

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЛПС-СТИМУЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК МИКРОГЛИИ ПРИ ДЕЙСТВИИ ОРЕКСИНА А

Сынчикова А.П., Корнева Е.А.

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Интерес к исследованию функции орексин-содержащих нейронов обусловлен сравнительно недавним их открытием и перспективой применения орексинов для лечения заболеваний различной природы.

Изучение их участия в регуляции клеток микроглии имеет небольшую историю и представляет особый интерес, поскольку возможность воздействия на функциональную активность клеток иммунной системы мозга имеет первостепенное значение для терапии различных форм патологии ЦНС.

Перспективные пути поиска и результаты исследования терапевтических эффектов орексинов при воспалительных, аутоиммунных заболеваниях и опухолях.

Существуют литературные данные, демонстрирующие, что орексины могут оказывать терапевтические эффекты при различных формах патологии, вызванных нарушением нейроиммунных взаимодействий. Доказано участие этой нейромедиаторной системы в патогенезе развития нарколепсии, ожирения, рассеянного склероза, болезни Альцгеймера, заболеваний кишечника, септического шока и рака, что обусловлено участием орексинов в регуляции функций различных компонентов иммунной систем, в том числе и клеток микроглии. Хотя характер этого участия не полностью ясен, полученные в последние годы экспериментальные данные являются основой для понимания механизмов действия орексинов на функциональную активность клеток иммунной системы мозга.

Комплекс проведенных ранее исследований позволил установить эффекты действия орексина на морфофункциональные особенности микроглиоцитов при активации ЛПС, что представляется перспективным для разработки новых подходов к терапии инфекционных, воспалительных, нейродегенеративных и аутоиммунных процессов, происходящих в центральной нервной системе. Целью данного исследования является определение эффектов действия нейромедиатора орексина А на функциональные особенности клеток микроглии, активированных ЛПС (фенотип М1), показателями которой являются изменения площади их тела и длины отростков, а также плотность распределения этих клеток.

Исследовано изменение количества клеток микроглии после интраперитонеального введения липополисахарида. Показано, что результате воздействия ЛПС происходит возрастание степени активации этих клеток: происходит увеличение количества микроглиальных клеток в соматосенсорной зоне коры головного мозга.

Комплекс проведенных исследований позволил показать, что интрацеребровентрикулярное введение орексина-А животным после предварительной инъекции ЛПС не вызывает изменений процессов, инициированных ЛПС, анализ не позволил выявить изменений длины отростков микроглиальных клеток, локализованных в соматосенсорной, моторной зонах коры и полосатого тела. В будущем будет произведен дальнейший анализ других показателей активации клеток микроглии.

Ключевые слова: клетки микроглии, орексин А, ЛПС

Адрес для переписки:

Сынчикова Анна Павловна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197022, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (921) 941-02-06.
E-mail: 9410206@gmail.com

Address for correspondence:

Synchikova Anna P.
Research Institute of Experimental Medicine
197022, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (921) 941-02-06.
E-mail: 9410206@gmail.com

Образец цитирования:

А.П. Сынчикова, Е.А. Корнева «Морфофункциональные характеристики ЛПС-стимулированных клеток микроглии при действии орексина А» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 3. С. 333-338. doi: 10.46235/1028-7221-1144-MAF

© Сынчикова А.П., Корнева Е.А., 2022

For citation:

A.P. Synchikova, E.A. Korneva "Morphological and functional characteristics of LPS-stimulated microglial cells under the action of orexin A", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 3, pp. 333-338. doi: 10.46235/1028-7221-1144-MAF

DOI: 10.46235/1028-7221-1144-MAF

MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF LPS-STIMULATED MICROGLIAL CELLS UNDER THE ACTION OF OREXIN A

Synchikova A.P., Korneva E.A.

Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Interest to the orexin-containing neurons is caused by their recent discovery and perspectives of their usage for treatment of different diseases. The studies in this area were launched recently and are of special interest since the opportunity of modulating functional activity of the brain immune system is of pivotal significance for therapy of various central nervous system (CNS) disorders providing novel ways of search and promising data on therapeutic effects of orexins in inflammatory, autoimmune diseases as well as malignant tumors.

Some data from literature show that orexins may exert therapeutic effects in different disorders caused by altered neuroimmune interactions. Participation of this neuromediator system is shown in pathogenesis of narcolepsia, obesity, multiple sclerosis, Alzheimer disease, intestinal disorders, septic shock and cancer, due to involvement of orexins in functional regulation of various components of immune system, e.g., microglial cell populations. Despite only scarce data on these effects, some experimental results obtained over last years, add to our understanding of orexin effects upon functional activity of the brain immune system.

A number of previous studies allowed to assess the orexin effects on morpho-functional features of microglial cells activated by lipopolysaccharide (LPS), thus presenting a prospective for development of novel approaches to therapy of infectious, inflammatory, neurodegenerative and autoimmune disorders affecting CNS. In the present study, we aimed for detecting the effects of neuromediator orexin A upon functional traits of microglial cells activated by LPS (M1 phenotype) as evaluated by changes of their size and length of their processes, as well as density of cell distribution.

We have studied the changes of microglia cell numbers following intraperitoneal LPS injection. It was shown that, the LPS causes higher activation degree of these cells, i.e., the contents of microglial cells becomes increased in somatosensory area of the brain cortex. A series of these studies allowed us to demonstrate that intracerebroventricular injection of orexin A in animals following LPS injection does not cause detectable changes of the processes initiated by LPS. The comparative analysis did not detect any changes in length of microglial processes localized in somatosensory or motor cortical areas, and corpus striatum. Other parameters of the microglial cell activation will be studied in future.

Keywords: microglia, orexin A, LPS

Это исследование было поддержано Японо-российским центром молодежных обменов (JREX, Токио, Япония) и выполнялось в лаборатории Гомеостатических разработок Национального Института физиологических наук, Окадзаки, Япония, под руководством профессора Ю. Набекура.

Введение

Клетки микроглии выполняют защитную функцию и по существу представляют собой иммунциты, резидентно присутствующие в центральной нервной системе [5]. При развитии аутоиммунных заболеваний клетки микроглии выполняют функцию макрофагов, которые активируются при развитии патологических процессов в мозге, приобретают амебоидную форму, повышается экспрессия рецепторов комплемента и молекул основного комплекса гистосовместимости, а также Toll-подобных рецепторов на их мембране [13].

Активированные клетки микроглии синтезируют ряд растворимых факторов, большинство из которых – цитотоксические. При их активации увеличивается экспрессия молекул основного комплекса гистосовместимости (МНС) и костимулирующих молекул, таких как В7 и CD40, что позволяет эффективно презентировать антигены Т-клеткам. Нейротрофины и противовоспалительные цитокины подавляют экспрессию этих молекул, что указывает на наличие регуляторных сигналов, модулирующих функции микроглии [15]. При развитии аутоиммунных заболеваний центральной нервной системы повышение экспрессии МНС, костимулирующих молекул и последующая презентация антигена клетками микроглии приводит к активации Т-клеток, распознающих антигены в центральной нервной системе, что может обусловить повреждение нейронов.

Клетки микроглии, как и макрофаги крови, активируются при повреждении головного мозга и развитии инфекционного процесса, мигрируют в пораженный участок. Повреждение нейронов

ведет к трансформации клеток микроглии в мигрирующие макрофаги округлой формы, которые продуцируют цитокины и трофические факторы, оказывающие повреждающее или защитное действие на клетки мозга [8].

Клетки микроглии активируются даже при небольших изменениях антигенного состава микроокружения и при помощи отростков отслеживают поврежденные клетки, апоптотические тельца, нейрофибрилярные клубки, а, например, при болезни Альцгеймера – фрагменты ДНК или бляшки [3].

В процессе развития мозга микроглиальные клетки играют основную роль в регуляции количества клеток-предшественников нейронов и удаляют умершие нейроны [14]. Эти клетки принимают участие в перестройке синаптических связей, ремоделируя и вызывая деструкцию ненужных синапсов [10].

Помимо поглощения и разрушения чужеродных веществ с помощью фагоцитоза, микроглиоциты оказывают цитотоксическое действие и, выделяя оксид азота и перекись водорода, активируют процесс повреждения клеток и гибели нейронов [4], а также продукцию эксайтотоксичных веществ, таких как глутамат.

И хотя клетки микроглии являются важнейшим компонентом иммунной системы мозга, их избыточная активация может оказывать нежелательные цитотоксические эффекты и приводить к развитию нейродегенеративных заболеваний [2]. Кроме того, затянувшийся воспалительный процесс в структурах мозга с участием микроглиоцитов может заканчиваться разрушением нейронов и развитием аутоиммунных реакций [12]. В связи с этим актуальным является поиск возможных регуляторных молекул эндогенного происхождения, которые оказывают противовоспалительное действие и коррегируют избыточную активность клеток микроглии. Одной из таких регуляторных молекул является орексин А.

Орексины – сравнительно недавно открытые нейропептиды, вырабатываемые небольшой популяцией гипоталамических нейронов, аксоны которых проецируются в различные структуры головного и спинного мозга [11]. Локализация орексинпродуцирующих нейронов, обилие их отростков и распределение рецепторов объясняют широкий спектр физиологических реакций, которые регулируются этой системой.

Спектр вегетативных функций, в регуляции которых участвуют орексин-содержащие нейроны, действительно разнообразен. Наиболее изученными в настоящее время является участие орексинов в поддержании цикла сон/бодрствование [6]. Система орексин-содержащих нейронов участвует в механизмах реализации нейроиммунного взаимодействия, в том числе в ответе ЦНС на антигенный стимул. Активация нейронов, содержащих орексин, показана после инъекции ли-

пополисахарида (ЛПС) у различных животных. Предполагается, что нейроны, синтезирующие орексины, участвуют в комплексе антиген-индуцированных реакций, опосредующих развитие продромального периода заболеваний [7].

Дисфункция этой системы констатирована при различных формах патологии, связанных с нейродегенеративными и аутоиммунными процессами. Нарушение функции орексинэргической системы показано при нарколепсии [9]. Вопрос участия орексин-содержащих нейронов в патогенезе рассеянного склероза (РС) активно изучается.

Известно, что орексин А оказывает терапевтическое действие на течение аутоиммунного энцефаломиелита, ограничивая инфильтрацию патогенными CD4⁺Т-лимфоцитами, снижая уровень хемокинов (MCP-1/CCL2 и IP-10/CXCL10) и цитокинов (IFN γ (Th1), IL-17 (Th17), TNF α , IL-10 и TGF- β) в центральной нервной системе [1].

Введение орексинов снижает повреждение головного мозга при очаговой ишемии у мышей, что связано со снижением экспрессии IL-6 и TNF α . Кроме того, подкожное введение орексина А увеличивает выживаемость мышей с индуцированным введением липополисахарида эндотоксическим шоком, снижая уровень провоспалительных цитокинов и хемокинов.

Целью данного исследования является определение возможного участия орексинов в регуляции функций микроглиоцитов.

Орексины, активируя основные аминергические нейромедиаторные системы, являются нейромедиаторами и обладают выраженным противовоспалительным эффектом. Однако механизмы реализации этих эффектов не ясны, как и эффекты их действия на клетки иммунной системы мозга.

Изучено действие липополисахарида на фенотипические особенности клеток микроглии в динамике. Как известно, длина филоподий микроглиальных клеток изменяется при ее активации и переходе в фенотип M1 [12]. В покое клетки микроглии имеют разветвленную форму с более длинными отростками, а при активации приобретают амёбовидную форму и отростки укорачиваются.

Проведен анализ эффектов действия орексина А на морфофункциональные особенности клеток микроглии в активированном состоянии и степени экспрессии рецепторов к орексину OXR1 на мембранах их клеток.

Комплекс проведенных исследований позволил установить эффекты действия орексина на морфофункциональные особенности микроглиоцитов, что представляется перспективным для разработки новых подходов к терапии инфекционных, воспалительных, нейродегенеративных и аутоиммунных процессов, происходящих в центральной нервной системе.

Материалы и методы

Экспериментальные животные

Эксперименты проводили в соответствии с рекомендациями Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных Японии и их протоколы одобрены этическим комитетом по уходу и использованию животных. В исследовании использовали мышей-самцов, чтобы избежать возможных изменений во время смены фаз цикла. Животным был предоставлен свободный доступ к пище и воде, они содержались в условиях 12-часового цикла день/ночь.

Экспериментальные животные (refer: Akiyoshi 2018 eNeuro), мыши дикого типа (с57BL6, самцы в возрасте 2 месяцев (n = 9)) перед стереотаксической инъекцией получили анестезию кетамин (74 мг/кг, внутривенно) и изофлуоран (ингаляционно).

Стереотаксические инъекции

Мышь помещали в стереотаксический прибор и надежно фиксировали голову. Затем череп обнажали и очищали. Точки лямбда и брегма на черепе находились на одинаковой высоте. Устанавливали кончик иглы на точку брегмы, фиксировали ее координаты, вычисляли координаты, необходимые для инъекции.

Животным вводили интрацеребровентрикулярно во второй желудочек раствор орексина А — 1 мкл в концентрации 0,3 мМ (Sigma-Aldrich, США). Скорость автоматической системы подачи составила не более 0,5 мкл/мин. Контрольным животным вводили 1 мкл физиологического раствора NaCl. Затем иглу извлекали, разрез зашивали и дезинфицировали.

Животных перемещали в клетку, обеспечив им легкий доступ к пище и воде на время восстановления после процедуры.

Антигенное воздействие

Спустя час после введения орексина А, животным обеих групп вводили внутривенно липополисахарид (ЛПС) в дозе 2 мг/кг веса (LPS, Funakoshi chemical, Токио, Япония). Спустя семь часов после начала эксперимента проводили интракардиальную перфузию с помощью перистальтического насоса с последующим извлечением и фиксацией мозга для иммуногистохимического анализа.

Для оценки влияния ЛПС на морфофункциональную активность микроглиальных клеток мышам внутривенно вводили ЛПС в дозе 2 мг/кг (n = 6) или физиологический раствор в том же объеме 0,1 мл (n = 3). Через 7 или 24 часа после начала эксперимента проводили перфузию, извлекали мозг для дальнейшей фиксации и иммуногистохимического анализа.

Подготовка срезов мозга

Фиксацию ткани мозга осуществляли при помощи интракардиальной перфузии, которую проводили с использованием перистальтического насоса малой мощности. В качестве промывочного буфера использовали фосфатно-солевой буфер (PBS), в качестве фиксирующего раствора — 4%-ный раствор параформальдегида (PFA). Извлекали мозг и помещали его в 4%-ный раствор параформальдегида для дальнейшей фиксации. Замороженные срезы мозга готовили с помощью вибротома (Leica Microsystem, Германия). Толщина фронтальных срезов составила 50 мкм. После нарезки срезы помещали на хранение в 1,5% раствор параформальдегида.

Имуногистохимическое окрашивание

Для отмывки от параформальдегида инкубировали срезы при комнатной температуре в течение 20 минут в растворе Cl 100 mM в фосфатно-солевом буфере (pH = 7,4). Далее осуществляли пермеабиллизацию фиксированной ткани, применяя 0,1% (вес/объем) Triton X-100 в фосфатно-солевом буфере при комнатной температуре в течение 15 минут, а затем в блокирующем буфере при комнатной температуре в течение 6 часов. Отмывали срезы в PBS 3 раза по 5 минут и помещали в блокирующий буфер (5% BSA в PBS) на 6 часов при комнатной температуре. Затем повторяли отмывку в фосфатно-солевом буфере 3 раза по 5 минут и помещали срезы в буфер (2,5% BSA в фосфатно-солевом буфере, 0,2% Tween 20), содержащий первичные моноклональные кроличьи антитела к Iba1 (в разведении 1:500, Вако, Осака, Япония), и оставляли на ночь на шейкере при +4 °C. Затем удаляли раствор с антителами и промывали в PBS, 4 раза по 30 минут для удаления несвязанных первичных антител. Инкубировали срезы с вторичными флуоресцентно-мечеными антителами Alexa Flour 488, или Alexa Fluor 594 (Abcam, United Kingdom) (1/2000) и, в зависимости от целей эксперимента, в блокирующем буфере в шейкере на низкой скорости в течение ночи при комнатной температуре или при 4 °C. Удаляли раствор с антителами и промывали в PBS 4 раза по 30 минут для удаления несвязанных вторичных антител. Далее срезы монтировали на стекла при помощи специального клея для срезов MountClue Glass.

Ядра клеток окрашивали флуоресцентным красителем VEC H-1200 с DAPI. Анализ клеток микроглии в ткани головного мозга проводили на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Nikon Eclipse TI (Токио, Япония).

Анализировали коронарные срезы мозга в области соматомоторной и соматосенсорной коры на уровнях 33-35 по атласу (Allen Brain Atlas). Обработку полученных фотографий проводили с помощью программы ImageJ с использованием плагина Simple Neurite Tracer и Multi-point.

Результаты и обсуждение

Реакции клеток микроглии на внутрижелудочковое введение орексина А у мышей

Проанализированы размеры микроглиоцитов, локализованных в соматосенсорной и моторной зонах коры и полосатого тела, а также их

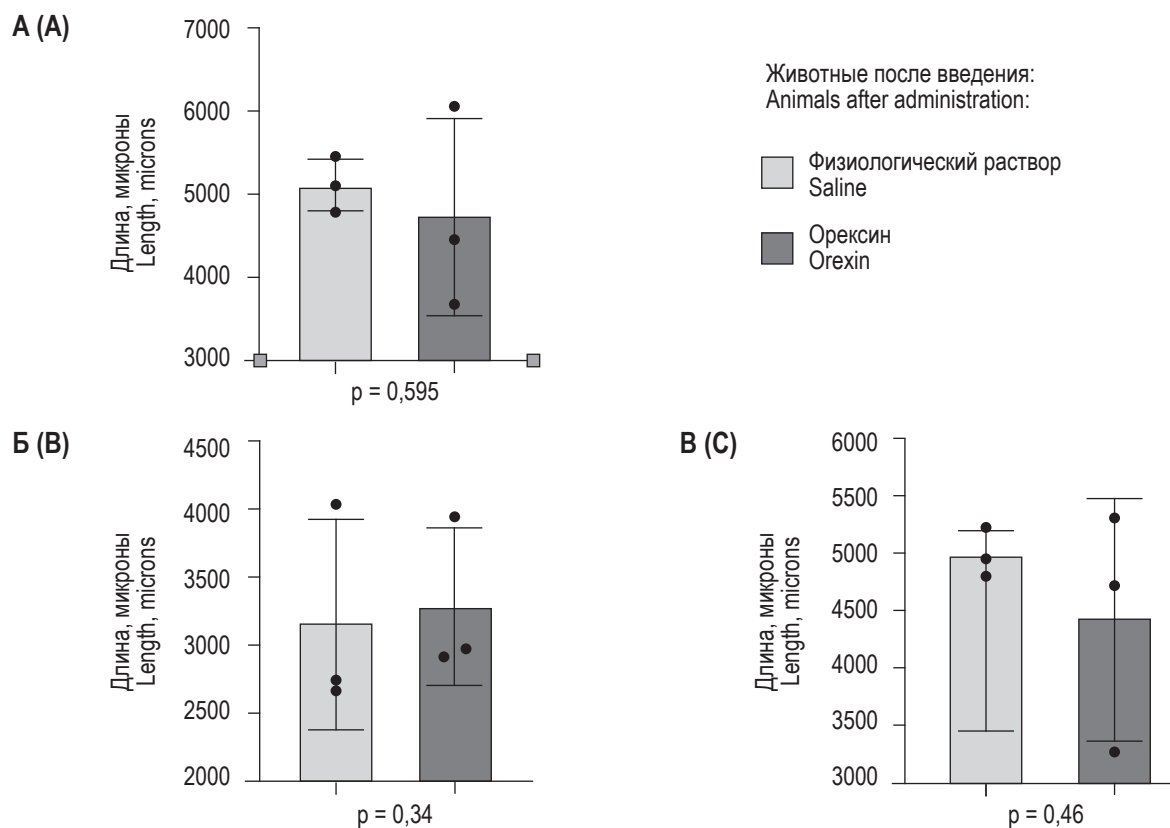


Рисунок 1. Длина отростков микроглиальных клеток, локализованных в соматосенсорной (А), моторной зонах коры (Б) и полосатого тела (В)

Figure 1. The length of processes of microglial cells localized in the somatosensory (A), motor cortex (B), and striatum (C)

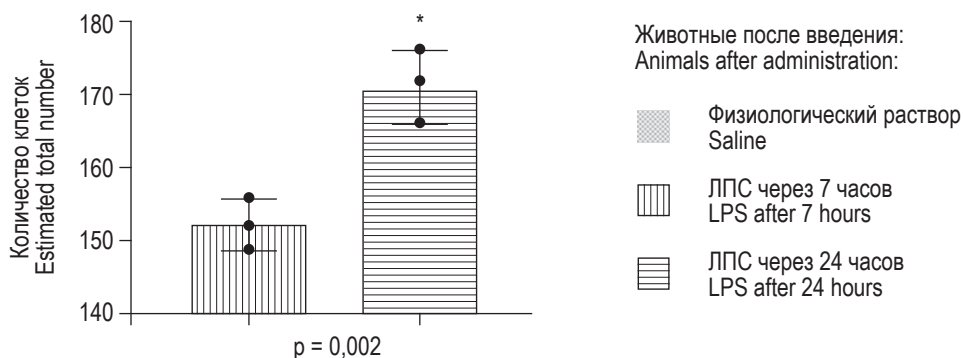


Рисунок 2. Количество клеток микроглии в зоне S1 коры головного мозга после введения ЛПС (через 7 и 24 часа)

Figure 2. Number of microglial cells in the somatosensory zone of the cerebral cortex after LPS administration (after 7 and 24 hours)

отростков после введения орексина А. Проведенный анализ не позволил выявить изменений отростков микроглиальных клеток (рис. 1).

Реакции клеток микроглии мышей на внутрибрюшинное введение липополисахарида

Подсчет количества микроглиоцитов на срезах соматосенсорной коры позволил установить возрастание степени активации этих клеток при введении ЛПС: происходит увеличение количества микроглиальных клеток в соматосенсорной коре на 12% через 7 часов и на 25% через 24 часа (рис. 2).

Заключение

Клетки микроглии выполняют защитную функцию и являются иммунocyтaми, присутствующими в центральной нервной системе. Их активация приводит к выработке цитокинов, которые могут оказывать повреждающее или защитное действие на клетки мозга. Как известно, Орексин А обладает противовоспалительным и нейропротективным действием. Подкожное введение орексина А повышает выживаемость мышей с индуцированным липополисахаридом

эндотоксиновым шоком на 80%, снижая уровень провоспалительных цитокинов и хемокинов.

Таким образом, исследование эффектов действия орексина А, вводимого во второй желудочек мозга, на морфофункциональные характеристики клеток микроглии, активированных внутрибрюшинной инъекцией липополисахарида (ЛПС), позволило констатировать изменение количества и морфофункциональных особенностей клеток микроглии в соматосенсорной коре, а именно активности микроглиоцитов, на мембранах которых представлены рецепторы к орексинам OXR1. И хотя введение орексина-А животным после предварительной инъекции ЛПС

не вызвало значительных изменений процессов, инициированных действием ЛПС, происходит увеличение длины их отростков в моторной зоне коры головного мозга.

Более того, продемонстрировано изменение количества рецепторов к орексинам OXR1 на клетках микроглии при введении липополисахарида.

Установленные в настоящей работе эффекты нейромедиатора орексина А на морфофункциональные характеристики клеток микроглии могут служить основой для создания препаратов, позволяющих адресно коррегировать функции иммунной системы мозга.

Список литературы / References

1. Becquet L., Abad C., Leclercq M., Miel C., Jean L., Riou G., Couvineau A., Boyer O., Tan Y.-V. Systemic administration of orexin A ameliorates established experimental autoimmune encephalomyelitis by diminishing neuroinflammation. *Neuroinflammation*, 2019, Vol. 16, 64. doi: 10.1186/s12974-019-1447-y.
2. Biber K., Möller T., Boddeke E., Prinz M. Central nervous system myeloid cells as drug targets: current status and translational challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2016, Vol. 15, no. 2, pp. 110-124.
3. Daria A., Colombo A., Llovera G., Hampel H., Willem M., Liesz A., Haass C., Tahirovic S. Young microglia restore amyloid plaque clearance of aged microglia. *EMBO J.*, 2016, Vol. 36, no. 5, pp. 583-603.
4. DeCoursey T.E., Morgan D., Cherny V.V. The voltage dependence of NADPH oxidase reveals why phagocytes need proton channels. *Nature*, 2003, Vol. 422, no. 6931, pp. 531-534.
5. Dheen S.T., Kaur C., Ling E.A. Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr. Med. Chem.*, 2007, Vol. 14, no. 11, pp. 1189-1197.
6. España R.A., Baldo B.A., Kelley A.E., Berridge C.W. Wake-promoting and sleep-suppressing actions of hypocretin (orexin): basal forebrain sites of action. *Neuroscience*, 2001, Vol. 106, no. 4, pp. 699-715.
7. Gaykema R.P.A., Goehler L.E. Lipopolysaccharide challenge-induced suppression of Fos in hypothalamic orexin neurons: their potential role in sickness behavior. *Brain Behav. Immun.*, 2009, Vol. 23, no. 7, pp. 926-930.
8. Kettenmann H., Hanisch U.K., Noda M., Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol. Rev.*, 2011, Vol. 91, no. 2, pp. 461-553.
9. Nishino S., Fujiki N., Ripley B., Sakurai E., Kato M., Watanabe T., Mignot E., Yanai K. Decreased brain histamine content in hypocretin/orexin receptor-2 mutated narcoleptic dogs. *Neurosci. Lett.*, 2001, Vol. 313, no. 3, pp. 125-128.
10. Paolicelli R.C., Bolasco G., Pagani F., Maggi L., Scianni M. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, 2011, Vol. 333, no. 6048, pp. 1456-1458.
11. Peyron C., Tighe D.K., van den Pol A.N., de Lecea L., Heller H.C., Sutcliffe J.G., Kilduff T.S. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J. Neurosci.*, 1998, Vol. 18, no. 23, pp. 9996-10015.
12. Ransohoff R.M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*, 2016, Vol. 353, no. 6301, pp. 777-783.
13. Rock R.B., Peterson P.K. Microglia as a pharmacological target in infectious and inflammatory diseases of the brain. *Neuroimmun. Pharmacol.*, 2006, Vol. 1, no. 2, pp. 117-126.
14. Thanos S. The Relationship of microglial cells to dying neurons during natural neuronal cell death and axotomy-induced degeneration of the rat retina. *Eur. J. Neurosci.*, 1991, Vol. 3, pp. 1189-1207.
15. Wei R., Jonakait G.M. Neurotrophins and the anti-inflammatory agents interleukin-4 (IL-4), IL-10, and IL-11 and transforming growth factor-B1 (TGF-B1) down-regulate T cell costimulatory molecules B7 and CD40 on cultured rat microglia. *Neuroimmunol.*, 1999, Vol. 95, no. 1-2, pp. 8-18.

Авторы:

Сынчикова А.П. — аспирант отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Корнева Е.А. — профессор, академик РАН, главный научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Synchikova A.P., Postgraduate Student, Department of General Pathology and Pathological Physiology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Korneva E.A., Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Chief Research Associate, Department of General Pathology and Pathological Physiology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 16.05.2022
Принята к печати 29.05.2022

Received 16.05.2022
Accepted 29.05.2022