

The new authority in science

Ausgabe 2-2014
www.Auris-verlag.de

Eastern European Scientific Journal



www.auris-verlag.de

DOI 10.12851/EESJ201404

IMPRESSUM:

Copyright:

©2014 AURIS Kommunikations- und Verlagsgesellschaft mbH

Internet:

<http://www.auris-verlag.de>

E-Mail:

M.Moneth@auris-verlag.de

Verlagsredaktion:

Khvataeva N. D.Ph. chief editor

Zaharishcheva M. D.Ph. prof., editor

Plekhanov Theodor I. ScD, prof., editor

Lobach Elena A. PhD, associate prof., editor

Brenner D. D.Ph. editor

Muhina A. D.Ph. editor

Blinov I. D.Sc. editor

Moneth T. M.Ph. designer/breadboard

Moneth M. M.Ph. breadboard

Layout:

Moneth M.

Umschlaggestaltung:

Moneth M.

Coverbild:

AURIS Kommunikations- und Verlagsgesellschaft mbH

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form, auch nicht für Zwecke der Unterrichtsgestaltung – mit Ausnahme der in §§ 53, 54 URG genannten Sonderfälle –, reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet oder verbreitet werden.

DOI 10.12851/EESJ201404

Inhalt

IMPRESSUM:	3
Biologie und Medizin	7
Molecular Biological Characteristics of Patients with Hereditarily- Induced Breast Cancer in the Tyumen Region	7
Morphological and Functional Features of Newborn Piglets Adrenal Cells During Culturing	11
Epizootological Aspects Pseudomonosis of Animals in Russia	20
Project of a Theoretical Biological Systematics: on a Way to Rapprochement Biological Systematics and Genetics	23
Naturwissenschaft	49
Comparative Characteristic of Work for Cleaning Small Rivers	49
Hypothesis about Dolmen Origin (Ancient Construction)	54
Internals of Newton's forces	58
Effect of Organic Acid Salts on the Initial Growth Processes of Malting Barley	72
Mechanics of Organizing Space without the Big Bang and the Accelerated Expansion of the Universe	76
Journalistik, Literaturwissenschaft, Medien- und Kulturwissenschaft	79
The Role of Government in Shaping the Soviet Holidays (For example, the Russian festive culture of the 1920s and 1930s)	79
Lyrical Reports in Halimat Bairamukova's Prose	84
Heuristic Potential Prose Adygey Educators Late XIX Early XX Century	92
Mifologema «Fire» in the Works of I. Goncharov and V. Rasputin	99
Names of Prey Birds of in Nogay Language	104
The Nature of Power in Cultural Context	109
Gesellschaftswissenschaften	114
Franchising as a Form of Business Running	114
The Perspectives of Cooperation between the Republic of Belarus and the European Union	118
Preconditions and Factors of Competitiveness of Firms in the Way Out of the Economic Crisis	121
The Impact of Technological Personnel on Quality Performance of the Continuous Hot Galvanizing Unit of OJSC "MMK"	139
Single Treasury Account of the Public Treasury and Development Prospects	147
Law and Legislation in Ukraine: theoretical and law Aspect	152
Government Policy on Protection of Consumer Rights to Quality and Safety of Goods and Services	157
Republic of Congo, as the Attractive Center of French and Chinese Transnational Corporations: Contradictions and Ways out	162

Olga S. Sidorenko,
engineer;

Galyna A. Bozhok,
DPh, senior researcher;

Evgeniy I. Legach,
DPh, chief researcher;

Tatyana P. Bondarenko,
DPh, department head;
Institute for Problems of Cryobiology and
Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkov

Morphological and Functional Features of Newborn Piglets Adrenal Cells During Culturing

Key words: adrenal cell culture, cytosphere, bromodeoxyuridine, 3- β -hydroxysteroiddehydrogenase, neuronal morphology.

Annotation: The article contains analysis of morphological and functional features of newborn piglets adrenal cells during culturing. It was shown that the newborn piglets adrenal cell culture consists of monolayer of fibroblast-like cells and spherical cell structures (cytospheres). It was demonstrated that the number of 3- β -HSD⁺ cells decreased gradually. The migration of neuron-like cells from the cytospheres after their reseeding was also shown.

На сегодняшний день культуры клеток млекопитающих широко используются для решения как фундаментальных теоретических проблем, так и различных практических задач, особенно в области медицины. Они применяются для получения ферментов, гормонов, моноклональных антител и т.д. в промышленных масштабах. На таких культурах изучаются механизмы и закономерности процессов клеточной пролиферации и дифференцировки, а также перерождения нормальных клеток в опухолевые. Клеточные культуры позволяют изучать чувствительность клеток к физическим и химическим факторам, в т. ч. к лекарствам, а также определять потенциальную мутагенность и канцерогенность этих факторов.

Первичная культура клеток надпочечников является интересным объектом исследования, поскольку состоит из множества типов клеток, имеющих различное эмбриональное происхождение. Известно, что в мозговом веществе надпочечников присутствуют недифференцированные клетки-производные нервного гребня, которые при определенных условиях культивирования способны дифференцироваться в нейроны (1). Кроме того, зрелые хромаффинные клетки могут подвергаться трансдифференцировке в нейрональном направлении (2). В связи с вышесказанным культура клеток надпочечников все чаще применяется для изучения процессов нейрогенеза, а также механизмов клеточной пластичности *in vitro*.

Известно, что при совместном культивировании несколько типов клеток, возможны качественные и количественные изменения популяционного состава исходной суспензии

и/или свойств клеток. Поэтому для успешного применения этого биотехнологического подхода необходимо изучить его влияние на свойства изучаемого объекта.

Целью данной работы было изучение морфологических особенностей клеток надпочечников новорожденных поросят при культивировании.

Объект и методы исследования.

Источником биологического материала служили новорожденные поросята первого поколения пород крупная белая и украинская мясная. Эксперименты проведены с соблюдением правил биоэтики в соответствии с положениями "Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей" (Страсбург, 1986) и одобрены комитетом по биоэтике ИПКиК.

Надпочечные железы выделяли, очищая от прилегающей жировой ткани, затем помещали в охлажденную среду DMEM/F12 (PAA Laboratories, Австрия), содержащую антибиотик (40 мкг/мл гентамицина, Здоров'я, Украина), и измельчали на фрагменты размером приблизительно 1 мм³, затем дважды отмывали от крови средой с антибиотиком. В дальнейшем отмытые фрагменты ткани надпочечников использовали для получения клеточной суспензии.

Суспензию клеток из фрагментов ткани получали ферментативным методом. Для дезагрегации клеток использовали ферментный раствор, содержащий коллагеназу I типа (Sigma, США) в концентрации 1 мг/мл и деоксирибонуклеазу (Sigma, США) в концентрации 0,1 мг/мл. Ферменты растворяли в среде DMEM/F12. Ферментативную обработку проводили в три этапа (30, 10, 10 мин) на водяной бане при 37°C и постоянном встряхивании. После каждого этапа дезагрегированные клетки собирали в пробирку с охлажденной фетальной телячьей сывороткой (ФТС, PAA Laboratories, Австрия), а к оставшимся фрагментам ткани добавляли свежий ферментный раствор. Клетки, полученные после трех этапов ферментации, объединяли, а затем отмывали от ферментов путем центрифугирования в среде с 0,2 % бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США). Полученную суспензию фильтровали через нейлоновое сито с диаметром пор 125 мкм для удаления клеточного дебриса. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью общепринятого метода окрашивания трипановым синим.

Клетки культивировали в пластиковых флаконах с площадью дна 25 см² (PAA Laboratories, Австрия) на питательной среде DMEM/F12 с добавлением 10 % ФТС, 40 мкг/мл гентамицина, 5 мкг/мл амфотерицина В (Sigma, США) при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Посевная концентрация составляла в среднем 0,33±0,16 млн клеток на 1 см² площади. После 1-х суток культивирования флаконы ополаскивали средой с антибиотиком, удаляя при этом неприкрепившиеся и мертвые клетки, и производили замену питательной среды. В дальнейшем среду меняли каждые 3-4 суток.

Для идентификации пролиферирующих клеток в культуре клеток надпочечников (ККН) 8-х суток культивирования в культуральную среду добавляли бромдеоксиуридин (BrdU, Sigma, США) в концентрации 10 μM, а затем исследовали его включение в ДНК пролиферирующих клеток с помощью иммуноцитохимического анализа. Для этого после 6 ч инкубации с BrdU (1) ККН фиксировали в 4% растворе параформальдегида (30 мин), денатурацию молекул ДНК осуществляли путем обработки фиксированных клеток 2N HCl (30 мин). Затем клетки отмывали боратным буфером, проводили пермеабиллизацию в 1%

растворе Triton и блокировали неспецифическое связывание антител путем инкубации в растворе с 5% нормальной лошадиной сыворотки и 0,2 % Triton. Инкубацию с первичными антителами проводили при +4°C в течение 12 часов, со вторичными антителами – при +20°C в течение 30 минут. В качестве первичных антител использовались BrdU (Bu20a) Mouse mAb #5292 (Cell Signaling Technology, США) в разведении 1:1000. В качестве вторичных антител использовались Goat polyclonal to Mouse IgG (ab6785, Abcam, Великобритания) в разведении 1:500.

Для исследования клеточной морфологии проводили окрашивание ККН липофильным флуоресцентным красителем DiO (Sigma, США), который широко используется для мечения мембранных структур (3). Для этого в среду культивирования клеток добавляли DiO (5 мкг/мл) и культивировали 1,5 часа, после чего среду с красителем заменяли на обычную культуральную среду.

Активность фермента 3β-гидроксистероиддегидрогеназы (3β-HSD) в суспензии клеток или в клетках монослоя определяли с помощью гистохимического метода (4). К 50 мкл клеточной суспензии добавляли 200 мкл красящего раствора - среды DMEM/F12, содержащей нитротетразолий синий (0,1 мг/мл, Sigma, США), дегидроэпиандростерон (0,12 мг/мл, Sigma, США) и никотинамидадениндинуклеотид (1 мг/мл, Sigma, США). При исследовании активности 3β-HSD в клетках монослоя производили замену питательной среды красящим раствором описанного состава. Клетки инкубировали в красящем растворе в течение 2 и 24 часов при 37°C.

Для подсчета количества 3β-HSD-позитивных клеток, а также в случае пересева первичную культуру клеток открепляли от поверхности культивирования с использованием смеси растворов трипсина (Sigma, США) и Версена в соотношении 1:1 (конечная концентрация трипсина составляла 0,25%) при 37°C в течение 3 мин. Открепившиеся клетки отмывали от трипсина охлажденной средой с 5% ФТС двукратным центрифугированием.

Микрофотосъемку осуществляли с помощью флуоресцентного микроскопа Carl Zeiss Axio Observer Z и светооптического микроскопа AmScope с цифровой камерой.

Морфометрические исследования культуры клеток проводили по микрофотографиям, используя программное обеспечение AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss).

Статистическую обработку данных проводили с использованием параметрического критерия Стьюдента, а также непараметрического критерия Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение.

Режим ферментативной обработки, применяемый в данной работе, позволил получить в среднем $4,81 \pm 2,64$ млн жизнеспособных клеток из одного надпочечника. При посевной концентрации $0,33 \pm 0,16$ млн клеток на 1 см^2 большая часть клеток прикреплялась и начинала расплываться в течение первых суток культивирования.

На начальном этапе культивирования в первичной культуре клеток надпочечников (ККН) наблюдались в основном клетки фибробластоподобной морфологии, а также округлые клетки, содержащие включения. На 4-5-е сутки культивирования конфлюентность достигала 80%, фибробластоподобные клетки располагались более упорядоченно, формируя характерные «потoki». В это же время в культуре наблюдалось формирование многоклеточных образований шаровидной формы, которые мы назвали цитосферами.

Ранее нами было показано, что в ККН новорожденных поросят цитосферы формируются только в среде с 10% ФТС и представляют собой образования, прикрепленные к монослою из фибробластоподобных клеток (4).

На начальном этапе формирования цитосфер их диаметр составлял в среднем 40 ± 14 мкм. При дальнейшем культивировании цитосферы увеличивались в размерах (рис. 1, А), некоторые из них достигали 400 мкм. На 13-е сутки культивирования диаметр цитосфер составлял в среднем 246 ± 70 мкм.

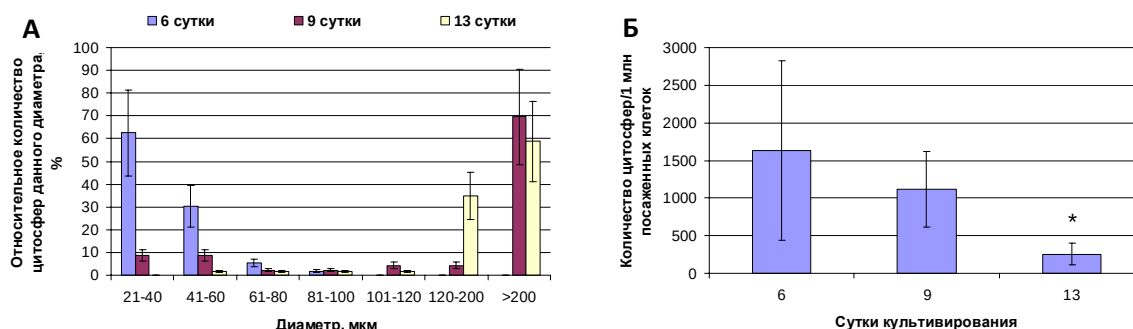


Рис.1. А - количество цитосфер различного диаметра в ККН на разные сутки культивирования, Б – общее количество цитосфер в ККН на разные сутки культивирования.

Одним из способов изучения клеточной пролиферации, является применение бромдеоксиуридина (BrdU). BrdU, являясь аналогом нуклеозида тимидина, встраивается в ДНК делящейся клетки, после чего его идентифицируют с помощью специфических антител (5).

Для идентификации пролиферирующих клеток в составе цитосфер на 8-е сутки культивирования в культуральную среду добавляли BrdU и культивировали в течение 6 часов. После этого культуру клеток фиксировали и проводили иммуноцитохимическое мечение BrdU, включенного в ДНК пролиферирующих клеток. Данные флуоресцентной микроскопии показали, что в составе цитосфер присутствует незначительное количество пролиферирующих клеток, что подтверждается соответствующей флуоресценцией (рис. 2).

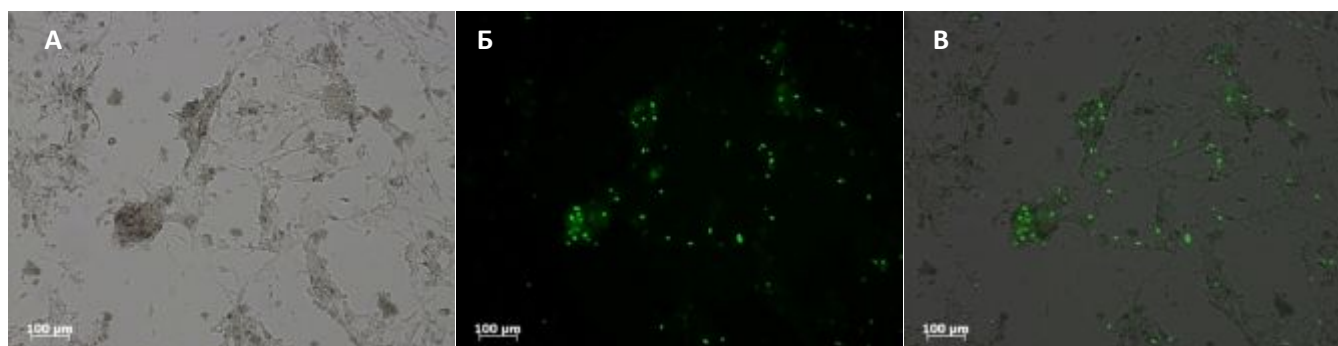


Рис. 2. Иммуноцитохимическое мечение BrdU в ККН. Клетки зафиксированы на 8-е сутки культивирования: А - световая микроскопия, Б – флуоресцентная микроскопия, В – совмещенная фотография.

Увеличение диаметра цитосфер может быть связано не только с пролиферацией клеток, формирующих цитосферу, но и с «захватом» клеток близлежащего монослоя. Подтверждением этого предположения может служить тот факт, что на более поздних

сроках культивирования (более 13 суток) наблюдается разрежение участков монослоя вокруг цитосфер (рис. 3, А). Кроме того, на поздних сроках культивирования наблюдалось слияние нескольких цитосфер с формированием одной многоклеточной структуры крупного размера (рис. 3, Б). В результате данного процесса слияния в культуре наряду с увеличением размера цитосфер снижается их количество (рис. 1, Б). При дальнейшем наблюдении за такими крупными цитосферами было установлено, что они подвержены спонтанному откреплению от подложки.

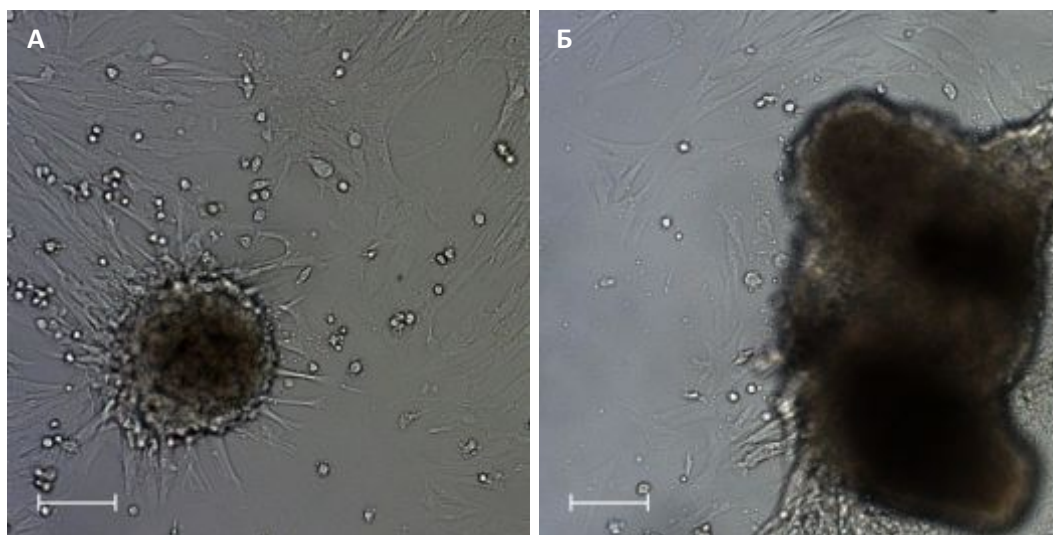


Рис. 3. ККН, 13-е сутки культивирования, световая микроскопия (прижизненное наблюдение). А - разрежение монослоя вокруг цитосферы, Б – слияние нескольких цитосфер. Масштабная линейка соответствует 100 мкм.

После открепления цитосфер от подложки и последующего пересева в культуральную среду аналогичного состава они снова прикреплялись к поверхности культивирования, после чего наблюдалась миграция из них клеток, морфологически отличающихся от крупных распластанных фибробластоподобных клеток, представленных в культуре до пересева. Так, выселяющиеся из цитосфер клетки были меньшего размера, характеризовались мелким ядром и компактной цитоплазмой. С помощью окрашивания ККН флуоресцентным красителем DiO мы смогли выделить клетки нескольких морфологических типов: округлые без отростков, клетки с конусом роста, клетки с униполярным отростком, а также клетки с двумя биполярными отростками (рис. 4).

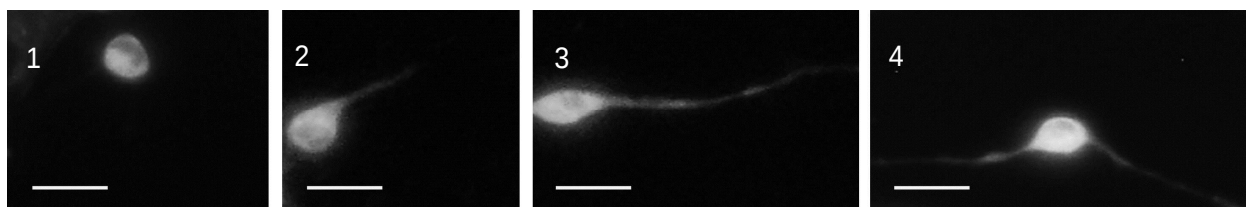


Рис. 4. Клетки, мигрирующие из цитосфер: 1 – округлая клетка без отростков, 2 – клетка с конусом роста, 3 – клетка с униполярным отростком, 4 – клетка с двумя биполярными отростками. Окрашивание DiO. Масштабный отрезок равен 20 мкм.

Очевидно, что клетки, мигрирующие из цитосфер в ККН новорожденных поросят, имеют нейрональную морфологию. Процессы нейрональной дифференцировки в культуре хромаффинных клеток надпочечников в последнее время активно изучаются (1, 6-7). Однако для подтверждения нейрональной природы клеток, наблюдаемых в наших экспериментах, необходимы дальнейшие иммуоцитохимические и электрофизиологические исследования. На данном этапе работы мы называем данные клетки нейроноподобными.

При дальнейшем культивировании отростки нейроноподобных клеток удлинялись, формируя сети (рис. 5).

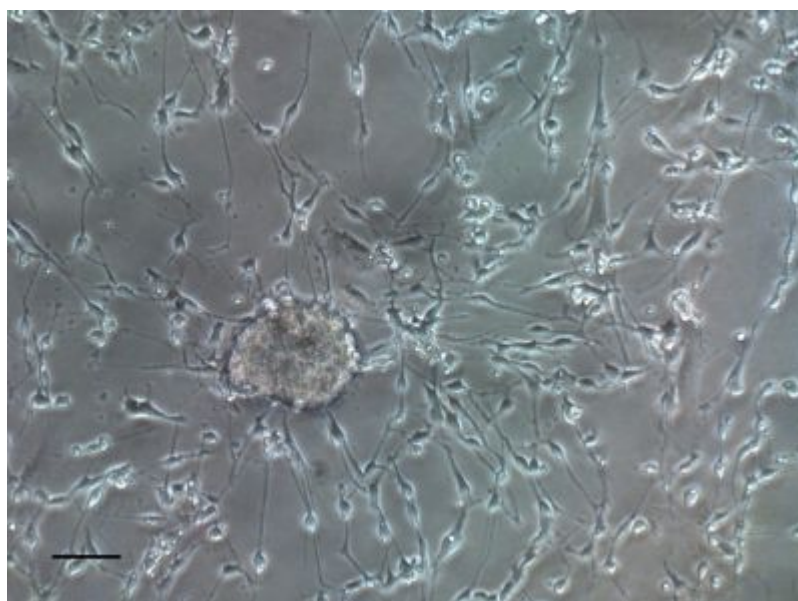


Рис. 5. Формирование сетей из отростков нейроноподобных клеток, мигрирующих из цитосферы в ККН, 19-е сутки культивирования. Масштабный отрезок равен 60 мкм.

Из литературных данных известно, что клетки нейроноподобной морфологии появляются в культуре клеток мозгового вещества надпочечников в результате трансдифференцировки (2) хромаффинных клеток либо дифференцировки прогениторных клеток (1). В обоих случаях для проявления нейронального фенотипа необходима культуральная среда, не содержащая глюкокортикоидных гормонов. Синтетический аналог глюкокортикоидов - дексаметазон, введенный в культуральную среду, не только препятствует нейрональной дифференцировке, но и вызывает обратный эффект - дедифференцировку сформировавшихся нейронов (8).

В данной работе мы использовали общую суспензию клеток, полученных из надпочечников, поэтому культура была гетерогенна по клеточному составу и содержала адренокортикальные гормонопродуцирующие клетки. Для оценки количества клеток, продуцирующих кортикостероиды в ККН, мы исследовали активность 3β -HSD – ключевого фермента синтеза кортикостероидов - в клетках в различные сроки культивирования. Перед посевом количество 3β -HSD-позитивных (3β -HSD⁺) клеток в общей суспензии составляло $48,4 \pm 3,3\%$ (рис. 6, 0 сутки). В дальнейшем количество 3β -HSD⁺ клеток постепенно снижалось (рис. 6), а к 5-м суткам культивирования 3β -HSD⁺ клетки не обнаруживались.

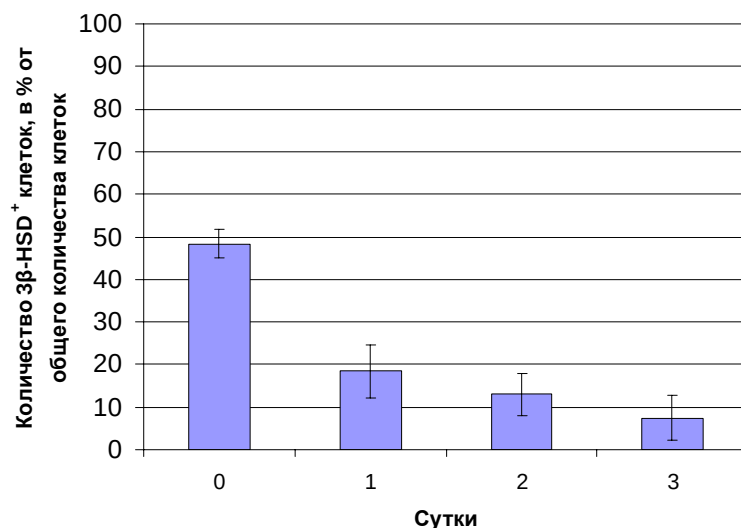


Рис. 6. Относительное количество 3β-HSD⁺ клеток среди всех клеток в исходной суспензии (0 сутки), а также в культуре на разные сроки культивирования.

Вероятно, снижение активности фермента 3β-HSD является следствием отсутствия естественной гипофизарной стимуляции.

Известно, что *in vivo* основным стимулятором синтеза стероидных гормонов клетками коры надпочечников является аденокортикотропный гормон (АКТГ) гипофиза. Вероятно, его отсутствие или недостаточное количество в среде культивирования может приводить к снижению гормонопродукции клетками коры надпочечников.

Так, например, в культуре аденокортикальных клеток мышей наблюдается быстрое снижение экспрессии *Cyp11b1*, ответственного за синтез 11 - бета - гидроксилазы – одного из ферментов синтеза глюкокортикоидов. Введение в среду АКТГ способствовало увеличению экспрессии *Cyp11b1*, а его отмена – повторному снижению (9).

Следует отметить, что снижение количества 3β-HSD⁺ клеток в ККН, наблюдаемое в наших исследованиях, свидетельствует не об элиминации стероидпродуцирующих клеток из культуры, а о снижении их функциональной активности. Методика, используемая нами для определения активности фермента 3β-HSD, предусматривает инкубацию клеток в среде, содержащей дегидроэпиандростерон в качестве субстрата для фермента 3β-HSD, в течение 90-120 минут. В некоторых экспериментах мы инкубировали суспензию клеток в присутствии дегидроэпиандростерона в течение 24 часов. При этом количество 3β-HSD⁺ клеток значительно увеличивалось. Так, при инкубации клеток 2-суточной ККН с дегидроэпиандростероном в течение 120 минут количество 3β-HSD⁺ клеток составляло 13±5 %, а при инкубации в течение 24 часов увеличивалось до 29,7±5,3 % (рис. 7).

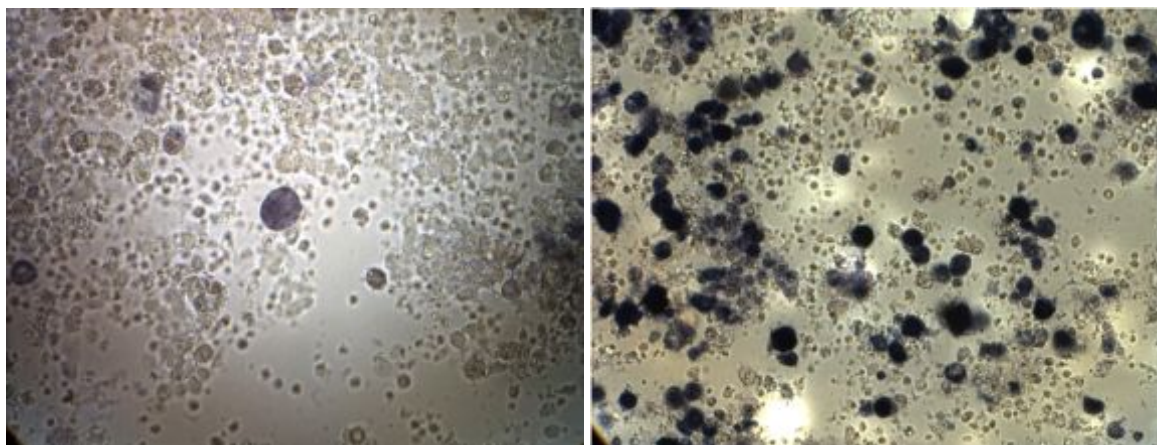


Рис. 7. Окрашивание 3β -HSD в ККН на 2 сутки культивирования. А – инкубация с дегидроэпиандростероном в течение 120 мин, Б – те же клетки после 24 ч инкубации с дегидроэпиандростероном. 3β -HSD⁺ клетки окрашены в фиолетовый цвет.

Возможно, что при длительной инкубации дегидроэпиандростерон выступает не только в качестве субстрата для 3β -HSD, но и как активатор синтеза данного фермента в клетках. Подобный активирующий эффект дегидроэпиандростерона описан в литературе. Так, при интраперитонеальном введении дегидроэпиандростерона самцам крыс наблюдалось увеличение экспрессии мРНК ряда ключевых ферментов стероидогенеза, в том числе и 3β -HSD (10).

Таким образом, в ККН новорожденных поросят наблюдаются морфологические и функциональные изменения клеточного состава. В течение первых 4-5-ти суток культивирования формируется монослой из клеток преимущественно фибробластоподобной морфологии, затем образуются многоклеточные структуры - цитосферы, а на более поздних сроках культивирования появляются нейроноподобные клетки. Данные морфологические изменения происходят на фоне угасания функциональной активности стероидпродуцирующих клеток, что подтверждается отсутствием в них фермента 3β -HSD и косвенно свидетельствует о снижении концентрации стероидных гормонов в среде культивирования.

Reference:

1. Chung KF, Sicard F, Vukicevic V, et al. Isolation of neural crest derived chromaffin progenitors from adult adrenal medulla. *Stem cells* 2009;27(10):2602-2613. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/stem.180> PubMed PMID: 19609938. doi: 10.1002/stem.180. [\[Google Scholar\]](#)
2. Doupe AJ, Landis SC, Patterson PH. Environmental influences in the development of neural crest derivatives: glucocorticoids, growth factors, and chromaffin cell plasticity.. *J Neurosci* 1985;5(8):2119-2142. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=4020432> PubMed PMID: 4020432. [\[Google Scholar\]](#)
3. O'Brien JA, Lummis SCR. Diolistic labeling of neuronal cultures and intact tissue using a hand-held gene gun.. *Nat Protoc* 2006;1(3):1517-1521. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/17406443> PubMed PMID: 17406443. doi: 10.1038/nprot.2006.258. [\[Google Scholar\]](#)

4. Wiebe JP. Steroidogenesis in rat leydig cells: changes in activity of 5-ane and 5-ene 3beta-hydroxysteroid dehydrogenases during sexual maturation.. *Endocrinology* 1976;98(2):505-513. PubMed PMID: 129324. doi: 10.1210/endo-98-2-505. [\[Google Scholar\]](#)
5. Sidorenko OS, Bozhok GA, Bilyavskaya SB. et al. Morphofunctional characteristics of newborn piglets adrenal cells culture. *Biotechnology* 2012;5(5):72-81. [\[Google Scholar\]](#)
6. Ehrhart-Bornstein M, Vukicevic V, Chung KF. et al. Chromaffin Progenitor Cells from the Adrenal Medulla. *Cell Mol Neurobiol* 2010;30(8):1417-1423. Available from: <http://www.scholaruniverse.com/ncbi-linkout?id=21080061> PubMed PMID: 21080061. doi: 10.1007/s10571-010-9571-3. [\[Google Scholar\]](#)
7. Santana MM, Chung KF, Vukicevic V. et al. Isolation, Characterization and Differentiation of Progenitor Cells from Human Adult Adrenal Medulla. *Stem Cells Transl Med* 2012;1(11):783-791. Available from: <http://stemcellstm.alphamedpress.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=23197690> PubMed PMID: 23197690. doi: 10.5966/sctm.2012-0022. [\[Google Scholar\]](#)
8. Unsicker K, Krisch B, Otten U, Thoenen H. Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells: impairment by glucocorticoids.. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75(7):3498-3502. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/28526> PubMed PMID: 28526. [\[Google Scholar\]](#)
9. Chu Y, Wu BM, McCabe ER, Dunn JCY. Serum-free cultures of murine adrenal cortical cells.. *J Pediatr Surg* 2006;41(12):2008-2012. Available from: <http://www.scholaruniverse.com/ncbi-linkout?id=17161193> PubMed PMID: 17161193. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2006.08.027. [\[Google Scholar\]](#)
10. Song L, Tang X, Kong Y. et al. The expression of serum steroid sex hormones and steroidogenic enzymes following intraperitoneal administration of dehydroepiandrosterone (DHEA) in male rats. *Steroids* 2010;75(3):213-218. Available from: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@rn+57-88-5> PubMed PMID: 19961867. doi: 10.1016/j.steroids.2009.11.007. [\[Google Scholar\]](#)