

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ТРАНСЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ТРАНСПОРТА ЛПНП И МИГРАЦИИ МАКРОФАГОВ

Чередниченко В.Р.¹, Хованцева У.С.¹, Кузьмин В.В.²,
Чертович Н.Ф.¹, Маркин А.М.¹

¹ ГНЦ РФ ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Резюме. Атеросклероз можно рассматривать как многофакторный процесс, включающий различные патологические механизмы, такие как воспаление, модификация липопротеинов, накопление холестерина, дисфункция эндотелия, окислительный стресс и, в конечном счете, образование атеросклеротической бляшки. Основными участниками развития данного заболевания являются эндотелиальные клетки, лейкоциты и гладкомышечные клетки интимы. Эндотелий взрослого человека содержит гетерогенные клетки, включая типичные эндотелиальные клетки (ТЭК) и гигантские многоядерные варианты ЭК (МВЭК). Процесс пропускания молекул называется трансэндотелиальным транспортом (ТЭТ).

Цель данной работы: моделирование процессов трансэндотелиального транспорта липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и миграции моноцитов с использованием различных вариантов эндотелиальных клеток.

В настоящем исследовании использовали клеточную линию эндотелиальных клеток (ЭК) человека (EA.hy926). Многоядерные варианты эндотелиальных клеток (МВЭК) получали путем обработки ЭК 50%-ным раствором полиэтиленгликоля 6000. Для исследования трансцитоза ЛПНП и миграции моноцитов использовали планшеты со вставками (0,4 или 3,0 мкм диаметр пор, соответственно), формирующими двухуровневую систему. Скорость пропускания ЛПНП оценивали путем измерения количества холестерина в верхней и нижней камере через каждые 2, 5 и 24 часа. Для измерения количества холестерина использовали модифицированный метод Фолча. Содержание холестерина корректировали по общему уровню белка в лунке, измеренному методом Лоури. Миграцию макрофагов оценивали прямым подсчетом количества клеток.

Содержание интернализированного холестерина в МВЭК было статистически значимо выше, чем в ЭК, в то время как скорость транспорта ЛПНП не различалась. Скорость прохождения макрофагами эндотелиального барьера, сформированного МВЭК, была выше в точках 2 и 5 часов, однако через 24 часа количество мигрировавших клеток не отличалось.

Адрес для переписки:

Чередниченко Вадим Романович
ГНЦ РФ ФГБНУ «Российский научный центр хирургии
имени академика Б.В. Петровского»
119435, Россия, Москва, Абрикосовский пер., 2.
Тел.: 8 (920) 429-70-30.
E-mail: cherednichenko_vadim@bk.ru

Address for correspondence:

Vadim R. Cherednichenko
Petrovsky National Research Centre of Surgery
2 Abrikosovsky Lane
Moscow
119435 Russian Federation
Pphone: +7 (920) 429-70-30.
E-mail: cherednichenko_vadim@bk.ru

Образец цитирования:

В.Р. Чередниченко, У.С. Хованцева, В.В. Кузьмин,
Н.Ф. Чертович, А.М. Маркин «Моделирование
процессов трансэндотелиального транспорта
ЛПНП и миграции макрофагов» // Российский
иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 3. С. 499-504.
doi: 10.46235/1028-7221-16678-MTP

© Чередниченко В.Р. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

V.R. Cherednichenko, U.S. Khovantseva, V.V. Kuzmin,
N.F. Chertovich, A.M. Markin "Modeling the processes
of transendothelial transport of LDL and macrophage
migration", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskiy Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 3, pp. 499-504.
doi: 10.46235/1028-7221-16678-MTP

© Cherednichenko V.R. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16678-MTP

Обнаружено, что скорость трансэндотелиального транспорта для типичных и многоядерных вариантов эндотелиальных клеток статистически не различается через 2, 5 и 24 часа. Хотя наличие МВЭК не влияет на транспорт липопротеидов в субэндотелиальный слой, тот факт, что многоядерные клетки аккумулируют липидные капли активнее, чем типичные ЭК, может указывать на важное значение в патогенезе атеросклероза. Скорость миграции макрофагов спустя 2 и 5 часов была выше для МВЭК, чем для ТЭК, тогда как незрелые макрофаги в течение 24 часов не мигрировали через эндотелиальный барьер.

Ключевые слова: эндотелий, эндотелиальные клетки, многоядерные варианты эндотелиальных клеток, липопротеиды низкой плотности, моноциты, макрофаги, трансэндотелиальный транспорт, миграция, атеросклероз, EA.hy926

MODELING THE PROCESSES OF TRANSENDOTHELIAL TRANSPORT OF LDL AND MACROPHAGE MIGRATION

Cherednichenko V.R.^a, Khovantseva U.S.^a, Kuzmin V.V.^b,
Chertovich N.F.^a, Markin A.M.^a

^a Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russian Federation

^b Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Atherosclerosis is a multifactorial process involving various pathological mechanisms: inflammation, lipoprotein modification, cholesterol accumulation, endothelial dysfunction, oxidative stress and formation of atherosclerotic plaque. The main participants in the development of this disease are endothelial cells, leukocytes and smooth muscle cells of intima. The adult endothelium contains heterogeneous cells, including typical endothelial cells (TEC) and giant multinucleated EC variants (MVEC). The process of passing molecules is called transendothelial transport (TET). The purpose of this work is to model the processes of TET of low-density lipoproteins (LDL) and monocyte migration using various EC variants. In the study, a human EC line (EA.hy926) was used. Multicore variants of EC (MVEC) were obtained by treating EC with a 50% solution of polyethylene glycol 6000. To study LDL transcytosis and monocyte migration, tablets with inserts (0.4 or 3.0 micron pore diameter, respectively) forming a two-level system were used. The LDL transmission rate was assessed by measuring the amount of cholesterol in the upper and lower chambers every 2, 5 and 24 hours. A modified Folch method was used to measure the amount of cholesterol. The cholesterol content was adjusted according to the total protein level in the well, measured by the Lowry method. The migration of macrophages was estimated by direct counting of cells. The content of internalized cholesterol in the MVEC was statistically significantly higher than in the EC. The rate of LDL transport did not differ. The rate of passage of the endothelial barrier formed by MVEC by macrophages was higher at points 2 and 5 hours. After 24 hours the number of migrated cells did not differ. The rate of transendothelial transport for typical and multinucleated variants of EC did not statistically differ. Although the presence of MBEC does not affect the transport of lipoproteins into the subendothelial layer, the fact that multinucleated cells accumulate lipid droplets more actively than typical ECS may indicate an important role in the pathogenesis of atherosclerosis. The rate of macrophage migration after 2 and 5 hours was higher for MVEC than for TEC, whereas immature macrophages did not migrate through the endothelial barrier for 24 hours.

Keywords: endothelium, endothelial, multinucleated variant endothelial cells, low-density lipoproteins, monocytes, macrophages, transendothelial transport, migration, atherosclerosis, EA.hy926

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (НИОКТР № 123030700024-4).

Введение

Атеросклероз представляет собой хроническое иммуновоспалительное заболевание средних и

крупных артерий. Атеросклероз можно рассматривать как многофакторный процесс, включающий различные патологические механизмы, такие как воспаление, модификация липопротеинов, накопление холестерина, дисфункция эндотелия, окислительный стресс и, в конечном счете, образование атеросклеротической бляш-

ки. Основными участниками развития данного заболевания являются эндотелиальные клетки, лейкоциты и гладкомышечные клетки интимы. В результате атеросклеротического изменения стенки сосудов утрачивают эластичность, атеросклеротические бляшки постепенно увеличиваются и закрывают просвет сосуда, что ведет к нарушению кровоснабжения внутренних органов. Огромное количество исследований к настоящему моменту не может в полной мере дать ответ на вопрос о начале развития атеросклеротического поражения. В России атеросклерозом страдает до 30% взрослого населения в возрасте до 45 лет, и до 80% в возрасте после 60 лет [8, 10, 12].

Эндотелий – тонкий слой клеток (ЭК), выстилающий внутреннюю поверхность кровеносных сосудов, является важным связующим звеном между кровью и всеми тканями. Эндотелий взрослого человека содержит гетерогенные клетки, включая типичные ЭК (около 100 мкм в диаметре) (ТЭК) и гигантские многоядерные варианты ЭК (МВЭК) (свыше 200 мкм в диаметре). Процесс пропускания молекул называется трансэндотелиальным транспортом (ТЭТ). За счет сети межклеточных контактов достигается избирательность пропускания веществ и клеток в интиму сосуда [7].

Эндотелиальную дисфункцию (ЭД) рассматривают как один из первых этапов атерогенеза. Развитие ЭД сопровождается активной секрецией ЭК молекул адгезии, цитокинов и хемокинов, привлекающих моноциты в очаг поражения, где они дифференцируются в макрофаги поглощают липопротеиды и накапливаются в субэндотелиальном слое [8]. В этом контексте также следует отметить, что в крови пациентов, страдающих атеросклерозом, моноциты преактивированы и обладают некоторыми чертами макрофагов – их адгезия к эндотелию в 1,5 раза выше, чем у здоровых людей [1].

Материалы и методы

Использовали эндотелиоциты человека линии EA.hy926 подтвержденным эндотелиальным фенотипом (наличием основного маркера эндотелия фактора фон Виллебранда) (ATCC, США). Для получения МВЭК монослой эндотелиальных клеток (EA.hy 926) обрабатывали 50%-ным раствором полиэтиленгликоля (ПЭГ) 6000 (НПП «ПанЭко», Россия).

Исследование проводили в 2-камерной системе, верхняя камера (ВК) которой представляет собой пористую вставку (трансвелл) с диаметром пор 0,4 для оценки скорости ТЭТ и 3,0 мкм для оценки скорости миграции макрофагов (BIOFIL,

Китай), а нижняя камера (НК) – лунку 24-луночного планшета (Sarstedt, Германия), в которой расположена указанная вставка. Поверхность трансвеллы засеивали клетками, в количестве 10^5 . Клетки культивировали в среде DMEM (НПП «ПанЭко», Россия) с 10% Fetal bovine serum (FBS) (Biosera, Южная Америка) при 37 °C и 5% CO₂ в течение 2-3 суток до формирования визуального монослоя. Затем в ВК добавляли по 500 мкл среды DMEM, содержащей 100 мкг/мл выделенных ЛПНП человека (обозначали как ВК (O)), для оценки скорости ТЭТ, или 10^5 макрофагов для оценки скорости миграции. Через 2, 5 и 24 часа проводили измерение оцениваемых параметров.

ЛПНП выделяли из сыворотки крови человека в соответствии с ранее описанным протоколом [3].

Определение концентрации холестерина в среде из лунок и вставок, а также в клетках после экстракции проводили ферментативным колориметрическим методом с использованием коммерческого набора CHOLESTEROL liquidcolor (HUMAN, Германия) по модифицированной методике Фолча [2]. Содержание холестерина корректировали по общему уровню белка в лунке, измеренному методом Лоури [4]. Скорость трансэндотелиального транспорта (ТЭТ) определяли как изменение концентрации холестерина в среде, отобранной из НК.

Моноциты CD14⁺ получали из образцов цельной крови стандартным методом выделения лейкоцитарной фракции в градиенте фикола с последующей магнитной сепарацией с использованием наночастиц (Miltenyi Biotec, США) в соответствии с протоколом производителя. Протокол исследования был одобрен Локальным этическим комитетом РНЦХ им. Б.В. Петровского (протокол № 5 от 11 декабря 2022 г.). Далее моноциты инкубировали в среде с гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (GM-CSF) (незрелые макрофаги) и/или с липополисахаридом (ЛПС) (GM-CSF+ЛПС) из Escherichia coli серотипа 026:B6 (Sigma-Aldrich, Израиль) в концентрации 1 мкг/мл для дифференцировки в макрофаги M1. После чего добавляли в ВК в количестве 10^5 клеток.

Измеряли количество мигрировавших клеток в НК через 2, 5 и 24 часа.

Статистический анализ полученных данных был проведен с использованием языка программирования Python и пакетов scipy, numpy, pandas, а также matplotlib, seaborn для визуализации результатов. В работе были использованы критерий Фишера с поправкой Данна для множественных сравнений, U-критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферони, а также критерий Краскела–

ТАБЛИЦА 1. НОРМИРОВАННЫЕ МЕДИАННЫЕ ЗНАЧЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ХОЛЕСТЕРИНА В ЛУНКАХ И ВСТАВКАХ ДЛЯ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК, 25-Й И 75-Й ПРОЦЕНТИЛИ

TABLE 1. NORMALIZED MEDIAN CHOLESTEROL CONCENTRATIONS IN WELLS AND INSERTS FOR VARIOUS ENDOTHELIAL CELL VARIANTS, 25TH AND 75TH PERCENTILES

Тип клеток Cell type	Время инкубации, часы Incubation time, hours	НК (К-) Well control		НК (О) Well test		ВК (К-) Insert control		ВК (О) Insert test	
		25	75	25	75	25	75	25	75
		Медиана Median	Медиана Median	Медиана Median	Медиана Median	Медиана Median	Медиана Median	Медиана Median	Медиана Median
ТЭК TEC	0	0,941	0,969	1,068	1,083	0,887	0,984	1,158	1,014
	2	1,007	1,091	1,129	1,235	0,821	0,874	1,074	0,971
	5	0,975	1,049	1,234	1,504	0,922	0,949	1,063	0,915
	24	0,746	1,146	1,228	1,842	0,483	0,736	0,957	0,797
МВЭК MVEC	0	0,957	1,027	1,075	1,098	0,856	1,082	1,090	0,932
	2	0,773	1,038	1,112	1,042	0,801	0,886	1,117	0,870
	5	0,883	0,954	1,117	1,402	0,681	0,831	1,176	0,812
	24	0,777	0,887	1,080	1,794	0,861	0,985	1,126	0,657

Примечание. * МВЭК – многоядерные варианты эндотелиальных клеток

Note. * MVEC, Multinucleated variant endothelial cells

Уоллиса с апостериорным тестом Коновера. Для описания результатов использовали медианное значение, а также 25-й и 75-й процентиля. Нормирование показателя накопления холестерина в НК и ВК проводили по среднему значению контроля, а для сравнения показателя соотношения холестерина к общему белку на 5×10^5 клеток использовали нормирование по минимальному и максимальному значению в эксперименте, которое приводит значения признака к диапазону от 0 до 1.

Результаты и обсуждение

Ранее исследователями было обнаружено, что МВЭК аккумулируют холестерин активнее, чем ТЭК [5, 9], однако никто до настоящего времени не оценивал ТЭТ и миграцию макрофагов через эндотелиальный барьер, состоящий из преимущественно многоядерных клеток.

Мы не увидели статистически значимой разницы через 2 и 5 часов, различия были найдены только спустя 24 часа измерений, причем содержание холестерина в НК для ТЭК спустя 24 часа выросло в 1,43 раза ($p < 0,05$), а для МВЭК – в 1,83 раза ($p < 0,05$). Статистических различий в скорости ТЭТ между ТЭК и МВЭК найдено не было (табл. 1).

Однако при сравнении содержания холестерина в ВК нами было обнаружено, что концентрация общего холестерина для ТЭК статистически значимо снижается спустя 24 часа в 1,27 раз ($p < 0,05$), в то время как для МВЭК – в 1,15 раз ($p < 0,05$) уже спустя 5 часов с момента добавления ЛПНП. Мы предположили, что подобные отличия могут свидетельствовать о разнице в степени накопления холестерина самими клетками, и МВЭК интернализуют ЛПНП активнее, чем ТЭК.

Для проверки гипотезы мы измеряли соотношение холестерина к общему белку на 500 тыс. клеток, было подтверждено, что концентрация холестерина в МВЭК в 1,17 раз выше, чем в клетках EA.hy926 ($p < 0,05$) (рис. 1).

В результате исследования скорости миграции макрофагов через монослой различных вариантов эндотелиальных клеток было показано, что при обработке моноцитов GM-CSF, миграции на протяжении 24 часов не происходило. В случае с макрофагами M1, спустя 2 часа и 5 часов скорость миграции выше для МВЭК ($p < 0,001$). Однако спустя 24 часа скорость миграции для ТЭК и для МВЭК статистически не различалась.

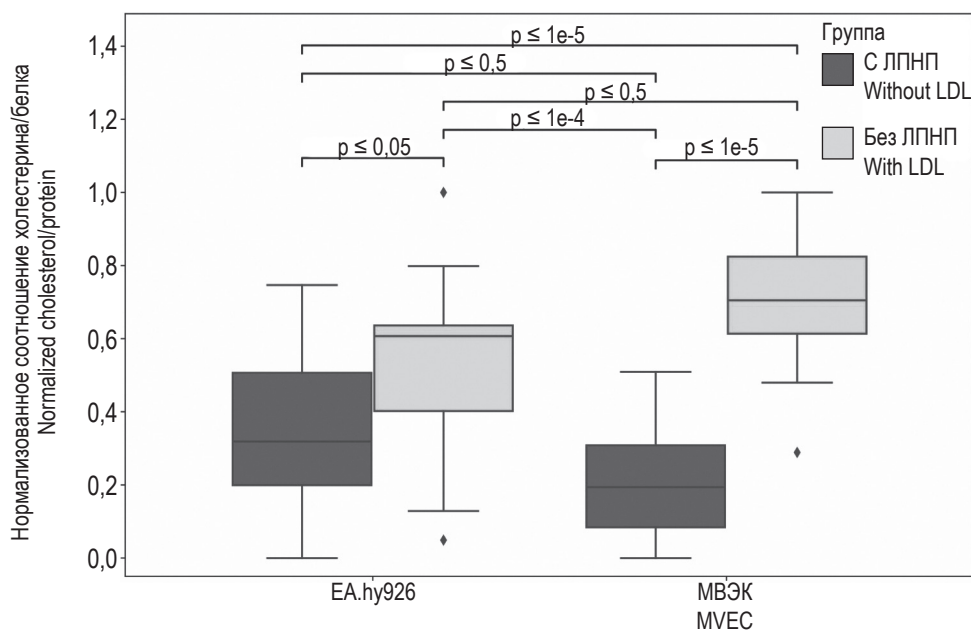


Рисунок 1. Нормализованное соотношение холестерина к белку для EA.hy926 и ГМЭК

Примечание. p – достоверность различий показателей между группами рассчитана согласно непараметрического критерия Вилкоксона, различия считаются достоверными и статистически значимыми при $p < 0,05$.

Figure 1. Normalized cholesterol to protein ratio for EA.hy926 and GMEC

Note. p , significance of differences in indicators between groups is calculated according to the non-parametric Wilcoxon test, the differences are considered reliable and statistically significant when $p < 0.05$.

Заключение

В настоящее время хорошо известно, что артериальные ЭК морфологически гетерогенны по размеру и плоидности: в эндотелии кроме одноядерных встречаются также многоядерные варианты эндотелиальных клеток. В стенке сосудов с атеросклеротическими поражениями в большом количестве встречались МВЭК, что дало основание исследователям предположить, что эти клетки участвуют в патогенезе атеросклероза [5, 6, 10]

Хотя уже было известно, что МВЭК имеют повышенную способность поглощать ЛПНП [5, 9], оставалось выяснить влияет ли наличие многоядерных вариантов эндотелиальных клеток на скорость трансэндотелиального транспорт липопротеидов и миграцию клеток иммунной системы в субэндотелиальный слой.

В настоящем исследовании было обнаружено, что скорость трансэндотелиального транспорта для типичных и многоядерных вариантов эндотелиальных клеток статистически не различается через 2, 5 и 24 часа. Хотя наличие МВЭК не влияет на транспорт липопротеидов в субэндотелиальный слой, тот факт, что многоядерные клетки аккумулируют липидные капли активнее, чем типичные ЭК, может указывать на важное значение в патогенезе атеросклероза.

Также было обнаружено, что скорость миграции макрофагов спустя 2 и 5 часов была выше для МВЭК, чем для ТЭК, тогда как незрелые макрофаги в течение 24 часов не мигрировали через эндотелиальный барьер.

Публикация размещена при участии Балтийского федерального университета им. И. Канта.

Список литературы / References

1. Челомбитко М.А., Шишкина В.С., Ильинская О.П., Каминный А.И., Павлунина Т.О., Самовилова Н.Н., Грачева Е.В., Тарарак Э.М., Проказова Н.В. Цитофлуориметрическое изучение мембранных рафтов на субпопуляциях моноцитов человека при атеросклерозе // *Acta Naturae*, 2014. № 4 (23). С. 86-94. [Chelombitko M.A., Shishkina V.S., Ilyinskaya O.P., Kaminsky A.I., Pavlunina T.O., Samovilova N.N., Gracheva E.V., Tararak E.M., Prokazova N.V. Cytofluorimetric study of membrane rafts on subpopulations of human monocytes in atherosclerosis. *Acta Naturae = Acta Naturae*, 2014, no. 4 (23). pp. 86-94. (In Russ.)]
2. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 1957. no. 1 (226), pp. 497-509.

3. Kiseleva D., Kolmogorov V., Cherednichenko V., Khovantseva U., Bogatyreva A., Markina Y., Gorelkin P., Erofeev A., Markin A. Effect of LDL Extracted from human plasma on membrane stiffness in living endothelial cells and macrophages via scanning ion conductance microscopy. *Cells*, 2024, Vol 13, no. 4, 358. doi: 10.3390/cells13040358.
4. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, Vol. 193, no. 1. pp. 265-275.
5. Nikiforov N.G., Zlenko D.V., Orekhova V.A., Melnichenko A.A., Orekhov A.N. Local Accumulation of Lymphocytes in the Intima of Human Aorta Is Associated with Giant Multinucleated Endothelial Cells: Possible Explanation for Mosaicism of Atherosclerosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 3, 1059. doi: 10.3390/ijms23031059.
6. Shirinsky V.P., Antonov AS, Birukov KG, Sobolevsky AV, Romanov YA, Kabaeva NV, Antonova GN, Smirnov VN. Mechano-chemical control of human endothelium orientation and size. *J. Cell Biol.*, 1989, Vol. 109, no. 1, pp. 331-339.
7. Sun X., Belkin N., Feinberg M.W. Endothelial microRNAs and atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.*. 2013, Vol. 12, no. 15, 372. doi: 10.1007/s11883-013-0372-2.
8. Tabas I., Bornfeldt K.E. Macrophage phenotype and function in different stages of atherosclerosis. *Circ. Res.*, 2016, Vol. 118, no. 4, pp. 653-667.
9. Tokunaga O., Satoh T., Yamasaki F., Wu L. Multinucleated variant endothelial cells (MVECs) in human aorta: chromosomal aneuploidy and elevated uptake of LDL. *Semin. Thromb. Hemost.*, 1998, Vol. 24, no. 3, pp. 279-284.
10. Tokunaga O., Fan J.L., Watanabe T. Atherosclerosis- and age-related multinucleated variant endothelial cells in primary culture from human aorta. *Am. J. Pathol.*, 1989, Vol. 135, no. 6, pp 967-976.

Авторы:

Чередниченко В.Р. — младший научный сотрудник отдела патологической морфологии лаборатории клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы ГНЦ РФ ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

Хованцева У.С. — младший научный сотрудник отдела патологической морфологии лаборатории клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы ГНЦ РФ ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

Кузьмин В.В. — студент биотехнологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Чертович Н.Ф. — инженер-исследователь отдела патологической морфологии лаборатории клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы ГНЦ РФ ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

Маркин А.М. — младший научный сотрудник отдела патологической морфологии лаборатории клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы ГНЦ РФ ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

Authors:

Cherednichenko V.R., Junior Research Associate, Department of Pathological Morphology, Laboratory of Cellular and Molecular Pathology of the Cardiovascular System, Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russian Federation

Khovantseva U.S., Junior Research Associate, Department of Pathological Morphology, Laboratory of Cellular and Molecular Pathology of the Cardiovascular System, Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russian Federation

Kuzmin V.V., Student, Biotechnology Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Chertovich N.F., Research Engineer, Laboratory of Cellular and Molecular Pathology of the Cardiovascular System, Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russian Federation

Markin A.M., Junior Research Associate, Laboratory of Cellular and Molecular Pathology of the Cardiovascular System, Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russian Federation

Поступила 01.04.2024
Отправлена на доработку 06.04.2024
Принята к печати 17.04.2024

Received 01.04.2024
Revision received 06.04.2024
Accepted 17.04.2024