

ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНА VDR rs731236 И rs2228570 ВЛИЯЮТ НА УРОВЕНЬ ВИТАМИНА D У ЛИЦ КАЛИНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

Бограя М.М., Вульф М.А., Сафиуллина Л.А., Паскидов Д.В.,
Шнар В.А., Газатова Н.Д., Михайлова Л.В., Литвинова Л.С.

ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Резюме. Витамин D является важным микроэлементом, участвующим в многочисленных биологических процессах. Помимо поддержания здоровья костей, оказывает протекторное действие на сердечно-сосудистую систему, поджелудочную железу и жировую ткань. Около 50% населения мира страдают дефицитом или недостаточностью витамина D. Распространенность данных состояний значительно выше у людей с ожирением, независимо от возраста и места проживания.

Наличие полиморфизмов в гене VDR (рецептор витамина D) способно объяснить индивидуальные особенности в концентрации витамина D 25(OH) в сыворотке крови. Особый интерес представляет влияние полиморфизмов rs731236 и rs2228570 на уровень витамина. Так, полиморфизм VDR rs731236 – это синонимичная замена, тогда как полиморфизм rs2228570 – не синонимичная замена.

В статье исследованы полиморфизмы гена VDR rs2228570 (Т/С), rs731236 (Т/С) и выявлены их взаимосвязи с уровнем витамина D в крови у лиц Калининградской области с различным индексом массы тела (ИМТ). Материалом для исследования была венозная кровь, взятая утром натощак у 232 человек (средний возраст 50±13,5 лет, 103 мужчины и 129 женщин). Содержание витамина D в крови оценивали методом ИФА, полиморфизмы гена VDR – методом ПЦР.

У лиц с ИМТ > 30 кг/м² регистрировались изменения липидного профиля и печеночных проб. Уровень витамина D не зависел от ИМТ лиц, принявших участие в исследовании. Выявлены значимые изменения уровней витамина D в крови, в зависимости от распределения генотипов гена VDR. Уровень витамина D был выше у лиц с генотипом СС относительно генотипов ТТ и СТ полиморфизма rs2228570 и не зависел от ИМТ. Тогда как наличие полиморфизма rs731236 в гене VDR связано с ИМТ. Так, при ожирении уровень витамина D снижен только у лиц с генотипом ТТ полиморфизма rs731236, но не у лиц с генотипами СС и ТС.

Ключевые слова: витамин D, рецепторы витамина D, ожирение, сахарный диабет 2 типа, полиморфизмы

Адрес для переписки:

Литвинова Лариса Сергеевна
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный
университет имени Иммануила Канта»
236001, Россия, г. Калининград, ул. Гайдара, б.
Тел.: 8 (401) 259-55-95 (доб. 6134).
E-mail: larisalitinova@yandex.ru

Address for correspondence:

Larisa S. Litvinova
Immanuel Kant Baltic Federal University
6 Gaidar St
Kaliningrad
236001 Russian Federation
Phone: +7 (401) 259-55-95 (acc. 6134).
E-mail: larisalitinova@yandex.ru

Образец цитирования:

М.М. Бограя, М.А. Вульф, Л.А. Сафиуллина,
Д.В. Паскидов, В.А. Шнар, Н.Д. Газатова,
Л.В. Михайлова, Л.С. Литвинова «Полиморфизмы
гена VDR rs731236 и rs2228570 влияют на уровень
витамина D у лиц Калининградской области»
// Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27,
№ 4. С. 995-1000.
doi: 10.46235/1028-7221-16881-VGP

© Бограя М.М. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.M. Bograya, M.A. Vulf, L.A. Safiullina, D.V. Paskidov,
V.A. Shnar, N.D. Gazatova, L.V. Mikhailova, L.S. Litvinova
“VDR gene polymorphisms rs731236 and rs2228570 affect
vitamin D levels in people of the Kaliningrad region”, Russian
Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 4, pp. 995-1000.
doi: 10.46235/1028-7221-16881-VGP

© Bograya M.M. et al., 2024

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16881-VGP

VDR GENE POLYMORPHISMS rs731236 AND rs2228570 AFFECT VITAMIN D LEVELS IN PEOPLE OF THE KALININGRAD REGION

Bograya M.M., Vulf M.A., Safiullina L.A., Paskidov D.V., Shnar V.A., Gazatova N.D., Mikhailova L.V., Litvinova L.S.

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Abstract. Vitamin D is an essential micronutrient that is involved in numerous biological processes. It not only keeps bones healthy, but also has a protective effect on the cardiovascular system, the pancreas and fatty tissue. Around 50% of the world's population suffers from vitamin D deficiency or insufficiency. The prevalence of these diseases is significantly higher in obese people, regardless of age and place of residence. The presence of polymorphisms in the VDR gene (vitamin D receptor) can explain individual differences in the concentration of vitamin D 25(OH) in blood serum. Of particular interest are the effects of the polymorphisms rs731236 and rs2228570 on vitamin levels. Thus, the VDR polymorphism rs731236 is a synonymous substitution, whereas the polymorphism rs2228570 is a non-synonymous substitution. The article investigated the polymorphisms of the VDR gene rs2228570 (T/C), rs731236 (T/C) and determined their association with blood vitamin D levels in people from the Kaliningrad region with different body mass index (BMI). The material for the study was venous blood taken in the morning on an empty stomach from 232 people (mean age 50 ± 13.5 years, 103 men and 129 women). The vitamin D content in the blood was determined by ELISA and the polymorphisms of the VDR gene were analyzed by PCR.

In individuals with a BMI > 30 kg/m², changes in the lipid profile and liver function tests were recorded. The vitamin D level did not depend on the BMI of the study participants. Significant changes in blood vitamin D levels were found depending on the distribution of the VDR genotype. Vitamin D levels were higher in individuals with the CC genotype than in the TT and CT genotypes of the rs2228570 polymorphism and did not depend on BMI. In contrast, the presence of the rs731236 polymorphism in the VDR gene is associated with BMI. In obesity, vitamin D levels are therefore only reduced in people with the TT genotype of the rs731236 polymorphism, but not in people with the CC and TC genotype.

Keywords: vitamin D, vitamin D receptors, obesity, type 2 diabetes, polymorphisms

Данное исследование поддержано из средств программы стратегического лидерства «Приоритет 2030» БФУ им. И. Канта и гранта FZWM-2024-0012.

Введение

Известно, что повышенные уровни витамина D связаны со снижением риска сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [3], диабет 2-го типа (СД2) [7] и ожирение [6]. 25(OH)D является основным метаболитом витамина D, и его содержание в крови считается индикатором запаса витамина D в организме. Из-за относительно длительного периода полувыведения (2-3 недели), уровни витамина в крови изменяются незначительно, что отражает оптимальное сочетание витамина D, который поступил с пищей и синтезировался в коже [5]. Поскольку уровни 1,25(OH)₂D в крови в 1000 раз ниже, чем уровни 25(OH)D, измерение 1,25(OH)₂D значительно сложнее [5]. Дефицит витамина D широко распространен во всем мире и ассоциирован с неблагоприятными последствиями для организма.

Биологическое действие витамина осуществляется через ядерный рецептор витамина D (VDR), который экспрессируется в большинстве клеток нашего организма, в том числе в клетках иммунной системы [2]. Витамин D является липофильной молекулой, которая способна проходить через клеточную мембрану и связывать VDR в ядре. Комплекс витамин D-VDR способен образовывать гетеродимер с ретиноидным рецептором X (RXR), впоследствии связываясь со специфическими последовательностями ДНК в промоторной области генов, чувствительных к витамину D, контролируя транскрипцию этих генов [6, 8].

В различных этнических группах показано разнонаправленное влияние полиморфизма rs731236 (T/C) и rs2228570 (T/C) на уровень витамина D. Полиморфизм rs2228570 располагается в кодирующей области гена VDR, является однонуклеотидной несинонимичной заменой и сдвигает рамку считывания, укорачивая белок на 3 аминокислоты в N-конце. Полиморфизм VDR rs731236 представляет собой частую (в среднем 34% среди разных популяций) синонимичную

замену, которая не приводит к замене аминокислоты в белке VDR.

В связи с вышесказанным **целью данного исследования** явился поиск взаимосвязи полиморфизмов гена VDR rs2228570 и rs731236 с уровнем витамина D у лиц Калининградской области с различным индексом массы тела (ИМТ).

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 232 человека, проживающие на территории Калининградской области (средний возраст $50 \pm 13,5$ лет, 103 мужчины и 129 женщин). Лица, принявшие участие в исследовании, были ранжированы по ИМТ: ИМТ < 30 кг/м² (32%) и ИМТ > 30 кг/м² (68%). Исследуемые группы сопоставимы по возрасту и полу. Материалом для исследования явилась венозная кровь, полученная утром натощак. Антропометрическая и клиническая характеристика пациентов представлена в таблице 1.

Анализ биохимических показателей в сыворотке крови проводили на автоматическом биохимическом анализаторе Furuno SA-180 (Furuno Electric Company, Япония) с использованием тест-систем DiaSys (DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim, Германия). Выделение геномной ДНК из цельной крови выполняли с помощью набора ДНК-ЭКСТРАН-1 (ООО «НПФ Синтол», Россия). Определение полиморфизма rs2228570, rs731236 в гене VDR осуществлялось методом ПЦР в реальном времени (набор NP-473-100, набор NP-639-100 соответственно) (ООО «НПФ Синтол», Россия). Детекция содержания витамина D в сыворотке крови была выполнена методом ИФА (EuroImmuno, Германия).

Статистическая обработка данных проведена в программе GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, США). Различия между уровнями витамина D у пациентов с разными генотипами были оценены с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Разница в частотах аллелей между группами была оценена с помощью критерия χ^2 .

Информированное согласие было подписано всеми пациентами. Исследование проводилось в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации.

Результаты и обсуждение

В результате комплексного анализа было выявлено, что у лиц с ИМТ > 30 кг/м² регистрировалось повышение активности ферментов печени (аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы) и показателей липидного обмена и уровень ЩФ, относительно лиц с ИМТ < 30 кг/м² (табл. 1).

Обратная взаимосвязь избыточной массы тела и уровня витамина D находит подтверждение в многочисленных исследованиях [1], однако при-

чинно-следственные взаимосвязи до сих пор не ясны.

В проведенном нами исследовании не обнаружено значимых различий в содержании витамина D у лиц с различным ИМТ (табл. 1). Однако распределение лиц внутри групп, в зависимости от генотипа (ТТ, ТС, СС) гена VDR, позволило выявить значимые отличия в концентрации витамина D у лиц с различным ИМТ. Так, у лиц с генотипом ТТ полиморфизма rs731236 гена VDR уровень витамина D в крови был снижен при ожирении ($p = 0,0011$) относительно лиц с ИМТ (рис. 1). У лиц с генотипом СС, напротив, выявлено повышение уровня витамина D в крови при ИМТ ≥ 30 кг/м² ($p = 0,0007$) (рис. 1). Следует отметить, что ранжирование всех пациентов в зависимости от распределения генотипов полиморфизма rs731236 гена VDR, позволило выявить весьма интересные особенности. Так, уровень витамина D в крови людей с рецессивным генотипом (СС) был выше, по сравнению с лицами с гетерозиготным генотипом (ТС), в независимости от ИМТ ($p = 0,0046$) (рис. 1).

Синонимичная замена rs731236 приводит к замене нуклеотида в белок-кодирующей последовательности мРНК VDR. Данное изменение может приводить к эпигенетическим сдвигам: возможно, вследствие изменения нуклеотида Т на С формируется сайт посадки для микроРНК (на данный момент, неизвестной). Образованная связь между измененной мРНК VDR и микроРНК подавляет трансляцию белка VDR, приводя к снижению эффективности контакта между VDR и витамином D, повышая уровень последнего в крови. Мы предполагаем, что потенциальную микроРНК следует искать среди микроРНК, уровень которых возрастает при ожирении.

Результаты исследования полиморфизма rs2228570 гена VDR у лиц, ранжированных по ИМТ, показали, что уровень витамина D значимо не изменяется у лиц с генотипами ТТ, ТС и СС. Распределение всех пациентов на генотипы выявило значимо более высокие уровни витамина D в крови пациентов с генотипом СС, в сравнении с пациентами с генотипом ТТ ($p = 0,0105$) и генотипом ТС ($p = 0,0134$) (рис. 2).

Далее, все пациенты были поделены на 4 группы по уровню витамина D: 1) норма (> 30 нг/мл) 38 пациентов; 2) недостаток (20-30 нг/мл), 71 пациент; 3) дефицит (10-20 нг/мл), 97 пациентов; 4) острый дефицит (< 10 нг/мл), 28 пациентов. Распределение частот аллелей Т и С в группах было следующим: 1) Т = 44%, С = 56%; 2) Т = 55%, С = 45%; 3) Т = 64%, С = 36%; 4) Т = 60%, С = 40%. Обнаружена значимая разница в частотах аллелей между пациентами с нормальным уровнем витамина D и пациентами как с дефицитом ($p = 0,0050$), так и острым дефицитом ($p = 0,0240$) анализа (рис. 2). Возможно, рецепторы пациентов с генотипом СС связывают

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКИЕ И ЛАБОРАТОРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУПП

TABLE 1. CLINICAL AND LABORATORY CHARACTERISTICS OF THE STUDY GROUPS

Показатели Indicators	ИМТ < 30 кг/м ² BMI < 30 kg/m ² n = 62	ИМТ > 30 кг/м ² BMI > 30 kg/m ² n = 180	p-значение p-values
ИМТ, кг/м ² BMI, kg/m ²	24,95±3,42	44,50±9,23	< 0,0001 ¹
Возраст, лет Age, years	52,57±15,37	50,14±12,96	0,2754 ¹
Пол (мужчины / женщины) Sex (men, women)	69,35% / 30,65%	35,29% / 64,71%	< 0,001 ²
Наличие СД 2 типа (отсутствие, НТГ, наличие) Type 2 diabetes (absent, impaired glucose tolerance)	93,44% / 0% / 6,56%	40,16% / 12,30% / 47,54%	< 0,001 ²
Наличие ГБ (отсутствие / наличие) Hypertension (absent, hypertension)	73,33% / 26,67%	22,52% / 77,48%	< 0,001 ²
ОКС (острый коронарный синдром) (отсутствие / наличие) ACS (acute coronary syndrome) (absent, heart failure)	37,10% / 62,90%	90,37% / 9,63%	< 0,001 ²
25(ОН)D, нг/мл 25(OH)D, ng/mL	22,03±10,93	20,84±10,67	0,7337
Пропорция генотипов по полиморфизму rs731236 (ТТ / ТС / СС) Proportion of genotypes by polymorphism rs731236 (TT / TC / CC)	44,83% / 46,55% / 8,62%	37,36% / 50,57% / 12,07%	0,492 ²
Пропорция генотипов по полиморфизму rs2228570 (ТТ / ТС / СС) Proportion of genotypes by polymorphism rs2228570 (TT / TC / CC)	20,69% / 63,79% / 15,52%	35,23% / 43,75% / 21,02%	0,016 ²
Холестерин, ммоль/л Cholesterol, mmol/L	4,86±1,23	5,32±1,14	0,0177 ¹
Липопротеины высокой плотности ммоль/л HDL, mmol/L	1,25±0,73	1,16±0,34	0,4147 ¹
Липопротеины низкой плотности, LDL, ммоль/л	3,01±0,90	3,17±0,81	0,27661
Индекс атерогенности усл. ед. Atherogenic Index, units	3,51±1,26	3,87±1,55	0,1345 ¹
Триглицериды, ммоль/л Triglycerides, mmol/L	1,57±0,81	1,84±0,93	0,0604 ¹
Аспаратаминотрансфераза, ммоль/л Aspartate aminotransferase, mmol/L	19,11±8,81	28,72±33,32	0,0123 ¹
Аланинаминотрансфераза, ммоль/л Alanine aminotransferase, mmol/L	15,20±8,63	27,19±38,70	0,0051 ¹
Щелочная фосфатаза, ед/л Alkaline phosphatase, u/L	140,81±55,68	167,42±56,21	0,0555 ¹
Креатинин, мкмоль/л Creatinine, μmol/L	89,04±18,13	87,02±21,51	0,6641 ¹
Мочевина, ммоль/л Urea, mmol/L	6,28±1,84	6,05±1,60	0,5720 ¹

Примечание. ¹ – анализ проведен через непарный t-тест Стьюдента. ² – анализ проведен через критерий хи-квадрат.

Note. ¹, analysis was carried out using an unpaired Student's t-test. ², analysis was carried out using the χ^2 test.

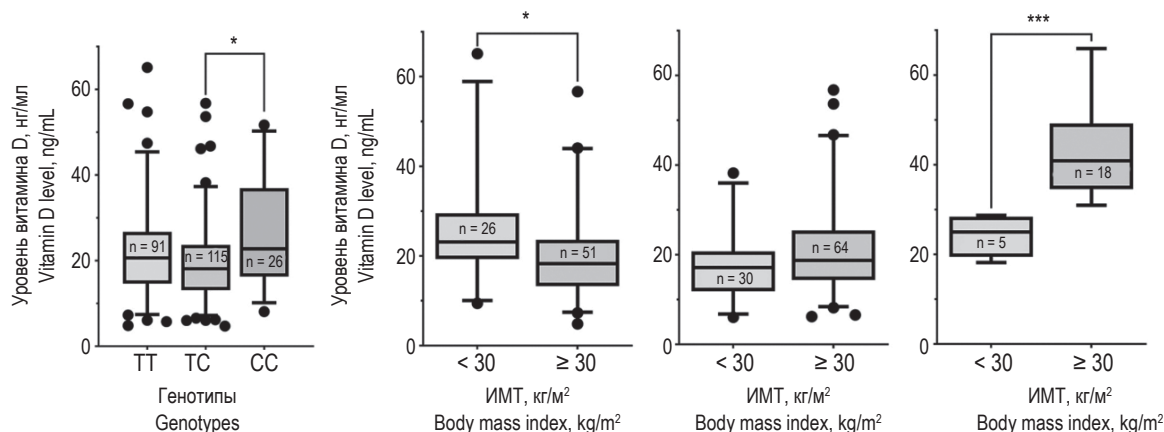


Рисунок 1. Уровень витамина D у лиц Калининградской области в зависимости от распределения генотипов полиморфизма rs731236 гена VDR и в зависимости от ИМТ

Figure 1. Vitamin D level in people of the Kaliningrad region depending on the distribution of genotypes of the rs731236 polymorphism of the VDR gene and depending on BMI

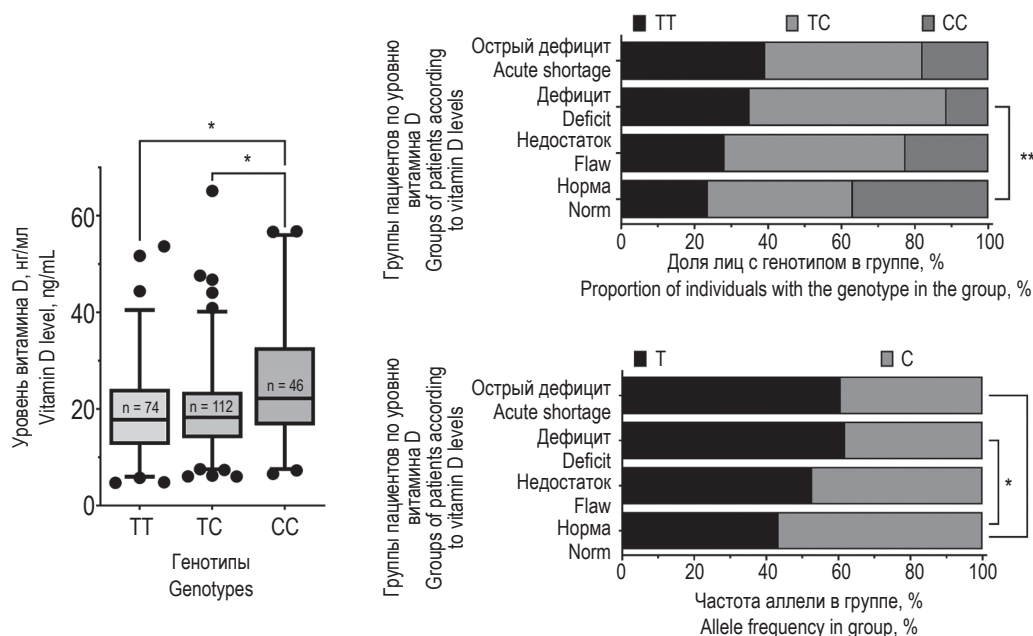


Рисунок 2. Уровень витамина D у лиц Калининградской области в зависимости от распределения генотипов и частот аллелей полиморфизма rs2228570 гена VDR

Figure 2. Vitamin D levels in individuals in the Kaliningrad region depending on the distribution of genotypes and allele frequencies of the rs2228570 polymorphism of the VDR gene

витамин D менее эффективно, чем аналогичные у лиц с генотипом TT, что объясняет более высокий уровень витамина в крови.

Заключение

Таким образом, низкий уровень витамина D характерен только для людей с ожирением и генотипом TT в полиморфизме гена VDR rs731236. В дальнейшем планируется изучение связи метаболитов витамина D с полиморфизмом rs731236, экспрессии, продукции и микроРНК-регуляции белка VDR. В настоящий момент не представляется возможным осуществить поиск микроРНК к

мутантной последовательности гена VDR в силу ограничения функционала используемых баз данных.

Уровень витамина D в крови гомозигот с полиморфизмом rs2228570 гена VDR (генотип CC) выше, чем у гомозигот без полиморфизма (генотип TT) и гетерозигот (генотип TC). Мы предполагаем, что рецепторы пациентов с генотипом C/C связывают витамин D менее эффективно, снижая его усвоение в организме и способствуя повышению его в циркуляции.

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

Список литературы / References

1. Carlberg C. Current understanding of the function of the nuclear vitamin D receptor in response to its natural and synthetic ligands. *Recent Results Cancer Res.*, 2003, Vol. 164, pp. 29-42.
2. Christakos S., Dhawan P., Verstuyf A., Verlinden L., Carmeliet G. Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. *Physiol. Rev.*, 2016, Vol. 96, pp. 365-408.
3. Herrmann M., Farrell C.L., Pusceddu I., Fabregat-Cabello N., Cavalier E. Assessment of vitamin D status – a changing landscape. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2017, Vol. 55, no. 1, pp. 3-26.
4. Jenkins D.J.A., Spence J.D., Giovannucci E.L., Kim Y.I., Josse R.G., Vieth R. Supplemental vitamins and minerals for cardiovascular disease prevention and treatment: JACC focus seminar. *J Am. Coll. Cardiol.*, 2021, Vol. 77, no. 4, pp. 423-436.
5. Sergeev I.N., Vitamin D. Status and vitamin D-dependent apoptosis in obesity. *Nutrients*. 2020, Vol., 12, no. 5, 1392. doi: 10.3390/nu12051392.
6. Soto J.R., Anthias C., Madrigal A., Snowden J.A. Insights into the role of vitamin D as a biomarker in stem cell transplantation. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 966. doi: 10.3389/fimmu.2020.00966.
7. Tobias D.K., Luttmann-Gibson H., Mora S., Danik J., Bubes V., Copeland T., LeBoff M.S., Cook N.R., Lee I.M., Buring J.E., Manson J.E. Association of body weight with response to vitamin D supplementation and metabolism. *JAMA Netw. Open*, 2023, Vol. 6, no. 1, e2250681. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2022.50681.
8. Zhang Y., Tan H., Tang J., Li J., Chong W., Hai Y. Effects of vitamin D supplementation on prevention of type 2 diabetes in patients with prediabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*, 2020, Vol. 43, no. 7, pp. 1650-1658.

Авторы:

Бограя М.М. — младший научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ОНК «Институт медицины и наук о жизни» ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Вульф М.А. — к.б.н., старший научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ОНК «Институт медицины и наук о жизни» ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Сафиуллина Л.А. — аспирант ОНК «Институт медицины и наук о жизни» ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Паскидов Д.В. — студент ОНК «Институт медицины и наук о жизни» ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Шнар В.А. — студент ОНК «Институт медицины и наук о жизни» ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Газатова Н.Д. — к.б.н., заведующая лабораторией экспериментальных исследований препаратов крови, ОНК «Институт медицины и наук о жизни» ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Михайлова Л.В. — к.м.н., доцент, заведующая кафедрой терапии ОНК «Институт медицины и наук о жизни» ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Литвинова Л.С. — д.м.н., директор Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ОНК «Институт медицины и наук о жизни» ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Authors:

Bograya M.M., Junior Research Associate, Centre of Immunology and Cell Biotechnology Institute of Medicine and Life Sciences, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Vulf M.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Centre of Immunology and Cell Biotechnology Institute of Medicine and Life Sciences, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Safullina L.A., Postgraduate Student, Institute of Medicine and Life Sciences, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Paskidov D.V., Student, Institute of Medicine and Life Sciences, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Shnar V.A., Student, Institute of Medicine and Life Sciences, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Gizatova N.D., PhD (Biology), Head, Laboratory of Experimental Studies of Blood Products, Institute of Medicine and Life Sciences, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Mikhailova L.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Therapy Institute of Medicine and Life Sciences, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Litvinova L.S., PhD, MD (Medicine), Head, Centre of Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Поступила 03.04.2024

Отправлена на доработку 04.04.2024

Принята к печати 25.04.2024

Received 03.04.2024

Revision received 04.04.2024

Accepted 25.04.2024