Хирургия. Журнал имени Н.И. Пирогова
2024, №12, выпуск 2, с. 122–126
https://doi.org/10.17116/hirurgia2024122122

Pirogov Russian Journal of Surgery
2024, No. 12, Issue 2, pp. 122–126
https://doi.org/10.17116/hirurgia2024122122

Оценка иммунореактивности цельной крови

© И.А. СЕЛЕДЦОВА, Т.Я. ЛЮБАВСКАЯ, А.А. ПЫШЕНКО, В.И. СЕЛЕДЦОВ

ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» Минобрнауки России, Москва, Россия

Резюме

Для оценки клеточной иммунореактивности в цельную кровь на 18 ч добавляли липополисахарид (ЛПС), Конканавалин А (Кон А) или ЛПС вместе с Кон А. Показано, что ЛПС преимущественно стимулировал секрецию клетками крови фактора некроза опухоли-alfa (tumor necrosis factor-alfa, TNF-α), интерлейкин-6 (interleukin-6, IL-6), IL-10 и фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF), тогда как Кон А наиболее существенно усиливал секрецию интерферна-гамма (interferon-gamma, IFN-gamma) и IL-2. Добавление гепарина в кровь несколько снижало клеточную секрецию IL-2 и VEGF, но не других исследованных цитокинов. Данный тест может быть использован для оценки врожденной и адаптивной иммунореактивности крови и может быть полезен в хирургической практике как при приготовлении лечебных компонентов крови (сыворотка, плазма, обогащенная лейкоцитами и тромбоцитами плазма), так и для объективного иммунологического контроля за состоянием пациента.

Ключевые слова: *иммунореактивность цельной крови, гепарин, эндотелий сосудов.*

Информация об авторах:
Селедцова И.А. — https://orcid.org/0009-0006-0401-1876
Любавская Т.Я. — https://orcid.org/0009-0002-8106-8148
Пышенко А.А. — https://orcid.org/0009-0002-1117-608X
Селедцов В.И. — https://orcid.org/0000-0002-4746-8853
Автор, ответственный за переписку: Селедцова И.А. — e-mail: iax34@yandex.ru

Как цитировать:
Селедцова И.А., Любавская Т.Я., Пышенко А.А., Селедцов В.И. Оценка иммунореактивности цельной крови. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2024;12 вып. 2:122–126. https://doi.org/10.17116/hirurgia2024122122

Evaluation of whole blood immunoreactivity

© I.A. SELEDTSOVA, T.YA. LYUBAVSKAYA, A.A. PYSHENKO, V.I. SELEDTSOV

Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow, Russia

Abstract

To assess cellular immunoreactivity, lipopolysaccharide (LPS), Concanavalin A (Con A), or LPS together with Con A was added to the whole blood for 18 hours. LPS preferentially stimulated release of tumor necrosis factor-alfa (TNF-α), interleukin-6 (IL-6), IL-10 and vascular endothelial growth factor (VEGF) by blood cells, whereas Con A significantly enhanced secretion of interferon-gamma (IFN-gamma) and IL-2. Addition of heparin to blood slightly decreased cellular secretion of IL-2 and VEGF, but not other cytokines. This test can be used to assess innate and adaptive blood immunoreactivity and may be useful in surgical practice for preparation of blood components (serum, plasma, leukocyte- and platelet-rich plasma) and objective immunologic monitoring.

Keywords: *whole blood immunoreactivity, heparin, vascular endothelium.*

Information about the authors:
Seledtsova I.A. — https://orcid.org/0009-0006-0401-1876
Lyubavskaya T.Ya. — https://orcid.org/0009-0002-8106-8148
Pyshenko A.A. — https://orcid.org/0009-0002-1117-608X
Seledtsov V.I. — https://orcid.org/0000-0002-4746-8853
Corresponding author: Seledtsova I.A. — e-mail: iax34@yandex.ru

To cite this article:
Seledtsova IA, Lyubavskaya TYa, Pyshenko AA, Seledtsov VI. Evaluation of whole blood immunoreactivity. *Pirogov Russian Journal of Surgery*. 2024;12 vyp 2:122–126. (In Russ.). https://doi.org/10.17116/hirurgia2024122122

Введение

Кровь играет ключевую роль в регенеративных механизмах и иммунологической защите организма. Компоненты крови, такие как обогащенная тромбоцитами плазма (platelet-rich plasma, PRP), обогащенная лейкоцитами и тромбоцитами плазма (leukocyte-rich PRP, L-PRP), обогащенный тромбоцитами фибрин (platelet-rich fibrin, PRF) бесклеточная плазма, аутологичная (Orthokine) или аллагенная сыворотка, нашли широкое применение в современной восстановительной медицины. Эти компоненты используются в лечении суставной патологии [1,2,3,4,5,6], болей разного генеза [7,8], дегенеративных кожных заболеваний [9], травматических и возрастных заболеваний органов зрения [10,11], челюстной патологии [12,13], а также длительно незаживающих раз различного происхождения [14,15]. Важно то, что компоненты крови обладают не только регенеративной, но и противоинфекционной активностью [16,17], наличие которой во многих случаях определяет течение заболевания. Очевидным недостатком компонентов крови с медицинской точки является отсутствие исходных критериев оценки их иммунобиологических свойств. Показания для их применения часто размыты, а результаты их использования вариабельны [12]. Ниже описан технически легко выполнимый тест, характеризующий иммунобиологическую реактивность крови, который может использован перед получением ее компонентов. Кроме того, этот тест дает возможность получать компоненты крови с заданными (оптимизированными) иммунобиологическими свойствами для того, чтобы использовать их более адресно и эффективно.

Материалы и методы

Исследование одобрено локальным этическим комитетом Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» (протокол №9, 2024).

Тест на иммунореактивность цельной крови

Забор венозной крови у здоровых доноров (мужчины 25—45 лет) осуществляли в предварительно охлажденные вакуумные пробирки с гепарином (зеленая крышка) или без гепарина (красная крышка). Пробирки с кровью сразу помещали на лед. Далее кровь из каждой пробирки делили на 4 равные части (по 2 мл) и добавляли по 50 мкл в одну часть физиологический раствор, в другую — липополисахарида (ЛПС *Salmonella typhi*, Пирогенал, конечная концентрация в образце — 1 мкг/мл), в третью — Кон А (Sigma, конечная концентрация 10 мкг/мл) и в четвертую — ЛПС и Кон А. Все образцы инкубировали при 37.5 °C в течение 18 ч. Для получения плазмы или сыворотки пробирки центрифугировали при 2000 g в течение 20 мин, после чего надосадочные (бесклеточные) жидкости размещали по 0.5 мл в микропробирки и в замороженном виде хранили их до последующего анализа.

Определение содержания цитокинов в плазме и сыворотке

Содержание TNF-α, IFN-гамма, VEGF, IL-2, IL-6, IL-10 в образцах определяли иммуноферментным методом с использованием коммерческих тест-систем производства Вектор-Бест (Новосибирск), согласно инструкциям производителя этих тест-систем.

Статистический анализ

Достоверность различий между образцами, полученными от одной и той же выборки доноров оценивали с использованием парного критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при $p<0,05$.

Результаты

Для стимуляции клеток крови были использованы 2 активатора: ЛПС и Кон А. ЛПС является термостабильным компонент наружной части клеточной мембраны всех грамотрицательных микроорганизмов. Он связывает комплекс рецепторов CD14/TLR4/MD2, расположенных преимущественно на фагоцитарных клетка и В-лимфоцитах, и является мощным активатором врожденного иммунитета (https://en.wikipedia.org/wiki/Lipopolysaccharide). КонА –растительный лектин, способный связываться со структурами, содержащими остатки α-D-маннозила и α-D-глюкозила. Он активирует лимфоциты, преимущественно Т-клетки (https://en.wikipedia.org/wiki/Concanavalin_A).

Рис. 1 показывает влияние митогенов на секрецию клетками крови TNF-α. Содержание TNF-α в нестимулированных образцах крови не превышало 1000 пк/мл. ЛПС индуцировал выраженный прирост клеточной секреции этого цитокина ($p< 0,01$), тогда как присутствие Кон А в крови не оказывало существенного влияния на этот процесс. Содержание TNF-α в пробах с ЛПС было существенно выше содержания в пробах с Кон А ($p<0,01$). Сходные данные были получены как в плазменных пробах с гепарином, так и в сывороточных пробах без гепарина.

Содержание IL-6 в нестимулированных образцах крови не превышало 400 пг/мл. Как и в случае с TNF-α, ЛПС, но не Кон А, существенно стимулировал секрецию IL-6 клетками крови ($p<0,05$). Содержание IL-6 в пробах с ЛПС было существенно выше

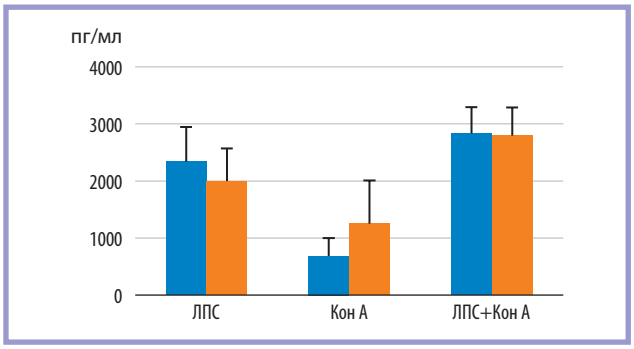

***Рис. 1.* Содержание TNF-α в митоген-стимулированных образцах крови.**
Показано содержание TNF-α в пробах без гепарина (синие столбцы) и в пробах с гепарином (оранжевые столбцы). Представлены результаты (*M*+*m*, среднее+ошибка среднего) 7 однотипных опытов.

***Fig. 1.* TNF-α in mitogen-stimulated blood samples.**
TNF-α in samples without heparin (blue columns) and in samples with heparin (orange columns). The results of 7 identical experiments are presented.

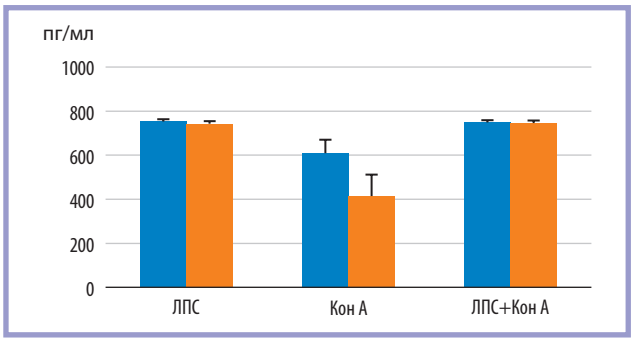

***Рис. 2.* Содержание IL-6 в митоген-стимулированных образцах крови.**
Показано содержание цитокина в пробах без гепарина (синие столбцы) и в пробах с гепарином (оранжевые столбцы). Представлены результаты (*M*+*m*) 7 однотипных опытов.

***Fig. 2.* IL-6 in mitogen-stimulated blood samples.**
Cytokine content in samples without heparin (blue columns) and in samples with heparin (orange columns). The results of 7 similar experiments are presented.

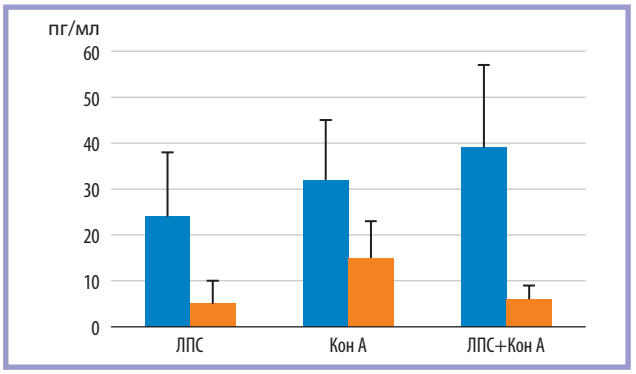

***Рис. 3.* Содержание IL-2 в митоген-стимулированных образцах крови.**
Показано содержание цитокина в пробах без гепарина (синие столбцы) и в пробах с гепарином (оранжевые столбцы). Представлены результаты (*M*+*m*) 5 однотипных опытов.

***Fig. 3.* IL-2 in mitogen-stimulated blood samples.**
Cytokine content in samples without heparin (blue columns) and in samples with heparin (orange columns). The results of 5 similar experiments are presented.

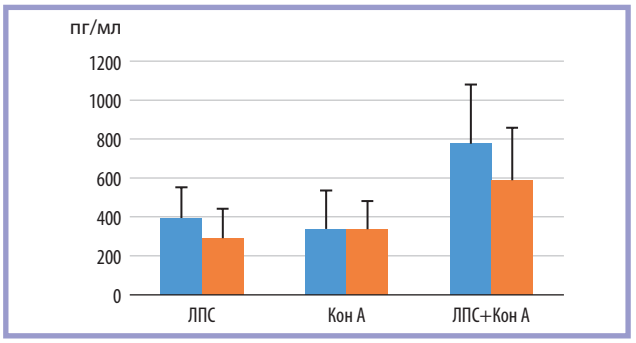

***Рис. 4.* Содержание IFN-γ в митоген-стимулированных образцах крови.**
Показано содержание цитокина в пробах без гепарина (синие столбцы) и в пробах с гепарином (оранжевые столбцы). Представлены результаты (*M*+*m*) 5 однотипных опытов.

***Fig. 4.* IFN-γ in mitogen-stimulated blood samples.**
Cytokine content in samples without heparin (blue columns) and in samples with heparin (orange columns). The results of 5 identical experiments are presented.

содержания в пробах с Кон А ($p < 0,03$). Совместный эффект ЛПС и Кон А на кровь не превышал эффекта, индуцированного одним ЛПС **(рис. 2).**

Содержание IL-2 в нестимулированных образцах крови находилось на неоопределяемых уровнях. Как ЛПС, так и Кон А, заметно усиливали секрецию этого цитокина **(рис. 3)**. Интересно, что особенно выраженный прирост IL-2 имел место в сывороточных пробах, стимулированных одновременно ЛПС и Кон А ($p < 0,05$ в сравнении с плазменными пробами).

Как и в случае с IL-2, содержание IFN-γ в нестимулированных образцах крови находилось близко к нулевым значениям. Оба активатора ЛПС и Кон А демонстрировали значимую способность стимулировать клеточную продукцию этого цитокина **(рис. 4)** Интересно, что в отличие от проб с другими исследованными цитокинами, наиболее выраженный прирост секреции IFN-γ был вызван одновременным воздействием ЛПС и Кон А. По-видимому, здесь имело место суммирование действий на клетки двух активаторов.

Содержание IL-10 в нестимулированных образцах крови не превышало 20 пг/мл. ЛПС и КОН А примерно в одинаковой степени умеренно стимулировали секрецию клетками крови этого цитокина **(рис. 5)**. Наибольший прирост секреции был отмечен в сывороточных пробах, одновременно стимулированных ЛПС и КонА, тогда как в плазменных пробах содержание этого цитокина находилось на относительно низких уровнях.

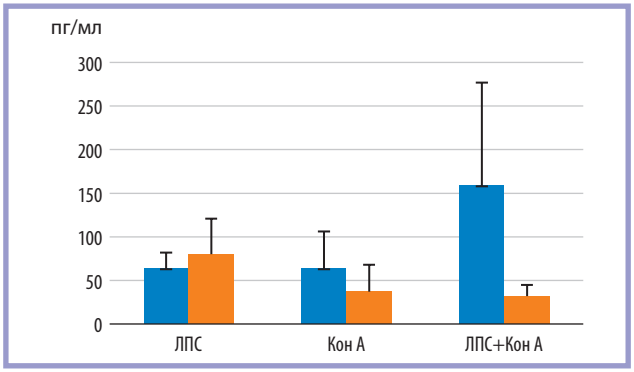

***Рис. 5.* Содержание IL-10 в митоген-стимулированных образцах крови.**
Показано содержание цитокина в пробах без гепарина (синие столбцы) и в пробах с гепарином (оранжевые столбцы). Представлены результаты ($M+m$) 7 однотипных опытов.

***Fig. 5.* IL-10 in mitogen-stimulated blood samples.**
Cytokine content in samples without heparin (blue columns) and in samples with heparin (orange columns). The results of 7 identical experiments are presented.

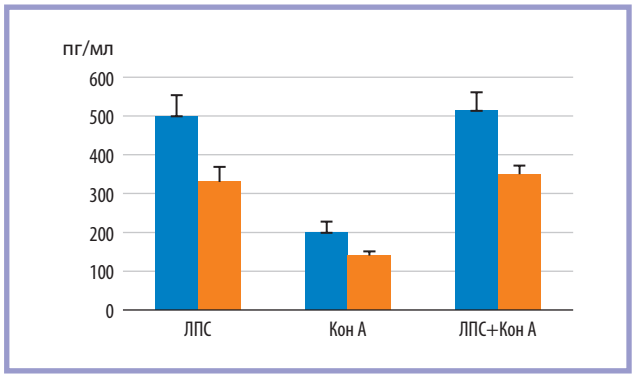

***Рис. 6.* Содержание VEGF в митоген-стимулированных образцах крови.**
Показано содержание цитокина в пробах без гепарина (синие столбцы) и в пробах с гепарином (оранжевые столбцы). Представлены результаты ($M+m$) 7 однотипных опытов.

***Fig. 6.* VEGF in mitogen-stimulated blood samples.**
Cytokine content in samples without heparin (blue columns) and in samples with heparin (orange columns). The results of 7 identical experiments are presented.

Содержание IL-10 в нестимулированных образцах крови не превышало 100 пг/мл. Как в плазменных, так и сывороточных пробах ЛПС более эффективно стимулировал секрецию VEGF, а содержание этого цитокина в сывороточных пробах было заметно выше в сравнении с аналогичными плазменными пробами **(рис. 6)**. По-видимому, свертывание крови само по себе оказывало существенной стимулирующее влияние на секрецию VEGF активированными клетками крови.

Обсуждение

Иммунореактивность крови определяет течение воспалительных реакций в организме, а также их конечную нацеленность: в норме — это защита от патогенов, при патологии — это развитие болезни. Важно, что наша экспериментальная модель максимально приближена к естественным условиям — в исследуемых пробах не было никаких синтетических культуральных добавок, лишь гепарин добавлялся в кровь с целью ингибирования процесса ее свертывания. В этой модели было изучено влияние природных активаторов иммуногенеза на секрецию про-воспалительных (TNF–alfa, ИЛ-6, IFN-gamma) и антивоспалительных цитокинов (IL-10 и VEGF). Известно, что дисбаланс продукции этих цитокинов в организме приводит к развитию патологических состояний [18]. Особняком в ряду цитокинов стоит ИЛ-2. В зависимости от условий он может проявлять как про-, так и антивоспалительную активность. IL-2 является ключевым ростовым фактором лимфоцитов и играет основополагающую роль в формировании иммунной памяти (https://en.wikipedia.org/wiki/Interleukin_2). Как и следовало ожидать, в нашей экспериментальной модели ЛПС преимущественно усиливал секрецию цитокинов (TNF–alfa, IL-6, IL-10 и VEGF), основными продуцентами которых являются клетки врожденного иммунитета, тогда как Кон А преимущественно стимулировал лимфоидную секрецию IL-2 и IFN-гамма — цитокинов, вовлеченных в развитие адаптивных иммунных реакций. На наш взгляд, экспериментальная модель, где имеет место одновременное воздействие ЛПС и Кон А на клетки крови на фоне свертывания крови наиболее приближена к реальным событиям, происходящим в организме. В действительности, проникновение инфекционного патогена в организм, часто сопровождается нарушением сосудистого русла, а активация врожденного иммунитета создает необходимые предпосылки для развития адаптивных иммунных реакций. С нашей точки зрение оценка базовой иммунореактивности крови могла бы быть чрезвычайно полезна при получении и лечебном использовании компонентов крови. В частности, разрабатываемая нами технология позволяет посредством относительно кратковременного (до 18 ч) воздействия на кровь фармакологическими иммуномодуляторами существенно влиять на иммунореактивность крови и, таким образом, усиливать лечебную активность ее клеточных и жидких компонентов. Есть основания также надеяться, что оценка иммунореактивности цельной крови может иметь прогностическое значение у больных с острыми и хроническими иммунологическими расстройствами, а также характеризовать эффективность воздействия на организм различных иммунотропных воздействий. Конечно, все эти предположения требуют дальнейших экспериментальных и клинических подтверждений.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare no conflicts of interest.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Xu Z, Yin W, Zhang Y, Qi X, Chen Y, Xie X, Zhang C. Comparative evaluation of leukocyte- and platelet-rich plasma and pure platelet-rich plasma for cartilage regeneration. *Sci Rep*. 2017 Mar 7;7:43301. https://orcid.org/ 10.1038/srep43301. PMID: 28265109; PMCID: PMC5339695.
2. Collins T, Alexander D, Barkatali B. Platelet-rich plasma: a narrative review. *EFORT Open Rev*. 2021 Apr 1;6(4):225-235. https://orcid.org/ 10.1302/2058-5241.6.200017. PMID: 34040800; PMCID: PMC8142058.
3. Клеточные технологии в лечении радиационных ожогов:опыт ФМБЦ им.А.И. Бурназяна. Котенко, К.В., Еремин, И.И., Мороз, Б.Б., Бушманов, А.Ю., Надежина, Н.М., Галстян, И.А., Гринаковская, О.С., Аксененко, А.В., Дешевой, Ю.Б., Лебедев, В.Г., Слободина, Т.С., Жгутов, Ю.А., Лаук-Дубицкий С.Е., Еремин П.С. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2012. Т. 7. №2. С. 97-102.
Cellular technologies in the treatment of radiation burns: experience of the A. I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center. Kotenko KV, Eremin II, Moroz BB, Bushmanov AYu, Nadezhda NM, Galstyan IA, Grinakovskaya OS, Aksenenko AV, Deshevoy YuB, Lebedev VG, Slobodina TS, Zhgutov YuA, Lauk-Dubitsky SE, Eremin PS. *Cellular transplantology and tissue engineering*. 2012. Vol. 7. No. 2. P. 97-102.
4. Васильев В.С., Корчажкина Н.Б., Михайлова А.А., Наделяева И.И., Васильев С.А., Васильев И.С., Васильев Ю.С., Терюшкова Ж.И., Казанцев И.Б., Васильева Е.С., Котенко К.В. Современные технологии регенеративной реабилитации в лечении пациентов с патологическими рубцовыми изменениями. Хирургия. *Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2021;6-2:7-14. 4.
Vasiliev V.S., Korchazhkina N.B., Mikhailova A.A., Nadelyaeva II., Vasiliev S.A., Vasiliev I.S., Vasiliev Yu.S., Teryushkova Zh.I., Kazantsev I.B., Vasilieva E.S., Kotenko K.V. Current regenerative rehabilitation technologies in the treatment of patients with pathological scar changes. Surgery. *Magazine them. N.I. Pirogov*. 2021;6-2:7-14.
5. Successful treatment of localised radiation lesions in rats and humans by mesenchymal stem cell transplantation. Kotenko K, Moroz B, Nadezhina N, Galstyan I, Eremin I, Deshevoy J, Lebedev V, Slobodina T, Grinakovskaya D, Zhgutov Y, Bushmanov A. *Radiation Protection Dosimetry*. 2012. Vol. 151. No. 4. P. 661-665.
6. Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2023623906 Российская Федерация. База данных научных исследований по методам получения клеточных продуктов жировой ткани: №2023623706: заявл. 02.11.2023: опубл. 13.11.2023 / К.В. Котенко, Н.Б. Корчажкина, И.И. Еремин [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского».
EDN QXYFHE. Certificate of state registration of database No. 2023623906 Russian Federation. Database of scientific research on methods of obtaining cellular products of adipose tissue: No. 2023623706: declared 02.11.2023: published 13.11.2023 / K.V. Kotenko, N.B. Korchazhkina, I.I. Eremin [et al.]; applicant Federal State Budgetary Scientific Institution «Russian Scientific Center of Surgery named after Academician B.V. Petrovsky». — EDN QXYFHE.
7. Liu X, Li Y, Shen L, Yan M. Leukocyte and Platelet-Rich Plasma (L-PRP) in Tendon Models: A Systematic Review and Meta-Analysis of *in vivo*/*in vitro* Studies. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2022 Dec 15;2022:5289145. https://orcid.org/ 10.1155/2022/5289145. PMID: 36569346; PMCID: PMC9780014.
8. Rajkovic CJ, Merckling ML, Lee AW, Subah G, Malhotra A, Thomas ZD, Zeller SL, Wainwright JV, Kinon MD. Conservative management of spinal pathology with autologous conditioned serum: A systematic review of the literature. *World J Orthop*. 2024 Sep 18;15(9):870-881. https://orcid.org/ 10.5312/wjo.v15.i9.870. PMID: 39318497; PMCID: PMC11417626.
9. Shrestha S, Pathak R, Jagat GC, Donovan J. Platelet-rich fibrin: A review of its role as a new treatment in androgenetic alopecia. *J Cosmet Dermatol*. 2024 Aug;23(8):2524-2530. https://orcid.org/ 10.1111/jocd.16333. Epub 2024 Apr 20. PMID: 38641925.
10. Mansouri K, Rostaminasab G, Ahmadi Jouybari T, Bagheri M. The use of orthokine therapy for the treatment of post refractive surgery corneal ulcer, a case report. *Int Immunopharmacol*. 2023 Jul;120:110273. https://orcid.org/ 10.1016/j.intimp.2023.110273. Epub 2023 May 14. PMID: 37192554.
11. He CZ, Zeng ZJ, Liu JQ, Qiu Q, He Y. Autologous serum eye drops for patients with dry eye disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Front Med (Lausanne)*. 2024 Sep 13;11:1430785. https://orcid.org/ 10.3389/fmed.2024.1430785. PMID: 39346942; PMCID: PMC11427303.
12. Akel M, Yosef B, Khalil F. Effects of Platelet-Rich Plasma Injections on Periodontal Health During Accelerated Orthodontic Tooth Movement. *Cureus*. 2024 Sep 16;16(9):e69498. https://orcid.org/ 10.7759/cureus.69498. PMID: 39416559; PMCID: PMC11480773.
13. Kiaipour Z, Shafiee M, Ansari G. Role of Platelet Concentrates in Dental-Pulp Regeneration: A Systematic Review of Randomized Clinical Trials. *J Dent (Shiraz)*. 2024 Jun 1;25(2):97-107. https://orcid.org/ 10.30476/dentjods.2023.96000.1912. PMID: 38962085; PMCID: PMC11217062.
14. Odložilová Š, Paral J, Sirovy M, Zajak J, Fibír A. Platelet-Rich Plasma: Characteristics and Current Review of its Use in Surgery. *Pol Przegl Chir*. 2024 Jul 9;96(5):66-74. https://orcid.org/ 10.5604/01.3001.0054.6750. PMID: 39465631.
15. Everts PA, Lana JF, Alexander RW, Dallo I, Kon E, Ambach MA, van Zundert A, Podesta L. Profound Properties of Protein-Rich, Platelet-Rich Plasma Matrices as Novel, Multi-Purpose Biological Platforms in Tissue Repair, Regeneration, and Wound Healing. *Int J Mol Sci*. 2024 Jul 19;25(14):7914. https://orcid.org/ 10.3390/ijms25147914. PMID: 39063156; PMCID: PMC11277244.
16. D'asta F, Halstead F, Harrison P, Zecchi Orlandini S, Moiemen N, Lord J. The contribution of leucocytes to the antimicrobial activity of platelet-rich plasma preparations: A systematic review. *Platelets*. 2018 Jan;29(1):9-20. https://orcid.org/ 10.1080/09537104.2017.1317731. Epub 2017 Jul 6. PMID: 28681651.
17. Cieślik-Bielecka A, Bold T, Ziółkowski G, Pierchała M, Królikowska A, Reichert P. Antibacterial Activity of Leukocyte- and Platelet-Rich Plasma: An *In Vitro* Study. *Biomed Res Int*. 2018 Jun 27;2018:9471723. https://orcid.org/ 10.1155/2018/9471723. PMID: 30050949; PMCID: PMC6040244.
18. Seledtsov VI, Darinskas A, Von Delwig A, Seledtsova GV. Inflammation control and immunotherapeutic strategies in comprehensive cancer treatment. *Metabolites*. 2023 Jan 13;13(1):123. https://orcid.org/ 10.3390/metabo13010123. PMID: 36677048; PMCID: PMC9865335

Поступила 29.09.2024
Received 29.09.2024
Принята к печати 16.10.2024
Accepted 16.10.2024