

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ



УДК 616.36+616.831-021.6:57.08:547.466

ОЦІНКА РІВНЯ ЦИТОКІНІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ПЕЧІНКОВІЙ ЕНЦЕФАЛОПАТІЇ У ЩУРІВ

Е. Г. Манжалій, О. В. Вірченко, Т. М. Фалалєєва, Т. В. Берегова,
О. М. Савчук, В. Є. Кондратюк

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОЗ України, м. Київ

ESTIMATION OF THE CYTOKINS LEVEL IN EXPERIMENTAL HEPATIC ENCEPHALOPATHY IN RATS

E. G. Manzhaliy, O. V. Virchenko, T. M. Falaleyeva, T. V. Beregova,
O. M. Savchuk, V. E. Kondratyuk

Bogomolets National Medical University, Kyiv

Печінкова енцефалопатія (ПЕ) — це порушення функціонування головного мозку, що супроводжується неврологічними та психічними розладами, виникає внаслідок тяжкого ураження печінки, зокрема, цирозу печінки (ЦП). Вираженість ПЕ після трансплантації печінки зменшується, а нейродегенеративні порушення — загострюються.

Основним етіологічним чинником захворювання є підвищення концентрації аміаку в тканині головного мозку [1]. У механізми нейротоксичної дії аміаку залучені стимуляція іонних транспортерів, зокрема, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ — котранспортеру — 1, неселективного катіонного каналу та збільшення рівня мембранного білка астроцитів аквапорину — 4 [1]. Ці механізми зумовлюють зв'язок між накопиченням аміаку в тканині головного мозку та виникнення його набряку, що супроводжується значним підвищенням внутрішньочерепного тиску та зміщенням (дислокацією) його структур. Ці зміни спостерігають у 80% пацієнтів за гострої форми ПЕ, вони найбільш часто спричиняють летальний кінець (у 70%). Набряк астроцитів переважає при ПЕ, значні чи постійні зміни нейронів при цьому не виявлені, тому ПЕ визначають як первинну астрогліопатію. Доведений зв'язок між ПЕ, накопиченням аміаку у

Реферат

Вивчений зв'язок змін профілю цитокінів за експериментальної печінкової енцефалопатії (ПЕ) у щурів. Дослідження проведене на 20 лабораторних щурах, у яких моделювали ПЕ шляхом введення CCl_4 . Рівень інтерлейкінів (ІЛ), зокрема, ІЛ—1 β , ІЛ—4, ІЛ—10 та інтерферону— γ (ІФН— γ) визначали імуноферментним методом з використанням поліклональних антитіл. Встановлено збільшення вмісту прозапальних ІЛ—1 β та ІФН— γ у сироватці крові щурів за індукованої ПЕ відповідно на 57,9 та 39,5% ($p < 0,05$) у порівнянні з таким у контролі та компенсаторне збільшення рівня протизапальних ІЛ—4 та ІЛ—10 — на 34,6 та 75,9% ($p < 0,05$). Отримані результати підтверджують роль цитокінів у патогенезі ПЕ, визначення їх рівня є важливим критерієм прогнозування післятрансплантаційних ускладнень. Запалення та профіль цитокінів є основною мішенню у терапії ПЕ у хворих на цироз печінки.

Ключові слова: цироз печінки; печінкова енцефалопатія; цитокіни; трансплантація печінки; експеримент.

Abstract

Connection of the cytokines profile with experimental hepatic encephalopathy (HE) in rats was studied. Investigation was conducted on 20 laboratory rats, in which HE was simulated, using CCl_4 injection. The interleukins (IL) level, including, IL—1 β , IL—4, IL—10 and interferon— γ (IFN— γ), was determined using immunoassay method with the help of polyclonal antibodies. Enhancement of the proinflammatory IL—1 β and IFN— γ content in the rats blood serum while induced HE by 57.9 and 39.5% accordingly ($p < 0.05$), comparing with such in a control and the compensation enhancement of the anti-inflammatory IL—4 and IL—10 level by 34.6 and 75.9% ($p < 0.05$) was established. The results obtained confirms the cytokines role in pathogenesis of HE, determination of their level constitutes significant criterion for the posttransplantation complications prognostication. Inflammation and profile of cytokines constitute the main target in therapy of HE in patients, suffering liver cirrhosis.

Keywords: liver cirrhosis; hepatic encephalopathy; cytokines; hepatic transplantation; experiment.

тканині головного мозку, його набряком та пошкодженням астроцитів, проте, є дані, що вміст аміаку може збільшуватися і за відсутності симптомів ПЕ, більш того, у 20% пацієнтів за ЦП та ПЕ застосування сорбенту лактулози неефективне.

Встановлено суттєву роль церебрального та периферійного запалення за гострої та хронічної форми ПЕ. При гепатиті та ЦП відзначено збільшення рівня багатьох цитокінів, зокрема, родини фактору некрозу пухлин (ФНП), ІЛ—1 β , ІЛ—6, вміст яких корелює з вираженістю

фіброзу [2, 3]. При культивуванні астроцитів з прозапальними цитокинами ФНП- α , ІЛ-1 β , ІЛ-6 та ІФН- γ спостерігали їх набряк, це свідчило, що виділення запальних цитокинів — не лише маркер ураження печінки, а й потенційний чинник, що ускладнює перебіг ПЕ та сприяє посиленню набряку тканини головного мозку.

Синтез цитокинів є індукцибельним процесом: експресія генів цитокинів починається у відповідь на потрапляння в організм патогенів, антигенне подразнення або пошкодження тканин. Найбільш агресивними провокуючими чинниками для синтезу цитокинів є компоненти клітинних стінок мікроорганізмів, зокрема, ліпополісахариди, пептидоглікани, мураміддипептиди, вміст яких значно збільшується при ЦП. Без антигенної стимуляції імунної системи цитокини функціонують на мінімальному рівні. Цитокини індують або пригнічують синтез самих себе, інших цитокинів та їх рецепторів, беручи участь у формуванні їх мережі. Власні цитокини клітини нерідко змінюють характер взаємодії інших цитокинів на ту ж саму клітину. Ця взаємодія може бути синергічною, додатковою, інгібуючою або навіть зумовлювати формування нового ефекту, невластивого такому окремим цитокинів. Цитокини — антигеннеспецифічні чинники. Проте, визначення їх концентрації в крові дає інформацію про функціональну активність різних типів імуннокомпетентних клітин, тяжкість запального процесу, його перехід на системний рівень, прогноз захворювання. За надмірної продукції цитокинів та інших медіаторів запалення порушується регулююча функція імунної системи, відбувається їх безконтрольне виділення, порушення балансу між прозапальними та протизапальними цитокинами з переважанням прозапальних. У зв'язку з цим, медіатори запалення з факторів, що захищають організм, стають такими, що пошкоджують [4].

Складність імунної відповіді при ЦП в тому, що цитокини можуть мати прямо протилежні ефекти — проци-

ротичний або гепатопротекторний. Баланс між прозапальними та протизапальними чинниками є вирішальним для прогресування ЦП, а отже, і ПЕ. Прозапальними є С-реактивний протеїн, Е-селектин, ендотоксин, ФНП, ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-12, ІЛ-18, макрофагальний хемоатрактантний протеїн, лейкотрієни тощо. До протизапальних, а відповідно, гепатопротекторних, належать ІЛ-4, ІЛ-10, трансформуючий фактор росту (TGF- β), тромбоцитарний фактор росту (PDGF) [4].

В дослідженні ми вивчали окремі ланки мережі цитокинів, зокрема, ІЛ-1, ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-10, ІФН- γ . ІЛ-1 бере участь практично в усіх етапах імунної відповіді: активує CD4 лімфоцити, впливає на диференціювання Т- і В-лімфоцитів та інших імуннокомпетентних клітин, активує цитотоксичні Т-лімфоцити і NK-клітини, впливає на функцію клітин ендотелію, м'язів і хряща, базофільних гранулоцитів, плазмочитів, кровотворних клітин. Він здатний індукувати більшість місцевих і загальних проявів запальної реакції: підвищує рухливість нейтрофільних гранулоцитів, є хемоатрактантом, у вогнищі запалення сприяє активації клітин і збільшенню продукції ними інших цитокинів (ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-8) та простагландинів, стимулює фагоцитоз, генерацію супероксид-радикалів, зумовлює дегрануляцію тканинних базофілів, бере участь у регуляції продукції інших цитокинів. Усе це сприяє перебігу ексудативної та проліферативної складових запальної реакції [4]. Ще одним прозапальним цитокином є ІФН- γ , клітинами-продуцентами якого є Т-хелпери 0 і 1 типів (CD4), клітини імунної пам'яті (CD45RA), Т-кілери (CD8), NK-клітини (CD16, CD56), дендритні клітини (CD23, CD35), В-лімфоцити (CD22, CD23). Секреція ІФН- γ відбувається під впливом практично будь-яких антигенів. ІФН- γ спричиняє як захисні, так і патологічні ефекти. При інфікуванні внутрішньоклітинними паразитами ІФН- γ активує макрофаги, що сприяє загибелі паразитів. Знищення внутрішньоклітинних пара-

зитів під дією ІФН- γ відбувається і в немакрофагальних клітинах. ІФН- γ підсилює протипухлинну дію цитотоксичних лімфоцитів. Дуже важливою функцією ІФН- γ є посилення експресії молекул головного комплексу гістосумісності (ГКГ) I і II класу на поверхні клітин. Якщо це посилення відбувається на поверхні патологічно-зміненої клітини, вона стає більш доступною мішенню для подальшого руйнування. Якщо дія спрямована на антигенпрезентуючу клітину, активується формування імунної відповіді [4].

ІЛ-4 та ІЛ-10 — інтерлейкіни, що проявляють протизапальну дію. Джерелом ІЛ-4 є Т-хелпери, стимульовані мітогеном, тканинні базофіли. Встановлено, що ІЛ-4 зумовлюють диференціювання незрілих Т-хелперів (T0) в Т-хелпери 2 типу, тобто, гуморальної ланки імунітету, та зменшує утворення Т-хелперів 1 типу, ІФН- γ , ІЛ-12, таким чином, послаблюючи клітинну ланку імунітету. ІЛ-4 пригнічують активацію макрофагів в M1 тип, залучений в активацію запалення, стимулюють перетворення їх в M2 тип, який, разом з цитокинами ІЛ-10 та TGF- β , забезпечують експресію ГКГ II класу, зменшення вираженості запалення та сприяє регенерації тканин. ІЛ-10 — прозапальний цитокин, що здійснює різноплановий вплив на організм: зменшує утворення Т-хелперів 1 типу, блокує активність NF- κ B, інгібує ліпополісахарид-індукований синтез ФНП- α , ІЛ-1 β , ІЛ-12, ІФН- γ [4].

Хоча ефекти цитокинів сьогодні досить ретельно досліджені, питання перебігу реакції цитокинів при ПЕ різної тяжкості недостатньо вивчені. Нез'ясована реакція протизапальної системи при ПЕ, а саме, зміни рівня ІЛ-4 та ІЛ-10. Не вирішені питання, чи є взаємозв'язок між концентрацією цитокинів у сироватці крові та тяжкістю ПЕ, як впливає рівень цитокинів на імуносупресивну терапію після трансплантації печінки.

Мета дослідження — оцінка змін профілю цитокинів при експериментальній ПЕ у щурів, встановлення діагностичної цінності визначення змін рівня цитокинів.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведені на білих лабораторних щурах, у яких моделювали ЦП та ПЕ.

Робота здійснена на базі Інституту біології Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Дослідження проведені за нормативами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей, загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (2001), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі. Тварин утримували в умовах акредитованого віварію згідно з стандартними правилами з упорядкування, устаткування та утримання експериментальних біологічних клінік (віваріїв).

Тварини розподілені на 2 групи по 10 особин у кожній: I група — інтактні тварини, II група — дослідні. Для моделювання експериментального ЦП та ПЕ тваринам дослідної групи внутрішньоочеревинно вводили 1 мл/кг 15% розчину CCl_4 в оливковій олії 4 рази на тиждень впродовж 4 тиж [5]. Всі тварини мали вільний доступ до води та їжі. По закінченні введення CCl_4 підтверджували порушення функції головного мозку (виникнення ПЕ) на моделі вироблення харчового умовного рефлексу [5].

Після дослідження неврологічних змін тварин виводили з експерименту шляхом декапітації. Кров збирали у центрифужні пробірки без антикоагулянту та лишали на водяній бані (при температурі 38 °C) для швидкого утворення фібринового згустка. Через 30 хв обережно скляною паличкою видаляли згусток крові, зразки центрифугували зі швидкістю 3500 об./хв протягом 20 хв. Отриманий супернатант (сироватку) відбирали в окремі одноразові мікропробірки, заморожували при температурі -20 °C та використовували для подальших досліджень.

Концентрацію ІФН- γ , ІЛ-1 β , ІЛ-10 та ІЛ-4 у сироватці крові щурів визначали імуноферментним мето-

дом (ELISA) з використанням специфічних поліклональних антитіл. Дослідження проводили у мікропланшетах з сорбційною здатністю за загальною методикою для розчинних білків. Антиген, попередньо розведений у 0,1 моль $NaHCO_3$ буфері, рН 9,6, до концентрації 10 мкг/мл, інкубували у комірках планшетів при температурі 4 °C впродовж 12 год. Несорбований антиген видаляли шляхом триразового промивання комірок буферним розчином для іммобілізації молекул. Інкубацію проводили у розчині буфера TBS (50 ммоль тріс- HCl та 150 ммоль $NaCl$), рН 7,4. Неспецифічні місця зв'язування блокували шляхом інкубації комірок з 3% розчином альбуміну бичачої сироватки протягом 60 хв в термостаті при температурі 37 °C. Комірки очищували шляхом триразового промивання розчином робочого буфера (TBS) з додаванням 0,1% tween—20. Первинні антитіла розводили розчином робочого буфера до концентрації 5—50 мкг/мл, додавали в комірки планшета та інкубували протягом 1 год в термостаті при температурі 37 °C. Далі комірки триразово відмивали робочим буфером з 0,1% tween—20. Після цього вносили кон'югат вторинних антитіл з ферментами візуалізації (лужною фосфатазою або пероксидазою хрому) та інкубували протягом 1 год в термостаті при температурі 37 °C. Комірки знову триразово відмивали розчином робочого буфера з 0,1% tween—20 та інкубували з субстратом для ферментів візуалізації — 1 мг/мл пара-нітрофенолфосфату у 10% розчині диетаноламіну, рН 9,8, або 1 мг/мл тетраметилбензидину (ТМВ) у 50 ммоль фосфат—цитратного буфера, рН 5,0 з 0,013% H_2O_2 протягом 1 год при температурі 37 °C. Оптичне поглинання вимірювали за довжини хвилі 450 і 550 нм на ридері для мікропланшетів. Оптичну похибку планшета визначали шляхом віднімання показників за довжини хвилі 550 нм від показника за довжини хвилі 450 нм. Оптична щільність розчину в лунці після додавання субстрату свідчила про кількість ферменту в лунці, а відповідно, кількість іммобілізованих молекул. Їх вміст

виражали в умовних одиницях оптичної щільності.

Статистична обробка даних здійснена в пакеті програм SPSS—20. Розподіл даних проаналізований з використанням критерію нормальності Колмогорова—Смирнова. Отримані значення мали параметричний розподіл, тому відмінності між групами аналізували за t —критерієм Ст'юдента. Для оцінки відмінностей між категоріальними даними застосовували критерій χ^2 . Для множинного порівняння груп проведений дисперсійний аналіз (ANOVA) з використанням тесту Тьюкі для парних порівнянь. Кореляційну залежність між визначеними параметрами оцінювали за параметричним коефіцієнтом кореляції Пірсона. Відмінності між групами вважали статистично значущими при значенні p менше 0,05. Позначення відмінностей між групами при множинному порівнянні здійснювали за допомогою латинських літер a, b, c, d . Однакова літера над значеннями двох груп вказувала на відсутність відмінностей між відповідними групами, різні літери відображали значущі відмінності між відповідними групами.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За даними імуноферментного аналізу відзначені суттєві зміни профілю цитокінів при ПЕ. Так, у тварин, яких не лікували, рівень прозапальних цитокінів ІЛ-1 β та ІФН- γ у сироватці крові перевищував такий у інтактних щурів відповідно на 57,9 та 39,5% ($p < 0,05$). Отримані результати свідчили про наявність запалення в організмі. Інші автори також вказували на збільшення вмісту прозапальних цитокінів, зокрема, ФНП- α та ІЛ-6, на тлі гепатотоксичності, спричиненої азоксиметаном [6]. Отже, отримані нами дані доповнюють загальну картину запальної реакції при ПЕ.

Встановлене збільшення рівня протизапальних цитокінів в крові щурів, яким вводили CCl_4 : ІЛ-4 — на 34,6% ($p < 0,05$), ІЛ-10 — на 75,9% ($p < 0,05$) у порівнянні з таким в інтактних тварин. Дані про зміни протизапальних цитокінів при ПЕ в лі-

тературі обмежені. Так, відзначено відсутність змін вмісту ІЛ—10 у тканині головного мозку при ПЕ, проте, даних про їх вміст у крові не було [7].

Більшість дослідників, що вивчали вміст цитокінів у пацієнтів при ПЕ, повідомляли про збільшення вмісту ФНП— α та ІЛ—6 [8]. Так, встановлено підвищення рівня прозапальних цитокінів ФНП— α , ІЛ—6, ІЛ—18 у пацієнтів при ПЕ, що корелювало з стадією захворювання [9]. Застосування анти—ФНП— α терапії сприяло зменшенню тяжкості ПЕ при ураженні печінки, що свідчило про суттєвий вклад запальних медіаторів в патогенез ПЕ [8].

Отримані результати розширюють уявлення про зміни профілю цитокінів при ПЕ, особливо проти—запального ІЛ—4. Проте, роботи, в яких наведені подібні результати, поодинокі. Зокрема, при комплексному обстеженні пацієнтів з приводу ПЕ на тлі гепатиту В встановлено збільшення концентрації ІФН— γ в сироватці крові, що корелювало з стадією захворювання [10].

При аналізі джерел літератури та отриманих даних відзначені декілька механізмів, залучених в системне запалення та нейрозапалення. Перший механізм включав посилення експресії прозапальних цитокінів у відповідь на деструктивні процеси в печінці. По—друге, у хворих при ЦП порушується баланс інтестинальної мікрофлори з надмірним розмноженням потенційно патогенних грамнегативних збудників, зокрема, Enterobacteriaceae, Alcaligenaceae,

Streptococcaceae. Більш того, стискування судин кишечника внаслідок порталної гіпертензії, окисне руйнування слизової оболонки кишечника та нестача в ній імуноглобуліну А зумовлюють пригнічення бар'єрної функції кишечника та підвищення проникності його стінки. Наслідком цього є транслокація мікроорганізмів у кровоток та ендотоксемія. По—третє, накопичення аміаку зумовлює дисфункцію нейтрофільних гранулоцитів та макрофагів з порушенням фагоцитозу, що на тлі ендотоксемії спричиняє "сепсис—подібний" імунний параліч. Дійсно, у хворих при ЦП переважають спонтанний бактеріальний перитоніт, інфекції видільної системи, нозокоміальна пневмонія, сепсис та синдром системної запальної реакції організму [11]. Прозапальні цитокіни, що накопичуються за таких умов у кровоносному руслі, не можуть напряму впливати на головний мозок, оскільки не здатні подолати гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ). За даними літератури, виділяють такі механізми зв'язку системного запалення та нейрозапалення: периферійні тканини передають сигнали до головного мозку шляхом активації аферентних волокон блукаючого нерва; ендотелій судин ГЕБ передає сигнали до головного мозку через утворення вторинних посередників (NO, простаноїдів) у відповідь на стимуляцію продукції цитокінів; цитокіни підвищують проникність ГЕБ та напряму проникають у головний мозок в ділянках по-

рушення ГЕБ, де зумовлюють активацію мікроглії та експресію генів прозапальних медіаторів. В дослідженнях авторів підтверджене значення системи цитокінів у формуванні ПЕ: рівень цитокінів, а не аміаку, корелював з тяжкістю ураження головного мозку у пацієнтів при ЦП і ПЕ III—IV стадії [11].

У наших дослідженнях показано збільшення вмісту протизапального цитокіну ІЛ—4 у щурів при ПЕ, що свідчило про намагання системи цитокінів збалансувати та зменшити надмірне продукування прозапальних медіаторів.

Отже, баланс системи цитокінів є основою нормального функціонування систем організму. Порушення рівноваги у бік збільшення концентрації прозапальних цитокінів зумовлює не лише підвищення інтенсивності запальних процесів, а є самостійним чинником ураження органів, в тому числі при ЦП та ПЕ. Проведені дослідження свідчать про участь клітинної, гуморальної та аутоімунної ланок імуногенезу у виникненні та прогресуванні ураження печінки, а також спрямованість цих реакцій в бік прозапальних.

Дисбаланс цитокінів у бік прозапальних спричиняє зміни імуноактивності організму, що робить його вразливим до ендогенних ендотоксинів та інфекцій і створює сприятливі умови для активації й прогресування ПЕ при ЦП, що є важливим критерієм прогнозування післятрансплантаційних ускладнень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Neuroinflammation in hepatic encephalopathy: mechanistic aspects / A. R. Jayakumar, K. V. Rama Rao, M. D. Norenberg [et al.] // J. Clin. Experim. Hepatol. — 2015. — Vol. 5, suppl. — P. 21 — 28.
2. Wright G. Ammonia and inflammation in the pathogenesis of hepatic encephalopathy: pandora's box? / G. Wright, R. Jalan // Hepatology (Baltimore). — 2007. — Vol. 46, N 2. — P. 291 — 294.
3. Butterworth R. F. The liver—brain axis in liver failure: neuroinflammation and encephalopathy / R. F. Butterworth // Nature reviews. Gastroenterol. Hepatol. — 2013. — Vol. 10, N 9. — P. 522 — 528.
4. Zhang J.—M. Cytokines, inflammation, and pain / J.—M. Zhang, J. An // Intern. Anesth. Clin. — 2007. — Vol. 45, N 2. — P. 27 — 37.
5. Покращення моделювання та діагностики печінкової енцефалопатії у щурів / Е. Г. Манжалій, Т. М. Кондратюк, В. Є. Фалалеева [та ін.] // Вісн. пробл. біології і медицини. — 2016. — Т. 126, № 1. — С. 239 — 243.
6. Inflammatory cascades driven by tumor necrosis factor—alpha play a major role in the progression of acute liver failure and its neurological complications / A. Chastre, M. Belanger, E. Beauchesne [et al.] // PloS One. — 2012. — Vol. 7, N 11. — e49670.
7. Carbon tetrachloride increases the proinflammatory cytokines levels in different brain areas of wistar rats: the protective effect of acai frozen pulp / F. de Souza Machado, J. P. Marinho, A. L. Abujamra [et al.] // Neurochem. Res. — 2015. — Vol. 40, N 9. — P. 1976 — 1983.
8. Bemeur C. Liver—brain proinflammatory signalling in acute liver failure: role in the pathogenesis of hepatic encephalopathy and brain edema / C. Bemeur, R. F. Butterworth // Metab. Brain Dis. — 2013. — Vol. 28, N 2. — P. 145 — 150.
9. Serum endotoxin and inflammatory mediators in patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy / L. Jain, B. C. Sharma, P. Sharma [et al.] // Dig. Liver Dis. — 2012. — Vol. 44, N 12. — P. 1027 — 1031.
10. Interferon gamma, interleukin—6, and —17a levels were correlated with minimal hepatic encephalopathy in hbv patients / W. Li, N. Li, R. Wang [et al.] // Hepatol. Intern. — 2015. — Vol. 9, N 2. — P. 218 — 223.
11. Luo M. Inflammation: a novel target of current therapies for hepatic encephalopathy in liver cirrhosis / M. Luo, J.—Y. Guo, W.—K. Cao // World J. Gastroenterol. — 2015. — Vol. 21, N 41. — P. 11815 — 11824.