Инфекция и иммунитет
2024, Т. 14, № 3, с. 500–504

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2024, vol. 14, no. 3, pp. 500–504

ИЗМЕНЕНИЕ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ МИКРОГЛИИ У МЫШЕЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ВПГ-1

И.Д. Булгакова[1,2], В.В. Зверев[1,2], Е.О. Кравцова[2], Г.Н. Усатова[2], Д.А. Шойхет[2], Е.А. Задворных[2], А.А. Шумкина[2]

[1] ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия
[2] ФГАОУ ВО Первый московский медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Резюме. *Введение.* На сегодняшний день неуклонно растет количество людей с нейродегенеративной патологией. За последние годы появляется все больше информации о роли микроглии в развитии этих заболеваний. Исследования на животных показывают, что периферические воспалительные стимулы могут активировать микроглию в головном мозге, что указывает на важную роль этих клеток в развитии нейродегенерации. Под действием разных факторов микроглия может изменять свой фенотип и участвовать как в репарации, так и в повреждении клеток головного мозга. Еще одним известным фактором развития различных нейродегенеративных патологий является хроническая герпесвирусная инфекция, вызванная ВПГ-1 (вирусом простого герпеса 1 типа), однако точные патогенетические механизмы до сих пор неизвестны, тем не менее изучение влияния этого вируса на микроглию имеет большой потенциал. В связи с этим целью этой работы стала оценка влияния ВПГ-1 на изменение фенотипов микроглии у линии мышей, обладающих обычной восприимчивостью к данному вирусу, и у линии, более устойчивой к действию ВПГ-1, путем определения цитокинового профиля. Также нами было проведено сравнение межлинейных различий экспрессии генов цитокинов в контрольных группах. *Материалы и методы.* В исследовании проводилось заражение мышей линий C57BL/6 и BALB/c вирусом простого герпеса 1 типа, микроглию получали с использованием прерывистого градиента плотности, цитокиновый профиль оценивали по уровням экспрессии генов с использованием ПЦР в режиме реального времени с обратной транскрипцией, подсчет осуществлялся по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$, статистическую значимость определяли с помощью U-критерия Манна–Уитни. *Результаты.* Межлинейных различий экспрессии генов цитокинов в контрольных группах разных линий мышей не было обнаружено. При этом экспрессия генов отличалось в экспериментальных группах: у мышей линии BALB/c увеличивалась экспрессия генов как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов, у мышей линии C57BL/6 наблюдалось незначительное увеличение экспрессии генов IL-1β. *Выводы.* Полученные данные свидетельствуют о формировании различных фенотипов микроглии после перенесенной ВПГ-1 инфекции у разных линий мышей. По всей видимости, у мышей линии BALB/c происходит переключение с провосполительного M1-фенотипа микроглии на противовоспалительный M2-фенотип, в то время как у мышей линии C57BL/6 затухание инфекционного процесса происходит через возвращение к исходному M0-фенотипу.

Ключевые слова: *IL-10, IL-1β, IL-6, TNFα, TGF-β, цитокины, экспрессия генов, ВПГ-1, микроглия, нейродегенерация.*

Адрес для переписки:
Булгакова Ирина Дмитриевна
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а,
ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.
E-mail: bulgakova_i_d@staff.sechenov.ru

Contacts:
Irina D. Bulgakova
105064, Russian Federation, Moscow, Maly Kazenny lane, 5a,
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera.
E-mail: bulgakova_i_d@staff.sechenov.ru

Для цитирования:
Булгакова И.Д., Зверев В.В., Кравцова Е.О., Усатова Г.Н., Шойхет Д.А., Задворных Е.А., Шумкина А.А. Изменение цитокинового профиля микроглии у мышей под действием ВПГ-1 // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 500–504. doi: 10.15789/2220-7619-MMC-16772

Citation:
Bulgakova I.D., Zverev V.V., Kravtsova E.O., Usatova G.N., Shoichet D.A., Zadvornykh E.A., Shumkina A.A. Mice microglia cytokine profile changes under the influence of HSV-1 // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 500–504. doi: 10.15789/2220-7619-MMC-16772

© Булгакова И.Д. и соавт., 2024

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-MMC-16772

Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution 4.0
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

MICE MICROGLIA CYTOKINE PROFILE CHANGES UNDER THE INFLUENCE OF HSV-1

Bulgakova I.D.[a,b], Zverev V.V.[a,b], Kravtsova E.O.[b], Usatova G.N.[b], Shoichet D.A.[b], Zadvornykh E.A.[b], Shumkina A.A.[b]

[a] *I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation*
[b] *I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation*

Abstract. *Introduction*. Today, prevalence of neurodegenerative diseases increases. In recent years, more studies have revealed a new knowledge about the role of microglia in the development of these diseases. Animal experiments showed that peripheral inflammation causes activation of microglia in brain. All this points to the essential role of the cells in the development of neurodegeneration. Under the influence of various factors, microglia can change the phenotype and participate in both repair and damage to brain cells. Chronic herpesvirus infection caused by HSV-1 is another known factor in the development of neurodegenerative pathology. However, the exact pathogenetic mechanisms are still unknown, nevertheless, studying the virus effect on microglia has great potential. The goal of our study in this connection was to assess the effect of HSV-1 on microglia polarization in mouse strain with normal susceptibility to this virus and in strain which is more resistant to the action of HSV-1. For this purpose, changes in the cytokine profile were detected. A comparison of interstrain differences in the expression of cytokine genes was also compared in control groups. *Materials and methods.* The study involved infecting C57BL/6 and BALB/c mice with herpes simplex virus type 1, an isolation of microglia was based on separation steps using a discontinuous gradient density, the cytokine profile was assessed by gene expression levels using a real-time reverse transcription PCR. To calculate the relative fold gene expression of samples the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was used. Statistical significance was determined using the Mann–Whitney U-test. *Results*. There were found no interstrain differences in cytokine gene expression in control groups of different mouse strains. At the same time, gene expression differed in the experimental groups: in BALB/c mice, the expression of genes for both pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines increased; in C57BL/6 mice, a slight increase in the expression of IL-1β genes was observed. *Conclusion*. The data indicate the formation of different microglial phenotypes after HSV-1 infection in different mouse strains. Apparently, in BALB/c mice there is a switch from the pro-inflammatory M1 phenotype of microglia to the anti-inflammatory M2 phenotype, while in C57BL/6 mice the attenuation of the infectious process occurs through a return to the original M0 phenotype.

Key words: *IL-10, IL-1β, IL-6, TNFα, TGF-β, cytokines, gene expression, HSV-1, microglia, neurodegeneration.*

Введение

Микроглия представляет собой мононуклеарные клетки ЦНС мезодермального происхождения. Это резидентные иммунные клетки в ЦНС, которые различаются по морфологической структуре и функциональным особенностям. Микроглия выполняет ряд жизненно важных функций: участие в нейропластичности, взаимодействие с другими клетками ЦНС, формирование и развитие нервной системы, поддержание гомеостаза, репарация, защита от инфекций, привлечение периферических иммунных клеток, регуляция иммунного ответа, старение и повреждение [2].

В физиологических условиях в головном мозге находятся следующие типы микроглии: «покоящаяся» или малоактивная, М0-фенотипа, и два типа активированной микроглии — М1 и М2. «Покоящаяся» микроглия характеризуется минимальным высвобождением хемокинов и цитокинов, низкой экспрессией антигенов на клеточной поверхности. М1-фенотип характеризуется продукцией провоспалительных цитокинов, активных форм кислорода и азота и других факторов, вызывающих сильный воспалительный ответ. Этот тип микроглии участвует в элиминации патогена, активации клеток адаптивного иммунитета и повреждении нейронов, что может становиться пусковым механизмом развития нейродегенерации. М2-фенотип характеризуется синтезом противовоспалительных цитокинов, участвует в очистке тканей от клеточного детрита, активирует ангиогенез, ремоделирует и репарирует ткани [3, 7].

Еще одним важным фактором, связанным с развитием нейродегенеративной патологии, является инфицирование ВПГ-1, однако конкретные патогенетические механизмы до сих пор остаются неизвестными. Тем не менее известно, что линия мышей C57BL/6 является более устойчивой к действию ВПГ-1, кроме того, вирус быстрее элиминируется из клеток мозга мышей этой линии, а сами поражения носят локальный характер, в то время как инфицирование мышей линии BALB/c тем же титром ВПГ-1 приводит к развитию энцефалита, серьезных поражений ЦНС, гибели мышей или длительной элиминации вируса, который поражает все отделы мозга [5].

Нами было выдвинуто предположение, что возможной причиной поражения ЦНС после перенесенной герпетической инфекции является нарушение переключения клеток микроглии с провоспалительного М1-фенотипа. Для проверки данной гипотезы были получены клетки микроглии от мышей этих двух линий после предварительного инфицирования ВПГ-1 с целью определения цитокинового профиля этих клеток.

Материалы и методы

В работе использовался эталонный штамм ВПГ-1 (из коллекции ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова). Культивирование и определение титра вируса проводилось на культуре клеток Vero. Титр вируса оценивали в lg $ТЦД_{50}$/мл.

Культуру клеток Vero выращивали в питательной среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS (Gibco, США)), бензилпенициллина (ПанЭко, Россия) 100 ЕД/мл, стрептомицин (ПанЭко, Россия) в концентрации 100 мкг/мл. Клетки инкубировали при 37°С в атмосфере с 5% CO_2 в течение 24 ч.

В работе использовались 8-месячные мыши линий BALB/c и C57BL/6. Мышей получали из питомника лабораторных животных филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА (Столбовая, Россия). Все процедуры проводились строго в соответствии с требованиями, изложенными в «Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных за № 755 от 12.08.1977». Инфекционный материал вводили интраназально под наркозом. В экспериментальную группу были включены мыши, перенесшие герпесвирусную инфекцию, в крови и ЦНС которых не обнаруживалась ДНК ВПГ-1.

Перед извлечением мозга под наркозом была проведена транскардиальная перфузия раствором Рингера. (Гематек, Россия), затем от мышей получали головной мозг, а клетки микроглии выделяли с использованием прерывистого градиента плотности [6]. Эксперимент воспроизводился по 3 раза для каждой линии мышей как инфицированных, так и контрольных групп.

Для обнаружения ВПГ-1 в мозге использовали набор для выделения ДНК — ДНК-СОРБ-АМ (АмплиСенс, Россия), с последующей постановкой ПЦР-РВ с помощью набора HSV I, II-FL (АмплиСенс) в соответствии с инструкциями производителя.

Для определения экспрессии генов IL-10, IL-1β, IL-6, TNFα, TGF-β получали клеточную РНК при помощи набора «Рибо-Сорб» (Синтол, Россия) с последующей постановкой ОТ-ПЦР-РВ с использованием набора «ОТ-1» для обратной транскрипции (Синтол) и набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I (Синтол). Подбор праймеров проводился на основании данных литературы.

Статистическую обработку данных проводили с помощью стандартных пакетов прикладных программ Excel (Microsoft Office, 2019), GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Holdings, США). При обработке результатов пользовались стандартными статистическими методами. Для статистической обработки полученных данных использовали метод $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Результаты, соответствующие значениям пороговых циклов (Ct) > 40, были признаны отрицательными. Для описания данных использовали средние величины (M) и стандартное отклонение (St Dev). Поскольку было замечено, что распределение ненормальное, то статистическую значимость полученных результатов определяли с помощью U-критерия Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Микроглия экспрессирует различные рецепторы врожденного иммунитета, такие как TLRs (Toll-like receptors) и NLRs (NOD-like receptors), результатом активации которых является продукция цитокинов. В зависимости от активирующих сигналов из M0-фенотипа формируется M1- или M2-фенотип, которые характеризуются синтезом определенных цитокинов. В исследование были включены цитокины, характерные для каждого фенотипа, а затем были отобраны цитокины, чья роль в развитии нейродегенерации играет наиболее важное значение [7]. Таким образом, была проведена оценка уровня экспрессии генов цитокинов, синтезируемых M1-фенотипом — IL-1β, IL-6, TNFα, и M2-фенотипом — IL-10, TGF-β.

Экспрессию генов цитокинов сравнивали у двух линий мышей, перенесших герпетическую инфекцию, а также в контрольных группах. Экспрессия генов цитокинов (значение $2^{-\Delta\Delta Ct}$, отн. ед.) и степень достоверности (p) представлены в табл.

Была проведена оценка межлинейных различий в экспрессии генов клеток микроглии у здоровы мышей линий BALB/c и C57BL/6. Полученные данные свидетельствуют в пользу отсутствия этих различий. Затем, было проведено сравнение цитокинового профиля микроглии после перенесенной инфекции, вызванной ВПГ-1, с цитокиновым профилем здоровых мышей той же линии. В результате у линии BALB/c достоверно увеличивалась экспрессия генов как провоспалительных (IL-1β, IL-6, TNFα) цитокинов, так и противовоспалительного цитокина TGF-β, в то время как у линии C57BL/6 достоверно была увеличена экспрессия только IL-1β, но не на таком высоком уровне, как у BALB/c.

Несмотря на то, что экспериментальные группы мышей обеих линий перенесли герпесвирусную инфекцию, межлинейные изменения в цитокиновом профиле микроглии этих мышей существенно отличался. У мышей линии BALB/c значительное увеличение количества как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов можно объяснить переходом M1-фенотипа микроглии в M2-фенотип,

Таблица. Экспрессия генов цитокинов (значение $2^{-\Delta\Delta Ct}$, отн. ед.) и степень достоверности (p) для пар групп 1/2, 3/4, 1/3 и 2/4

Table. Cytokine gene expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ method) and P-value for groups 1/2, 3/4, 1/3 and 2/4

	BALB/c		C57BL/6		Значение P P-value
	Контрольная группа Control group	**После инфицирования ВПГ-1** Mice infected with HSV-1	**Контрольная группа** Control group	**После инфицирования ВПГ-1** Mice infected with HSV-1	
IL-1β	1,02 (0,72–1,35)	12706,98* ** (11856,03–13619,0)	0,96 (0,68–1,55)	2,90* (1,66–4,10)	$P_{1/2} < 0,05$ $P_{3/4} < 0,05$ $P_{1/3}$ — ns $P_{2/4} < 0,05$
IL-6	1,32 (0,57–1,32)	18,38* (13,93–24,25)	–	–	$P_{1/2} < 0,05$ $P_{3/4}$ — ns
TNFα	1,02 (0,72–1,35)	1702,38* ** (1290,16–2246,30)	1,0 (0,54–1,87)	1,07 (0,62–1,07)	$P_{1/2} < 0,05$ $P_{3/4}$ — ns $P_{1/3}$ — ns $P_{2/4} < 0,05$
TGF-β	1,29 (0,46–1,70)	1824,560575* (1382,76–1955,52)	–	–	$P_{1/2} < 0,05$ $P_{3/4}$ — ns

Примечание. * — обозначены группы с достоверно повышенным значением экспрессии генов цитокинов в сравнении с контрольной группой той же линии. ** — обозначены межлинейные группы с достоверно повышенной экспрессией генов в сравнении с экспрессией тех же генов другой линии мышей; «–» — результаты, соответствующие значениям пороговых циклов (Ct) > 40, были признаны отрицательными.

Note. * — groups with significantly increased expression of cytokine genes in comparison with the control group of the same line; ** — groups with significantly increased gene expression in comparison with the expression of the same genes of another mouse strain; «–» — results corresponding to cycle threshold (Ct) values > 40 were considered negative.

что обычно и происходит после завершения инфекционного процесса. Однако у мышей линии C57BL/6 мы получили совершенно другие результаты. После перенесенной герпетической инфекции наблюдалось менее выраженное увеличение экспрессии генов провоспалительного цитокина IL-1β, при том, что достоверных изменений в экспрессии генов других цитокинов не наблюдалось. Данные результаты могут свидетельствовать о переходе M1-фенотипа в M0-фенотип без формирования M2-микроглии. По всей вероятности, затухание инфекционного процесса через возвращение к исходному фенотипу M0 оказывает меньшее повреждающее действие на нейроны, что может быть связано, например, с усилением фагоцитарной активности M2-клеток.

Заключение

В данном исследовании были описаны изменения цитокинового профиля после инфицирования ВПГ-1 у двух линий мышей с разной восприимчивостью к данному вирусу. Возможно, формирование различных фенотипов микроглии можно объяснить различной экспрессией рецепторов врожденного иммунитета, участвующих в активации внутриклеточных каскадных путей и изменении экспрессии генов цитокинов. Микроглия играет ключевую роль в развитии нейродегенерации. Более детальное изучение фенотипов этих клеток, механизмов переключения и их функций, а также определение взаимосвязи с другими факторами развития нейродегенерации позволит приблизиться к пониманию патогенеза деменций и других нейропатологий. Отдельного внимание заслуживает изучение лигандов рецепторов врожденного иммунитета, под действием которых происходит активация микроглии, а также изучение синтеза антимикробных пептидов, который регулируется активацией тех же рецепторов врожденного иммунитета [1, 4].

Благодарности

Авторы выражают благодарность НИИВС им. И.И. Мечникова и кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии Сеченовского университета, на базе которых были проведены данные исследования.

Список литературы/References

1. Булгакова И.Д., Свитич О.А., Зверев В.В. Механизмы формирования толерантности Toll-подобных рецепторов под действием микробных лигандов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2022. Т. 99, № 6. С. 708–721. [Bulgakova I.D., Svitich O.A., Zverev V.V. Mechanisms of Toll-like receptor tolerance induced by microbial ligands. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology Epidemiology and Immunobiology, 2022, vol. 99, iss. 6: 708. (In Russ.)*] *doi: 10.36233/0372-9311-323*

2. Deczkowska A., Keren-Shaul H., Weiner A., Colonna M., Schwartz M., Amit I. Disease-Associated Microglia: A Universal Immune Sensor of Neurodegeneration. *Cell, 2018, vol. 173, no. 5, pp. 1073–1081. doi: 10.1016/j.cell.2018.05.003*
3. Guo S., Wang H., Yin Y. Microglia Polarization From M1 to M2 in Neurodegenerative Diseases. *Front. Aging Neurosci., 2022, no. 14: 815347. doi: 10.3389/fnagi.2022.815347*
4. Kovalchuk L.V., Gankovskaya L.V., Gankovskaya O.A., Lavrov V.F. Herpes simplex virus: treatment with antimicrobial peptides. *Adv. Exp. Med. Biol., 2007, vol. 601, pp. 369–376. doi: 10.1007/978-0-387-72005-0_39*
5. Lopez C. Genetics of natural resistance to herpesvirus infections in mice. *Nature, 1975, vol. 258, no. 5531, pp. 152–153. doi: 10.1038/258152a0*
6. Moussaud S., Draheim H.J. A new method to isolate microglia from adult mice and culture them for an extended period of time. *J. Neurosci. Methods., 2010, vol. 187, no. 2, pp. 243–253. doi: 10.1016/j.jneumeth.2010.01.017*
7. Orihuela R., McPherson C.A., Harry G.J. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br. J. Pharmacol., 2016, vol. 173, pp. 649–665. doi: 10.1111/bph.1313*

Авторы:

Булгакова И.Д., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; аспирант и ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. акад. А.А. Воробьева института общественного здоровья им. Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО Первый московский медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия;
Зверев В.В., академик РАН, д.б.н., профессор, научный руководитель ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии им. акад. А.А. Воробьева института общественного здоровья им. Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО Первый московский медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия;
Кравцова Е.О., к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. акад. А.А. Воробьева института общественного здоровья им. Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО Первый московский медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия;
Усатова Г.Н., к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. акад. А.А. Воробьева института общественного здоровья им. Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО Первый московский медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия;
Шойхет Д.А., аспирант и ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. акад. А.А. Воробьева института общественного здоровья им. Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО Первый московский медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия;
Задворных Е.А., студентка ФГАОУ ВО Первый московский медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия;
Шумкина А.А., студентка ФГАОУ ВО Первый московский медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия.

Authors:

Bulgakova I.D., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation; PhD Student and Assistant Professor, Vorobiev Department of Microbiology, Virology and Immunology, Erisman Institute of Public Health, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;
Zverev V.V., RAS Full Member, DSc (Biology), Professor, Scientific Director of I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation; Head of the Vorobiev Department of Microbiology, Virology and Immunology, Erisman Institute of Public Health, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;
Kravtsova E.O., PhD (Medicine), Associate Professor, Vorobiev Department of Microbiology, Virology and Immunology, Erisman Institute of Public Health, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;
Usatova G.N., PhD (Medicine), Associate Professor, Vorobiev Department of Microbiology, Virology and Immunology, Erisman Institute of Public Health, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;
Shoichet D.A., PhD Student and Assistant Professor, Vorobiev Department of Microbiology, Virology and Immunology, Erisman Institute of Public Health, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;
Zadvornykh E.A., Student, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;
Shumkina A.A., Student, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 30.03.2024
Принята к печати 01.04.2024

Received 30.03.2024
Accepted 01.04.2024