

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

УДК 616.411-018:612.112.9

© С.О. Фетисов, Г.Г. Вердиян, А.А. Бахмет, Д.А. Соколов, 2021

С.О. Фетисов¹, Г.Г. Вердиян², А.А. Бахмет², Д.А. Соколов¹ МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СЕЛЕЗЁНКИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА

¹ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет
им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, г. Воронеж
²ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный университет
им. И.М. Сеченова» Минздрава России, г. Москва

Целью исследования явилось изучение структурных изменений в красной и белой пульпе селезенки крыс при иммобилизационном стрессе на фоне введения липополисахарида бактериальной природы.

Материал и методы. Эксперимент выполнен на 60 белых крысах линии Wistar. Первая контрольная группа получала физраствор, вторая – липополисахарид. У крыс экспериментальной группы формировали иммобилизационный стресс длительностью 24 часа. Первой экспериментальной группе вводили физраствор, второй – липополисахарид Пирогенал («Медгамал», Россия) в дозе 100 мкг/кг. Забор материала производили через 3 часа на 3-и и 8-е сутки эксперимента. Из фиксированных в 10% растворе нейтрального формалина фрагментов селезенки изготавливали парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином. Измеряли площади продольного среза органа, белой и красной пульпы; ширину реактивного центра лимфатических узелков белой пульпы, ширину мантийной и маргинальной зон узелков, а также ширину периартериальной лимфоидной муфты (по 40–50 измерений для каждого животного).

Результаты. Установлено, что на 3-и сутки после стресса выявлялись морфологические признаки снижения активности белой пульпы в виде уменьшения площади белой пульпы (на 39,7%), а также общего уменьшения площади среза селезенки на 4,3%. На 8-е сутки отмечались восстановительные процессы в селезенке, однако полного восстановления структуры селезенки не происходило – площадь белой пульпы была на 11,55%, а красной – на 6,7% меньше показателей контрольной группы. При введении липополисахарида на фоне стресса в селезенке не обнаруживалось признаков угнетения активности белой и красной пульпы; морфологические параметры селезенки не отличались от контрольных значений.

Ключевые слова: селезенка, белая и красная пульпа, периартериальная лимфоидная муфта, иммобилизация, липополисахарид.

S.O. Fetisov, G.G. Verdiyan, A.A. Bakhmet, D.A. Sokolov MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE SPLEEN OF RAT UNDER IMMOBILIZATION STRESS

The aim of the study was to investigate structural changes in the red and the white pulp of the rat spleen under immobilization stress when introducing bacterial lipopolysaccharide.

Material and methods. The experiment was performed on 60 white rats of the Wistar line. The first control group received physiological saline, the second one received lipopolysaccharide. In the experimental group of rats, the immobilization stress was 24 hours duration. The first experimental group was administered physiological saline solution, the second experimental group was administered 100 µg/kg dose of lipopolysaccharide Pyrogenal («Medgamal», Russia). The material sampling was performed after 3 hours, on the 3rd day and the 8th day of the experiment. Paraffin sections of 4–5 microns thickness were made from the spleen fragments fixed in 10% solution of neutral formalin, then they were stained with hematoxylin and eosin. The areas of the organ's longitudinal section, the white and the red pulp, the width of the lymph nodes reactive center of the white pulp, the width of the nodules, mantle and marginal zones as well as the width of the periarterial lymphoid muff were measured (40–50 measurements for each animal).

Results. It was found that on the 3rd day after the stress, morphological signs of the white pulp activity reduction were detected via the decrease in the white pulp area (by 39.7%), as well as a general decrease of the spleen section area by 4.3%. On the 8th day, there were recovery processes in the spleen, but there was no complete restoration of the spleen structure – the white pulp area was 11.55% less than the control group values, and the red pulp area was 6.7% less than the control group values. When lipopolysaccharide was administered under stress, there were no signs of the white and the red spleen pulp activity inhibition; the morphological parameters of the spleen did not differ from the control values.

Key words: spleen, white and red pulp, periarterial lymphoid sheaths, immobilization, lipopolysaccharide.

Стресс – это привычный аспект жизни, являющийся стимулятором для одних, но бременем для многих других. Долгое время считалось, что стресс играет определенную роль в этиологии многих заболеваний, и многочисленные исследования показали, что стресс влияет на секрецию нейроэндокринных гормонов, особенно глюкокортикоидов, подавляет иммунную систему и вызывает острую дисфункцию органов [2–4]. Снижение числа лимфоцитов селезенки является важным следствием индуцированного стрессом

иммунокомпрометирования [11]. Это может вызвать нарушение гомеостаза иммунной функции, что приведет к раку и нейродегенеративным или аутоиммунным заболеваниям [10,11]. Иммобилизация – одна из самых мощных моделей стресса у грызунов: она сильно активизирует оба компонента симпатoadреналовой системы и влияет на метаболизм, инициируя альтеративные процессы в органах, включая органы иммунной системы [6,7,9,10]. В настоящее время усилия многих исследователей направлены на разработку и

применение эффективных способов коррекции иммунодефицитных состояний, которые могут развиваться в результате хронического стресса [6,7,9]. Отдельный интерес ученых вызывает использование в качестве иммуномодуляторов липополисахаридов для стимуляции иммунных процессов в организме. «Пирогенал» – один из иммуномодуляторов широкого спектра действия на основе липополисахарида, выделенного из *Salmonella typhi*. Существуют данные о положительном влиянии пирогенала на активацию системы тканевых макрофагов, формирование ответных реакций со стороны гипоталамо-гипофизарной системы, усиление синтеза интерлейкинов (ИЛ-1, ИЛ-2) и стимуляцию фагоцитоза [1,5,8].

Целью исследования явилось изучение структурных изменений в белой и красной пульпе селезенки крыс при иммобилизационном стрессе и на фоне введения липополисахарида (ЛПС) бактериальной природы.

Материал и методы

Эксперимент в части содержания и забора биоматериала проводился в полном соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях (Страсбург, 1986), в соответствии с «Общими этическими принципами экспериментов на животных» (Россия, 2011), правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г.). Получено разрешение локального этического комитета ВГМУ им. Н.Н. Бурденко (протокол №2 от 16.03.2018 г.).

Эксперимент поставлен на 60 белых крыс-самцах линии Wistar массой 180-200 г, распределенных на 4 группы: 2 контрольные и 2 экспериментальные. Животным контрольных групп внутрибрюшинно вводили: 1-й – физиологический раствор в объеме, эквивалентном введению ЛПС особям других групп; 2-й – препарат «Пирогенал» (Медгамал, Россия), липополисахарид, выделенный из *Salmonella typhi*, в дозе 100 мкг/кг массы тела животного. Для формирования иммобилизационного стресса крыс помещали в пластиковые боксы размерами 16.5×7.0×5.5 см на 24 часа. В дальнейшем части животных (1-я экспериментальная группа) внутрибрюшинно вводили физраствор, а другой части (2-я основная экспериментальная группа) вводили липополисахарид в вышеуказанной дозе. На протяжении всего эксперимента животные имели свободный доступ к пище и воде. Забор материала проводили через 3 часа на 3-и и 8-е

сутки от начала эксперимента. Биопрепараты селезенки фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, обезживали в спиртах возрастающей крепости и заливали в парафин. Тонкие парафиновые срезы толщиной 4-5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином.

При использовании классической планиметрии определяли площадь продольных срезов органа и площадь белой и красной пульпы вместе с соединительнотканной стромой органа. С помощью оптического микрометра измеряли ширину реактивного центра лимфатических узелков белой пульпы, ширину мантийной и маргинальной (краевой) зон лимфатических узелков, а также ширину периаартериальной лимфоидной муфты (ПАЛМ). Для каждого животного проводили не менее 50-и измерений.

Статистический анализ результатов в сравниваемых группах проводили при помощи параметрического t-критерия Стьюдента при нормальном распределении и одинаковых дисперсиях. Нормальность распределения выборок определяли с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,001$. В случае ненормального распределения (для показателей площадей белой и красной пульпы) применяли непараметрический T-критерий Уайта. Статистически значимыми различия в группах считали при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Гистологическая картина селезенки в контрольных группах характеризовалась классической с хорошо выраженными центральными артериями, вокруг которых были видны скопления Т-лимфоцитов, формирующих периаартериальную муфту, располагающуюся на периферии узелка. Толщина периаартериальной муфты достигала значительной величины. Выявлялся также высокий уровень плотности клеток в этой зоне. Реактивный центр чаще располагался ниже периаартериальной муфты. В нём выявлялась высокая плотность клеток и поэтому лимфатические узелки селезенки крыс отличались от аналогичных структур селезенки других млекопитающих. Вокруг лимфатического узелка различалась расширенная маргинальная зона с низким уровнем плотности клеток (рис. 1).

Структура селезенки после введения липополисахаридов контрольным животным не демонстрировала значительных особенностей: центральные артерии хорошо выражены, вокруг артерий видны скопления Т-лимфоцитов, формирующих периаартериаль-

ную муфту. Реактивные центры лимфатических узелков отчетливо определялись начиная с 3-их суток после начала эксперимента. Вокруг реактивных центров располагалась мантийная зона, отличавшаяся наиболее высокой плотностью клеток.

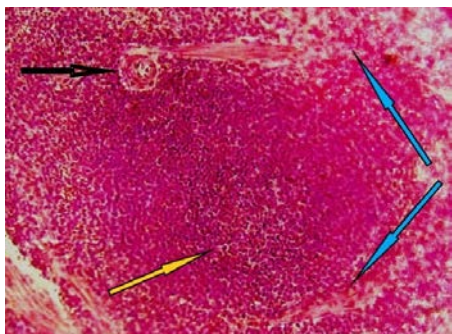


Рис. 1. Лимфатический узелок селезенки животного контрольной группы на 3-и сутки после введения физраствора. Хорошо выражена периартериальная муфта (черная стрелка) и центральная артерия, вокруг которой видны скопления Т-лимфоцитов. Реактивный центр (желтая стрелка) слабо выражен. Вокруг лимфатического узелка видна расширенная маргинальная зона (голубые стрелки). Окраска гематоксилином и эозином. Об. 20, ок.15.

Имобилизационный стресс у крыс провоцировал значительные изменения в гистологической картине селезенки. Качественные изменения характеризовались следующими свойствами: уже через 3 часа нами было выявлено резкое уменьшение диаметра лимфатических узелков, диаметра центральной артерии и ширины периартериальной муфты, реактивный центр и мантийная зона белой пульпы стали слабо выраженными, отмечалось расширение маргинальной зоны. При этом в центре лимфатических узелков выявлялась высокая плотность клеток. Наблюдалось уменьшение диаметра центральной артерии, которая на препаратах слабо дифференцировалась. На 3-и сутки после начала эксперимента морфофункциональные показатели лимфатических узелков селезенки оставались без изменений по сравнению с предыдущим сроком. Восьмые сутки после начала эксперимента характеризовались увеличением диаметра лимфатических узелков, а также ширины периартериальной муфты. Реактивные центры оставались слабо выраженными. Маргинальная зона достигала значительной ширины (рис. 2).

Результаты морфометрических исследований: площадь среза селезенки, относительная доля белой и красной пульпы контрольных крыс (1- и 2-я группы) через 3 часа, на 3-и и 8-е сутки после начала эксперимента (рис. 3,4) статистически значимых различий не отмечено.

Имобилизационный стресс длительно — 24 часа приводил к уменьшению доли

площади белой пульпы в 1,21 раза уже через 3 часа после начала эксперимента. Дальнейшее уменьшение площади белой пульпы по сравнению с контролем обнаруживалось и на 3-и сутки — белая пульпа составляла 18,2% от площади среза. На 8-е сутки отмечалось увеличение доли белой пульпы до 26,8% по сравнению с предыдущим сроком исследования (рис. 4). Эти изменения, по всей видимости, являются следствием восстановительных процессов в белой пульпе селезенки к 8-м суткам после стрессового воздействия, однако полного восстановления структуры селезенки отмечено не было. Площадь, занимаемая белой пульпой, была меньше на 11,5% ($p < 0,05$). Отмечалось также уменьшение на 4,3% общей площади среза селезенки ($p < 0,05$).

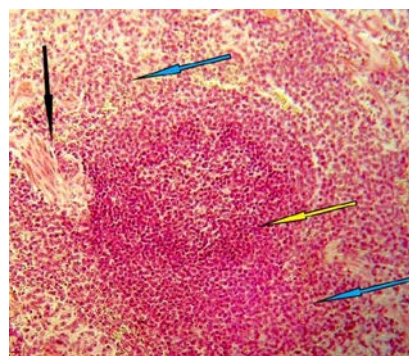


Рис. 2. Белая пульпа селезенки крыс после стресса и введения физраствора: 3-и сутки после начала эксперимента. Выявлено резкое уменьшение диаметра лимфатических узелков, диаметра центральной артерии и ширины периартериальной муфты (черная стрелка). Слабо выражены реактивный центр и мантийная зона белой пульпы. В мантийной зоне лимфатического узелка выявлена высокая плотность клеток (желтая стрелка). Реактивный центр лимфатического узелка слабо выражен. Отмечается расширение маргинальной зоны (голубые стрелки). Окраска гематоксилином и эозином. Об. 20, ок.15.

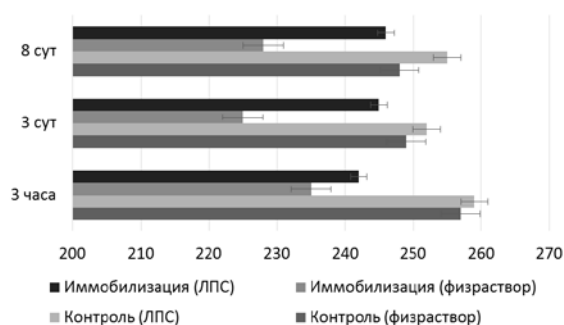


Рис. 3. Площадь продольного среза селезенки крысы, мм². Ось ординат — сроки забора материала, ось абсцисс — среднее значение ($n=5$) площади продольного среза, мм². ЛПС — внутрибрюшинное введение липополисахарида

Размеры реактивных центров, маргинальной зоны, периартериальной муфты и мантийной зоны у крыс после иммобилизации и введения физраствора (рис. 6,7) через 3 часа демонстрировали тенденцию к уменьшению в сравнении с контрольными показателями. На 3-и сутки после начала эксперимента отмечалось увеличение размеров реактивных цен-

тров и мантийной зоны на 22,3% и 13,8% соответственно. При этом показатели периартериальных лимфоидных муфт и маргинальной зоны продолжали уменьшаться на 9,4% и 14,7% соответственно. На 8-е сутки эксперимента на фоне стресса все морфометрические показатели лимфатических узелков демонстрировали тенденцию к восстановлению, однако не достигали аналогичных показателей контрольной группы животных (рис. 6,7).

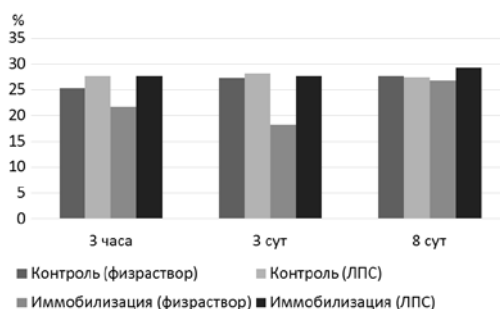


Рис. 4. Относительная доля площади среза селезенки со структурами белой пульпы, %. Ось ординат – доля белой пульпы, %, ось абсцисс – экспериментальные группы и сроки забора материала. ЛПС – внутрибрюшинное введение липополисахарида

Введение липополисахарида при иммобилизационном стрессе отчетливо изменяло как гистологическую картину, так и динамику изменения морфометрических показателей. Гистологические исследования показали, что у крыс после стресса и введения липополисахарида через 3 часа после начала эксперимента в селезенке отчетливо дифференцировались периартериальная муфта и центральная артерия. Реактивный центр лимфатического узелка белой пульпы был выражен слабо. В центре узелка обнаруживалась высокая плотность клеток. На 3-и сутки после стресса и введения липополисахарида в селезенке определялись все компоненты лимфатического узелка: реактивный центр, мантийная и маргинальная зоны, а также периартериальная муфта. Расширенная периартериальная муфта располагалась на периферии лимфатического узелка и характеризовалась высокой плотностью клеток. На периферии лимфатического узелка отмечалась узкая маргинальная зона. При этом 8-е сутки после начала эксперимента характеризовались хорошо выраженными реактивными центрами лимфатических узелков, мантийной зоной и периартериальными муфтами. Причем отмечалась высокая плотность клеток как в мантийной зоне, так и в периартериальной муфте белой пульпы (рис. 5).

У данной экспериментальной группы через 3 часа на 3-и и 8-е сутки соотношение белой пульпы и соединительнотканного компонента селезенки статистически значимо не

отличалось от аналогичных показателей контрольной группы животных (рис. 4).

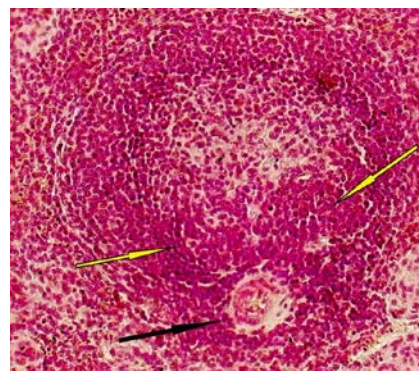


Рис. 5. Структура селезенки после стресса и введения липополисахаридов. 3-и сутки после начала эксперимента. Хорошо выраженные периартериальная муфта и центральная артерия (черная стрелка). Отмечается высокая плотность клеток в мантийной зоне и в периартериальной муфте белой пульпы (желтые стрелки). Окраска гематоксилином и эозином. Об. 20, ок. 15

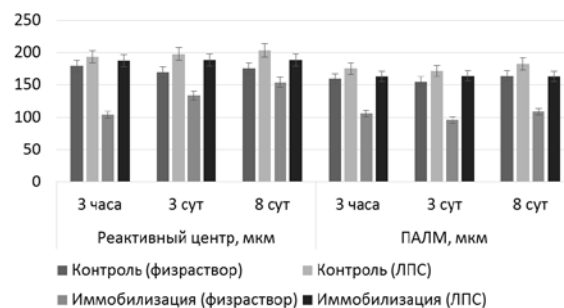


Рис. 6. Морфометрические показатели белой пульпы селезенки: средняя ширина реактивного центра и периартериальной лимфоидной муфты, мкм. Ось ординат – ширина, мкм, ось абсцисс – сроки забора материала. ЛПС – внутрибрюшинное введение липополисахарида, ПАЛМ – периартериальная лимфоидная муфта

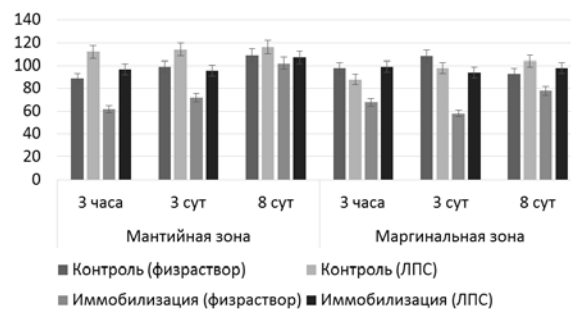


Рис. 7. Морфометрические показатели белой пульпы селезенки: размер мантийной и маргинальной (краевой) зон, мкм. Ось ординат – ширина, мкм, ось абсцисс – сроки забора материала. ЛПС – внутрибрюшинное введение липополисахарида, ПАЛМ – периартериальная лимфоидная муфта

Схожий характер имели и изменения размеров реактивных центров, мантийной и маргинальной зон, периартериальной муфты: через 3 часа после начала эксперимента статистически значимых изменений выявлено не было. На 3-и сутки отмечалось незначительное снижение (на 4,5% и 4,6% соответственно) размеров реактивных центров и мантийной зоны. На 8-е сутки у крыс после иммобилизационного стресса и введения липополисахарида морфометрические показатели лим-

фатических узелков не имели статистически значимых различий в сравнении с контрольной группой животных (рис. 6, 7).

Заключение

Имобилизационный стресс вызывает значительные морфологические изменения во внутренней структуре селезенки крысы, выражающиеся в снижении доли белой пульпы, что подтверждается проведенными нами качественными и количественными исследованиями органа. Нарастание этих процессов к 3-им суткам свидетельствует о подавлении функциональной активности органа в динамике. При этом необходимо отметить, что на

8-е сутки после стресса структура селезенки в значительной мере восстанавливалась. На 8-е сутки эксперимента основные морфофункциональные показатели селезенки приближались к таковым у контрольных животных. Применение липополисахарида «Пирогенал» после иммобилизационного стресса способствует активизации восстановительных процессов в селезенке и может служить обоснованием к включению данного препарата в протокол лечения.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Сведения об авторах статьи:

Фетисов Сергей Олегович – к.б.н., ассистент кафедры нормальной анатомии человека ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России. Адрес: 394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, 10. E-mail: fetisovbiol@yandex.ru.

Вердиян Генрик Георгиевич – ассистент кафедры анатомии человека ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет). Адрес: 125009, г. Москва, ул. Моховая, 11, стр.10.

Бахмет Анастасия Анатольевна – д.м.н., профессор кафедры анатомии человека ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет). Адрес: 125009, г. Москва, ул. Моховая, 11, стр.10. Email: bakhmet_a_a@staff.sechenov.ru.

Соколов Дмитрий Александрович – к.м.н., доцент кафедры нормальной анатомии человека ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России. Адрес: 394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, 10. Email: anat-vrn@yandex.ru.

ЛИТЕРАТУРА

1. Долгушин, И.И. Влияние пирогенала на способность моноцитов к образованию внеклеточных ловушек / И.И. Долгушин [и др.] // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2012. – Т. 41, №4. – С. 31-32.
2. Евлахова, Л.А. Структурные особенности белой пульпы селезенки у мышей после радиационного воздействия низкой интенсивности / Л.А. Евлахова, С.В. Чава, Н.К. Акыева // Морфологические ведомости. – 2013. – № 2. – С. 98-100.
3. Кварацхелия, А.Г. Морфологическая характеристика тимуса и селезенки при воздействии факторов различного происхождения / А.Г. Кварацхелия [и др.] // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2016. – Т. 5, № 3. – С. 77-83.
4. Сапин М.Р. Лимфатическая система и её роль в иммунных процессах / М.Р. Сапин, Д.Б. Никитюк. – М.: Медицинская книга, 2014. – 40 с.
5. Шишкова, Ю.С. Влияние препарата "Пирогенал" на образование нейтрофильных внеклеточных ловушек / Ю.С. Шишкова [и др.] // Медицинская наука и образование Урала. – 2009. – Т.10, №3. – С. 23-24.
6. Rokytová I, Mravec B, Lauková M, Vargovič P Effect of rapamycin on repeated immobilization stress-induced immune alterations in the rat spleen. J Neuroimmunol. 2020 Jun 25;346:577309. doi: 10.1016/j.jneuroim.2020.577309.
7. Repeated Stress Exaggerates Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response in the Rat Spleen / M. Laukova [et al] // Cell Mol Neurobiol. 2018 Jan;38(1):195-208. doi: 10.1007/s10571-017-0546-5.
8. Sepsis-like syndrome caused by the Russian medication pyrogenal (Salmonella typhi endotoxin). / Zucker T [et al] // Isr Med Assoc J. 2003 Oct;5(10):750-1.
9. Xiaoyaosan improves depressive-like behavior in rats with chronic immobilization stress through modulation of the gut microbiota / Hui-Zheng Zhu [et al] // Biomed Pharmacother. 2019 Apr;112:108621. doi: 10.1016/j.biopha.2019.108621.
10. Yang EV, Glaser R. Stress-induced immunomodulation and the implications for health. International Immunopharmacology. 2002;2:315–324. doi: 10.1016/s1567-5769(01)00182-5
11. Yi-Fang Li, Rong-Rong He, Bun Tsoi [et al] Anti-stress effects of carnosine on restraint-evoked immunocompromise in mice through spleen lymphocyte number maintenance. PLoS One. 2012;7(4):e33190. doi: 10.1371/journal.pone.0033190.

REFERENCES

1. Dolgushin II, Smirnova TG, Shishkova YuS, Prokop'eva OB Effect of pyrogenal on ability monocytes to production of extracellular traps. Journal of Ural Medical Academic Science. 2012;4(41):31–32. (in Russian)
2. Evlakhova L., Chava SV, Akyeva NK Structural peculiarities of white pulp of the spleen in mice after radiation exposure of low intensity Morfologicheskie vedomosti. 2013;(2):98-100. (in Russian)
3. Kvaratskheliya AG, Klochkova SV, Nikityuk D., Alekseeva NT Morfologicheskaya kharakteristika timusa i selezenki pri vozdeistvii faktorov razlichnogo proiskhozhdeniya./A.G. Kvaratskheliya [et al] // Zhurnal anatomii i gistopatologii. 2016;3(5):77-83. (in Russian)
4. Sapin MR Limfaticeskaya sistema i ee rol' v immunnykh protsessakh / MR Sapin, DB Nikityuk. M.:Meditsinskaya kniga, 2014. 40. (in Russian)
5. Shishkova YuS, Savochkina AY, Ryzhkova AI, Mezentsева EA. Pyrogenalum on formation a neutrophils extracellular traps. Meditsinskaya nauka i obrazovanie Urala. 2009; 10(3): 23–24.] (in Russian).
6. Rokytová I, Mravec B, Lauková M, Vargovič P Effect of rapamycin on repeated immobilization stress-induced immune alterations in the rat spleen. J Neuroimmunol. 2020 Jun 25;346:577309. doi: 10.1016/j.jneuroim.2020.577309. (in English)
7. Repeated Stress Exaggerates Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response in the Rat Spleen / M. Laukova [et al] // Cell Mol Neurobiol. 2018 Jan;38(1):195-208. doi: 10.1007/s10571-017-0546-5. (in English)
8. Sepsis-like syndrome caused by the Russian medication pyrogenal (Salmonella typhi endotoxin). / Zucker T [et al] // Isr Med Assoc J. 2003 Oct;5(10):750-1. (in English)
9. Xiaoyaosan improves depressive-like behavior in rats with chronic immobilization stress through modulation of the gut microbiota / Hui-Zheng Zhu [et al] // Biomed Pharmacother. 2019 Apr;112:108621. doi: 10.1016/j.biopha.2019.108621. (in English)
10. Yang EV, Glaser R. Stress-induced immunomodulation and the implications for health. International Immunopharmacology. 2002;2:315–324. doi: 10.1016/s1567-5769(01)00182-5 (in English)
11. Yi-Fang Li, Rong-Rong He, Bun Tsoi [et al] Anti-stress effects of carnosine on restraint-evoked immunocompromise in mice through spleen lymphocyte number maintenance. PLoS One. 2012;7(4):e33190. doi: 10.1371/journal.pone.0033190.. (in English)