

Влияние интерлейкина-6 и гипоксии на экспрессию белков-маркеров повреждения головного мозга в клеточной модели нейроваскулярной единицы

А. А. Ивкин^{1*}, Е. В. Григорьев¹, Е. Д. Хилажева²

¹ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний Минобрнауки России, Россия, 650002, г. Кемерово, бульвар им. акад. Л. С. Барбараша, д. 6

² НИИ молекулярной медицины и патобиохимии Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, Россия, 660022, Красноярский край, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1

Для цитирования: А. А. Ивкин, Е. В. Григорьев, Е. Д. Хилажева. Влияние интерлейкина-6 и гипоксии на экспрессию белков-маркеров повреждения головного мозга в клеточной модели нейроваскулярной единицы. *Общая реаниматология*. 2025; 21 (3): 32–40. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2025-3-2540> [На русск. и англ.]

*Адрес для корреспонденции: Ивкин Артём Александрович, ivkiaa@kemcardio.ru

Резюме

Высокая частота послеоперационных когнитивных нарушений при кардиохирургических операциях у детей обуславливает поиск новых стратегий нейропротекции.

Цель исследования. Установить влияние гипоксии и интерлейкина-6 (ИЛ-6) на экспрессию клаудина-5, окклюдина-1, рецепторов ИЛ-1 и ИЛ-6 в клетках нейроваскулярной единицы (НВЕ).

Материалы и методы. В исследовании *in vitro* сформировали клеточную модель НВЕ, состоящую из нейронов, астроцитов и эндотелиоцитов. Провели культивирование НВЕ в условиях нормоксии и гипоксии с содержанием кислорода в среде 15, 10, 7 и 5%, а также с добавлением сыворотки больных из групп с максимальной и минимальной концентрацией ИЛ-6. Инкубацию клеток проводили в режиме нормотермии в течение 30 мин с дальнейшей оценкой экспрессии маркеров повреждения клеток НВЕ.

Результаты. Уменьшение интенсивности флюоресценции для клаудина-5 наступало при 10% кислорода в среде (15,2 vs 34,3 в контрольной группе ($p=0,0105$)) и менее. На окклюдин-1 гипоксия не оказала влияния. Увеличение флюоресценции для экспрессии рецепторов интерлейкина-1 отметили при 7 и 5% кислорода (соответственно 12,2 и 12,9 vs 9,9 в контрольной группе, $p=0,0105$), но гипоксия не повлияла на экспрессию рецепторов интерлейкина-6. В группе с нормоксией и во всех группах с гипоксией добавление сыворотки пациентов значимо влияло на экспрессию исследуемых маркеров, гипоксия потенцировала данные эффекты. Добавление сыворотки с максимальным содержанием ИЛ-6 приводило к наибольшему снижению интенсивности флюоресценции маркеров.

Заключение. Воздействие ИЛ-6 оказало более выраженное действие на экспрессию исследуемых маркеров в клетках НВЕ, чем гипоксия. Гипоксия с концентрацией кислорода в среде до 10% не обладала действием на экспрессию маркеров.

Ключевые слова: нейроваскулярная единица; нейроны; астроциты; эндотелиоциты; гипоксия; ИЛ-6; рецептор ИЛ-1; клаудин-5; окклюдин-1

Финансирование. Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 22-15-00258, <https://rscf.ru/project/22-15-00258/>.

The Impact of Interleukin-6 and Hypoxia on the Expression of Brain Injury Marker Proteins in a Cellular Model of the Neurovascular Unit

Artem A. Ivkin^{1*}, Evgeniy V. Grigoriev¹, Elena D. Khilazheva²

¹ Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Disease, Ministry of Education and Science of the Russian Federation, 6 Academician L. S. Barbarash Boulevard, 650002 Kemerovo, Russia

² Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Prof. V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Health of Russia, 1 Partizana Zheleznyaka Str., 660022 Krasnoyarsk, Krasnoyarsk area, Russia

Summary

The high incidence of postoperative cognitive dysfunction in children undergoing cardiac surgery underscores the urgent need for effective neuroprotective strategies.

Aim. To examine the effects of hypoxia and interleukin-6 (IL-6) on the expression of claudin-5, occludin-1, and interleukin-1 (IL-1) and IL-6 receptors in neurovascular unit (NVU) cells.

Materials and methods. An *in vitro* NVU model comprising neurons, astrocytes, and endothelial cells was established. The cells were cultured under normoxic and hypoxic conditions with oxygen concentrations of 15%, 10%, 7%, and 5%. The cultures were also treated with patient-derived sera containing high or low levels

of IL-6. All incubations were conducted under normothermic conditions for 30 minutes. Injury marker expression was then assessed using fluorescence analysis.

Results. Significant reductions in claudin-5 fluorescence intensity were observed at oxygen levels of 10% and below (15.2 vs. 34.3 in controls, $P=0.0105$). Hypoxia did not affect occludin-1 expression. IL-1 receptor fluorescence intensity increased under 7% and 5% oxygen conditions (12.2 and 12.9 versus 9.9 in the control group, $P=0.0105$), while IL-6 receptor expression remained unchanged. In both normoxic and hypoxic conditions, adding patient sera significantly altered marker expression; hypoxia enhanced these effects. Sera with the highest IL-6 levels induced the most pronounced reduction in injury marker fluorescence.

Conclusion. IL-6 had a more significant impact on injury marker expression in NVU cells than hypoxia did. Hypoxic conditions with oxygen concentrations down to 10% did not affect marker expression.

Keywords: *neurovascular unit, neurons, astrocytes, endothelial cells, hypoxia, interleukin-6, IL-1 receptor, claudin-5, occludin-1*

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. This study was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 22-15-00258). <https://rscf.ru/project/22-15-00258>.

Информация об авторах/ Information about the authors:

Ивкин Артем Александрович/Artem A. Ivkin: <http://orcid.org/0000-0002-3899-1642>.

Григорьев Евгений Валерьевич/Evgeniy V. Grigoriev: <http://orcid.org/0000-0001-8370-3083>.

Хилажева Елена Дмитриевна/Elena D. Khilazheva: <http://orcid.org/0000-0002-9718-1260>

Read the full-text English version at www.reanimatology.com

Введение

Современные достижения кардиохирургии и кардиоанестезиологии достигли такого уровня, что при проведении хирургических операций необходимо учитывать сохранение не только жизненно важных функций пациента, но и качества его жизни. Когнитивные функции играют важную роль в этом контексте, и требуется приложить все усилия для их поддержания на уровне, существовавшем до операции. Однако многочисленные исследования показывают, что кардиохирургические операции у детей часто связаны с высоким риском послеоперационных когнитивных нарушений. Послеоперационный делирий (ПОД) фиксируется в 40–65% случаев [1–4]. Это состояние значительно увеличивает время пребывания пациента в отделении интенсивной терапии из-за нарастания потребности в механической вентиляции, седативных препаратах и других вмешательствах [1, 5]. В результате увеличивается продолжительность госпитализации и летальность [6]. Более того, негативное влияние ПОД не ограничивается только этими эффектами, так как было установлено, что он имеет долгосрочные последствия, снижающие когнитивные способности ребенка в течение нескольких месяцев после операции. Подобные долгосрочные последствия могут возникать не только из-за ПОД, но и вследствие любых церебральных повреждений, происходящих во время операции [7, 8].

Существуют данные о негативных поведенческих изменениях у детей, перенесших эпизод послеоперационного делирия. Эти изменения могут проявляться в виде проблем с концентрацией внимания, эмоциональной нестабильности и трудностей в социальных взаимодействиях. Исследования показывают, что такие дети могут сталкиваться с долгосрочными последствиями,

влияющими на их психоэмоциональное состояние и качество жизни [9]. Это приводит к трудностям использования уже приобретенных навыков, а также к проблемам в освоении новой информации, что особенно актуально для детей дошкольного возраста [10, 11]. Развитие делирия у детей приводит к увеличению как медицинских, так и финансовых затрат [12].

При рассмотрении причин высокой частоты когнитивных нарушений после хирургической коррекции врожденных пороков сердца у детей следует учитывать, что кардиохирургические вмешательства включают множество патологических факторов, оказывающих негативное воздействие на мозг и вызывающих церебральные повреждения. К таким факторам относятся влияние анестетиков, которые способны вызывать апоптоз нейронов и нарушать синаптическую пластичность, что в свою очередь может приводить к когнитивным нарушениям. Кроме того, следует учитывать возможные эпизоды гипоксии и нестабильной гемодинамики, применение симпатомиметических препаратов и длительность операции, что характерно, но не уникально для данного типа вмешательств [13–15].

Особенностью же кардиохирургических операций является частое использование искусственного кровообращения (ИК). Эффекты, связанные с ИК и создающие риски церебрального повреждения, включают микроэмболию, ламинарный поток крови и циркуляторный арест. И даже гипотермия, которая очень часто применяется в детской кардиохирургии по различным причинам, может иметь как защитные свойства для головного мозга, так и негативные, как, например, изменение реологических свойств крови и нарушения микроциркуляции, а также инициацию нейровоспаления посредством активации CIRBP (Cold-inducible RNA-binding pro-

tein) [16–18]. Эти факторы требуют особого внимания и тщательного контроля для минимизации риска повреждения мозга.

Функционирование клеток мозга осуществляется посредством взаимодействия структур комплекса: сосудов и астроцитов, образующих гематоэнцефалический барьер, и нейронов (рис. 1). Данный комплекс носит название нейроваскулярной единицы (НВЕ). Под действием прямых деструктивных факторов и системного воспаления в мозге происходит разрушение гематоэнцефалического барьера и поступление через него в НВЕ системных цитокинов, которые усиливают возникшее нейровоспаление и нарушают функционирование НВЕ через различные механизмы. В частности, интерлейкин-1 β способен вызывать дисфункцию глимфатической системы, взаимодействуя с астроцитами, и тем самым нарушать выведение токсинов, что усугубляет цикл нейровоспаления [19–23].

Таким образом, интерлейкин-1 β способен выступать в качестве маркера развития воспаления. Два других потенциальных маркера — это клаудин-5 и окклюдин-1, которые являются белками плотных контактов гематоэнцефалического барьера и их исследование отражает состояние данной структуры. Так как многочисленные исследования доказали корреляцию между концентрацией данных маркеров в крови и клинической картиной повреждения головного мозга, а также есть данные, что клаудин-5 и окклюдин-1 участвуют в процессе воспаления, то существует возможность их использования для оценки состояния НВЕ [24–26].

Исходя из вышеописанного можно заключить, что существует сочетание прямых повреждающих факторов и тех, которые действуют косвенно, через системное воспаление, приводящее к последующей гибели НВЕ (рис. 2). В этом контексте применение любых методик, направленных на ограничение системного воспалительного ответа (СВО) у детей, которым проводится коррекция ВПС, представляет особый интерес. Од-

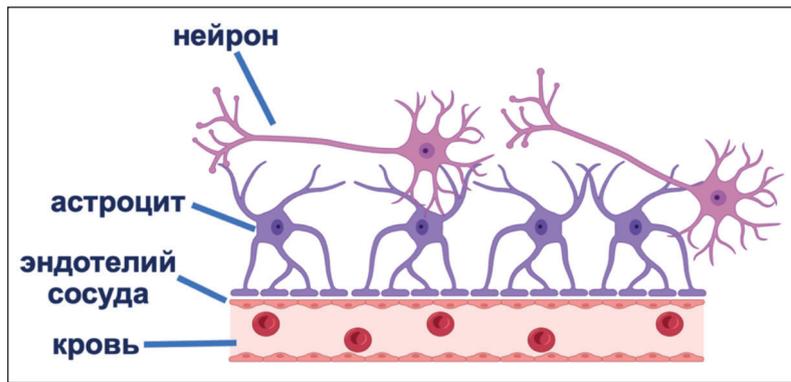


Рис. 1. Схема строения нейроваскулярной единицы (рисунок авторов).

ним из возможных подходов является ограничение использования донорских компонентов крови в течение интраоперационного и послеоперационного периода. Эта концепция особенно критична для педиатрических пациентов, поскольку трансфузии в кардиохирургии часто проводятся профилактически для предотвращения избыточной гемодилюции, возникающей из-за несоответствия между объемом циркулирующей крови ребенка и объемом, необходимым для подготовки системы ИК [21].

Однако исследования показали, что донорские компоненты крови сами по себе могут быть источником СВО [27, 28]. Тем не менее, несмотря на сложность этой проблемы, донорские компоненты крови при ИК используются не путем системного регулирования, а по усмотрению анестезиолога или перфузиолога.

В настоящее время в педиатрической практике преобладает рестриктивная стратегия трансфузий из-за многочисленных рисков. Эти



Рис. 2. Схема воздействия патологических факторов на нейроваскулярную единицу во время кардиохирургических вмешательств (рисунок авторов).

риски включают возможность развития инфекций, острых гемолитических реакций, метаболических осложнений в виде гиперкалиемии или гипокальциемии, аллергических реакций, а также синдромов перегрузки кровообращения, ассоциированной с трансфузией (ТАСО), и острого легочного повреждения, связанного с трансфузией (TRALI). Тем не менее, в кардиохирургии трансфузия по-прежнему широко используется из-за опасений осложнений гемодилюции в период экстракорпорального кровообращения [29–31]. Следовательно, актуальным остается вопрос: что оказывает больший деструктивный эффект на НВЕ — гипоксия, вызванная гемодилюцией, или же системное воспаление, как результат применения компонентов донорской крови.

Цель экспериментального исследования — установление влияния гипоксии и интерлейкина-6 (ИЛ-6) на экспрессию клаудина-5, окклюдина-1, рецепторов ИЛ-1 и ИЛ-6 в клетках нейроваскулярной единицы.

Материал и методы

В лаборатории КрасГМУ разработали модель повреждения головного мозга при кардиохирургических операциях на основе клеточной модели НВЕ, которую культивировали в условиях, аналогичных интраоперационным. Посредством реализации следующих этапов на базе КрасГМУ провели экспериментальное исследование.

1. Получение первичных культур клеток головного мозга *in vitro*.

Процесс получения первичных культур клеток головного *in vitro* и формирование экспериментальных групп подробно описали в ранее опубликованной работе [32]. Индикатором степени выраженности системного воспаления выступила концентрация интерлейкина-6 (ИЛ-6) в сыворотке крови пациентов.

2. Формирование экспериментальных групп.

Для определения эффектов ИЛ-6 на клеточную модель НВЕ *in vitro* в культуральную среду добавляли образцы сыворотки с минимальной и максимальной концентрацией ИЛ-6. Это позволило моделировать воздействие системного воспаления различной выраженности.

Сформировали группы с зависимости от концентрации ИЛ-6 в образце.

1. Группа «Контроль» — интактная модель НВЕ.
2. Группа «Минимум» — образцы с минимальным содержанием ИЛ-6 в культуре.
3. Группа «Максимум» — образцы с максимальным содержанием ИЛ-6 в культуре.

В соответствии с условиями гипоксической инкубации НВЕ сформировали группы:

1. Контрольная — стандартные условия культивирования: N_2 — 75%, O_2 — 20%, CO_2 — 5%.
2. Гипоксия 1: N_2 — 80%, O_2 — 15%, CO_2 — 5%.

3. Гипоксия 2: N_2 — 85%, O_2 — 10%, CO_2 — 5%.
4. Гипоксия 3: N_2 — 88%, O_2 — 7%, CO_2 — 5%.
5. Гипоксия 4: N_2 — 90%, O_2 — 5%, CO_2 — 5%.

Инкубацию проводили при 37°C. Длительность воздействия гипоксией составила 30 мин.

Число повторностей в каждой группе составило 5.

На данном этапе исследования оценили воздействия сыворотки с высоким и низким содержанием ИЛ-6, а также различных кислородных условий на следующие параметры: экспрессия белков плотных контактов (клаудин 5, ZO-1), экспрессия рецепторов и концентрация в культуральной жидкости цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6).

3. Иммуноцитохимические исследования.

Для регистрации целевых молекул-маркеров использовали метод двойного непрямого иммуноцитохимического окрашивания согласно протоколу фирмы-изготовителя антител. Использовали первичные антитела к клаудину-5 (Claudin 5) (AF0130, Affinity Biosciences), окклюдину-1 (ZO1) (AF5145, Affinity Biosciences), Interleukin 1 Receptor Type I (PAA066Ra01, Cloud-Clone Corp), Interleukin 6 Receptor (DF2530, Affinity Biosciences). Технология исследования более подробно описана в другом нашем исследовании [32].

Статистический анализ.

Данные обрабатывали статистически с помощью программы BioStat Pro 5.9.8 и представили в тексте, таблицах в виде медианы (*Me*), верхнего (*Q1*) и нижнего (*Q3*) квартилей, так как большинство данных имело характер распределения, отличный от нормального (критерий Шапиро–Уилка, $p < 0,05$). Количественные переменные сравнивали с использованием одностороннего критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Для выявления значимых отличий в нескольких независимых группах применяли критерий Краскела–Уоллеса. Для попарного сравнения групп использовали критерий Манна–Уитни с применением поправки Бонферрони. С учетом поправки Бонферрони на множественные сравнения, критический уровень значимости равнялся 0,0125, так как для выявления влияния гипоксии на НВЕ сравнивали 4 исследуемых группы с одной контрольной. Для выявления влияния ИЛ-6 на НВЕ сравнили между собой группы с максимальным и минимальным содержанием ИЛ-6, с учетом поправки Бонферрони на множественные сравнения, критический уровень значимости был равен 0,017.

Результаты и обсуждение

При воздействии гипоксии отметили уменьшение интенсивности флюоресценции клаудина-5 с 34,3 у. е. до 27,0 у. е. Статистически значимым снижением было в группах с гипоксией 10% ($p=0,0105$), 7% ($p=0,0105$) и 5% ($p=0,0105$) (табл. 1).

Воздействие гипоксии с концентрацией кислорода 15% не вызвало значимого снижения экспрессии клаудина-5. При этом одновременное воздействие гипоксии и ИЛ-6 вызвало умень-

Таблица 1. Интенсивность флюоресценции клаудина-5.

Группы	Значения показателей при различном содержании O ₂					p-value				
	Нормоксия	15%	10%	7%	5%	Сравнения 15% vs 10% vs 7% vs 5%	Контрольная vs 15%	Контрольная vs 10%	Контрольная vs 7%	Контрольная vs 5%
Контрольная	34,3 [30,9–36,9]	27,0 [25,1–28,7]	15,2 [13,5–16,9]	10,6 [8,5–12,5]	13,0 [11,5–13,6]	0,0029	0,0416	0,0105	0,0105	0,0105
«Минимум»	13,5 [11,2–15,8]	10,7 [10,0–11,6]	8,6 [8,0–9,0]	7,4 [6,4–8,3]	6,9 [6,4–7,4]	0,0043	0,0956	0,0105	0,0105	0,0105
«Максимум»	3,6 [3,3–3,8]	4,7 [3,9–4,9]	2,5 [2,1–2,8]	3,8 [3,7–4,2]	3,6 [3,2–3,7]	0,0734	—	—	—	—
Контрольная vs «Минимум» vs «Максимум»	0,0073	0,0073	0,0073	0,0125	0,0073					
Контрольная vs «Минимум»	0,0105	0,0105	0,0105	0,0105	0,0105					
Контрольная vs «Максимум»	0,0105	0,0105	0,0105	0,0105	0,0105					
«Минимум» vs «Максимум»	0,0105	0,0105	0,0105	0,0105	0,0105					

Примечание. Здесь и в табл. 2–4: все значения указали в условных единицах (у. е.) флуоресценции.

Таблица 2. Интенсивность флюоресценции окклюдина-1.

Группы	Значения показателей при различном содержании O ₂					p-value				
	Нормоксия	15%	10%	7%	5%	Сравнения 15% vs 10% vs 7% vs 5%	Контрольная vs 15%	Контрольная vs 10%	Контрольная vs 7%	Контрольная vs 5%
Контрольная	53,8 [51,6–56,9]	59,7 [56,4–60,4]	54,7 [53,2–58,2]	60,6 [58,8–62,0]	62,2 [61,0–64,0]	0,2092	—	—	—	—
«Минимум»	26,3 [25,0–28,1]	26,2 [24,9–26,8]	22,1 [21,6–23,4]	19,8 [18,9–20,4]	20,4 [19,4–21,2]	0,0106	0,3864	0,0416	0,0105	0,0105
«Максимум»	8,2 [7,8–8,6]	9,1 [8,3–9,3]	8,0 [7,7–8,5]	11,0 [10,3–11,6]	12,3 [11,3–12,9]	0,0065	0,1932	0,4423	0,0105	0,0105
Контрольная vs «Минимум» vs «Максимум»	0,0073	0,0073	0,0073	0,0073	0,0073					
Контрольная vs «Минимум»	0,0105	0,0105	0,0105	0,0105	0,0105					
Контрольная vs «Максимум»	0,0105	0,0105	0,0105	0,0072	0,0105					
«Минимум» vs «Максимум»	0,0105	0,0105	0,0105	0,0105	0,0105					

шение интенсивности флюоресценции в подгруппе с минимальным содержанием ИЛ-6 ($p=0,0043$). При попарном сравнении выявили, что интенсивность флюоресценции клаудина-5 была ниже в группе с гипоксией 2 ($p=0,0105$), гипоксией 3 ($p=0,0105$) и гипоксией 4 ($p=0,0105$) относительно группы с нормоксией.

Также необходимо отдельно обратить внимание, что максимальное уменьшение изучаемого показателя наблюдали в группе «Максимум», даже в условиях нормоксии ($p=0,0105$). При гипоксическом воздействии не произошло дальнейшего уменьшения интенсивности флюоресценции ($p=0,0734$). Одновременно с этим, в присутствии ИЛ-6 с минимальной концентрацией, отметили динамическое изменение интенсивности флюоресценции при усилении гипоксических воздействий ($p=0,043$).

Особый интерес представляет сравнение интенсивности флюоресценции клаудина-5 между группами с минимальным и максимальным содержанием ИЛ-6 в культуре и группой с концентрацией кислорода в среде 5%. Анализ выявил, что статистически значимых отличий между группой с минимальным ИЛ-6 и группой с гипоксией (13,0 [11,5–13,6] у. е. vs 13,5 [11,2–15,8] у. е. ($p=0,5637$)) не было, однако интенсивность флюоресценции клаудина-5 была значимо ниже в группе с высоким содержанием ИЛ-6 относительно группы с гипоксией (13 [11,5–13,6] у. е. vs 3,6 [3,3–3,8] ($p=0,0105$)). Таким образом, можно говорить о том, что гипоксия с минимальным содержанием кислорода в среде, равна по своим эффектам на выработку клаудина-5 воздействию низких концентраций ИЛ-6. Однако, высокая концентрация ИЛ-6, а значит и уровень СВО, превосходила гипоксию по своим эффектам на НВЕ.

Поэтому можно считать, что влияние ИЛ-6 было более выражено, чем влияние гипоксии. То есть, более высокое содержание ИЛ-6 приводило к максимально выраженному влиянию на экспрессию клаудина 5, оцененную посредством интенсивности флюоресценции. А гипоксическое состояние усиливало эффекты ИЛ-6, даже если его содержание было низким.

Таблица 3. Экспрессия рецепторов интерлейкина-1.

Группы	Значения показателей при различном содержании O ₂					p-value				
	Нормоксия	15%	10%	7%	5%	Сравнения 15% vs 10% vs 7% vs 5%	Контрольная vs 15%	Контрольная vs 7%	Контрольная vs 5%	
Контрольная	9,9 [9,8–10,1]	10,1 [9,8–10,4]	10,6 [10,3–10,9]	12,2 [11,7–12,7]	12,9 [12,1–13,3]	0,0117	0,2819	0,0956	0,0105	0,0217
«Минимум»	22,7 [21,7–23,7]	22,0 [21,3–22,4]	28,8 [27,7–29,7]	32,6 [31,3–34,1]	33,1 [32,3–33,8]	0,0027	0,2339	0,0105	0,0105	0,0105
«Максимум»	27,6 [26,6–29,0]	32,2 [31,0–34,4]	36,0 [33,6–37,8]	38,3 [34,9–41,0]	39,8 [38,5–40,7]	0,0218	0,0416	0,0217	0,0217	0,0105
Контрольная vs «Минимум»	0,0097	0,0073	0,0073	0,0073	0,0073					
vs «Максимум»										
Контрольная vs «Минимум»	0,0105	0,0105	0,0105	0,0105	0,0105					
Контрольная vs «Максимум»	0,0105	0,0105	0,0105	0,0105	0,0105					
«Минимум» vs «Максимум»	0,0217	0,0105	0,0105	0,0745	0,0105					

Таблица 4. Экспрессия рецепторов интерлейкина-6.

Группы	Значения показателей при различном содержании O ₂					p-value				
	Нормоксия	15%	10%	7%	5%	Сравнения 15% vs 10% vs 7% vs 5%	Контрольная vs 15%	Контрольная vs 7%	Контрольная vs 5%	
Контрольная	8,6 [7,9–9,0]	8,0 [7,5–8,5]	8,5 [8,3–8,6]	8,6 [8,4–8,8]	8,9 [8,6–9,2]	0,0552	—	—	—	—
«Минимум»	8,8 [8,2–9,4]	10,9 [10,3–12,3]	16,0 [14,1–17,8]	21,1 [17,7–24,1]	20,7 [19,7–22,2]	0,0034	0,0217	0,0105	0,0105	0,0105
«Максимум»	8,9 [8,3–10,1]	16,2 [15,0–17,0]	19,4 [17,1–22,3]	33,6 [30,6–36,0]	41,3 [39,2–44,4]	0,0014	0,0105	0,0105	0,0105	0,0105
Контрольная vs «Минимум»	0,6678	0,0097	0,0169	0,0073	0,0073					
vs «Максимум»										
Контрольная vs «Минимум»	—	0,0105	0,0105	0,0105	0,0105					
Контрольная vs «Максимум»	—	0,0105	0,0105	0,0105	0,0105					
«Минимум» vs «Максимум»	—	0,0217	0,0956	0,0105	0,0105					

Вторым белком, который участвует в обеспечении функциональной активности гематоэнцефалического барьера, является белок плотных контактов окклюдина-1.

Гипоксическое воздействие не вызвало статистически значимого изменения интенсивности флюоресценции окклюдина-1, которая составила 58,7–62,2 у. е. ($p=0,2092$). Обнаружили только некоторую тенденцию к увеличению интенсивности флюоресценции (табл. 2).

Присутствие сыворотки пациентов в питательной среде при культивировании клеток привело к значимому снижению интенсивности флюоресценции как для группы с минимальным ИЛ-6 ($p=0,0151$), так и для группы с максимальной концентрацией ИЛ-6 ($p=0,0105$). Гипоксические условия приводили к дальнейшему снижению интенсивности флюоресценции только в группах гипоксия 3 ($p=0,0105$) и гипоксия 4 — для сыворотки как с минимальным, так и с максимальным ИЛ-6 ($p=0,0105$).

Таким образом можно сделать считать, что влияние ИЛ-6 на окклюдина было значимым при любой его концентрации. При этом эффект ИЛ-6 зависел от его содержанием в питательной среде, т. е. чем выше было содержание ИЛ-6, тем меньше — интенсивность флюоресценции окклюдина-1. Гипоксия не оказала статистически значимого влияния на окклюдина-1.

Следующим видом исследований было определение экспрессия рецепторов интерлейкина-1 (ILR1).

В условиях гипоксии, но без присутствия ИЛ-6 в питательной среде, изменения интенсивности флуоресценции рецепторов ILR1 отметили в группах «Гипоксия 3» и «Гипоксия 4» (концентрация O₂ 7% и 5%) — увеличение на 23% ($p=0,0105$) и 30% ($p=0,0105$), соответственно (табл. 3).

Присутствие минимального содержания ИЛ-6 в условиях нормоксии привело к увеличению интенсивности флюоресценции ILR1 более чем в 2 раза (с 9,9 у. е. до 22,7 у. е.) ($p=0,0105$), максимальное содержание ИЛ-6 вызвало увеличение флюоресценции ILR1 в 2,8 раза — 27,6 у. е. по сравнению с 9,9 у. е. для контроля ($p=0,0105$).

В условиях усиления гипоксии обнаружили, что интенсивность флюоресценции рецепторов ИЛ-1 динамически увеличивается. При этом максимальные изменения проявлялись в подгруппе «Максимум» при более выраженной гипоксии (Гипоксия 4), когда фиксировали четырехкратное увеличение изучаемого показателя ($p=0,0105$) по сравнению с интактной группой клеток, которые культивировали в условиях нормоксии. В группе «Минимум» произошло трехкратное увеличение интенсивности флюоресценции ILR1 ($p=0,0105$). При этом в группе с минимальным ИЛ-6 влияние гипоксии с 15% кислорода еще не оказывала значимого влияния на интенсивность флюоресценции и статистическую разницу выявили только для групп с концентрацией кислорода 10 и менее %.

Таким образом, выявили, что минимальное влияние на интенсивность флюоресценции ILR1 оказывает гипоксия — изменения варьировали в пределах 20%. Присутствие ИЛ-6 в питательной среде вызывало более выраженные изменения по сравнению с гипоксическим влиянием. При этом наблюдали потенцирующее влияние гипоксических условий на эффекты ИЛ-6, связанных с ILR1.

В условия гипоксии, но без присутствия ИЛ-6 в питательной среде, статистически значимых изменений интенсивности флюоресценции рецепторов ИЛ-6 (IL6R) не обнаружили ($p=0,5152$) (табл. 4).

Даже в условиях усиления гипоксического воздействия, вплоть до 5% концентрации кислорода в среде, не фиксировали статистически значимого изменения интенсивности флюоресценции, по сравнению с условиями нормоксии.

При добавлении в культуру сыворотки пациентов, содержащей ИЛ-6, в условиях нормоксии не происходило статистически значимого изменения интенсивности флюоресценции ни в группе с минимальным ($p=0,2819$), ни в группе с максимальным ИЛ-6 ($p=0,1933$). В группе с минимальным ИЛ-6 при усилении гипоксических воздействий отметили значимое увеличение интенсивности флюоресценции экспрессии IL6R в группах с 10% ($p=0,0105$), 7% ($p=0,0105$) и 5% кислорода ($p=0,0105$) относительно нормоксических условий. В группах с максимальным содержанием ИЛ-6 также наблюдали динамическое увеличение интенсивности флюоресценции экспрессии IL6R по мере увеличения степени гипоксии, но статистически значимым оно стало уже начиная с концентрации кислорода 15% ($p=0,0105$). По мере снижения концентрации кислорода в среде значения интенсивности флюоресценции увеличивались с аналогичным уровнем статистической значимости. Наивысшее значения, как и в случае с IL1R, были достигнуты

в группе в максимальным ИЛ-6 в культуре и гипоксии 5% — в 4,8 раза выше, чем в контрольной группе ($p=0,0105$). Таким образом выявили, что присутствие ИЛ-6 в питательной среде вызывает увеличение экспрессии IL6R, оцененную по-средством интенсивности флюоресценции, и эффекты ИЛ-6 при этом усиливаются в условиях гипоксии. Обнаруженные изменения соответствовали изменениям в отношении эффектов гипоксии и ИЛ-6 на IL6R.

Все эксперименты показали, что гипоксия обладает меньшим эффектом на клеточную модель НВЕ, чем ИЛ-6. При этом увеличение степени гипоксии приводило к динамическому снижению показателей флюоресценции для всех маркеров. Таким образом, можно предположить, что стратегии отказа от компонентов донорской крови при кардиохирургических операциях у детей будет эффективна. При рестриктивной трансфузионной тактике существует риск гемической гипоксии, однако при применении трансфузии значимо потенцируется СВО и нейровоспаление в дальнейшем, что описано нами ранее [27, 28]. Это согласуется с другими работами, где было изучено влияние трансфузии на НВЕ у детей и доказано, что ее применение сопряжено с повышенным риском послеоперационного делирия и когнитивных нарушений [33, 34]. При этом ранее в клиническом исследовании доказали, что оперативная коррекция септальных ВПС в условиях ИК безопасна даже без трансфузии, при условии массы тела ребенка более 8 кг и отсутствии анемии до операции [35]. В этом же исследовании доказали, что среди детей, которым не вводили компоненты донорской крови, выраженность СВО и церебрального повреждения была меньше.

Стоит отметить, что выполненное исследование имеет ряд ограничений. Во-первых, оценивали небольшое количество групп с различными концентрациями кислорода, что уменьшает шансы на достоверные результаты относительно влияния гипоксии на модель НВЕ. Во-вторых, использовали неоптимальную клеточную модель. Существует несколько типов клеточных моделей НВЕ. Самая простая модель состоит из монокультуры эндотелиальных клеток [36]. Более сложной моделью является Transwell-модель, содержащая полупроницаемую вставку, позволяющую имитировать просвет сосуда и, с помощью которой возможно исследовать механизмы проницаемости ГЭБ, а также моделировать заболевания центральной нервной системы [37].

Данная модель является самой распространенной, и мы использовали именно такой тип. Более сложными считаются 3D-модели, например, модели ГЭБ *in vitro* на основе вне-

клеточного матрикса [38]. Они стали первым шагом на пути к созданию наиболее достоверных моделей, имитирующих пространственное взаимодействие клеток. Однако, сложности доставки питательных веществ в матрикс, а также отсутствие тока крови и низкая воспроизводимость состава матрицы считаются существенными недостатками подобных моделей и потому они не имеют широкого распространения. Более современным типом модели являются сфероидные [39]. В моделях этого типа, в результате сокультивирования, эндотелиальные клетки, астро- и перициты самоорганизуются в сфероидные структуры, где эндотелиальные клетки представляют внешний слой, а ядро состоит из астроцитов и перицитов располагаются в среднем слое. Отличаются такие модели более выраженной экспрессией белков плотных и адгезивных контактов (ZO-1, окклюдин, клаудин-5), а также простой, хорошей воспроизводимостью и длительным сроком жизнеспособности — до 21 сут. К их недостаткам относят недостаточность питания «ядра» сфероида и невозможность измерения трансэндотелиального сопротивления.

Самым современным и перспективным типом моделей по праву считаются микрофлюидные [40]. В них клетки организованы также трехмерно, а отличительной чертой является наличие постоянного ламинарного тока жидкости по микроканалам, что обеспечивает автоматизированное питание клеток, снижает

риск контаминации и создает напряжение сдвига, что обуславливает клеточную морфологию, приближенную к условиям *in vivo*. К недостаткам таких моделей относят трудности с измерением трансэндотелиального сопротивления и сложность их воспроизведения, требующая дорогостоящего оборудования. Возможно, использование сфероидных или микрофлюидных моделей могло бы принести большой объем информации о влиянии гипоксии и системного воспаления на НВЕ, но на данный момент отсутствует материально-техническая база их применения.

Заключение

Исследование на клеточной модели НВЕ показало, что гипоксия оказала меньшее воздействие на экспрессию маркеров церебрального повреждения, чем концентрация ИЛ-6. Клаудин-5 был значимо повышен только при гипоксии с 10% кислорода и менее, а окклюдин-1 не реагировал на изменение кислородного статуса, также как экспрессия рецепторов к ИЛ-1. При этом экспрессия рецепторов к ИЛ-6 значимо изменялась при гипоксии с 7 и 5% кислорода. Добавление сыворотки пациентов в культуру НВЕ во всех группах изменяло интенсивность флюоресценции больше, чем гипоксия, и потенцировала ее эффекты, причем негативный эффект усиливался с увеличением концентрации ИЛ-6 в добавляемой сыворотке.

Литература

1. Staveski S. L., Pickler R. H., Khoury P. R., Ollberding N. J., Donnellan A. L. D., Mauney J. A., Lincoln, P. A., et al. Prevalence of ICU delirium in postoperative pediatric cardiac surgery patients. *Pediatr Crit Care Med.* 2021; 22 (1): 68–78. DOI: 10.1097/PCC.0000000000002591. PMID: 33065733.
2. Patel A. K., Biagas K. V., Clarke E. C., Gerber L. M., Mauer E., Silver G., Chai P., et al. Delirium in children after cardiac bypass surgery. *Pediatr Crit Care Med.* 2017; 18 (2): 165–171. DOI: 10.1097/PCC.0000000000001032. PMID: 27977539.
3. Alvarez R. V., Palmer C., Czaja A. S., Peyton C., Silver, G. Traube C., Mourani P. M., et al. Delirium is a common and early finding in patients in the pediatric cardiac intensive care unit. *J Pediatr.* 2018; 195: 206–212. DOI: 10.1016/j.jpeds.2017.11.064.
4. Köditz H., Drouche A., Dennhardt N., Schmidt M., Schultz M., Schultz B. Depth of anesthesia, temperature, and postoperative delirium in children and adolescents undergoing cardiac surgery. *BMC Anesthesiol.* 2023; 23 (1): 148. DOI: 10.1186/s12871-023-02102-3. PMID: 37131120.
5. Chomat M. R., Said A. S., Mann J. L., Wallendorf M., Bickhaus A., Figueroa M. Changes in sedation practices in association with delirium screening in infants after cardiopulmonary bypass. *Pediatr Cardiol.* 2021; 42 (6): 1334–1340. DOI: 10.1007/s00246-021-02616-y. PMID: 33891134.
6. Dechnik A., Traube C. Delirium in hospitalised children. *Lancet Child Adolesc Health* 2020; 4 (4): 312–321. DOI: 10.1016/s2352-4642 (19)30377-3. PMID: 32087768.
7. Goldberg T. E., Chen C., Wang Y., Jung E., Swanson A., Ing C., Garcia P. S., et al. Association of delirium with long-term cognitive decline. *JAMA Neurol.* 2020; 77 (11): 1373–1381. DOI: 10.1001/jamaneurol.2020.2273. PMID: 32658246.
8. Gunn J. K., Beca J., Hunt R. W., Goldsworthy M., Brizard C. P., Finucane K., Donath S., et al. Perioperative risk factors for impaired neurodevelopment after cardiac surgery in early infancy. *Arch Dis Child.* 2016; 101 (11): 1010–1016. DOI: 10.1136/archdischild-2015-309449. PMID: 27272973.
9. Houben A., Ghamari S., Fischer A., Neumann C., Baehner T., Ellerkmann R. K. Pediatric emergence delirium is linked to increased early postoperative negative behavior within two weeks after adenoidectomy: an observational study. *Braz J Anesthesiol.* 2024; 74 (5): 744114. DOI: 10.1016/j.bjane.2021.03.008. PMID: 33887334.
10. Koch S., Stegherr A.-M., Rupp L., Kruppa J., Prager C., Kramer S., Fahlenkamp A., et al. Emergence delirium in children is not related to intraoperative burst suppression — prospective, observational electrography study. *BMC Anesthesiol.* 2019; 19 (1): 146. DOI: 10.1186/s12871-019-0819-2. PMID: 31395011.
11. Hansen T. G. Anesthesia-related neurotoxicity and the developing animal brain is not a significant problem in children. *Paediatr Anaesth.* 2015; 25 (1): 65–72. DOI: 10.1111/pan.12548. PMID: 25266176.
12. Jevtovic-Todorovic V. General anesthetics and neurotoxicity: how much do we know? *Anesthesiol Clin.* 2016; 34 (3): 439–451. DOI: 10.1016/j.anclin.2016.04.001. PMID: 27521190.
13. Dahmani S., Stany I., Brasher C., Lejeune C., Bruneau B., Wood C., Nivoche Y., et al. Pharmacological prevention of sevoflurane- and desflurane-related emergence agitation in children: a meta-analysis of published studies. *Br J Anaesth.* 2010; 104 (2): 216–223. DOI: 10.1093/bja/aep376. PMID: 20047899.
14. Hogue C. W. Jr., Palin C. A., Arrowsmith J. E. Cardiopulmonary bypass management and neurologic outcomes: an evidence-based appraisal of current practices. *Anesth Analg.* 2006; 103 (1): 21–37. DOI: 10.1213/01.ane.0000220035.82989.79. PMID: 16790619.
15. Hori D., Brown C., Ono M., Rappold T., Sieber F., Gottschalk A., Neufeld K. J., et al. Arterial pressure above the upper cerebral autoregulation limit during cardiopulmonary bypass is associated with postoperative delirium. *Br J Anaesth.* 2014; 113 (6): 1009–1017. DOI: 10.1093/bja/aeu319. PMID: 25256545
16. Hirata Y. Cardiopulmonary bypass for pediatric cardiac surgery. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2018; 66 (2): 65–70. DOI: 10.1007/s11748-017-0870-1. PMID: 29185163.

17. Toomasian C. J., Aiello S. R., Drumright B. L., Major T. C., Bartlett R. H., Toomasian J. M. The effect of air exposure on leukocyte and cytokine activation in an *in-vitro* model of cardiomyotomy suction. *Perfusion*. 2018; 33 (7): 538–545. DOI: 10.1177/0267659118766157. PMID: 29638199.
18. Liu M., Li Y., Gao S., Yan S., Zhang Q., Liu G., Ji B. A novel target to reduce microglial inflammation and neuronal damage after deep hypothermic circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2020; 159 (6): 2431–2444. e7. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2019.06.115. PMID: 31564537.
19. Pozhilenkova E. A., Lopatina O. L., Komleva Y. K., Salmin V. V., Salmirina A. B. Blood-brain barrier-supported neurogenesis in healthy and diseased brain. *Nat Rev Neurosci*. 2017; 28 (4): 397–415. DOI: 10.1515/revneuro-2016-0057. PMID: 28195555.
20. Cerejeira J., Firmiro H., Vaz-Serra A., Mukaetova-Ladinska E. B. The neuroinflammatory hypothesis of delirium. *Acta Neuropathol*. 2010; 119 (6): 737–754. DOI: 10.1007/s00401-010-010-0 674-1. PMID: 20309566.
21. Sun Y., Koyama Y., Shimada S. Inflammation from peripheral organs to the brain: how does systemic inflammation cause neuroinflammation? *Front Aging Neurosci*. 2022; 14: 903455. DOI: 10.3389/fnagi.2022.903455. PMID: 35783147.
22. Linnerbauer M., Wheeler M. A., Quintana F. J. Astrocyte crosstalk in CNS inflammation. *Neuron*. 2020; 108 (4): 608–622. DOI: 10.1016/j.neuron.2020.08.012. PMID: 32898475.
23. Kress B. T., Iliff J. J., Xia M., Wang M., Wei H. S., Zeppenfeld D., Xie L., et al. Impairment of para-vascular clearance pathways in the aging brain. *Ann Neurol*. 2014; 76 (6): 845–861. DOI: 10.1002/ana.24271. PMID: 25204284.
24. Kuo W. T., Odenwald M. A., Turner J. R., Zuo L. Tight junction proteins occludin and ZO-1 as regulators of epithelial proliferation and survival. *Ann NY Acad Sci*. 2022; 1514 (1): 21–33. DOI: 10.1111/nyas.14798. PMID: 35580994.
25. Li Y., Liu B., Zhao T., Quan X., Han Y., Cheng Y., Chen Y., et al. Comparative study of extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells and brain endothelial cells attenuating blood-brain barrier permeability via regulating Caveolin-1-dependent ZO-1 and Claudin-5 endocytosis in acute ischemic stroke. *J Nanobiotechnology*. 2023; 21 (1): 70. DOI: 10.1186/s12951-023-01828-z. PMID: 36855156.
26. Yang Z., Lin P., Chen B., Zhang X., Xiao W., Wu S., Huang C., et al. Autophagy alleviates hypoxia-induced blood-brain barrier injury via regulation of CLDN5 (claudin 5). *Autophagy*. 2021; 17 (10): 3048–3067. DOI: 10.1080/15548627.2020.1851897. PMID: 33280500.
27. Baker R. A., Nikolic A., Onorati F., Alston R. P. 2019 EACTS/EACTA/EBCP guidelines on cardiopulmonary bypass in in adult cardiac surgery: a tool to better clinical practice. *Eur J Cardio-Thorac Surg*. 2020; 57 (2): 207–209. DOI: 10.1093/ejcts/ezz358. PMID: 31942985.
28. Ivkin A., Grigoriev E., Mikhailova A. Impact of intraoperative blood transfusion on cerebral injury in pediatric patients undergoing congenital septal heart defect surgery. *J Clin Med*. 2024; 13 (20): 6050. DOI: 10.3390/jcm13206050. PMID: 39458000.
29. Wittenmeier E., Piekarski F., Steinbicker A. U. Blood product transfusions for children in the perioperative period and for critically ill children. *Dtsch Arztebl Int*. 2024; 121 (2): 58–65. DOI: 10.3238/arztebl.m2023.0243. PMID: 38051160.
30. Ивкин А. А., Григорьев Е. В., Балахнин Д. Г., Чермных И. И. Интраоперационная трансфузия как фактор риска церебрального повреждения после кардиохирургических вмешательств у детей: проспективное наблюдательное исследование. *Вестник интенсивной терапии имени А. И. Салтанова*. 2023; (1): 101–114. Ivkin A. A., Grigoryev E. V., Balakhnin D. G., Chermnykh I. I. Intraoperative transfusion is a risk factor for cerebral injury after cardiac surgery in children: a prospective observational study. *Ann Crit Care = Vestnik Intensivnoy Terapii im AI Saltanova*. 2023; 1: 101–114. (in Russ.). DOI: 10.21320/1818-474X-2023-1-101-114.
31. Malati Z. A., Pourfathollah A. A., Dabbaghi R., Balaghali S., Javan M. R. Evaluation of a new method of leukocyte extractions from the leukoreduction filter. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2023; 39 (3): 478–486. DOI: 10.1007/s12288-022-01618-x. PMID: 37304478.
32. Ивкин А. А., Григорьев Е. В., Хилажева Е. Д., Моргунов А. В. Влияние трансфузии и гипоксии на клетки модели нейроваскулярной единицы *in vitro*. *Общая реаниматология*. 2024; 20 (1): 37–42. Ivkin A. A., Grigoriev E. V., Khilazheva E. D., Morgun A. V. The effect of transfusion and hypoxia on cells in an *in vitro* model of the neurovascular unit. *General Reanimatology = Obshchaya Reanimatologiya*. 2024; 20 (1): 37–42. (in Russ.&Eng.). DOI: 10.15360/1813-9779-2024-1-2350.
33. Ивкин А. А., Григорьев Е. В., Цепоккина А. В., Шукевич Д. Л. Послеоперационный делирий у детей при коррекции врожденных септальных пороков сердца. *Вестник анестезиологии и реаниматологии*. 2021; 18 (2): 62–68. Ivkin A. A., Grigoriev E. V., Tsepokina A. V., Shukevich D. L. Postoperative delirium in children in undergoing treatment of congenital septal heart defects. *Messenger of Anesthesiology and Resuscitation = Vestnik Anesteziologii i Reanimatologii*, 2021; 18 (2): 62–68. (In Russ.). DOI: 10.21292/2078-5658-2021-18-2-62-68.
34. Naguib A. N., Winch P. D., Tobias J. D., Simic J., Hersey D., Nicol K., Preston T., et al. A single-center strategy to minimize blood transfusion in neonates and children undergoing cardiac surgery. *Paediatr Anaesth*. 2015; 25 (5): 477–486. DOI: 10.1111/pan.12604. PMID: 25581204.
35. Борисенко Д. В., Ивкин А. А., Шукевич Д. Л., Корнелюк Р. А. Значение эритроцитсодержащих компонентов донорской крови в объеме первичного заполнения контура искусственного кровообращения в развитии системного воспаления при коррекции врожденных пороков сердца у детей. *Общая реаниматология*. 2022; 18 (3): 30–37. Borisenko D., Ivkin A. A., Shukevich D. L., Kornelyuk R. A. The effect of erythrocyte containing donor blood components in the priming of the cardiopulmonary bypass circuit on the development of systemic inflammation during correction of congenital heart defects in children. *General Reanimatology = Obshchaya Reanimatologiya*. 2022; 18 (3): 30–37. (in Russ.&Eng.). DOI: 10.15360/1813-9779-2022-3-30-37.
36. Siddharthan V., Kim Y. V., Liu S., Kim K. S. Human astrocytes/astrocyte-conditioned medium and shear stress enhance the barrier properties of human brain microvascular endothelial cells. *Brain Res*. 2007; 1147: 39–50. DOI: 10.1016/j.brainres.2007.02.029. PMID: 17368578.
37. Cenini G., Hebisch M., Iefremova V., Flitsch L. J., Breikreuz Y., Tanzi R. E., Kim D. Y., et al. Dissecting Alzheimer's disease pathogenesis in human 2D and 3D models. *Mol Cell Neurosci*. 2021; 110: 103568. DOI: 10.1016/j.mcn.2020.103568. PMID: 33068718.
38. Wang H., Yang H., Shi Y., Xiao Y., Yin Y., Jiang B., Ren H., et al. Reconstituting neurovascular unit with primary neural stem cells and brain microvascular endothelial cells in three-dimensional matrix. *Brain Pathol*. 2021; 31 (5): e12940. DOI: 10.1111/bpa.12940. PMID: 33576166.
39. Sokolova V., Nzou G., Van Der Meer S. B., Ruks T., Heggen M., Loza K., Hagemann N., et al. Ultrasmall gold nanoparticles (2 nm) can penetrate and enter cell nuclei in an *in vitro* 3D brain spheroid model. *Acta Biomater*. 2020; 111: 349–362. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.04.023. PMID: 32413579.
40. Teixeira M. I., Amaral M. H., Costa P. C., Lopes C. M., Lamprou D. A. Recent developments in microfluidic technologies for central nervous system targeted studies. *Pharmaceutics*. 2020; 12 (6): 542. DOI: 10.3390/pharmaceutics12060542. PMID: 32545276.

Поступила 05.12.2024
Принята 09.06.2025