

УДК 577.2+577.29+57.021

**Применение импедансной спектроскопии для оценки влияния ламининов на дифференцировку клеток кишечника *in vitro***© 2019 С. В. НИКУЛИН<sup>1,2,\*</sup>, Е. Н. КНЯЗЕВ<sup>2,3</sup>, Д. В. МАЛЬЦЕВА<sup>1,3</sup>, Д. А. САХАРОВ<sup>1</sup>, Т. Н. ГЕРАСИМЕНКО<sup>1</sup><sup>1</sup>Научно-технический центр «БиоКлиникум», Москва, 115088<sup>2</sup>Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, 690091<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997

\*e-mail: s.nikulin@bioclinicum.com

Поступила в редакцию 07.10.2019 г.

После доработки 29.10.2019 г.

Принята к публикации 05.11.2019 г.

Проведен сравнительный анализ электрических параметров монослоя клеток Caco-2, культивируемых на подложках, покрытых ламининами 111, 332 и 511. Электрические параметры клетки отражают ее состояние и, в частности, степень ее дифференцированности. Наиболее удобным методом для комплексной оценки электрических параметров является импедансная спектроскопия. В результате было показано, что оптимальным субстратом для роста и дифференцировки клеток Caco-2 *in vitro* является ламинин 332. Использование ламинина 511 приводило к значительно более низким значениям электрической емкости, а ламинин 111 – к сильному увеличению TEER.

**Ключевые слова:** импедансная спектроскопия, ламинины, барьерные ткани, TEER, электрическая емкость, внеклеточный матрикс, Caco-2

**doi:** 10.21519/0234-2758-2019-35-6-102-107

На сегодняшний день для моделирования кишечного барьера *in vitro* широко используется линия клеток Caco-2 [1]. Эта клеточная линия изначально была получена от пациента с аденокарциномой толстой кишки, однако, по мере роста в культуре клетки дифференцируются и начинают проявлять многие свойства эпителия тонкого кишечника. В культуре они образуют монослой поляризованных призматических клеток, экспрессирующих целый ряд ферментов щеточной каемки и мембранных транспортеров, характерных для клеток эпителия тонкого кишечника [2, 3]. Несмотря на свою популярность, клетки линии Caco-2 обладают целым рядом недостатков. В частности, из-за образования более плотных межклеточных контактов, монослой клеток Caco-2 обладает сниженной проницаемостью для молекул, транспортирующихся парацеллюлярным путем, а также

значительно более высокими значениями трансэпителиального сопротивления по сравнению с кишечником *in vivo* [2, 3]. Одной из причин наблюдаемых отличий между *in vitro* и *in vivo* экспериментами может быть изменение состава внеклеточного матрикса (ВКМ) [4].

Применение белков внеклеточного матрикса при культивировании способствует приближению условий культивирования к физиологическим.

Важным компонентом ВКМ являются ламинины, образующие семейство секретируемых гетеротримерных белков, в состав которых входит три цепи:  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  [5]. Среди рецепторов ламининов на поверхности клеток можно выделить интегрины,  $\alpha$ -дистрогликан и некоторые другие классы молекул [6]. При связывании с рецепторами на поверхности клетки ламинины могут активировать различные сигнальные пути, включая

Список сокращений: ВКМ – внеклеточный матрикс; ПО – программное обеспечение; TEER – трансэпителиальное/трансэндотелиальное сопротивление; DPBS – фосфатно-солевой буферный раствор Дульбекко; LM – ламинин.

PI3K/Akt и NF-κB [5]. На сегодняшний день была показана важная роль ламининов в развитии и поддержании функционального состояния кишечника [7]. Также известно, что смесь различных ламининов человека способствует дифференцировке клеток Caco-2 [8].

Цель настоящей работы – оценка влияния различных ламининов на электрические параметры монослоя клеток Caco-2 при помощи импедансной спектроскопии.

Импедансная спектроскопия – это измерение импеданса – полного электрического сопротивления переменному синусоидальному току – при разных частотах электрического тока [9]. Ранее было показано, что применение импедансной спектроскопии позволяет измерять не только трансэпителиальное/трансэндотелиальное сопротивление (TEER), отражающее состояние плотных контактов, но и другие электрические параметры монослоя клеток, такие как электрическая емкость и фоновое сопротивление [10–12]. Электрическая емкость монотонно растет в ходе дифференцировки клеток эпителия кишечника и отражает степень дифференцированности, так как ее значения напрямую связаны с площадью поверхности мембраны [11, 13]. Фоновое сопротивление также изменяется в процессе роста клеток Caco-2 и, судя по всему, отражает состояние базальной мембраны [14]. Таким образом, импедансная спектроскопия является информативным методом, позволяющим оценить целый ряд параметров, имеющих отношение к росту и дифференцировке клеток кишечника.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Материалы и реактивы

Материалы и реактивы, используемые в работе: культуральные флаконы с площадью поверхности 25 см<sup>2</sup> (TPP, Швейцария); питательная среда MEM (Gibco, США), фетальная бычья сыворотка (Gibco); раствор пенициллина 10000 МЕ/мл и стрептомицина 10000 мкг/мл (Gibco); раствор трипсина-ЭДТА 0,25% с солями Хенкса («ПанЭко», Россия); раствор DPBS («ПанЭко»); раствор ламининов 111, 332 и 521 0,1 мг/мл (BioLamina, Швеция); 96-луночные планшеты с мембранными вставками (материал мембраны – поликарбонат, средний размер поры – 0,4 мкм) Transwell (Corning, США).

### Культивирование эпителиальных клеток кишечника Caco-2

Клетки линии Caco-2 культивировали в культуральных флаконах с площадью поверхности

25 см<sup>2</sup> в 5 мл питательной среды в клеточном инкубаторе (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C). Питательная среда состояла из базовой среды MEM с добавлением 20% фетальной бычьей сыворотки и 1%-ного раствора пенициллина и стрептомицина. Пересев производили каждые два-три дня.

Перед посевом клеток Caco-2 в мембранные вставки, мембраны покрывали различными ламининами. Для этого в мембранные вставки добавляли по 30 мкл раствора ламининов в DPBS с концентрацией 10 мкг/мл. Затем 96-луночный планшет с мембранными вставками инкубировали при температуре 4 °C в течение 24 ч. После чего отбирали раствор ламининов из всех лунок и промывали каждую лунку 3 раза 100-мкл раствора DPBS. Далее все лунки планшета заполняли питательной средой (50 мкл в каждую лунку верхней камеры планшета, 235 мкл – нижней) и помещали планшет в клеточный инкубатор (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) на 1 ч.

Клетки Caco-2 открепляли от подложки при помощи 0,25%-ного раствора трипсина-ЭДТА с солями Хенкса, после чего клетки ресуспендировали в питательной среде. Подсчет количества клеток осуществляли при помощи автоматического счетчика клеток Countess (Invitrogen, США).

В каждую мембранную вставку добавляли по 50 мкл клеточной суспензии с концентрацией 112000 кл/мл. Далее в течение всего эксперимента инкубировали мембранные вставки в клеточном инкубаторе (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C). Среду меняли через каждые 2-3 сут.

### Измерение импедансных спектров и вычисление электрических параметров монослоя клеток Caco-2

Измерение спектров импеданса проводили в диапазоне частот 20 Гц–20 кГц (200 точек), при помощи системы импедансной спектроскопии («БиоКлиникум») и электрода STX100C96 (World Precision Instruments). Измерения проводили при комнатной температуре. Для расчета основных электрических параметров клеточного монослоя была использована упрощенная эквивалентная схема, состоящая из элемента постоянной фазы, трансэпителиального/трансэндотелиального сопротивления (TEER) и фонового сопротивления  $R_m$  [15]. Первичную обработку полученных данных проводили при помощи ПО CEISA Impedance fitting («БиоКлиникум»). Для каждого экспериментального состояния использовали по шесть мембранных вставок с клетками. Дальнейшую статистическую обработку полученных данных проводили при помощи языка программирования R 3.5 с интегрированной средой разработки RStudio 1.1. Для оценки статистической

достоверности различий электрических параметров в группах использовали дисперсионный анализ (ANOVA) с поправкой Тьюки. Пороговый уровень значимости – 0,05.

### Транскриптомный анализ

Анализ уровней экспрессии интегринов в дифференцированных и недифференцированных клетках Сасо-2 проводили при помощи микрочипов GeneChip Human Genome 1.0 ST (Affymetrix) [11, 14, 16, 17]. Клетки лизировали при помощи лизирующего буфера QIAzol (Qiagen, Германия). Далее выделяли тотальную РНК по протоколу производителя набора реагентов miRNeasy Mini Kit (Qiagen). Концентрацию выделенной тотальной РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Качество РНК оценивали с помощью автоматической системы для электрофореза Experion (Bio-Rad, США). Для гибридизации на микрочипах использовали по 500 нг каждого образца РНК по методике, описанной ранее [16, 17]. Эксперимент проводили в трех повторах.

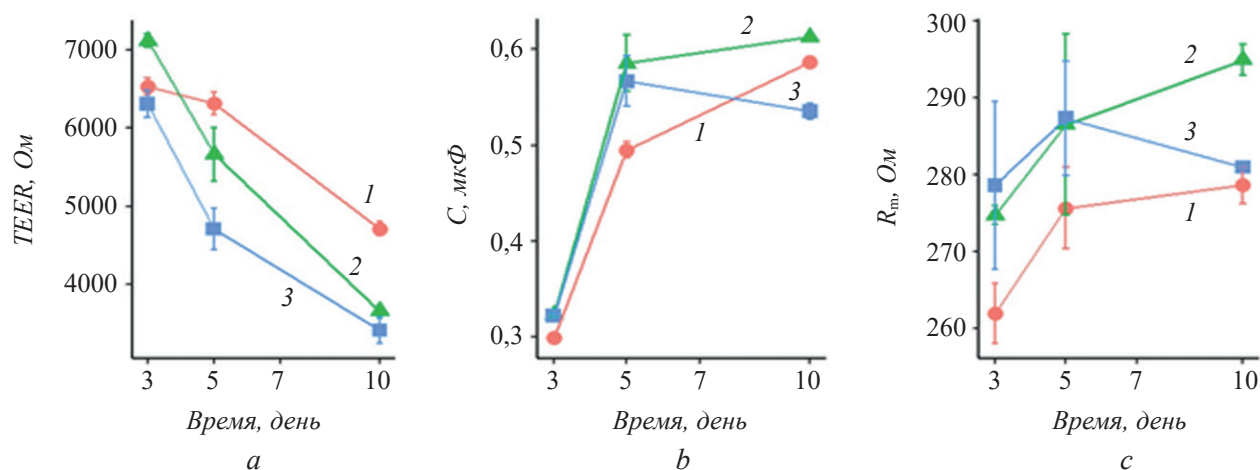
Полученные результаты обрабатывали с помощью ПО TAC 4.0 (Thermo Fisher Scientific). Оценку статистической достоверности различий уровней экспрессии между дифференцированными и недифференцированными клетками Сасо-2 проводили при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с поправкой Бенджамини–Хохберга. Пороговый уровень значимости – 0,05. Гены с уровнем экспрессии ниже 6,0 по логарифмической шкале Affymetrix считались неэкспрессирующимися.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Анализ электрических параметров

Зависимость TEER от продолжительности культивирования при покрытии субстрата для роста клеток различными ламининами показана на рис. 1а. Через три дня после посева клеток значения TEER для клеток, растущих на ламинине 332, были статистически значимо выше, чем для клеток, растущих на ламининах 111 и 511 ( $p = 0,012$  и  $p = 0,001$  соответственно). Затем, по мере дифференцировки клеток, значения TEER снижались, и через 10 сут после начала эксперимента значения TEER для клеток, культивируемых на ламининах 332 и 511, не отличались между собой ( $p = 0,341$ ). При этом значения TEER для клеток, растущих на подложке, покрытой ламинином 111, были выше более чем на 1000 Ом ( $p < 0,001$ ).

Зависимость электрической емкости от продолжительности культивирования при росте клеток на подложках, покрытых различными ламининами, приведена на рис. 1б. Через три дня после начала эксперимента значения электрической емкости для клеток, растущих на ламининах 332 и 511 не отличались между собой ( $p = 0,978$ ), но были статистически значимо выше, чем для клеток, растущих на ламинине 111 ( $p = 0,002$  и  $p = 0,003$ , соответственно). В ходе дифференцировки клеток, значения электрической емкости постепенно увеличивались, и через 10 сут наибольшая емкость была достигнута при культивировании клеток на подложке, покрытой ламинином 332. Электрическая емкость монослоя клеток Сасо-2 была статистически значимо ниже при культивировании на



**Рис. 1.** Зависимость TEER (а), электрической емкости (б) и фонового сопротивления (с) от продолжительности эксперимента при покрытии пористого субстрата для роста клеток различными ламининами. 1 – LM-111, 2 – LM-332, 3 – LM-511

**Fig. 1.** The dependence of TEER (a), electric capacitance (b) and background resistance (c) on time in case of coating of the porous substrate for cell growth with various laminins. 1 – LM-111, 2 – LM-332, 3 – LM-511

ламининых 111 и 511 ( $p=0,02$  и  $p<0,001$  соответственно). Данный эффект был сильнее всего выражен для ламинина 511 (емкость была ниже примерно на 0,08 мкФ, по сравнению с ламинином 332), кроме того для него наблюдалась тенденция к снижению электрической емкости между 5-ми и 10-ми сутками после начала эксперимента.

Анализ зависимости фонового сопротивления при росте клеток на подложках, покрытых различными ламининами (рис. 1с), показал, что через три дня после посева клеток статистически значимых отличий в фоновом сопротивлении не было ( $p=0,219$ ). Однако на 10-е сутки наибольшие значения фонового сопротивления были достигнуты при культивировании клеток на субстрате, покрытом ламинином 332. Значения фонового сопротив-

ления были статистически значимо ниже, как для ламинина 111, так и для ламинина 511 ( $p<0,001$  в обоих случаях). При этом значения фонового сопротивления для клеток, растущих на ламининах 111 и 511 не отличались между собой ( $p=0,638$ ).

### Транскриптомный анализ

На сегодняшний день известно, что основными рецепторами к  $\alpha 1$  цепи ламинина являются интегрины  $\alpha 6\beta 1$  и  $\alpha 7\beta 1$  [5]. Анализ транскрипционного профиля клеток Сасо-2 показал, что интегрины  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$  и  $\beta 1$  (гены *ITGA6*, *ITGA7* и *ITGB1* соответственно) экспрессированы на достаточно высоком уровне в клетках Сасо-2, причем их экспрессия не меняется в процессе дифференцировки (табл. 1). Основными рецепторами к  $\alpha 3$  цепи

Таблица 1

### Уровни экспрессии генов интегринов в дифференцированных и недифференцированных клетках Сасо-2 (по логарифмической шкале Affymetrix)

Expression of integrin genes in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells (Affymetrix logarithmic scale)

Ген	Средний уровень экспрессии в клетках		$F_c$	FDR $p$
	дифференцированных	недифференцированных		
<i>ITGA2</i>	9,20	9,54	-1,26	$3,81 \cdot 10^{-2}$
<i>ITGA2B</i>	6,04	6,12	-1,06	$4,15 \cdot 10^{-1}$
<i>ITGA3</i>	7,85	6,88	1,96	$3,28 \cdot 10^{-5}$
<i>ITGA4</i>	5,15	5,12	1,02	$7,22 \cdot 10^{-1}$
<i>ITGA5</i>	8,77	7,46	2,48	$2,00 \cdot 10^{-4}$
<i>ITGA6</i>	9,40	9,42	-1,01	$9,99 \cdot 10^{-1}$
<i>ITGA7</i>	7,14	7,26	-1,09	$5,11 \cdot 10^{-1}$
<i>ITGA8</i>	4,59	4,58	1,00	$5,65 \cdot 10^{-1}$
<i>ITGA9</i>	7,75	7,98	-1,17	$1,14 \cdot 10^{-2}$
<i>ITGA10</i>	5,48	5,48	1,00	$7,90 \cdot 10^{-1}$
<i>ITGA11</i>	5,74	5,74	1,00	$7,23 \cdot 10^{-1}$
<i>ITGAD</i>	6,62	6,66	-1,02	$7,90 \cdot 10^{-1}$
<i>ITGAE</i>	6,27	6,33	-1,04	$3,01 \cdot 10^{-1}$
<i>ITGAL</i>	5,32	5,67	-1,27	$5,16 \cdot 10^{-2}$
<i>ITGAM</i>	5,54	5,58	-1,03	$9,06 \cdot 10^{-1}$
<i>ITGAV</i>	9,74	9,84	-1,07	$6,12 \cdot 10^{-1}$
<i>ITGAX</i>	5,93	6,00	-1,05	$2,02 \cdot 10^{-1}$
<i>ITGB1</i>	10,00	10,06	-1,04	$3,53 \cdot 10^{-1}$
<i>ITGB2</i>	6,31	6,40	-1,07	$6,11 \cdot 10^{-1}$
<i>ITGB3</i>	5,32	5,32	-1,00	$9,87 \cdot 10^{-1}$
<i>ITGB4</i>	8,92	8,86	1,04	$7,12 \cdot 10^{-1}$
<i>ITGB5</i>	9,07	9,59	-1,43	$3,00 \cdot 10^{-4}$
<i>ITGB6</i>	7,68	6,90	1,72	$2,00 \cdot 10^{-4}$
<i>B7</i>	6,12	6,10	1,01	$7,55 \cdot 10^{-1}$
<i>B8</i>	6,86	7,45	-1,50	$2,00 \cdot 10^{-4}$

Примечание: FDR  $p$  – уровень значимости с поправкой на множественные сравнения по методу Бенджамини-Хохберга;  $F_c$  (Fold change) – степень изменения содержания мРНК гена в дифференцированных клетках по сравнению с недифференцированными.

Note: FDR  $p$  is the significance level adjusted for multiple comparisons according to the Benjamini-Hochberg method;  $F_c$  (Fold change) – the degree of change in the content of the mRNA in differentiated cells compared with undifferentiated.

ламнина являются интегрин  $\alpha 6\beta 4$  и  $\alpha 3\beta 1$  и  $\alpha 6\beta 1$  [5]. Интегрины  $\alpha 3$  и  $\beta 4$  (гены *ITGA3* и *ITGB4* соответственно) также экспрессированы в клетках Caco-2 на достаточно высоком уровне, причем экспрессия интегрин  $\alpha 3$  растет в процессе дифференцировки клеток ( $p < 0,001$ ). С  $\alpha 5$  цепью ламнина могут связываться все перечисленные выше интегринальные рецепторы [5]. Таким образом, клетки Caco-2 обладают необходимым набором рецепторов для взаимодействия со всеми, рассматриваемыми в этой работе,  $\alpha$ -цепями ламинина. Вероятнее всего, наблюдаемые эффекты являются результатом взаимодействия экзогенных ламининов с соответствующими интегринальными рецепторами на поверхности клеток.

Известно, что  $\alpha 1$ -цепь ламнина экспрессируется в тонком кишечнике только во время эмбрионального развития организма, а цепи  $\alpha 3$  и  $\alpha 5$  экспрессируются эпителиальными клетками во взрослом организме на достаточно высоком уровне [7].

Из полученных данных видно, что покрытие субстрата для роста клеток ламинином 111 приводит к высоким значениям TEER, свидетельствующим об уплотнении межклеточных контактов, а также к достаточно низким значениям электрической емкости, что связано со снижением площади поверхности апикальной мембраны и соответствует менее дифференцированному фенотипу. Таким образом, ламинин 111 не является оптимальным субстратом для роста и дифференцировки клеток Caco-2.

Культивирование клеток Caco-2 на подложке, покрытой ламинином 511, не приводило к аномальному повышению значений TEER. Однако результаты измерения электрической емкости свидетельствуют о снижении площади поверхности клеточной мембраны под воздействием ламинина 511.

Применение ламинина 332 в качестве субстрата для роста клеток кишечника позволило добиться максимальных значений электрической емкости, а следовательно и площади поверхности клеточной мембраны, без увеличения TEER. Более того, взаимодействие клеток с ламинином 332 приводит к повышению значений фонового сопротивления, свидетельствующему о лучшем развитии базальной мембраны. Таким образом, на основании полученных данных, можно сделать вывод о том, что ламинин 332 является оптимальным субстратом для роста и дифференцировки клеток Caco-2 *in vitro*.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-19-10597).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Shah P., Jogani V., Bagchi T., Misra A. Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnol. Prog.* 2006, 22, 186–198.
2. Hilgendorf C., Spahn-Langguth H., Regårdh C.G., et al. Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX Co-cultured cell lines: permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport. *J. Pharm. Sci.*, 2000, 89, 63–75.
3. Artursson P., Palm K., Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2012, 64, 280–289.
4. Vllasaliu D., Falcone F.H., Stolnik S., Garnett M. Basement membrane influences intestinal epithelial cell growth and presents a barrier to the movement of macromolecules. *Exp. Cell Res.*, 2014, 323, 218–231.
5. Domogatskaya A., Rodin S., Tryggvason K. Functional diversity of laminins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2012, 28, 523–553.
6. Maltseva D.V., Rodin S.A. Laminins in metastatic cancer. *Mol. Biol.*, 2018, 52, 350–371.
7. Teller I.C., Auclair J., Herring E., et al. Laminins in the developing and adult human small intestine: Relation with the functional absorptive unit. *Dev. Dyn.*, 2007, 236, 1980–1990.
8. Vachon P.H., Beaulieu J.F. Extracellular heterotrimeric laminin promotes differentiation in human enterocytes. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.*, 1995, 268, 857–867.
9. Srinivasan B., Kolli A.R., Esch M.B., et al. TEER measurement techniques for *in vitro* barrier model systems. *J. Lab. Autom.*, 2015, 20, 107–126.
10. Nikulin S.V., Gerasimenko T.N., Shilin S.A., et al. Application of impedance spectroscopy for the control of the integrity of *in vitro* models of barrier tissues. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2019, 166, 512–516.
11. Nikulin S.V., Knyazev E.N., Poloznikov A.A., et al. Expression of SLC30A10 and SLC23A3 transporter mRNAs in Caco-2 cells correlates with an increase in the area of the apical membrane. 2018, *Mol. Biol.*, 52, 577–582.
12. Henry O.Y.F., Villenave R., Crouce M.J., et al. Organ-on-chips with integrated electrodes for trans-epithelial electrical resistance (TEER) measurements of human epithelial barrier function. *Lab. Chip.*, 2017, 17, 2264–2271.
13. van der Helm M.W., Henry O.Y.F., Bein A., et al. Non-invasive sensing of transepithelial barrier function and tissue differentiation in organ-on-chips using impedance spectroscopy. *Lab. Chip.*, 2019, 19, 452–463.
14. Nikulin S.V., Knyazev E.N., Gerasimenko T.N., et al. Non-Invasive evaluation of extracellular matrix formation in the intestinal epithelium. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2018, 166, 35–38.
15. Nikulin S.V., Knyazev E.N., Gerasimenko T.N., et al. Impedance spectroscopy and transcriptome analysis of choriocarcinoma BeWo b30 as a model of human placenta. *Mol. Biol.*, 2019, 53, 411–418.

16. Samatov T.R., Senyavina N.V., Galatenko V.V., et al. Tumour-like druggable gene expression pattern of CaCo2 cells in microfluidic chip. *BioChip J.*, 2016, 10, 215–220.
17. Semenova O.V, Petrov V.A., Gerasimenko T.N., et al. Effect of circulation parameters on functional status of heparg spheroids cultured in microbioreactor. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2016, 161, 425–429.

## Use of Impedance Spectroscopy to Assess the Effect of Laminins on the *in vitro* Differentiation of Intestinal Cells

S. V. NIKULIN<sup>1,2,\*</sup>, E. N. KNYAZEVA<sup>2,3</sup>, D. V. MALTSEVA<sup>1,3</sup>, D. A. SAKHAROV<sup>1</sup>, and T. N. GERASIMENKO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Bioclinicum Scientific Research Center, Moscow, 115088 Russia*

<sup>2</sup>*Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690091 Russia*

<sup>3</sup>*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

\**e-mail: s.nikulin@bioclinicum.com*

Received October 7, 2019

Revised October 29, 2019

Accepted November 5, 2019

**Abstract**—The comparative analysis of electrical parameters of a Caco-2 cell monolayer cultured on substrates coated with laminins 111, 332 и 511 has been carried out. The cell electrical parameters reflect its state and, in particular, its degree of differentiation. Impedance spectroscopy is the most convenient method for comprehensive assessment of electrical parameters. It was shown via this method that laminin 332 was the optimal substrate for CACO-2 cell growth and differentiation *in vitro*. The use of laminin 511 led to significantly lower electric capacitance, and laminin 111 caused a large increase in TEER.

*Key words:* impedance spectroscopy, laminins, barrier tissues, TEER, electric capacitance, extracellular matrix, Caco-2

**Funding**—The study was funded by the Russian Science Foundation (Project 16-19-10597).

**doi:** 10.21519/0234-2758-2019-35-6-102-107