

БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ

УДК 616-006:576.385.5:51-76

**КИНЕТИКА РОСТА МНОГОКЛЕТОЧНЫХ
ОПУХОЛЕВЫХ СФЕРОИДОВ.
МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ.****Г.И.Соляник***Институт экспериментальной патологии, онкологии и
радиобиологии им.Р.Е.Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина*

Поступила в редакцию 14 мая 1998 г.

Влияние кислорода и глюкозы на рост многоклеточных опухолевых сфероидов и гетерогенность их клеточного состава исследовалось с помощью математической модели. В рамках модели кислород и глюкоза рассматривались как неспецифические регуляторные факторы жизнеспособности опухолевых клеток, влияющие как на скорость перехода клеток из пролиферации в состояние покоя, так и на их гибель. Модель была использована для анализа кинетики роста и пролиферативной гетерогенности клеточного состава ЕМТ6/Ro сфероидов. Сопоставление предсказаний модели с данными экспериментальных исследований показало, что скорость потребления кислорода одной клеткой (карциномы молочной железы мышей) по теоретическим оценкам в 4 раза ниже значений, измеренных в эксперименте.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: математическое моделирование, многоклеточные опухолевые сфероиды, кинетика роста, гетерогенность клеточного состава.

Трехмерные агрегаты опухолевых клеток (многоклеточные опухолевые сфероиды) широко используются как экспериментальная (*in vitro*) модель солидных опухолей на протяжении уже более двух десятилетий [1]. Одной из основных причин сходства между ростом многоклеточных сфероидов и небольшими опухолевыми образованиями является уменьшение в процессе роста доли пролиферирующих клеток и увеличение доли покоящихся [2]. Экспериментальные исследования убедительно показали, что существенный вклад в возникновение популяции покоящихся клеток вносит прогрессивное уменьшение концентрации кислорода и глюкозы [3,4]. Градиенты концентраций этих субстратов, обуславливают неоднородное в пространстве распределение клеток, отличающихся пролиферативной активностью [5]. Известно, что соотношение делящихся и покоящихся клеток и их пространственное расположение в значительной степени определяет эффективность противоопухолевой терапии [6,7]. Между тем экспериментальное исследование пролиферативной гетерогенности клеточных популяций, непрерывно изменяющейся в пространстве и во времени, связано с известными трудностями и ограничениями.

В этой связи целью работы является построение математической модели кинетики роста многоклеточных опухолевых сфероидов, учитывающей микроокружение и гетерогенность клеточного состава. В рамках модели клеточная гетерогенность обусловлена взаимосвязанным влиянием кислорода и глюкозы на скорость перехода опухолевых клеток из пролиферации в покой и на образование некротической зоны, что позволяет определять пространственное распределение различных субпопуляций опухолевых клеток. Так как большинство параметров модели могут быть определены по данным экспериментальных исследований, модель дает возможность анализировать особенности роста и изменения клеточного состава многоклеточных опухолевых сфероидов.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

При построении математической модели мы исходили из следующих предположений:

- Многоклеточный опухолевый сфероид растет как сферически симметричная колония клеток.

- Биоэнергетика опухолевой клетки обусловлена катаболизмом глюкозы.

- Гетерогенность клеточного состава обусловлена зависимостью скорости переключения клетки из пролиферации в покой от внутриклеточного уровня кислорода и глюкозы.

- Покоящиеся клетки могут быть вовлечены в пролиферации, или могут погибать. Скорость гибели (в отсутствие воздействия повреждающих агентов) не зависит от концентрации кислорода, а полностью определяется внутриклеточным уровнем глюкозы.

- Внутриклеточная концентрация кислорода и глюкозы равна внеклеточной. Последняя определяется балансом между диффузией субстратов из среды инкубации внутрь сфероида и потреблением этих субстратов опухолевыми клетками.

- Так как время диффузии кислорода и глюкозы внутрь сфероида мало по сравнению с характерным временем роста сфероида (эта оценка верна по крайней мере для сфероидов с диаметром менее 1500 микрон), предполагается, что в каждый момент времени внутри сфероида достигается стационарное распределение основных субстратов.

В рамках сделанных предположений кинетика роста популяции делящихся и покоящихся клеток может быть представлена следующей системой дифференциальных уравнений (x - количество делящихся клеток в единице объема сфероида, y - покоящихся):

$$\frac{dx}{dt} = bx(t) - F_p x(t) + F_q y(t) \quad (1)$$

$$\frac{dy}{dt} = F_p x(t) - F_q y(t) - F_d y(t)$$

со стационарными диффузионными уравнениями для концентрации кислорода (C_o) и глюкозы (C_g)

$$D_i (d^2 C_i / dr^2 + (2/r) dC_i / dr) = -P_i \quad (2)$$

Параметр b в системе (1) является средней скоростью деления клеток. D_i - эффективный (макроскопический) коэффициент диффузии кислорода ($i=0$) и

глюкозы ($i=g$), которые в рамках сделанных предположений не зависят от уровня этих субстратов в сфероиде. P_i характеризует скорость потребления кислорода и глюкозы (соответственно) опухолевыми клетками, находящимися в единичном объеме сфероида.

В рамках модели в качестве граничных условий для уравнений (2) рассматривались следующие:

$$\begin{aligned} \text{at } r = 0; & \quad dC_i/dr = 0 \\ \text{at } r = r_{\max} = R; & \quad C_g = G_{\text{ext}} \text{ and } C_o = O_{\text{ext}} \end{aligned} \quad (3)$$

Первое отражает центральную симметрию сфероида; второе - равенство концентрации субстратов на поверхности сфероида их значению в среде инкубации.

Очевидно, что кинетики роста многоклеточного сфероида существенно зависит от вида функций F_p , F_q (первая определяет скорость переключения клетки из пролиферации в покой, вторая - обратно) и функции F_d , характеризующей скорость гибели клетки.

Известно, что нехватка кислорода приводит к возникновению популяции гипоксических клеток. Исследования, проведенные *in vitro* убедительно показали, что, кроме гипоксии, важную роль в образовании некротической зоны играет также низкий уровень глюкозы в клетке. Такое влияние кислорода и глюкозы на жизнеспособность клеток обусловлено взаимосвязанной ролью этих субстратов в центральном энергетическом процессе клеточного метаболизма - синтезе АТФ. Естественно предположить, что скорость перехода клеток из пролиферации в покой в значительной степени определяется скоростью производства АТФ (под скоростью здесь подразумевается величина обратная времени, которое необходимо клетке для синтеза АТФ, в количестве, достаточном для поддержания нормального ее функционирования в каждый момент времени). Синтез АТФ представляет собой сложную пространственно не локализованную последовательность сопряженных биохимических реакций (субстратом для первой реакции этой последовательности является глюкоза, а для последней - кислород). Производство АТФ в этом случае определяется функционированием всей последовательности реакций как единой целостной системой, а зависимость скорости синтеза АТФ от концентрации кислорода и глюкозы (и, следовательно, функция F_p) может быть адекватно описана функцией Вейбула [8]:

$$F_p = p \cdot \exp(-k_p (C_o^6 C_g^2)^{1/n}) \quad (4)$$

где C_o и C_g - нормированные концентрации кислорода и глюкозы, p - максимальная скорость перехода пролиферирующих клеток в состояние покоя, а k_p - нормировочный коэффициент. Для нормальных условий, при которых концентрация кислорода в среде инкубации (O_{ext}) порядка 0.2 mM, а глюкозы (G_{ext}) порядка 6.4 mM, k_p должен быть равен единице. Показатель степени ($1/n$) в формуле (4) отражает многоступенчатый (в пространстве и во времени) характер синтеза АТФ и должен быть меньше 1/10.

Как видно из формулы (4) в рамках модели скорость перехода опухолевой клетки из пролиферации в покой в значительно большей степени зависит от кислорода, чем от глюкозы. Такое предположение модели кажется вполне разумным. Действительно, нормальное функционирование пролиферирующей клетки обеспечивается притоком свободной энергии, источником которой являются процессы катаболизма пищевых молекул, протекающие как в аэробных, так и в анаэробных условиях. При этом следует подчеркнуть, что

сопряженность катаболических и анаболических процессов обеспечивает минимизацию производства энергии в клетке. Истощение кислорода выключает из энергетического производства процессы окисления углеводов, жиров и аминокислот, оставляя клетке только один путь синтеза АТФ гликолитический. Будучи значительно (более чем в 15 раз) менее энергетичным по сравнению с аэробным расщеплением глюкозы, гликолиз не может обеспечить в клетке уровень АТФ, необходимый для поддержания ее митотической активности, что и обуславливает переход клетки в состояние покоя.

Известно, что в отличие от нормальных клеток, в которых механизмы гликолиза, цикла Кребса и окислительного фосфорилирования жестко взаимосвязаны, в раковых клетках регуляция этих трех стадий нарушена: скорость гликолиза значительно выше, чем это требуется для обеспечения пируватом цикла лимонной кислоты. Таким образом в аэробных раковых клетках синтез АТФ обусловлен как аэробным так и анаэробным гликолизом. Этот факт находит свое отражение в показателе степени отнормированной концентрации глюкозы в формуле (4).

Вследствие вышесказанного логически обоснованным выглядит предположение о том, что жизнеспособность покоящейся раковой клетки полностью определяется уровнем глюкозы и скорость ее гибели может быть представлена в виде:

$$F_d = d \cdot \exp(-C_g/k_d) \quad (5)$$

где d - максимальная скорость гибели клетки. Из (5) видно, что независимо от уровня глюкозы, покоящаяся клетка обречена на гибель - гликолиз не может удовлетворить потребности клетки в АТФ.

Существенно влияя на пролиферативный статус клеток, уровень кислорода и глюкозы в свою очередь зависит от скорости потребления этих субстратов опухолевыми клетками (P_i). Следует отметить, что скорости потребления кислорода и глюкозы различными клеточными линиями как функции концентраций этих субстратов в среде инкубации исследовались и измерялись во многих экспериментальных работах [9,10]. Результаты этих исследований могут быть обобщены следующими эмпирическими соотношениями:

$$P_o = q_o C_o (1 + v_o (C_g + w_o)^{-1}) X(t) / (C_o + m_o) \quad (6)$$

$$P_g = q_g C_g (1 + v_g (C_o + w_g)^{-1}) (X(t) + gY(t)) / (C_g + m_g)$$

Где q_o и q_g - скорости потребления кислорода и глюкозы одной клеткой (соответственно), измеренные при нормальных условиях инкубации. Параметры v_i , w_i , m_i (эмпирические константы) характеризуют зависимость скоростей потребления от концентраций кислорода и глюкозы и могут быть оценены по данным экспериментальных исследований. g - отражает скорость потребления глюкозы покоящимися клетками в сравнении с потреблением ее делящимися клетками.

Естественно, что кинетика роста многоклеточных опухолевых сфероидов в значительной степени определяется скоростью перехода клеток из покоя в пролиферацию. Между тем понятно, что для сфероидов, клетки которого не обладают выраженной подвижностью, этим влиянием можно пренебречь. Действительно, внеклеточная среда покоящейся клетки, вовлеченной обратно в пролиферацию

(по любому механизму) содержит уровень кислорода и/или глюкозы не выше того, который обусловил ранее переход этой клетки в состояние покоя. Так как $p > b$, то после вовлечения в пролиферацию клетка с большей вероятностью опять перейдет в состояние покоя, чем разделится.

Следует отметить, что система (1) с функциями F_p (4), $F_q=0$ и F_d (5) описывает динамику изменения количества делящихся и покоящихся клеток при их плотной упаковке в единице объема сфероиде. Под плотностью клеточной упаковки в свою очередь следует понимать величину, обратную объему отдельной клетки при условии, что этот объем не меняется во времени. Сказанное в полной мере применимо к покоящимся клеткам (V_y - объем покоящейся клетки). Однако возникает естественный вопрос: что есть объем делящейся клетки (V_x), ведь в процессе митотического цикла клетка увеличивается практически вдвое? В рамках модели V_x - это усредненный по времени наблюдения объем митотической клетки асинхронно делящейся клеточной популяции. Понятно, что $V_x > V_y$.

Так как гибель покоящихся клеток происходит преимущественно в центральных областях сфероиде, откуда отток продуктов распада клеток крайне затруднен, для расчета кинетики роста многоклеточного опухолевого сфероиде необходимо определение эффективного объема мертвой клетки. В рамках модели под эффективным объемом мертвой клетки (V_z) следует понимать часть некротического пространства, которая приходится на одну погибшую клетку (отметим, что изменение плотности мертвых клеток в модели характеризуется последним членом второго уравнения системы (1)).

Таким образом, построенная модель позволяет определять кинетику роста сфероиде и рассчитывать изменения количества делящихся, покоящихся и мертвых клеток и концентрации кислорода и глюкозы как функций радиуса сфероиде и времени, если известны параметры модели.

Как следует из построения модели, практически все ее параметры являются собственно клеточными характеристиками, для определения которых используются данные экспериментальных исследований клеточных линий в монослое [9-11]. Так параметры $b, p, d, k_p, k_d, n, q_0, q_g, g$ могут быть определены из результатов кинетических исследований, а оценка v_i, w_i, m_i может быть проведена по данным исследований влияния концентраций кислорода и глюкозы на скорость их потребления клетками, растущими в монослое. Исключение составляет параметр V_z , значение которого может быть оценено только по данным кинетики роста многоклеточного сфероиде. Фактически, построенная модель дает возможность исследовать трехмерные агрегаты опухолевых клеток, используя для этого данные, полученные в двухмерных экспериментальных моделях их роста.

КИНЕТИКА РОСТА EMT6/Ro СФЕРОИДА РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Мы использовали модель для анализа кинетики роста и клеточной гетерогенности EMT6/Ro сфероиде (трехмерный агрегат клеток карциномы молочной железы мышей). Такой выбор типа сфероиде обусловлен большим количеством экспериментальных и теоретических исследований (имеющихся в литературе) кинетики роста этих клеток как в монослое, так и в виде многоклеточных сфероидов.

В таблице представлены значения параметров модели, характеризующие рост EMT6/Ro сфероиде. Как видно большинство параметров были взяты из литературных источников или оценивались нами по данным экспериментальных

исследований клеток данного типа в монослое. Определение эффективного объема мертвой клетки V_z , а также вычисление параметров p и d (в виду отсутствия экспериментальных исследований кинетики роста клеток этого типа в монослое при указанных выше концентрациях кислорода и глюкозы) проводилось по данным кинетике роста EMT6/Ro сфероида в среде, содержащей 0.28 mM кислорода и 5.5 mM глюкозы, методом нелинейной регрессии (из наилучшего приближения построенной динамической модели к экспериментальным данным [11]). Единственный параметр, значение которого мы не смогли оценить из-за отсутствия достаточной экспериментальной информации - это параметр n , значение которого было выбрано нами равным 12.

Таблица.

Параметры модели для EMT6/Ro сфероида

$D_o = 3.0 \cdot 10^{-5}$	см ² /сек	Thews, Hutten [14]
$D_g = 9.0 \cdot 10^{-6}$	см ² /сек	Li [9]
$b = 0.053$	час ⁻¹	Landry et al. [15]
$p = 0.071$	час ⁻¹	Определялись из наилучшего приближения
$d = 0.05$	час ⁻¹	модели к экспериментальным данным
$k_p = 0.86$	mM	Оценивались, используя данные Casciari, Sotirchos, Sutherland [10]
$k_d = 3.3$	mM	
$q_o = \left\{ \begin{array}{l} 8.0 \cdot 10^{-17} \\ 1.7 \cdot 10^{-17} \end{array} \right.$	Мол/(сек·клетку)	Freyer, Sutherland [16]
$q_g = 1.6 \cdot 10^{-16}$	Мол/(сек·клетку)	Определялись из наилучшего приближения модели к экспериментальным данным Freyer, Sutherland [16]
$m_o = 4.6 \cdot 10^{-3}$	mM	Casciari et al. [10]
$m_g = 0.15$	mM	Оценивались, используя экспериментальные данные Freyer, Sutherland [16]
$v_o = 0.3$	mM	
$v_g = 0.01$	mM	и Casciari et al. [10]
$w_o = 0.2$	mM	
$w_g = 0.005$	mM	
$g = 0.6$		
$V_x = 5.0 \cdot 10^{-8}$	см ³	Freyer, Sutherland [12,5]
$V_y = 3.0 \cdot 10^{-8}$	см ³	Freyer, Sutherland [16]
$V_z = 6.0 \cdot 10^{-8}$	см ³	Определялись из наилучшего приближения модели к экспериментальным данным

Исследование модели и оценка ее параметров показали, что концентрация кислорода в центре сфероида как функция диаметра сфероида, предсказанная моделью, принципиально отличается от таковой, измеренной экспериментально. Скорость снижения уровня кислорода в центре сфероида в процессе его роста значительно выше по модельным оценкам, чем по экспериментальным

наблюдениям. Это расхождение предсказаний модели с экспериментальными данными в рамках модели полностью обусловлено высокой скоростью потребления кислорода (в расчете на одну клетку), т.е. параметром q_0 , значение которого, равное $8 \cdot 10^{-17}$ moles/sec, было взято нами из данных экспериментальных измерений [12]. Между тем, проведенный нами анализ показал, что значение этого параметра, обеспечивающее наилучшее приближение модели одновременно как к экспериментальным данным изменения концентрации кислорода в центре сфероида (Рис.1(а)) так и к кривой роста сфероида (Рис.1.(б)), лежит в диапазоне $1.4 \cdot 10^{-17}$ - $1.7 \cdot 10^{-17}$ moles/sec, т.е. более чем в 4 раза ниже экспериментально измеренного. Такая разница между экспериментально измеренными значениями параметра и модельными оценками может быть обусловлена, по крайней мере, двумя причинами. Во-первых, энергетика опухолевой клетки при плотной упаковке в пространственных агрегатах может изменяться, обуславливая снижение потребления кислорода клеткой (возможность такого механизма была экспериментально показана для некоторых линий опухолевых клеток). Во-вторых, высокая скорость потребления кислорода клеткой, измеренная экспериментально, может быть обусловлена увеличением кислотности внеклеточной среды за счет пассивной диффузии и активного транспорта ионов водорода из внутриклеточного пространства во внеклеточное (значительное уменьшение рН регистрировались и в опухолевой ткани и при росте многоклеточных опухолевых сфероидов). Взаимодействие ионов водорода с буферной системой внеклеточного пространства (в которую существенный вклад вносит кислород) с необходимостью должно оказывать влияние на уровень кислорода и на скорость его изменения во внеклеточной среде. Следует отметить, что оценка степени этого влияния требует проведения дополнительных как экспериментальных, так и теоретических исследований. Между тем есть основание считать, что реальная скорость потребления кислорода клеткой ниже тех показателей, которые получают из экспериментальных измерений. Принимая во внимание вышесказанное, для дальнейших исследований мы предположили, что эффективная скорость потребления кислорода одной клеткой равна модельной оценке, т.е. $q_0 = 1.7 \cdot 10^{-17}$ moles/sec.

Как указывалось ранее, рост многоклеточных опухолевых сфероидов сопровождается возникновением неоднородных в пространстве распределений клеток, отличающихся пролиферативной активностью (возникновение пролиферативных градиентов). На Рис.2 представлено пространственное распределение плотностей делящихся и покоящихся клеток в ЕМТ6/Ro сфероидах с различными диаметрами, полученные с помощью математической модели. Видно, что изменения пролиферативного градиента в процессе роста сфероида (при нормальных условиях инкубации) носит монотонный характер и находится в четкой взаимосвязи с изменениями градиента концентрации кислорода (Рис.4).

Известно, что условия инкубации сфероида могут существенным образом влиять на кинетику роста и пролиферативную гетерогенность МОС. Именно этим фактом объясняются многочисленные экспериментальные (и клинические) попытки изменять темпы роста опухоли и/или ее клеточные пролиферативные градиенты модифицируя уровни кислорода и глюкозы в ней. Построенная нами математическая модель является удобным инструментом для таких исследований.

Для иллюстрации этого мы проанализировали кинетику роста и пролиферативную гетерогенность ЕМТ6/Ro сфероида при инкубации в среде, содержащей 1.7 мМ и 16.5 мМ глюкозы. На рис.3 видно, что трехкратное (по сравнению с 5.5 мМ) уменьшение концентрации глюкозы в среде инкубации

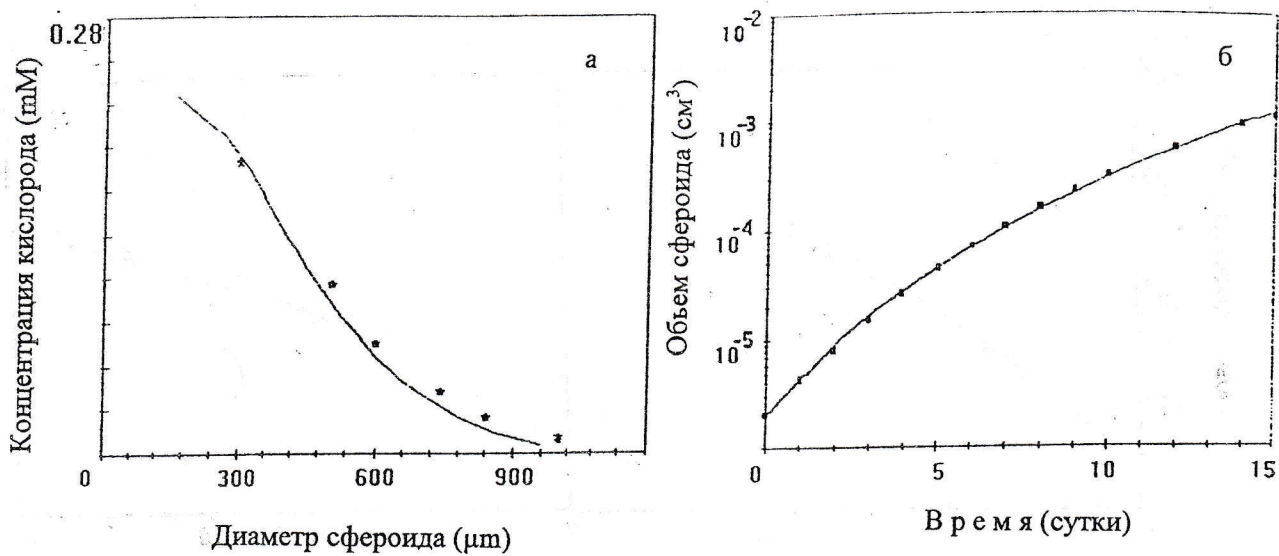


Рис.1. Динамика изменения концентрации кислорода в центре EMT6/Ro сфероида (а) и кинетика его роста (б) в среде, содержащей 0.28 мМ кислорода и 5.5 мМ глюкоза. Точки – экспериментальные данные, линии – наилучшее приближение математической модели к экспериментальным данным.

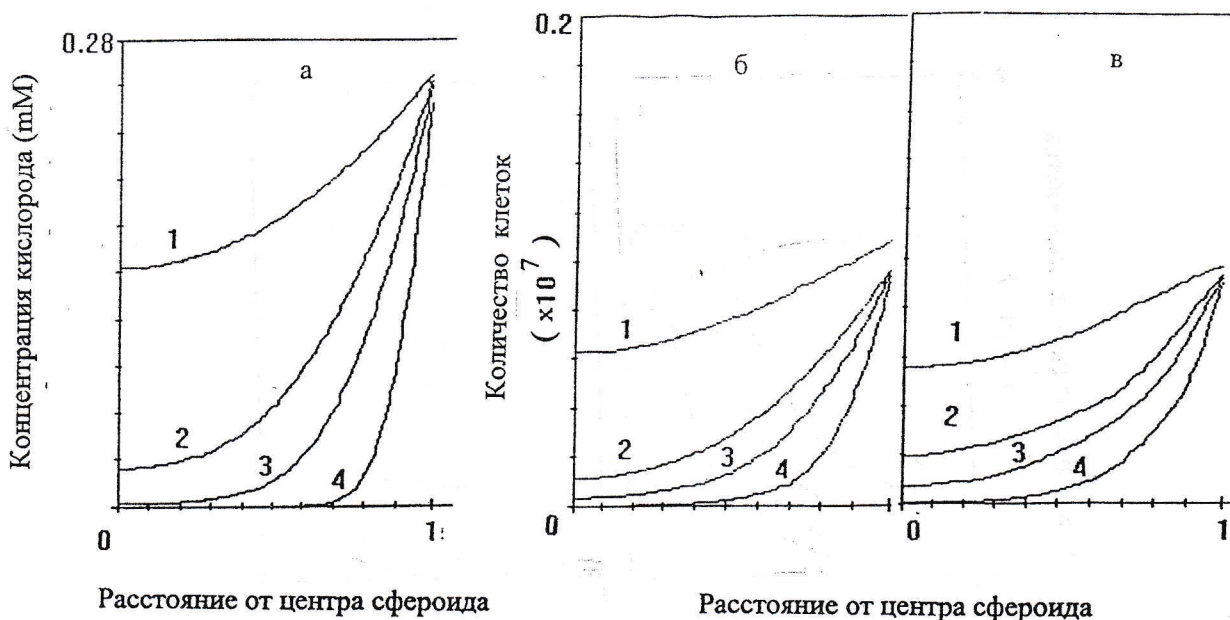


Рис.2. Радиальное распределение кислорода (а) и плотностей делящихся (б) и покоящихся (в) клеток в EMT6/Ro сфероиде с диаметром 300 μm (1), 600 μm (2), 800 μm (3), 1500 μm (4) при уровне глюкозы в среде 5.5 мМ (предсказания модели).

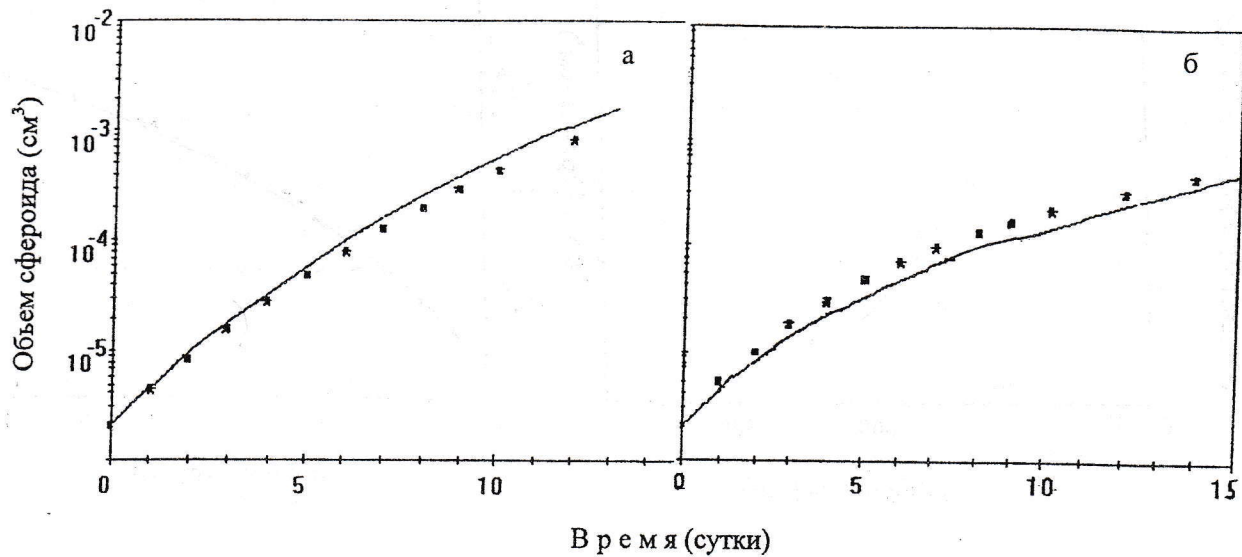


Рис.3. Кинетика роста EMT6/Ro сфероида в среде, содержащей 16.5 мМ (а) и 1.7 мМ (б) глюкозы. Линии – предсказания модели, точки – экспериментальные данные (в работе использованы экспериментальные данные из [12]).

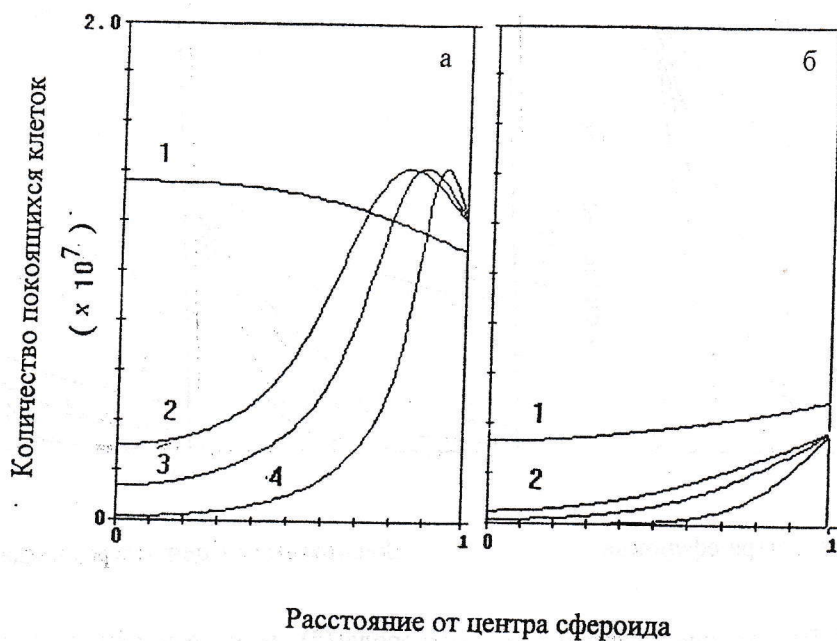


Рис.4. Радиальное распределение количества покоящихся (непролиферирующих) клеток в единице объема EMT6/Ro сфероида при уровне глюкозы в среде 16.5 мМ (а) и 1.7 мМ (б) (предсказания модели). Диаметр сфероида: 300 μм (1), 600 μм (2), 800 μм (3), 1500 μм (4).

приводит к ожидаемому замедлению роста сфероида, а трехкратное увеличение уровня глюкозы обуславливает их более быстрый рост (отметим, что предсказания модели кинетики роста достаточно хорошо совпадают с данными экспериментальных исследований).

Интересным результатом исследования является предсказанное моделью (рис.4) увеличение пула покоящихся клеток при высоком уровне глюкозы. Долгое время существовала точка зрения о возможности уменьшать количество покоящихся (и, как правило, резистентных к действию многих противоопухолевых агентов) клеток путем увеличения уровня глюкозы в опухоли (в медицинской практике метод создания высоких концентраций глюкозы в организме перед проведением противоопухолевой терапии называется гипергликемией и порой до сих пор проводится в клиниках). Полученные нами данные противоречат такой точке зрения. В рамках модели только уменьшение уровня глюкозы во внеклеточной среде приводит к снижению количества непролиферирующих клеток в опухоли. Отметим, что эти выводы модели имеют свое экспериментальное подтверждение [13].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tong J.Z., Sarrazin S., Cassio D., Gauthier F., Alvarez F. // *Biol.of Cell.* 1994. 81. 77 с.
2. Groebe K., Muller-Klieser W. // *Int.J.Radiat.Oncol.,Biol.,Physics.* 1996. V.34. P.395.
3. Gorlach A., Bolling B., Holtermann G., Schwachofer J., Carlsson J., Acker H. // *Int.J.Oncol.* 1995.V.7.P.831.
4. Franko A.J., Koch C.J., Boisvert P.J. // *Cancer Res.* 1992. V.25.P. 3831.
5. Freyer J.P., Sutherland R.M. // *Cancer Res.* 1986. V.46.P. 3513.
6. Steeg P.S., Alley M.C., Grever M.R. // *J.of the Nat.Cancer Inst.* 1994. V.86.P. 953.
7. Freitas I. & Baronzio G.F. // *Anticancer Res.* 1994. V.14.P. 1097-1102.
8. Weibull W., Sweden S. // *J. Appl. Mech.* 1951 .V. 18. P.293-297.
9. Li C.K.N. // *Cancer.* 1982. V.50. P. 2066-2073.
10. Casciari J.J., Sotirchos S.V., Sutherland R.M. // *Cell Prolif.* 1992.V.25.P. 1 -22.
11. Solyanik G., Berezetskaya N., Bulkiewicz R., Kulik G. // *Cell Prolif.* 1995. V.28. P. 263 -278.
12. Freyer J.P., Sutherland R.M. // *Cancer Res.* 1986. V.46. P. 3504.
13. Hlatky L., Sachs R.K., Ring C.S. // *Br.J.Cancer* .1989. V.59. P. 375-380.
14. Thews G., Hutten H. *Biophysics of respiratory gas transport.* In: *Biophysics.* W.Hoppe, H.Lohmann, H.Markl, H.Ziegler, eds. Springer-Verlag, Berlin. 1983.P. 503.
15. Landry J., Freyer J.P., Sutherland R.M. // *Cell Tissue Kin.* 1982.V.15.P. 585.
16. Freyer J.P., Sutherland R.M. // *J.Cell Physiol.* 1985. V.154. P. 516.