

ДИСФУНКЦИЯ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ С ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫМИ КОГНИТИВНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ ПОСЛЕ АОРТОКОРОНАРНОГО ШУНТИРОВАНИЯ

**Маркелова Е.В.¹, Зенина А.А.^{1,2}, Силаев А.А.², Чагина Е.А.¹,
Федянина Л.Н.²**

¹ ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

² ФГАУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

Резюме. Учитывая значимость послеоперационных когнитивных нарушений, в настоящее время активно ведется поиск биологических маркеров этих неврологических осложнений. Проведен сравнительный анализ NSE, IL-6, TGF- β_1 , MMP9 и TIMP1 в сыворотке крови исследуемых пациентов.

В исследовании участвовали 110 человек после аортокоронарного шунтирования с использованием искусственного кровообращения. Разделение на группы выполнено на основании разницы данных тестирования по Монреальской шкале нейропсихологического обследования до операции и на 7-е сутки после операции. В I группу отнесены пациенты без осложнений с изменениями менее 3 баллов, во II – пациенты с послеоперационными когнитивными осложнениями и отклонением при тестировании более 3 баллов. Также для сравнения использовалась III группа – 35 относительно здоровых человек. Исследование уровня NSE, IL-6, TGF- β_1 , MMP9 и TIMP1 в сыворотке крови проводилось методом твердофазного иммуноферментного анализа (R&D Systems, США). Результаты выражали в пг/мл и нг/мл. Проводилось четыре этапа исследования: до операции, сразу после операции, через 24 часа и на 7-е сутки после операции.

Обнаружен более высокий уровень NSE у пациентов II группы, за исключением на 7-е сутки после операции, где его концентрация выравнивается между группами. Было выявлено более повышенное содержание IL-6 у пациентов II группы во все периоды после операции. Отмечена более низкая концентрация TGF- β_1 во II группе в периоды до операции, через 24 часа и на 7-е сутки после операции. Тогда как в период после операции зарегистрировано его повышение и значение мало отличается от I и III группы. По данным исследования MMP9, значимые различия между I и II группами были выявлены только на 7-е сутки после операции. Однако обращает внимание более низкое содержание этого показателя у пациентов I и II групп до операции по сравнению с III группой. Значения TIMP1 в течении всех периодов исследования плавно повышалось, но существенно не отличались между I и II группами.

Адрес для переписки:

Зенина Александра Александровна
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
690105, Россия, г. Владивосток, ул. Невельского, 1, кв. 208.
Тел.: 8 (914) 707-26-52.
E-mail: Zenina.aa@dyfu.ru

Address for correspondence:

Zenina Alexandra A.
Pacific State Medical University
690105, Russian Federation, Vladivostok,
Nevelsky str., 1, apt 208.
Phone: 7 (914) 707-26-52.
E-mail: Zenina.aa@dyfu.ru

Образец цитирования:

Е.В. Маркелова, А.А. Зенина, А.А. Силаев, Е.А. Чагина,
Л.Н. Федянина «Дисфункция врожденного иммунитета
у пациентов с послеоперационными когнитивными
нарушениями после аортокоронарного шунтирования»
// Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24,
№ 4. С. 507-512. doi: 10.46235/1028-7221-1043-CID
© Маркелова Е.В. и соавт., 2021

For citation:

E.V. Markelova, A.A. Zenina, A.A. Silaev, E.A. Chagina,
L.N. Fedyanina "Congenital immunity dysfunction in patients
with postoperative cognitive impairment after coronary artery
bypass grafting", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 4, pp. 507-512.
doi: 10.46235/1028-7221-1043-CID
DOI: 10.46235/1028-7221-1043-CID

У пациентов II группы установлено увеличение NSE и IL-6, низкий уровень TGF- β_1 и снижение соотношения MMP9/TIMP1 в раннем послеоперационном периоде, что свидетельствует о вовлеченности дисфункции врожденного иммунитета в патогенез ПОКД.

Ключевые слова: нейровоспаление, NSE, MMP9, TIMP1, АКШ, когнитивная дисфункция

CONGENITAL IMMUNITY DYSFUNCTION IN PATIENTS WITH POSTOPERATIVE COGNITIVE IMPAIRMENT AFTER CORONARY ARTERY BYPASS GRAFTING

Markelova E.V.^a, Zenina A.A.^{a, b}, Silaev A.A.^b, Chagina E.A.^a, Fedyanina L.N.^b

^a Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

^b Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. With regard to post-surgical cognitive disturbances, an active search for biological markers of these neurological complications is performed. We have studied the contents of NSE, IL-6, TGF- β_1 , MMP9 and TIMP1 in blood serum of these patients. The study included 110 patients after aortal-coronary bypass surgery using extracorporeal blood circulation. Splitting into separate groups was based on the test scores, according to Montreal Cognitive Assessment Scale prior to surgery and on day +7 after the intervention: (I) patients without complications (< 3 points); (II) patients with post-surgical cognitive impairment (> 3 points). The comparison group (III) included 35 healthy subjects. Evaluation of NSE, IL-6, TGF- β_1 , MMP9 and TIMP1 in blood serum was performed by means of ELISA technique (R&D Systems, USA). The data were expressed as pg/ml, or ng/ml. Blood sampling was made at 4 terms: before surgery, just after intervention, 24 h later, and on day 7 after the surgery.

The patients from group II showed higher NSE levels, except of 7 days after surgery when it became similar to other groups. Increased IL-6 levels were found in the patients from group II at all terms after surgery. Decreased concentration of TGF- β_1 was found in the II group prior to operation, 24 h and 7 days after the surgery. However, just after surgery, this index was increased, and its values barely differed from results of groups I and III. Studies of MMP9 showed significant differences between groups I and II only on day +7 after. However, lower MMP9 content was detected in the patients from I and II groups before surgery compared to group III. TIMP1 values showed gradual increase over the observation period, but did not differ between groups I and II. In the patients from group II, an increased content of NSE and IL-6 was revealed, along with low TGF- β_1 levels and decreased MMP9/TIMP1 ratio over early postsurgical period, thus suggesting possible role of innate immunity dysfunction in pathogenesis of postsurgical cognitive impairment.

Keywords: neuroinflammation, NSE, MMP9, TIMP1, cognitive dysfunction

Введение

С совершенствованием медицинских методик анестезии и операций клинические жалобы побуждали к изучению когнитивных изменений после хирургического вмешательства [4]. Развитие реабилитационной медицины предъявляет все более высокие требования к точной диагностике и системе безопасного лечения послеоперационной когнитивной дисфункции (ПОКД). Хотя исследования этого осложнения идут полным ходом, лежащий в основе патогенез все еще остается неубедительным из-за противоречивых резуль-

татов и данных. Исследователи выдвинули различные гипотезы, чтобы объяснить механизмы ПОКД, включая нейровоспаление, окислительный стресс, расстройство аутофагии, нарушение синаптической функции, отсутствие нейротрофической поддержки и т.д. [6]. Учитывая значимость послеоперационных когнитивных нарушений в настоящее время активно ведется поиск биологических маркеров этих неврологических осложнений. В нашем исследовании проведен сравнительный анализ нейрон-специфической енолазы (NSE), цитокинов (IL-6, TGF- β_1), систем металлопротеиназ (MMP9 и TIMP1) в сыво-

ротке крови пациентов с ПОКД и без нее после операции.

Материалы и методы

В исследовании участвовали 110 человек, которым было выполнено аортокоронарное шунтирование с использованием искусственного кровообращения. Разделение на группы выполнено на основании разницы данных тестирования по Монреальской шкале нейропсихологического обследования до операции и на 7-е сутки после операции. В I группу отнесены пациенты без осложнений с изменениями менее 3 баллов, во II – пациенты с послеоперационными когнитивными осложнениями и отклонением при тестировании более 3 баллов. Также для сравнения использовалась III группа – это 35 относительно здоровых человек.

Уровень NSE, IL-6, TGF- β_1 , MMP9 и TIMP1 в сыворотке крови определялся методом твердофазного иммуноферментного анализа (R&D Systems, США). Результаты выражали в пг/мл и нг/мл. Проводилось четыре этапа исследования: до операции, сразу после операции, через 24 часа и 7-е сутки после операции. Статистический анализ осуществлен с помощью непараметрических критериев. Результаты представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей. Сравнение средних значений в выборках осуществляли с помощью критерия Уилкоксона–Манна–Уитни. $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

Результаты и обсуждение

Значения NSE до операции во II группе 5,41 (4,3-6,05) нг/мл было выше, чем в I 4,19 (2,67-5,15) нг/мл ($p_{I \text{ и } II} = 0,046$) и III группах 4,0 (2,3-4,6) нг/мл ($p_{II \text{ и } III} = 0,045$). В дальнейшем после АКШ его концентрация существенно возрастала в исследуемых группах ($p < 0,05$). Однако во II группе она была выше 6,25 (5,76-6,84) нг/мл, чем в I группе 5,61 (4,64-6,16) нг/мл ($p_{I \text{ и } II} = 0,047$). Через 24 часа после операции концентрация этого нейропептида снижалась в обеих основных группах ($p < 0,05$), но его уровень был значимо выше во II группе 5,25 (4,28-5,97) нг/мл, чем в I группе 4,01 (3,44-4,7) нг/мл ($p_{I \text{ и } II} = 0,044$). На 7-е сутки после операции содержание NSE продолжало снижаться. При этом в I группе его концентрация 4,55 (3,65-5,28) нг/мл была примерно сопоставима с II группой – 4,52 (2,95-6,28) нг/мл, $p_{I \text{ и } II} = 0,054$.

Данные мониторинга содержания цитокинов, MMP9 и TIMP1 в сыворотке крови представлены в таблице 1.

Уровень интерлейкина 6 до операции значимо не отличался между I и II группой, а также группой контроля (1,22 (1,13-1,51) пг/мл). В пе-

риод после операции отмечался выраженный рост этого цитокина в обеих группах ($p < 0,01$), но его содержание было значимо выше во II, чем в I ($p_{I \text{ и } II} = 0,037$). Через 24 часа после операции определено снижение этого показателя в обеих группах ($p < 0,01$), но его уровень оставался выше во второй группе ($p_{I \text{ и } II} = 0,048$). На 7-е сутки после операции продолжалось снижение уровня IL-6 в 2 группах $p_1 = 0,042$, $p_2 = 0,04$, $p_{I \text{ и } II} = 0,048$. Однако значения IL-6 оставались все же выше группы контроля.

Концентрация TGF- β_1 в I и III группах (28,7 (21,3-37,16) нг/мл) существенно не отличалась. Однако при сравнении со II группа разница оказалась очевидна $p_{I \text{ и } II} = 0,041$ и $p_{II \text{ и } III} = 0,048$. В период после операции TGF- β_1 не существенно снижался в I группе, однако во II группе его уровень увеличивался ($p_{II} = 0,049$) и достиг дооперационных значений в I группе. Через 24 часа после операции установлено снижение содержания этого цитокина в обеих группах, но достоверное снижение зарегистрировано только во II группе $p_{II} = 0,049$. На 7-е сутки после операции выявлено выраженное повышение в I ($p_1 = 0,046$) и II ($p_{II} = 0,048$) группах с достоверным различием между ними $p_{I \text{ и } II} = 0,048$.

По данным исследования металлопротеиназы 9 значимые различия между I и II группами были выявлены только на 7-е сутки после операции $p_{I \text{ и } II} = 0,048$. Однако обращает внимание более низкое содержание этого показателя у пациентов этих групп до операции по сравнению с группой контроля 251,1 (216,56-325,75) нг/мл ($p_{I \text{ и } III} = 0,041$ и $p_{I \text{ и } II} = 0,042$). В период после операции отмечено повышение в обеих группах ($p_1 = 0,040$ и $p_{II} = 0,039$), что сравнивало их значения с группой контроля. В остальные периоды наблюдения значимое повышение MMP9 наблюдалось только в сравнении с периодом до операции.

Значения TIMP1 в течении всех периодов исследования существенно не отличались между I и II группами. Однако его уровень до операции был значимо выше группы контроля 216,67 (202,45-224,6) нг/мл, $p_{I \text{ и } III} = 0,049$ и $p_{II \text{ и } III} = 0,047$. В дальнейшем происходит плавное повышение TIMP1, которое достигло достоверных различий с дооперационным уровнем через 24 часа после операции $p_1 = 0,049$ и $p_{II} = 0,048$ и на 7-е сутки после операции $p_1 = 0,045$ и $p_{II} = 0,043$.

Также нами выполнен расчет коэффициента MMP9/TIMP1. Данные представлены в таблице 2.

После АКШ развиваются нейровоспаление и нейрогуморальные изменения, которые приводят к выраженной активации глии и повреждению гематоэнцефалического барьера. Это способствует появлению в крови нейроспецифических

ТАБЛИЦА 1. ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ, MMP9 И TIMP1

TABLE 1. DYNAMICS OF THE CONTENT OF CYTOKINES, MMP9 AND TIMP1

Показатели, единицы измерения Indicators, units	Группа Group	До операции Before surgery	После операции After operation	24 часа после операции 24 hours after surgery	7-е сутки после операции 7 th day after surgery
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	I	1,2 (1,08-1,56)	40,77 (20,98-78,52)*	5,84 (2,76-11,15)**	2,3 (1,36-4,56)***
		$p_{I,II} > 0,05$	$p_{I,II} = 0,037$	$p_{I,II} = 0,048$	$p_{I,II} = 0,049$
	II	1,34 (1,09-1,58)	58,47 (30,07-106,64)*	8,1 (6,17-15,72)**	3,75 (2,37-9,23)***
TGF- β_1 , нг/мл TGF- β_1 , ng/ml	I	32,54 (26,38-37,37)	31,09 (18,14-37,65)	28,74 (11,91-37,26)	38,48 (24,87-48,09)***
		$p_{I,II} = 0,041$	$p_{I,II} > 0,05$	$p_{I,II} > 0,05$	$p_{I,II} = 0,048$
	II	21,25 (15,55-28,14)	29,03 (22,17-37,17)*	24,17 (13,5-33,8)**	33,71 (20,85-43,55)***
MMP9, нг/мл MMP9, ng/ml	I	147,88 (61,48-245,22)	248,08 (188,03-302,52)*	267,17 (187,99-338,40)	305,3 (210,06-372,61)
		$p_{I,II} > 0,05$	$p_{I,II} > 0,05$	$p_{I,II} > 0,05$	$p_{I,II} = 0,049$
	II	137,52 (78,52-223,05)	239,7 (203,53-305,43)*	247,83 (177,43-322,52)	279,4 (193,28-334,19)
TIMP1, нг/мл TIMP1, ng/ml	I	240,21 (210,18-270,35)	256,29 (219,56-279,39)	278,35 (254,69-304,81)	295,33 (272,15-333,53)***
		$p_{I,II} > 0,05$	$p_{I,II} > 0,05$	$p_{I,II} > 0,05$	$p_{I,II} > 0,05$
	II	253,83 (220,15-262,19)	254,65 (231,02-290,24)	283,22 (258,85-325,15)	296,19 (280,28-334,19)

Примечание. Статистическая достоверность различий $p < 0,05$ в динамике в группах: * – до операции и после операции, ** – после операции и через 24 часа после операции, *** – через 24 часа после операции и на 7-е сутки после операции.

Note. The statistical significance of the differences $p < 0.05$ in the dynamics in the groups: *, before and after surgery; **, after surgery and 24 hours after surgery; ***, 24 hours after surgery and on the 7th day after surgery.

ТАБЛИЦА 2. РАСЧЕТ КОЭФФИЦИЕНТА MMP9/TIMP1

TABLE 2. CALCULATION OF THE COEFFICIENT MMP9/TIMP1

MMP9/TIMP1	I группа Group I	II группа Group II	III группа Group III
До операции Before surgery	0,65 (0,29-1,02)	0,58 (0,36-0,80)	1,25 (0,99-1,46)
После операции After operation	0,93 (0,78-1,45)	0,93 (0,81-1,31)	
Через 24 часа после операции 24 hours after surgery	0,89 (0,63-1,12)	0,91 (0,60-1,03)	
7-е сутки после операции 7 th day after surgery	0,96 (0,72-1,18)	0,84 (0,66-0,97)	

белков, в частности NSE [9]. Этим обусловлено значительное повышение в сыворотке крови этого белка у пациентов с ПОКД после АКШ.

IL-6 играет решающую роль в патогенезе воспалительных заболеваний и в физиологическом гомеостазе нервной ткани. Глубокие нейрпатологические изменения, такие как рассеянный склероз, болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера, связаны с повышенной экспрессией IL-6 [8]. В нашем исследовании у пациентов с послеоперационными когнитивными нарушениями так же зарегистрировано выраженное повышение этого интерлейкина в периоды после операции, что связано с выраженным избыточным провоспалительным ответом.

Согласно современным литературным данным, известно, что TGF- β оказывает нейропротекторную и нейротрофическую функцию в мозге, активно участвуя в противовоспалительном пути нейровоспаления [1]. В нашей работе установлены более низкие значения TGF- β_1 до операции и на 7-е сутки после операции у обследуемых II группы, что свидетельствует о снижении противовоспалительной реакции у этой категории пациентов и способности мозга к восстановлению.

Показано, что при повреждении головного мозга происходит активация MMP9, что приводит к нарушению функции гематоэнцефалического барьера [7]. Так, некоторые исследования, например при черепно-мозговой травме, указывают на увеличение этого показателя через 72 часа и выявляют корреляцию повышенного уровня MMP9 с летальностью [2]. Однако исследователи все же затрудняются определиться в ее роли в нейровоспалении как нейропротектора или повреждающего агента [5]. Аналогичные противоречивые сведения выявлены в публикациях и

по поводу TIMP1 [3]. В нашем исследовании до операции определено более низкое содержание MMP9 и повышение TIMP1 в сыворотке крови по сравнению с группой контроля. Это, возможно, связано с наличием у пациентов, планируемых на АКШ, сопутствующих церебро-васкулярных нарушений, или же вовлеченностью их в патогенез ишемической болезни сердца. Однако в дальнейшем происходит увеличение MMP9, но к 7-м суткам отмечен дефицит этого показателя у пациентов с когнитивными нарушениями. Одновременно происходит увеличение TIMP1, но его значение существенно не отличается между группами. Однако следует отметить, о нарушении соотношения MMP9 и TIMP1, которое ниже у пациентов II группы. Складывается впечатление, что недостаток MMP9 или нарушение соотношения между MMP9 и TIMP1 способствуют развитию ПОКД. Это, вероятно, связано с недостатком провоспалительной реакции или, напротив, с избытком противовоспалительной реакции у пациентов с ПОКД. Сложно точно определить, какой из этих двух показателей играет провоспалительную, а какой противовоспалительную роль. На наш взгляд, вполне возможно, что MMP9 проявляет нейропротективные свойства, а TIMP1 выступает в роли повреждающего фактора. Однако все это требует дальнейших исследований.

Заключение

У пациентов с ПОКД установлено увеличение нейрпептида NSE и IL-6, низкий уровень TGF- β_1 и снижение соотношения MMP9/TIMP1 в раннем послеоперационном периоде, что свидетельствует о вовлеченности в дисфункцию врожденного иммунитета в патогенез ПОКД.

Список литературы / References

1. Левин С.Г., Годухин О.В. Модулирующее действие цитокинов на механизмы синаптической пластичности в мозге // Биохимия, 2017. Т. 82, № 3. С. 397-409. [Levin S.G., Godukhin O.V. The modulating effect of cytokines on the mechanisms of synaptic plasticity in the brain. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2017, Vol. 82, no. 3, pp. 397-409. (In Russ.)]
2. Bogoslovsky T., Gill J., Jeromin A., Davis C., Diaz-Arrastia R. Fluid biomarkers of traumatic brain injury and intended context of use. *Diagnostics (Basel)*, 2016, Vol. 6, no. 4, 37. doi: 10.3390/diagnostics6040037.
3. Casault C., Al Sultan A.S., Banoei M., Couillard P., Kramer A., Winston B.W. Cytokine responses in severe traumatic brain injury: where there is smoke, is there fire? *Neurocrit. Care*, 2019, Vol. 30, no. 1, pp. 22-32.
4. Evered L., Silbert B., Knopman D.S., Scott D.A., DeKosky S.T., Rasmussen L.S., Oh E.S., Crosby G., Berger M., Eckenhoff R.G. The Nomenclature Consensus Working Group Recommendations for the nomenclature of cognitive change associated with anaesthesia and surgery. *Br. J. Anaesth.*, 2018, Vol. 121, no. 5, pp. 1005-1012.
5. Jassam Y.N., Izzy S., Whalen M., McGavern D.B., El Khoury J. Neuroimmunology of traumatic brain injury: time for a paradigm shift. *Neuron*, 2017. Vol. 95, no. 6, pp. 1246-1265.

6. Lin X., Chen Y., Zhang P., Chen G., Zhou Y., Yu X. The potential mechanism of postoperative cognitive dysfunction in older people. *Exp. Gerontol.*, 2020, Vol. 130, 110791. doi: 10.1016/j.exger.2019.110791.
7. Rempe R.G., Hartz A.M., Bauer B. Matrix metalloproteinases in the brain and blood–brain barrier: versatile breakers and makers. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 2016, Vol. 36, no. 9, pp. 1481-1507.
8. Rothaug M., Becker-Pauly C., Rose-John S. The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, Vol. 1863, no. 6, Pt A, pp. 1218-1227.
9. Silva F.P., Schmidt A.P., Valentin L.S., Pinto K.O., Zeferino S.P., Osés J.P. S100B protein and neuron-specific enolase as predictors of cognitive dysfunction after coronary artery bypass graft surgery. *Eur. J. Anaesthesiol.*, 2016, Vol. 33, pp. 681-689.

Авторы:

Маркелова Е.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Зенина А.А. — аспирант кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; врач анестезиолог-реаниматолог ФГАУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

Силаев А.А. — к.м.н., заведующий отделением анестезиологии, реанимации и интенсивной терапии ФГАУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

Чагина Е.А. — к.м.н., доцент кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Федянина Л.Н. — д.м.н., профессор, профессор департамента фундаментальной медицины Школы биомедицины ФГАУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

Authors:

Markelova E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Normal and Pathological Physiology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Zenina A.A., Postgraduate Student, Department of Normal and Pathological Physiology, Pacific State Medical University; Anesthesiologist-Resuscitator, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Silaev A.A., PhD (Medicine), Head, ICU Department, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Chagina E.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Normal and Pathological Physiology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Fedyanina L.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Fundamental Medicine, School of Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Поступила 08.07.2021
Принята к печати 20.08.2021

Received 08.07.2021
Accepted 20.08.2021