

УДК 576.08

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕЧЕНИ ТРИТОНА *PLEURODELES WALTJ* В УСЛОВИЯХ РОЛЛЕРНОГО ОРГАНОТИПИЧЕСКОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO*

¹Мальцев Д.И., ²Новикова Ю.П., ²Ямскова В.П., ¹Ямсков И.А.¹Учреждение Российской академии наук, Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва;²Учреждение Российской академии наук, Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, e-mail: mal-dima@yandex.ru

Проведено исследование состояния печени тритона *Pleurodeles Waltj* в условиях роллерного органотипического культивирования *in vitro*. Методами иммуногистохимии было показано, что в ткани печени тритона при роллерном органотипическом культивировании происходит увеличение количества апоптотизирующих клеток. Макрофагальный антиген человека LN-5 был обнаружен на поверхности паренхиматозных клеток как в нативной печени тритона, так и после культивирования. При культивировании с фракцией, содержащей биорегулятор из печени млекопитающих, было отмечено, что количество ДНК-синтезирующих клеток уменьшается в 3 раза по сравнению с контрольными культурами. В процессе исследования были обнаружены непигментированные клетки с морфологией макрофага, которые не окрашивались на антиген LN-5. Предполагается, что биорегулятор, выделенный из печени млекопитающих, оказывает протекторное действие на состояние ткани в данных условиях культивирования *in vitro*.

Ключевые слова: биорегуляторы, печень, тритон, роллерное органотипическое культивирование, иммуногистохимия

IMMUNOHISTOCHEMISTRY RESEARCHING OF LIVER NEWT *PLEURODELES WALTJ* UNDER ROLLER ORGANOTYPIC CULTURING *IN VITRO*

¹Maltsev D.I., ²Novikova Y.P., ²Yamskova V.P., ¹Yamakov I.A.¹Nesmeyanov Institute of Organoelemental Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow, e-mail: mal-dima@yandex.ru;²Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow

Study of *Pleurodeles Waltj* newt liver condition under roller organotypic culturing *in vitro* was performed. By the immunohistochemistry method LN-5 antigen macrophage human was detected on the parenchymal cells surface both in the native newt liver and after culturing. In this study we revealed unpigmented cells with macrophage morphology, which were not stained with LN-5 antigen. Biological action of fraction containing bioregulator from mammalian liver expressed decreasing the number of DNA-synthesizing cells approximately in 3 times in comparison with control and decreasing the number of apoptosis cells which increased under this culturing condition. We suggested that bioregulator from mammalian liver affects protective action tissue condition under this type of culturing.

Keywords: bioregulators, liver, newt, roller organotypic culturing, immunohistochemistry

Ранее было показано: в межклеточном пространстве тканей животных и растений присутствуют биорегуляторы новой группы, представляющие собой пептидно-белковые комплексы [1]. Биорегуляторы данной группы оказывают влияние на важнейшие биологические процессы, в том числе на адгезию, миграцию клеток, клеточную дифференцировку и пролиферацию [1]. Во многих исследованиях был продемонстрирован тканеспецифический, но не видоспецифический характер их биологического действия. По сути биорегуляторы этой группы представляют собой «тонких настройщиков» органо-тканевого гомеостаза [1]. Они были выделены в отдельную группу, получившую название мембранотропные гомеостатические тканеспецифические биорегуляторы (МГТБ).

Например, было показано, что МГТБ, выделенные из печени, сыворотки и жел-

чи млекопитающих, по-разному влияют на состояние печени тритона *Pleurodeles Waltj* при роллерном органотипическом культивировании *in vitro* [3]. В отличие от биорегуляторов сыворотки и желчи, МГТБ, полученный из печени, оказывал влияние на пигментированные клетки, что выражалось в увеличении площади образованных ими кластеров в 1,5–1,7 раза по сравнению с контролем.

Согласно источникам, в печени тритона присутствуют пигментные клетки, которые часто располагаются в виде групп, как в кортикальном слое, так и в паренхиме. Пигментированные клетки печени амфибий являются аналогами купферовских клеток печени млекопитающих и функционируют как макрофаги, поглощая разные частицы, например, микроорганизмы, вирусы, а также осуществляют детоксикацию ксенобиотиков [5]. Некоторые исследователи

относят пигментированные клетки печени амфибий к рекрутированным макрофагам, которые принадлежат к мононуклеарнофагоцитарной системе и способны автономно синтезировать меланин, но в то же время не являются меланоцитами, происходящими из клеток нервного гребня [8]. Распределение пигмента в этих клетках печени зависит от ряда причин, например, оно сезонно изменяется: значительно уменьшается ко второй половине зимы и увеличивается весной и летом [5].

Для объяснения способности МГТБ, выделенного из печени млекопитающих, влиять на пигментированные клетки печени тритона при роллерном органотипическом культивировании были сделаны следующие предположения [3]. Во-первых, образованию крупных клеточных кластеров может способствовать активация миграции этих клеток. Во-вторых, возможно, что увеличение площади кластеров пигментированных клеток связано с усилением их фагоцитарной активности и внутриклеточным накоплением окрашенных продуктов деградации гемоглобина, ферритина, гемосидерина. Не исключено также, что МГТБ печени стимулирует биосинтез меланина в данных условиях культивирования, и увеличение количества пигмента в клетках способствует их визуальной идентификации. Кроме того, возможно, что МГТБ печени стимулирует дифференцировку клеток предшественников макрофагов, которые дифференцировались в зрелые меланомакрофаги. Последние два предположения представляются менее вероятными по сравнению с первыми двумя: в условиях длительного культивирования *in vitro* затруднительно представить активно протекающие пролиферацию и дифференцировку клеток, а также стимуляцию биосинтетических процессов.

В настоящей работе была предпринята попытка с помощью иммуногистохимических методов оценить состояние ткани печени тритона в условиях роллерного органотипического культивирования.

Для выявления экспрессии белков-маркеров основных клеточных типов использовали метод непрямого иммуноокрашивания с применением различных специфических первых и вторых антител. Окрашивание вторичных антител также проводили с использованием пероксидазной метки. Методами иммуногистохимии изучали состояние ткани печени до и после культивирования, а также после действия МГТБ, выделенного из печени млекопитающих, а именно исследовали клеточную пролиферацию, апоптоз клеток, проводили окрашивание клеток на макрофагальный антиген человека LN-5.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования были взрослые тритоны *Pleurodeles waltl* (Urodela) (9–12 мес., длина 10–12 см, 12 шт.), полученные из аквариальной ИБР им. Н.К. Кольцова РАН.

Тритоны были наркотизированы в 0,1 %-ном растворе MS-222. После наркотизации животных декапитировали. Изолированную печень помещали в стерильные чашки Петри (3,5 см) в бессывороточную среду для амфибий. С помощью бинокля, оснащенного источником холодного света, печень разрезали на фрагменты размером 3×3 мм, каждый фрагмент включал как паренхиму, так и соединительную ткань капсулы.

Органотипическое роллерное культивирование ткани печени тритонов проводили, используя среду культивирования, состоящую из среды 199 (70%), дистиллированной воды (30%), буфера HEPES (30 мкл на 100 мл среды), гентамицин сульфата (200 мкл на 100 мл среды) и 10 %-ной эмбриональной бычьей сыворотки HyClone (10 мл на 100 мл среды). Перед внесением в пузырьки среду стерилизовали пропусканием через мембранные фильтры типа «Millex-GV» фирмы Millipore с размером пор 0,2 мкм. Во флаконы из темного стекла к 5 мл среды добавляли фрагменты печени: в опытных сериях в среду однократно добавляли фракцию супернатанта экстракта печени (0,1 мл) в конечной концентрации, соответствующей 10^{-12} мг/мл, которую получали последовательным десятикратным разбавлением исходного препарата в питательной среде 199; в контрольной серии во флаконы ничего не добавляли. Все флаконы закрывали стерильными крышками, затем пленкой Parafilm M и культивировали со скоростью вращения 35 об/мин в течение 3 суток при $19 \pm 1^\circ\text{C}$. Для оценки клеточной пролиферации в культуральную среду добавляли бромдезоксисуридин (аналог тимидина).

Приготовление гистологических срезов. Фиксацию проводили 4 % раствором формалина в фосфатном буфере. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Срезы для иммунохимии размещали на желатинизированных стерильных стеклах и не окрашивали.

Методы иммунохимического анализа. Перед инкубацией с первичными антителами срезы освобождали от парафина, проводя их через ксилолы и спирты, и затем тщательно отмывали в фосфатном буфере (PBS, pH = 7,4). После этого срезы обрабатывали (30 мин) в 0,1 %-ном растворе бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigma) на PBS, вновь отмывали и инкубировали в растворе, увеличивающем проницаемость антител (0,25 % Triton X-100 (Sigma, США) на 0,1 %-м растворе Tween/PBS (Sigma, США)). Затем проводили обработку первичными антителами ($t = 20^\circ\text{C}$, в течение ночи).

Растворы первых антител включали 5–10 % готового раствора BSA для устранения неспецифического связывания и 0,3 % Triton X-100 – для улучшения проницаемости первичных антител.

После инкубации с первичными антителами срезы отмывали в PBS и наносили вторичные антитела Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, США). Рабочая концентрация вторичных антител составляла 1:50. В ряде случаев в качестве вторичных применяли антитела, связанные с пероксидазой хрена (HRP), и реакцию проявления окраски с DAB (Sigma). После

отмывания срезы заключали под покровные стекла в смесь глицерина с буфером (1:10) с добавлением DABCO (Sigma).

Окрашивание на клеточную гибель методом TUNEL. Метод TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) маркирует клетки с ДНК, деградирующей в результате активации Ca/Mg-зависимой эндонуклеазы. Окрашивали компонентами кита DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega Corporation, США) в соответствии с протоколом производителя. Окрашенные срезы заключали в смесь глицерин-PBS (1:9) с добавлением DABCO (Sigma) под покровные стекла.

Изучение локализации и интенсивности иммунохимического окрашивания проводили с помощью микроскопа Olympus AH-3. При анализе рассматривалась флуоресценция как в зелёном канале (канал, в котором дает свечение FITC метка), так и в красном (для исключения неспецифического окрашивания), а также и в синем канале (для изучения окраски Hoechst).

Морфометрическая оценка гистологических срезов. Оценку количества ДНК-синтезирующих клеток, меченых BrdU, проводили с помощью инструмента анализа изображений – «счетчик» программы Adobe Photoshop CS5.1. Все фотографии срезов были получены на микроскопе Olympus AH-3 с цифровой камерой. Было просчитано по 2000 паренхиматозных клеток как в контрольной, так и в опытной сериях; ИМЯ рассчитывали на 100 клеток. Статистическая обработка данных производилась с помощью критерия Стьюдента.

Получение МГТБ из печени млекопитающих. Экстракт печени крыс получали после перфузии через портальную вену 10 мл водно-солевого раствора Рингера (0,15 M NaCl; 1 mM CaCl₂; 5 mM KCl; 1 mM HEPES), удаляя основную массу крови. Печень разрезали на фрагменты размером приблизительно 1,5–2,0 см³ и помещали на 2–2,5 ч при +4...+8°C в экстрагирующий раствор. После центрифугирования (2000 g, 30 мин) к тканевому экстракту добав-

ляли сульфат аммония до образования насыщенного раствора соли (78 г сухой соли на 100 г раствора), оставляли на 72 часа при +4°C, после чего выпавшие белки отделяли центрифугированием в течение 30 мин (15000 g), +4°C. Супернатант экстракта диализовали против дистиллированной воды в течение 4 дней при +4°C с многократной сменой воды (в соотношении 1:50). Процедуру высаливания повторяли. Полученный таким образом супернатант экстракта концентрировали в 8–10 раз, используя вакуумный ротационный испаритель (+37°C). Данную фракцию исследовали адгезиометрическим методом на наличие мембранотропной активности [4], изучали состав фракции масс-спектрометрическим методом, а также изучали на модели роллерного органотипического культивирования ткани печени тритона *in vitro*.

MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ проводили на MALDI-времетраплетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенном УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона и в тандемном режиме (MS/MS).

Электрофорез в 15%-м полиакриламидном геле проводили в денатурирующих условиях по методу Лэмли (толщина геля – 0,75 мм, размер 8·10 см) [7].

Результаты исследования и их обсуждение

Иммуногистохимическое исследование интактной печени тритона показало, что при окрашивании ядерным красителем Hoechst расположение ядер соответствует таковому в паренхиме нормальной печени тритона. Обнаружено небольшое количество гибнущих клеток в интактной ткани печени (показаны стрелками). Также обнаружено увеличение плотности клеток в области стенок сосудов (рис. 1).

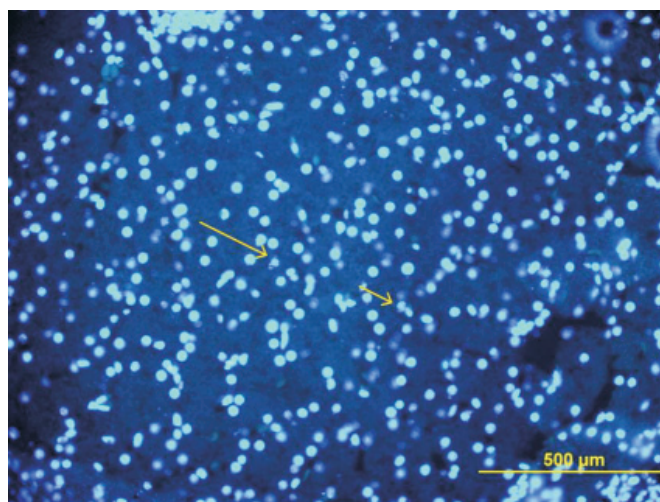


Рис. 1. Окрашивание нативной ткани печени ядерным красителем Hoechst. (Стрелками показаны гибнущие клетки); увеличение ок.х10, об.х20

Проведено иммунохимическое окрашивание на отрицательный контроль антител. Вместо первичных антител наносился раствор для разведения антител и далее сре-

зы инкубировались в соответствии с протоколом окрашивания. Контроль вторых антител специфического окрашивания не выявил.

Для исследования апоптотических клеток было проведено TUNEL-окрашивание. В интактной ткани печени тритона обнаружено неспецифическое окрашивание клеток крови, которое наблюдается как в красном, так и в зелёном канале (рис. 2, А). Анало-

гично в обоих каналах были видны ядерные эритроциты. Специфическое окрашивание во всех образцах не выявлялось. Из чего следует вывод, что в интактной ткани печени тритона отсутствуют апоптотические клетки.

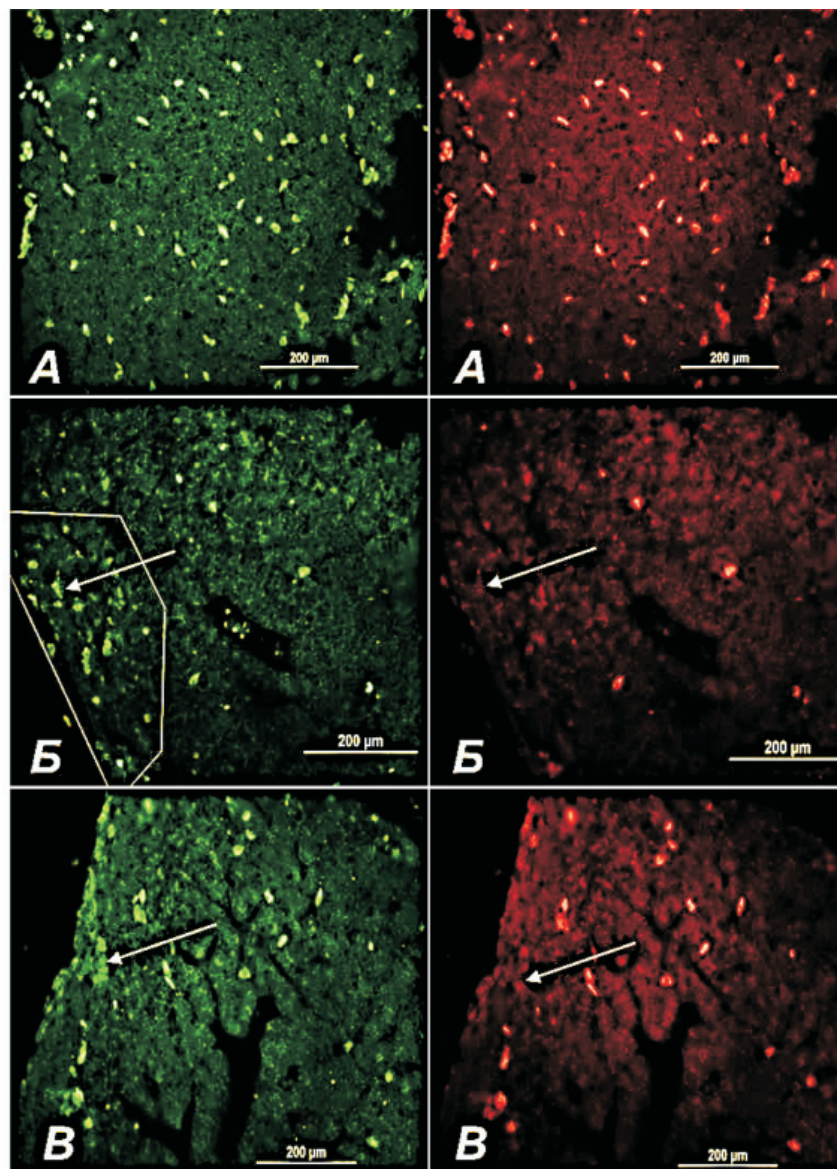


Рис. 2. TUNEL-окрашивание в печени тритона:
 А – до культивирования (стрелками показаны неспецифически окрашенные клетки крови);
 Б – в контрольных образцах (желтой рамкой показана зона специфически окрашенных апоптотических клеток); В – в образцах с добавлением супернатанта экстракта печени крыс (стрелками показаны специфически окрашенные апоптотические клетки); увеличение ок.х10, об.х20

После роллерного органотипического культивирования в ткани печени тритона наряду с неспецифическим окрашиванием клеток крови наблюдается также специфическое окрашивание, отличающееся по интенсивности и характеру свечения, групп клеток, которое свидетельствует об увеличении числа

клеток, входящих в апоптоз (рис. 2, Б). Эти клетки имели другое по интенсивности свечение и не имели сигнала в красном канале. Большинство меченых клеток наблюдалось на периферии среза, в зоне максимально подверженной механическим воздействиям. Клетки образовали группы и скопления. Та-

ким образом, данный метод позволил выявить апоптотические клетки в печени тритона после роллерного органотипического культивирования в течение трех дней.

В данной работе было проведено исследование фракции, содержащей биорегулятор, выделенный из печени крыс [3]. Данный биорегулятор относится к новой группе мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов (МГТБ), обнаруженных ранее в различных тканях млекопитающих [1]. МГТБ имеют сложный состав, белковая компонента которого содержит небольшие пептиды, проявляющие мембранотропную активность, характерную для биорегуляторов данной группы, и белок, относящийся к суперсемейству сывороточных альбуминов. Результаты MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа супернатанта тканевого экстракта печени следующих показали присутствие следующих молекулярных ионов: 1510, 1677, 1734, 1871, 1996, 2215, 2299, 2908, 3007, 3640 Да. Методом SDS-ПААГ-электрофореза было показано наличие в данной фракции высокомолекулярного белка (рис. 3). Методом триптического гидролиза было установлено, что он относится к семейству сывороточных альбуминов. Данный пептидно-белковый комплекс составляет основу биорегуляторов данной группы, проявляющих тканеспецифическое биологическое действие [1].

В ткани печени, культивированной с супернатантом тканевого экстракта печени крыс, при иммунохимическом TUNEL-окрашивании наблюдалось изменение локализации меченых клеток: в отличие от контрольной серии, где обнаруживались группы меченых апоптотических клеток, в опытной серии наблюдались только единичные меченые клетки (рис. 2, В). Это, возможно, свидетельствует о меньшем количестве гибнущих клеток и о протекторном влиянии фракции супернатанта на клетки печени тритона.

Состояние печени тритона оценивалось также по наличию пролиферативных процессов. Клетки в фазе синтеза ДНК регистрировали с помощью иммунохимического окрашивания антителами против BrdU.

Выявление предшественника синтеза ДНК-BrdU проводили окрашиванием с помощью пероксидазной метки (рис. 4). В контрольных сериях количество ДНК-синтезирующих клеток составило $1,1 \pm 0,5$; в опытных сериях – $0,37 \pm 0,34$ ($p \leq 0,05$). Полученные результаты согласуются с ранее полученными данными об уменьшении количества ДНК-синтезирующих паренхиматозных клеток печени мышей при культивировании с биорегулятором, выделенным из печени крыс [4].

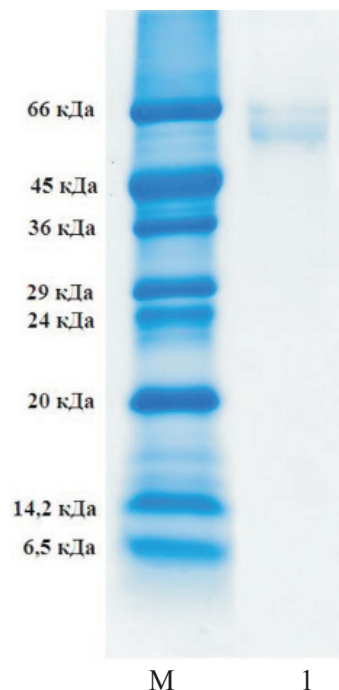


Рис. 3. SDS-Электрофорез в ПААГ супернатанта тканевого экстракта, выделенного из печени (Дорожка 1 – Супернатант экстракта печени крысы. Дорожка М – Маркеры (апротинин из легкого быка – 6,5 кДа, α -лактальбумин – 14,2 кДа, соевый ингибитор трипсина – 20,0 кДа, трипсиноген из поджелудочной железы быка – 24,0 кДа, карбоангидраза – 29,0 кДа, глицеральдегид – 3 – фосфатгидрогеназа – 36,0 кДа, овальбумин – 45,0 кДа, альбумин – 66, 0 кДа)

Впервые в этом исследовании было проведено иммунохимическое окрашивание на наличие макрофагального антигена человека в клетках интактной печени тритона.

На рис. 5, А показано флуоресцентное свечение специфического макрофагального антигена человека в интактной печени тритона; специфичность подтверждается отсутствием свечения в красном канале.

В ткани печени тритона после 3-дневного культивирования также наблюдается иммунохимическое окрашивание на макрофагальный антиген человека LN-5 на поверхности паренхиматозных клеток (рис. 5, Б). Следует также отметить, что в ткани печени тритона после культивирования с добавлением супернатанта тканевого экстракта печени крыс наблюдается иммунохимическое окрашивание участков отдельных клеток против макрофагального антигена человека (рис. 5, В). Наличие иммунохимического окрашивания этих клеток, видимого как в красном, так и в зеленом канале, может быть связано с неспецифической флуоресценцией фагоци-

тированного ими материала. Кроме того, наблюдается общее снижение интенсивности реакции во всех культивированных

образцах, что является результатом повреждающего воздействия условий культивирования тканей.

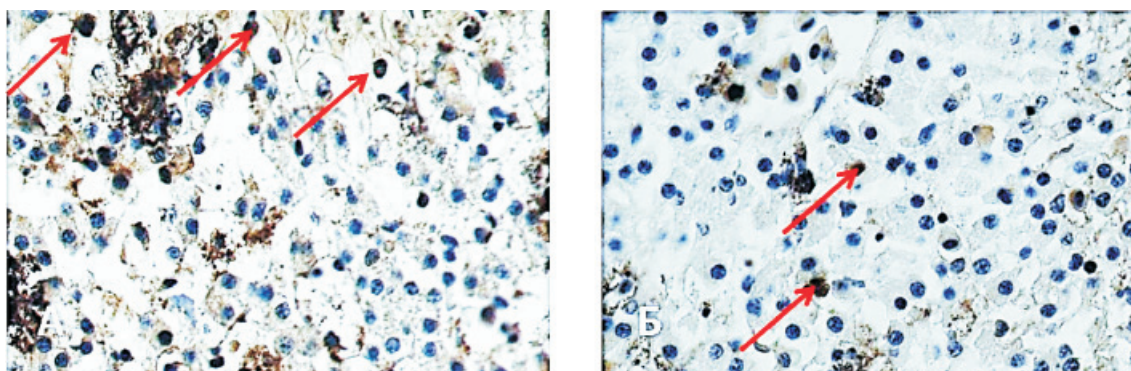


Рис. 4. Иммунохимическое окрашивание с пероксидазной меткой клеток, синтезирующих ДНК, в печени тритона в опытных (А) и контрольных сериях (Б). (Стрелками указаны клетки, синтезирующие ДНК); увеличение ок.х10, об.х20

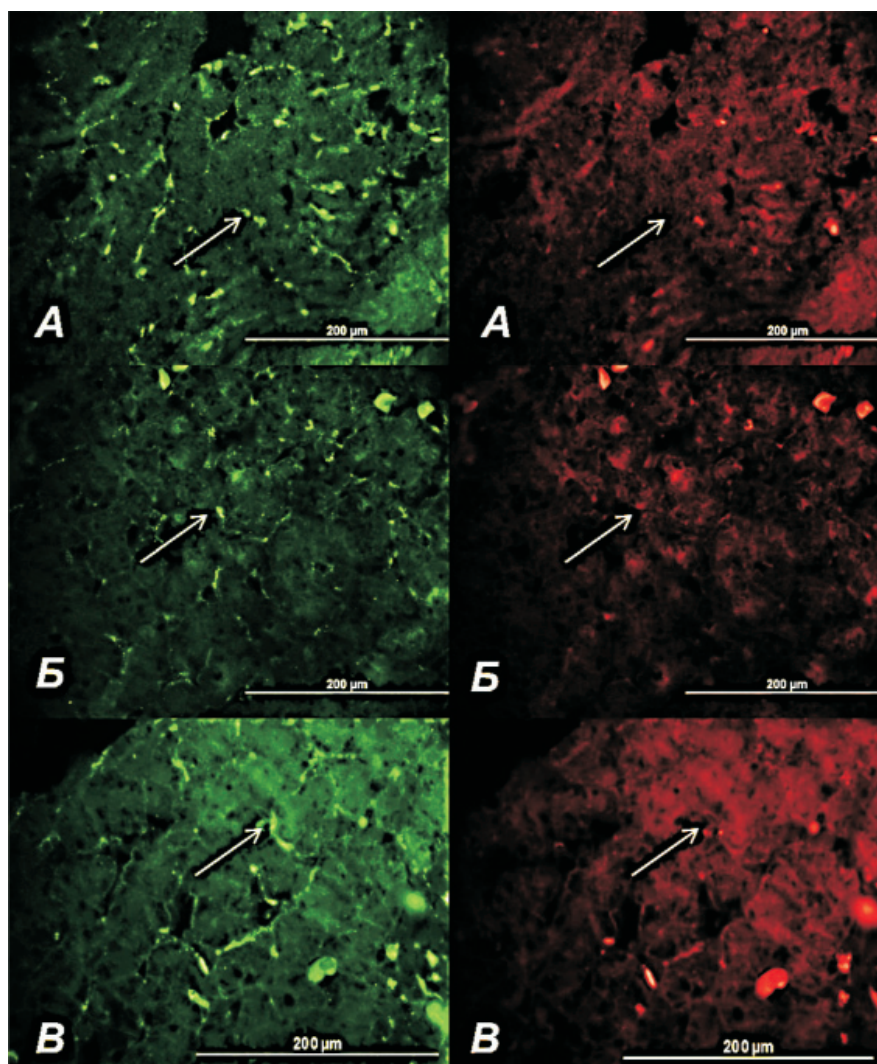


Рис. 5. Иммунохимическое окрашивание против макрофагального фенотипа: А – в интактной печени тритона; Б – после культивирования в контрольных образцах; В – после культивирования в присутствии супернатанта экстракта печени крысы (стрелками указан специфический антиген на поверхности клеток); увеличение ок.х10, об.х20

Таким образом, с помощью метода иммуногистохимии было впервые продемонстрировано наличие экспрессии макрофагального антигена человека на поверхности клеток печени тритона.

На рис. 6 представлены гистологические срезы ткани печени тритона после иммуногистохимического окрашивания на присутствие макрофагального антигена человека и микрофотография, полученная в фазово-контрастной микроскопии.

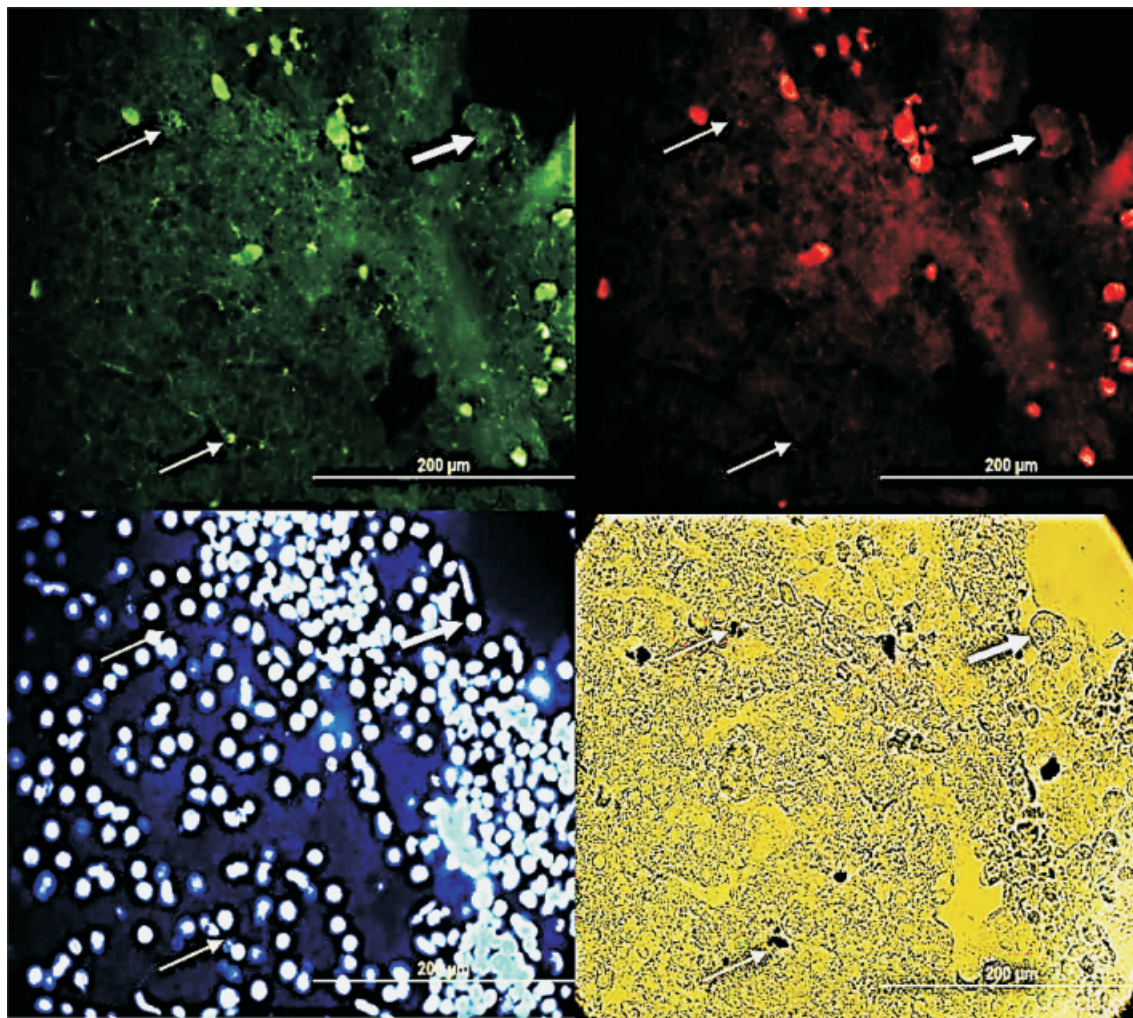


Рис. 6. Исследование на присутствие макрофагального фенотипа в печени тритона после 3-дневного культивирования (толстой стрелкой показана клетка с морфологией макрофага, тонкими стрелками показаны места специфического свечения); увеличение ок.х10, об.х20

Полученные данные показывают, что в зеленом канале обнаруживается специфическое свечение, которое указывает на присутствие данного антигена на поверхности клеток печени тритона (тонкие стрелки), окрашенные клетки могут быть пигментированными, в то же время в некоторых положительно окрашиваемых клетках визуально не обнаруживается присутствие пигмента. Следует также отметить, что клетки, обладающие типичной морфологией макрофагов не окрашивались специфически на данный антиген (толстые стрелки).

Заключение

Таким образом, проведенное иммунохимическое исследование печени тритона показало, что в отличие от интактной ткани, после трех дней роллерного органотипического культивирования появляются апоптотические клетки, которые локализованы по краям фрагмента ткани. Однако в присутствии фракции биорегулятора, выделенного из печени крыс, можно наблюдать лишь единичные апоптотические клетки, расположенные по всему объему культивируемого фрагмента ткани. Также было

установлено, что биорегулятор, выделенный из печени млекопитающих, способствовал уменьшению числа ДНК-синтезирующих паренхиматозных клеток.

В настоящем исследовании впервые было продемонстрировано присутствие макрофагального антигена LN-5 человека на поверхности клеток печени тритона. В этом аспекте можно добавить, что присутствие данного антигена возможно не только у макрофагов, но и у гистиоцитов, представляющих собою так называемые блуждающие клетки, способны к амёбoidному движению и выполняющих также защитную функцию, которая выражается в поглощении различных крупных частиц [6]. Кроме того, полученные результаты предполагают, что наличие на поверхности клеток печени макрофагального антигена может быть связано с миграцией клеток, выполняющих функцию макрофагов в печени амфибий.

Визуально отмеченное нами изменение количества окрашенных апоптотических клеток и клеток, на поверхности которых обнаруживается макрофагальный антиген, при воздействии фракции, содержащей биорегулятор, выделенный из печени млекопитающих, позволяет предположить не только его протекторное действие на фагоцитирующие клетки иммунной системы тритона, но и их дополнительную активацию.

Список литературы

1. Ямска В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. // Новые экспериментальные и теоретические аспекты в биорегуляции. Механизм действия мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов. – Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2012. – 136 p.
2. Ямсков И.А., Благодатских И.В., Краснов М.С., Борисенко А.В., Маргасюк Д.В., Вечеркин В.В., Скрипникова В.С., Назарова П.А., Битко С.А., Березин Б.Б., Яминский И.В., Мешков Г.Б., Грачев С.А., Серебрякова М.В., Рыбакова Е.Ю., Ямска В.П. Физико-химические свойства биологически активных в микродозах регуляторных белков, выделенных из различных тканей млекопитающих // Изв. АН Сер. Хим. – 2009. – № 3. – С. 623–628.
3. Ямска В.П., Борисенко А.В., Краснов М.С., Ильина А.П., Рыбакова Е.Ю., Мальцев Д.И., Ямсков И.А. Влияние биорегуляторов, выделенных из печени, сыворотки крови и желчи млекопитающих, на состояние ткани печени тритона при органотипическом культивировании // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2010. – № 3. – С. 156–159.

4. Ямска В.П., Модянова Е.А., Резникова М.М., Маленков А.Г. Высокоактивные тканеспецифические адгезионные факторы печени и легкого // Молекулярная биология. – 1977. – т.11. – № 5. – С. 1147–1154.

5. Barni S., Bertone V., Croce A.C., Bottiroli G., Bernini F., Gerzeli G. Increase in liver pigmentation during natural hibernation in some amphibians // J. Anat. – 1999. – Vol. 195. – P. 19–25.

6. Kmiec Z. // Cooperation of liver cells in health and disease // Adv Anat Embryol Cell Biol. – 2001. – 161:III–XIII. – P. 1–151.

7. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.

8. Sichel G., Scalia M., Corsaro C. Amphibia Kupffer cells // Microsc. Res. Tech. – 2002. – Vol. 57. – P. 477–490.

References

1. Yamskova V.P., Krasnov M.S., Yamskov I.A. // New experimental and theoretical aspects in bioregulation. The mechanism of action of tissue-specific homeostatic membranotropic bioregulators Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2012. 136 p.
2. Yamskov I.A., Blagodatskih I.V., Krasnov M.S., Borisenko A.V., Margasyuk D.V., Vecherkin V.V., Skripnikova V.S., Nazarova P.A., Bitko S.A., Berезin B.B., Yaminski I.V., Meshkov G.B., Grachev S.A., Serebryakova M.V., Rybakova E.YU., Yamskova V.P. Physical and chemical properties regulatory proteins isolated from various mammalian tissues, of biologically active at microdoses, // Rus Chem Bull. 2009. no. 3. pp. 623–628.
3. Yamskova V.P., Borisenko A.V., Krasnov M.S., Il'ina A.P., Rybakova E.YU., Maltsev D.I., Yamskov I.A. Effect of bioregulators isolated from the liver, blood serum, and bile of mammals on the state of newt liver tissue in organotypic culture // Bull Exp Biol Med. 2010. no. 3. pp. 156–159.
4. Yamskova V.P., Modyanova E.A., Reznikova M.M., Malenkov A.G. Ultraactive tissue-specific adhesion factors from lung and liver. // Mol Biol. 1977. т.11. no. 5. pp. 1147–1154.
5. Barni S., Bertone V., Croce A.C., Bottiroli G., Bernini F., Gerzeli G. Increase in liver pigmentation during natural hibernation in some amphibians // J. Anat. 1999. Vol. 195. pp. 19–25.
6. Kmiec Z. // Cooperation of liver cells in health and disease. // Adv Anat Embryol Cell Biol. 2001. 161:III–XIII. 1–151.
7. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227. pp. 680–685.
8. Sichel G., Scalia M., Corsaro C. Amphibia Kupffer cells // Microsc. Res. Tech. 2002. Vol. 57. pp. 477–490.

Рецензенты:

Голиченков В.А., д.б.н., профессор, зав. кафедрой эмбриологии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва;

Шарова Н.П., д.б.н., зав. лабораторией биохимии Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, г. Москва.

Работа поступила в редакцию 21.03.2014.