (цитокератин 19) и гепатоцитарного (альбумин, цитохром P450 1A1) направления дифференцировки, т.е. обладают бипотентным потенциа-

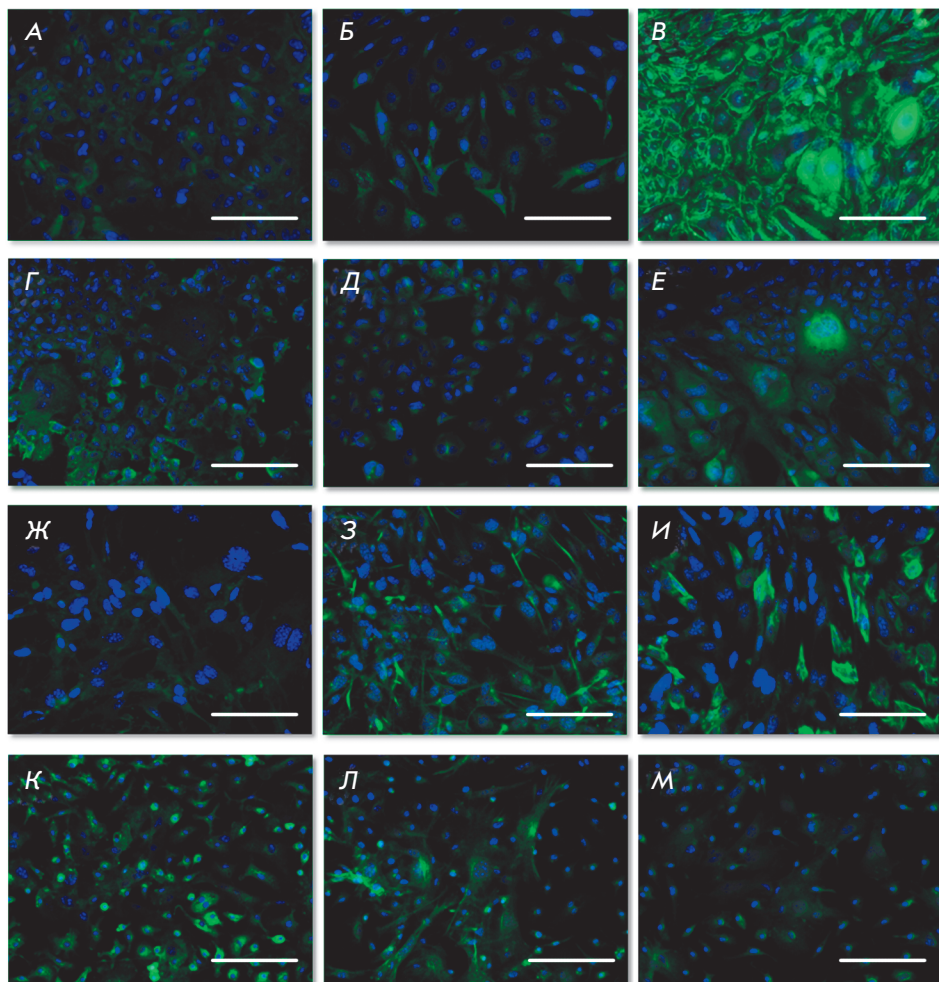


Рис. 3. Иммуноцитохимическая характеристика культур клеток печени и слюнной железы мыши на 1 пассаже, флуоресцентная микроскопия. Синим окрашены ядра клеток (DAPI), зеленым – соответствующие антигены (Alexa Fluor 488), длина мерного отрезка – 100 мкм. А – ПКСЖ, альбумин, 2D-условия; Б – ПКСЖ, цитохром P450 1A1, 2D-условия; В – ПКСЖ, цитокератин 19, 2D-условия; Г – ППКП, альбумин, 2D-условия; Д – ППКП, цитохром P450 1A1, 2D-условия; Е – ППКП, цитокератин 19, 2D-условия; Ж – ПКСЖ, альбумин, после 10 дней инкубации в геле; З – ПКСЖ, цитохром P450 1A1, после 10 дней инкубации в геле; И – ПКСЖ, цитокератин 19, после 10 дней инкубации в геле; К – ППКП, альбумин, после 10 дней инкубации в геле; Л – ППКП, цитохром P450 1A1, после 10 дней инкубации в геле; М – ППКП, цитокератин 19, после 10 дней инкубации в геле

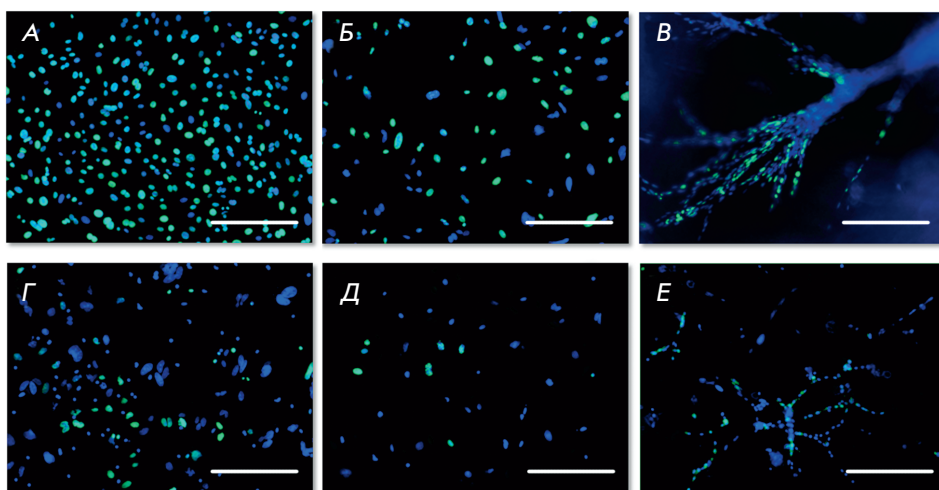


Рис. 4. Анализ пролиферативной активности культур клеток печени и слюнной железы мыши в 2D- и 3D-условиях культивирования, 1 пассаж, флуоресцентная микроскопия. Синим окрашены ядра клеток (DAPI), зеленым – BrdU (Alexa Fluor 488), длина мерного отрезка – 100 мкм. А – ПКСЖ, 2D-условия; Б – ПКСЖ, клетки, выделенные из геля после 10 дней инкубации; В – ПКСЖ, 10 дней инкубации в 3D-условиях (без выделения из геля); Г – ППКП, 2D-условия; Д – ППКП, клетки, выделенные из геля после 10 дней инкубации; Е – ППКП, 10 дней инкубации в 3D-условиях (без выделения из геля)



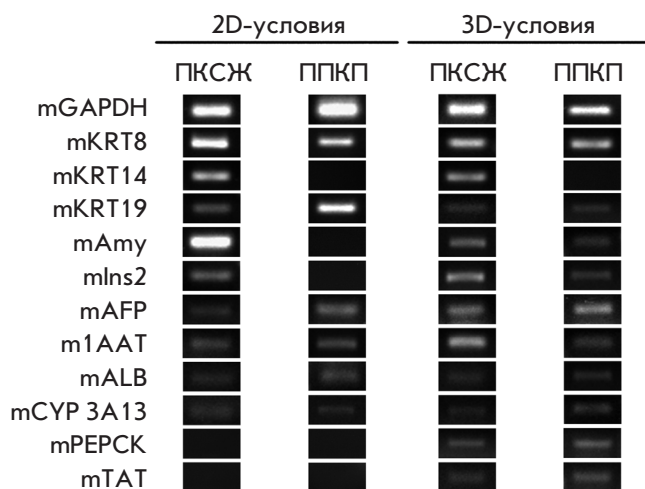


Рис. 5. ОТ-ПЦР-анализ культур клеток печени и слюнной железы мыши на 1 пассаже в 2D- и 3D-условиях культивирования

лом дифференцировки, что характерно, например, для овальных клеток [25]. После культивирования в 3D-условиях в клетках возрастает экспрессия маркеров, характерных для гепатоцитарного направления, причем в ППКП это выражено сильнее. Экспрессия маркеров протокового направления (цитокератин 19) снижается в обеих культурах.

#### Определение пролиферативной активности клеток слюнной железы и прогениторных клеток печени мыши в 2D- и 3D-условиях

Анализ пролиферативной активности клеток при помощи определения включения BrdU выявил высокий пролиферативный потенциал ПКСЖ. На первом пассаже при культивировании в 2D-условиях BrdU включали более 90% клеток слюнной железы (рис. 4А) и 30% ППКП (рис. 4Г). По-видимому, популяция ППКП более гетерогенна и содержит клетки с различной степенью дифференцировки.

На 10-й день культивирования в коллагеновом геле BrdU включался только в 52% ПКСЖ и 11.6% ППКП (рис. 4Б,Д). Таким образом, в 3D-условиях клеточная пролиферация обеих культур замедляется примерно в 2 раза. Для выяснения особенностей роста клеток в геле и выявления закономерностей морфогенеза в 3D-условиях провели окрашивание на BrdU без выделения клеток из геля. В результате не выявили каких-либо закономерностей в распределении пролиферирующих клеток: позитивные по BrdU клетки располагались как в наружных, так и во внутренних слоях по всей длине клеточных тяжей (рис. 4В,Е).

#### ОТ-ПЦР для культур клеток слюнной железы и прогениторных клеток печени мыши в 2D- и 3D-условиях культивирования

ОТ-ПЦР-анализ ПКСЖ и ППКП был проведен на первом пассаже в 2D-условиях культивирования, а также в 3D-условиях после 10 дней инкубации клеток в геле. ОТ-ПЦР проводили по широкому набору маркеров, характерных для клеток энтодермы. В качестве положительного контроля ПЦР использовали ген домашнего хозяйства *GAPDH*.

По данным ОТ-ПЦР ПКСЖ, как и ППКП, на первом пассаже в 2D-условиях экспрессируют цитокератины 8, 18, 19, характерные для эпителиальных клеток энтодермы. ПКСЖ, кроме этого, экспрессируют цитокератин 14, характерный для клеток, ассоциированных с базальной мембраной, а также амилазу и инсулин (рис. 5), ППКП являются отрицательными по этим маркерам. Что касается маркеров, характерных для гепатоцитов, то в ПКСЖ и ППКП экспрессируются  $\alpha$ -фетопротейн,  $\alpha$ -1-антитрипсин, альбумин и характерный для гепатоцитов цитохром P450 3A13. Маркеры, характерные для поздних стадий дифференцировки гепатоцитов (*PEPCK*, *TAT*), в 2D-условиях культивирования не обнаруживаются.

После 10 дней культивирования в коллагеновом геле в ПКСЖ и ППКП выявляется экспрессия *PEPCK* и *TAT*, что характерно для поздних стадий дифференцировки клеток печени. В ППКП, кроме того, наблюдается экспрессия амилазы и инсулина, маркеров клеток панкреатического направления. Подобная фенотипическая пластичность прогениторных клеток печени согласуется с опубликованными данными, согласно которым стволовые клетки печени и поджелудочной железы могут трансдифференцироваться друг в друга при определенных условиях культивирования *in vitro* [2, 26].

#### Количественная ПЦР с детекцией в реальном времени для культур клеток слюнной железы в сравнении с прогениторными клетками печени в 2D- и 3D-условиях культивирования

Сравнительный анализ культур клеток ПКСЖ и ППКП проводили методом количественной ПЦР с детекцией в реальном времени на первом пассаже по маркерам, характерным для клеток печени (табл. 4). Помимо этого проанализировали экспрессию этих генов в ПКСЖ после 10 дней культивирования в коллагеновом геле. Данные для каждой культуры нормировали по гену *GAPDH*, уровень экспрессии которого принят за 1.

ПКСЖ на первом пассаже в 2D-условиях экспрессируют цитокератин 19 на довольно высоком уровне, но в ППКП его экспрессия более чем в 18 раз выше.

Таблица 4. ПЦР-РВ для ПКСЖ и ППКП на первом пассаже в 2D- и 3D-условиях культивирования\*

Праймер	2D-условия		3D-условия, 10-й день
	ПКСЖ	ППКП	ПКСЖ
mGAPDH	1	1	1
mKRT19	14.1	295.59	7.9
mAFP	0.01	0.12	1.19
m1AAT	0.04	0.30	3.19
mTAT	0.09	0.43	0.32
mPEPCK	0.02	0.08	0.18

\*Данные нормированы по GAPDH.

После инкубации в геле экспрессия цитокератина 19 в клетках слюнной железы снижается примерно в 2 раза. Экспрессия  $\alpha$ -фетопротеина, характерного для овальных клеток, в обеих культурах довольно низкая, но в ППКП его экспрессия выше примерно в 10 раз. Гепатоцитарные маркеры экспрессируются в изучаемых клетках на относительно низком уровне, причем в ППКП экспрессия этих маркеров в несколько раз выше. После 10 дней инкубации в геле экспрессия  $\alpha$ -фетопротеина в ПКСЖ возрастает более чем в 100 раз и значительно превышает уровень экспрессии в ППКП в 2D-условиях культивирования. Экспрессия  $\alpha$ -1-антитрипсина, характерного для начальных этапов гепатоцитарной дифференцировки, возрастает в 3D-условиях в ПКСЖ почти в 80 раз. Экспрессия маркеров поздних стадий гепатоцитарной дифференцировки также значительно увеличивается.

#### Определение уровня синтеза мочевины клетками слюнной железы и прогениторными клетками печени мыши в 2D- и 3D-условиях культивирования

Для определения функциональной активности изучаемых клеток проведен анализ уровня синтеза мочевины ПКСЖ и ППКП в 2D- и 3D-условиях культивирования.

В 2D-условиях обе культуры энтодермальных клеток практически не синтезируют мочевины: на первом пассаже – около 2 мМ мочевины на  $1 \times 10^6$  клеток ПКСЖ за 24 ч, ППКП – около 2.5 мМ (рис. 6). Этот показатель несколько снижается при увеличении числа пассажей (данные не представлены). Однако при культивировании в 3D-условиях синтез мочевины постепенно увеличивается как в ППКП, так и в ПКСЖ. В 10-му дню культивирования уровень синтеза мочевины увеличился почти в 15 раз

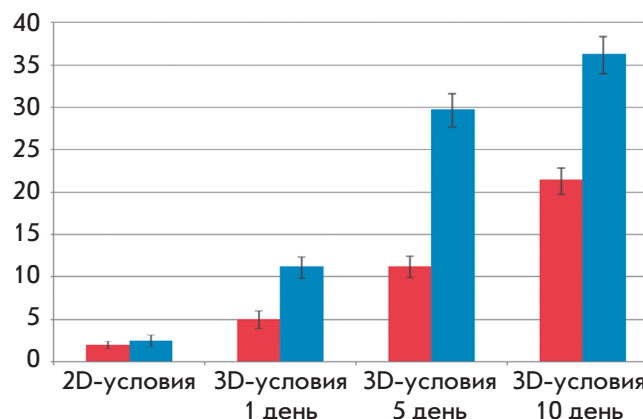


Рис. 6. Синтез мочевины культурами клеток печени и слюнной железы мыши при культивировании в 2D- и 3D-условиях, 1 пассаж. По оси Y – количество мочевины (мМ) в пересчете на  $1 \times 10^6$  клеток за 24 ч. Красным выделены столбики, относящиеся к ПКСЖ, синим – к ППКП

в ППКП и в 10 раз в ПКСЖ. Таким образом, к 10-му дню культивирования в 3D-условиях уровень синтеза мочевины в ПКСЖ составил около 60% от уровня в ППКП.

Известно, что стволовые клетки печени и поджелудочной железы способны к трансдифференцировке в пределах энтодермального зародышевого листка. Так, при пересадке протоковых клеток поджелудочной железы в печень они дифференцируются в гепатоциты [27]. Овальные клетки могут дифференцироваться в эндокринные и экзокринные клетки поджелудочной железы [26]. В культуре при увеличении плотности посева островковые клетки могут дифференцироваться в гепатоциты. Показано, что при воздействии дексаметазона ацинарные клетки поджелудочной железы могут дифференцироваться в гепатоциты [2]. Однако информация о дифференцировочных потенциях клеток слюнной железы все еще немногочисленна. При стимуляции культуры клеток слюнной железы свиньи никотиномидом экспрессия альбумина в них возрастает в 5 раз [18]. Клетки слюнной железы мыши, введенные в печень через портальную вену, способны интегрироваться в печень и синтезировать альбумин и  $\alpha$ -1-антитрипсин [16].

В целом полученные нами результаты подтверждают высокую фенотипическую пластичность клеток слюнной железы мыши в пределах энтодермального зародышевого листка. ПКСЖ в значительной степени и специфично подвергаются гепатоцитарной дифференцировке в коллагеновом геле без дополнительной стимуляции факторами роста и цитокинами.

## ВЫВОДЫ

Нами получена культура постнатальных клеток подчелюстной слюнной железы мыши и проведено ее сравнение с постнатальными прогениторными клетками печени мыши в 2D- и 3D-условиях культивирования.

Постнатальные клетки слюнной железы и прогениторные клетки печени мыши – это энтодермальные эпителиальные клетки. ПКСЖ являются протоковыми клетками с высоким пролиферативным потенциалом. Популяция ППКП гетерогенна и содержит в своем составе клетки на разных стадиях дифференцировки. Обе культуры обладают бипотентным потенциалом дифференцировки в гепатоцитарном и протоковом направлениях. ПКСЖ, кроме того, способны к дифференцировке в панкреатическом направлении, а ППКП приобретают такую способность при культивировании в коллагеновом геле.

По экспрессии различных клеточных маркеров ПКСЖ и ППКП проявляют значительное сходство и, по всей видимости, имеют сходные дифференцировочные потенции. В целом ПКСЖ и ППКП обладают значительной фенотипической пластичностью и способностью к трансдифференцировке в пределах энтодермального зародышевого листка.

В 3D-условиях культивирования ПКСЖ и ППКП подвергаются дифференцировке, о чем свидетельствуют замедление клеточной пролиферации и повышение уровня экспрессии маркеров дифференцировки. Для ПКСЖ в 3D-условиях характерны снижение экспрессии маркеров протокового направления и увеличение экспрессии маркеров гепатоцитарного направления в сравнимой с ППКП степени.

Культивирование клеток в коллагеновом геле является удобной моделью *in vitro*-анализа дифференцировочного потенциала клеток. Постнатальные клетки слюнной железы при культивировании в коллагеновом геле подвергаются дифференцировке в гепатоцитарном направлении без дополнительной стимуляции цитокинами и факторами роста. Таким образом, полученные постнатальные клетки слюнной железы перспективны для трансдифференцировки в гепатоцитарном направлении и могут стать удобным источником клеток для заместительной клеточной терапии заболеваний печени. ●

Работа поддержана РФФИ  
(проект № 11-04-12061-офи-М-2011).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Урываева И.В. Стволовые клетки в регенерации печени. Биология стволовых клеток и клеточные технологии. М.: Изд-во Медицина, 2009. Т. 2. 456 с.
2. Zaret K.S. // Nat. Rev. Genet. 2008. V. 9. P. 329–340.
3. Rambhatla L., Chiu C.P., Kundu P., Peng Y., Carpenter M.K. // Cell Transplant. 2003. V. 12. № 1. P. 1–11.
4. Hay D.C., Fletcher J., Payne C., Terrace J.D., Gallagher R.C., Snoeys J., Black J.R., Wojtacha D., Samuel K., Hannoun Z., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 26. № 105. P. 12301–12306.
5. Soto-Gutierrez A., Navarro-Alvarez N., Caballero-Corbalan J., Tanaka N., Kobayashi N. // Acta Med. Okayama. 2008. V. 62. P. 63–68.
6. Mizumoto H., Aoki K., Nakazawa K., Ijima H., Funatsu K., Kajiwara T. // Transplant. Proc. 2008. V. 40. № 2. P. 611–613.
7. Snykers S., Vanhaecke T., De Becker A., Papeleu P., Vinken M., van Riet I., Rogiers V. // BMC Dev. Biol. 2007. V. 2. № 7. P. 24.
8. De Kock J., Vanhaecke T., Rogiers V., Snykers S. // Aatex. 2008. V. 14. P. 605–611.
9. Гумерова А.А., Шафигуллина А.К., Трондин А.А., Газизов И.М., Андреева Д.И., Калигин М.С., Ризванов А.А., Киясов А.П. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011. Т. 6. № 4. С. 72–81.
10. Sgodda M., Aurich H., Kleist S., Aurich I., Konig S., Dollinger M.M., Fleig W.E., Christ B. // Exp. Cell Res. 2007. V. 313. P. 2875–2886.
11. Seo M.J., Suh S.Y., Bae Y.C., Jung J.S. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 328. P. 258–264.
12. Stock P., Staeger M.S., Muller L.P., Sgodda M., Volker A., Volkmer I., Lutzkendorf J., Christ B. // Transplant. Proc. 2008. V. 40. P. 620–623.
13. Dawn M.D., De Coppi P., Bartsch G., Atala A. // Meth. Enzymology. 2006. V. 419. P. 426–438.
14. Zheng Y.B., Gao Z.L., Xie C., Zhu H.P., Peng L., Chen J.H., Chong Y.T. // Cell Biol. Internat. 2008. V. 32. № 11. P. 1439–1448.
15. Гвазава И.Г., Васильев А.В., Балан О.В., Терских В.В. // Цитология. 2011. Т. 53. № 2. С. 129–134.
16. Hisatomi Y., Okumura K., Nakamura K., Matsumoto S., Satoh A., Nagano K., Yamamoto T., Endo F. // Hepatology. 2004. V. 39. P. 667–675.
17. Sato A., Okumura K., Matsumoto S., Hattori K., Hattori S., Shinohara M., Endo F. // Cloning Stem. Cells. 2007. V. 9. P. 191–205.
18. Matsumoto S., Okumura K., Ogata A., Hisatomi Y., Sato A., Hattori K., Matsumoto M., Kaji Y., Takahashi M., Yamamoto T., et al. // Cloning Stem. Cells. 2007. V. 9. P. 176–190.
19. Давыдова Д.А., Воротеяк Е.А., Брагина Е.Е., Терских В.В., Васильев А.В. // Цитология. 2011. Т. 53. № 4. С. 325–331.
20. Шинин В.В., Черная О.Г., Терских В.В. // Онтогенез. 2002. Т. 33. № 3. С. 176–181.
21. Воротеяк Е.А., Леонова О.Г., Шинин В.В., Васильев А.В., Терских В.В. // Докл. АН. 1999. Т. 369. № 5. С. 695–697.
22. Chermnykh E.S., Vorotelyak E.A., Gnedeva K.Y., Moldaver M.V., Yegorov Y.E., Vasiliev A.V., Terskikh V.V. // Histochem. Cell Biol. 2010. V. 133. P. 567–576.
23. Zhang Y., Jalili R.B., Warnock G.L., Ao Z., Marzban L., Ghahary A. // Am. J. Pathol. 2012. V. 181. № 4. P. 1296–1305.
24. Бабаева А.Г., Шубникова Е.А. Структура, функция и адаптивный рост слюнных желез. М.: Изд-во МГУ, 1979. 192 с.
25. Duncan A.W., Dorrell C., Grompe M. // Gastroenterology. 2009. V. 137. № 2. P. 466–481.
26. Reddy J.K., Rao M.S., Yeldandi A.V., Tan X.D., Dwivedi R.S. // Digestive Diseases Sci. 1991. V. 36. № 4. P. 502–509.
27. Dabeva M.D., Hwang S.G., Vasa S.R., Hurston E., Novikoff P.M., Hixson D.C., Gupta S., Shafritz D.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 8. № 94. P. 7356–7361.