

Черепно-мозговая травма и нейровоспаление: обзор основных биомаркеров*

Зудова А.И.^{1,2}, Сухоросова А.Г.^{1,2}, Соломатина Л.В.^{1,2}

¹ ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», Институт естественных наук и математики (620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19, Россия); ² ФГБУН Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук (620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106, Россия)

Автор, ответственный за переписку: Зудова Алевтина Игоревна, e-mail: tina.zudova@mail.ru

Резюме

Черепно-мозговая травма является одной из основных причин как острой, так и долговременной заболеваемости в человеческой популяции. Большое количество доклинических и клинических исследований не даёт полного описания и понимания патофизиологических процессов, происходящих при черепно-мозговой травме и инициируемым ей нейровоспалением.

Нейровоспалительная реакция является очень сложным взаимодействием между клетками врождённой и адаптивной иммунной системы. Врождённая иммунная система активируется неспецифическими сигналами опасности, которые высвобождаются из повреждённых клеток и тканей, что, в свою очередь, приводит к фильтрации нейтрофилов, активации микроглии и астроцитов, высвобождению комплемента, а также выбросу гистамина тучными клетками. Впоследствии активируется адаптивный иммунный ответ, что приводит к развитию более отдалённых эффектов нейровоспаления. Мы представили обзор биомаркеров и их роль в прогнозе исхода при черепно-мозговой травме.

Среди рассматриваемых в данной статье биомаркеров наиболее специфичными в отношении черепно-мозговой травмы и нейровоспаления являются интерлейкин-6, интерлейкин-8, интерлейкин-10 и матриксные металлопротеиназы. Интерлейкин-6 может быть использован в качестве предиктора исхода, риска осложнений черепно-мозговой травмы. Интерлейкин-8 коррелирует с летальностью; Интерлейкин-10 наиболее специфичен в отношении пациентов с положительными результатами компьютерной томографии при лёгкой черепно-мозговой травме без временных ограничений. Активация матриксных металлопротеиназ обуславливает изменение проницаемости гематоэнцефалического барьера и дисфункцию нервно-сосудистой системы. Данных по остальным показателям, рассматриваемым в статье, недостаточно, чтобы использовать их в качестве специфичных для черепно-мозговой травмы биомаркеров.

Для более объективной оценки состояния пациента следует определять несколько биомаркеров в совокупности, так как именно комплекс показателей позволяет более полно оценить состояние пациента с черепно-мозговой травмой.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, биомаркеры, нейровоспаление

Для цитирования: Зудова А.И., Сухоросова А.Г., Соломатина Л.В. Черепно-мозговая травма и нейровоспаление: обзор основных биомаркеров. *Acta biomedica scientifica*. 2020; 5(5): 60-67. doi: 10.29413/ABS.2020-5.5.8

Traumatic Brain Injury and Neuroinflammation: Review of the Main Biomarkers

Zudova A.I.^{1,2}, Sukhorosova A.G.^{1,2}, Solomatina L.V.^{1,2}

¹ Institute of Natural Sciences and Mathematics, Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin (ul. Mira 19, Yekaterinburg 620002, Russian Federation); ² Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (ul. Pervomayskaya 106, 620046, Yekaterinburg Russia, Russian Federation)

Corresponding author: Alevtina I. Zudova, e-mail: tina.zudova@mail.ru

Abstract

Traumatic brain injury is one of the main causes of both acute and long-term morbidity that concern that affects individuals in all demographics.

The processes that occur during traumatic brain injury and neuroinflammation cannot be fully explained in most clinical and preclinical researches.

Neuroinflammation is a very complex interaction between the cells of the innate and adaptive immune systems.

The development of reactions of the innate immune system occurs under the influence of various signals that are released from damaged cells and tissues. This leads to the activation of neutrophils, microglia and astrocytes, the release of complement, as well as the release of histamine by mast cells.

Subsequently, activation of an adaptive immune response leads to the development of later effects of neuroinflammation. The topic of biomarkers in traumatic brain injury is extensive and rapidly developing. We presented an overview of the most common and well-studied biomarkers in the literature regarding head injury in humans and their role in predicting the outcome in traumatic brain injury.

Among the presented biomarkers, the most specific for traumatic brain injury are interleukins-6, -8, -10 and matrix metalloproteinases. We can use interleukin-6 to predict the outcome and risk of complications of traumatic brain injury.

* Статья опубликована по материалам доклада на IV Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты в медицине и биологии» (Иркутск, 16 октября 2020 г.).

The concentration of interleukin-8 shows the relationship of the biomarker with mortality. We can use interleukin-10 to confirm the results of computed tomography in traumatic brain injury. Matrix metalloproteinases present the degree of violation of the blood-brain barrier and brain dysfunction. Other indicators need a more complete study to clarify their role in this pathology. Of course, for a more reliable conclusion about the patient's condition, it is preferable to use the data of several biomarkers at the same time.

Key words: brain injuries, biomarkers, neuroinflammation

For citation: Zudova A.I., Sukhorosova A.G., Solomatina L.V. Traumatic Brain Injury and Neuroinflammation: Review of the Main Biomarkers. *Acta biomedica scientifica*. 2020; 5(5): 60-67. doi: 10.29413/ABS.2020-5.5.8

ПРОЦЕДУРА ПОИСКА ЛИТЕРАТУРЫ

В основном мы использовали данные статей, опубликованных в период с 2016 года по 2020 г. на «Web of Science» и относящихся к категориям Q1–Q3, но небольшая часть информации, касающаяся определений и классификаций, была взята из статей более ранних лет (2008, 2010, 2015 гг.).

Статьи включают материалы исследований и обзоров, проведённых в рамках изучения черепно-мозговой травмы и процессов нейровоспаления, а также биомаркеров, определяемых при данных патологиях. В период с 2016 г. по 2020 г. на платформе «Web of Science» (квартили Q1–Q3) было выявлено 1657 статей. Окончательный список избранных исследований был составлен на основе новизны и непосредственного отношения к основному направлению данного обзора.

Поиск был осуществлён по следующим ключевым словам: черепно-мозговая травма, биомаркеры черепно-мозговой травмы, нейровоспаление, биомаркеры нейровоспаления.

ЧЕРЕПНО-МОЗГОВАЯ ТРАВМА: ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ

Черепно-мозговая травма – это изменение функции мозга или другие признаки патологии головного мозга, вызванные внешней силой [1]. Черепно-мозговая травма может включать очаговое внутричерепное кровоизлияние, эпидуральную и субдуральную гематомы, гипоксемию, гипотензию, отёк, повреждение аксонов, гибель нейронов, глиоз и нарушение гематоэнцефалического барьера [2]. Первоначальное механическое повреждение инициирует патологические биохимические процессы, так называемое «вторичное повреждение», что способствует развитию нейровоспаления [2].

В современном мире черепно-мозговая травма является одним из социально-значимых заболеваний. По данным министерства здравоохранения Российской Федерации, в 2018 г. было зарегистрировано 256 случаев черепно-мозговой травмы на 100 тыс. населения; абсолютное число случаев внутричерепных травм за этот период времени составило 375 990 случаев [3].

Существует несколько систем классификации черепно-мозговой травмы, но чаще всего используются классификации по клинической тяжести или по физическому механизму воздействия.

Согласно данным института нейрохирургии имени Н.Н. Бурденко, черепно-мозговые травмы можно классифицировать по биомеханике, виду и генезу повреждения, типу черепно-мозговой травмы (изолированная, сочетанная или комбинированная), характеру, форме и тяжести повреждений, течению или исходу травмы [4]. По тяжести черепно-мозговой травмы в соответствии с шкалой комы Глазго подразделяются на лёгкую (13–15 баллов), средней тяжести (9–12 баллов), тяжёлую (3–8 баллов) [4].

По данным К.Е. Saatman et al. [5], различают симптоматическую, этиологическую, патологоанатомическую, механистическую (биологический механизм травмы) и прогностическую классификации черепно-мозговой травмы [5].

НЕЙРОВОСПАЛЕНИЕ ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ

Нейровоспаление, возникающее при черепно-мозговой травме, является суммацией взаимодействий различных компонентов иммунной и нервной систем организма. Оно возникает после действия повреждающего фактора и может продолжаться в течение длительного периода (до нескольких десятков лет) [6].

После воздействия внешнего фактора при травме происходит первичное повреждение головного мозга с нарушением целостности нервных и глиальных клеток, кровеносных сосудов [6]. В дальнейшем первичное повреждение вызывает биохимические каскады [6], приводящие к вторичному повреждению в головном мозге [2].

Вторичные нарушения включают: эксайтотоксичность, окислительный стресс, нарушение митохондрий, повреждение гематоэнцефалического барьера и нейровоспаление [6].

При эксайтотоксичности повреждённые нейроны секретируют во внеклеточное пространство нейромедиатор глутамат, активируя рецепторы аминокислоты-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовую кислоту и N-метил-D-аспартат. Активация рецепторов обеспечивает поступление в клетки ионов натрия и кальция. За счёт увеличения концентрации кальция в нейронах осуществляется активация внутриклеточных ферментов: протеинфосфатаз, фосфолипаз и эндонуклеаз, что обеспечивает расщепление структур клеток (белков, фосфолипидов мембран, нитей дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и приводит к гибели нейронов путём некроза и апоптоза [6, 7].

Также повышение уровня кальция в клетке обеспечивает изменение потенциала мембран митохондрий, что приводит к нарушению биохимических процессов, протекающих в митохондриях и высвобождению во внутриклеточное пространство веществ, запускающих апоптоз [6, 7].

При черепно-мозговой травме происходит интенсивное образование активных форм кислорода и оксида азота клетками активированной микроглии [2]. Помимо этого, образование активных форм кислорода вызывают оксигемоглобин, метгемоглобин и брадикинин [7]. Брадикинин вызывает продукцию активных форм кислорода опосредованно через арахидоновую кислоту, которая активирует NADPH-оксидазу-2. Активные формы кислорода обеспечивают каскад реакций, приводящих к окислению белков, липидов, нуклеиновых кислот клеток, изменяя их структуру и функции, тем самым обеспечивая ещё большее нарушение и гибель клеток головного мозга.

В результате механического повреждения и возникшего отёка головного мозга происходит нарушение гематоэнцефалического барьера [9], так как активируется матриксная металлопротеиназа-9, которая разрушает межклеточные контакты, обеспечивая увеличение проницаемости гематоэнцефалического барьера [6], что ведёт за собой проникновение в очаг клеток иммунной системы нейтрофилов, лейкоцитов, моноцитов и циркулирующих факторов крови [6, 9], усугубляющих отёк головного мозга [6].

После повреждения головного мозга происходит выделение внутриклеточных эндогенных молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждениями [2], и патоген-ассоциированных молекулярных фрагментов [9]. Связывание молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждениями, с толл-подобными рецепторами приводит к активации микроглии с её дальнейшей трансформацией по типу M1 или по типу M2 [10]. Хотя имеются данные о наличии смешанного фенотипа [7]. Тип M1 является провоспалительным, тип M2-противовоспалительным [9, 11]. Дифференцировка пути трансформации микроглии (тип M1 или тип M2) определяется присутствием липополисахарида и интерферона, интерлейкина-4 и интерлейкина-13 [6, 7]. После дифференцировки, микроглия начинает выделять цитокины и другие факторы: M1 – интерлейкин-1 β , фактор некроза опухоли- α , интерлейкин-12, трансформирующий ростовой фактор- β , активные формы кислорода [10], M2 – интерлейкин-10 [6, 10]. Именно этим обусловлено защитное и повреждающее действия микроглии на головной мозг. Кроме того, под воздействием выделяемых веществ происходит увеличение проницаемости гематоэнцефалического барьера, обуславливающее ещё большее повреждение ткани головного мозга. Также активированная микроглия экспрессирует NADPH-оксидазу-2, обеспечивающую продукцию активных форм кислорода [8, 12].

Астроциты оказывают двоякое влияние на головной мозг после черепно-мозговой травмы. Они защищают здоровые ткани головного мозга от воздействия токсинов повреждённого вещества мозга, образуя глиальный рубец [2, 6]. Но при этом они также выделяют хемокины, цитокины, активные формы кислорода, металлопротеиназу-9, вызывая воспаление и увеличение проницаемости гематоэнцефалического барьера [2, 13]. Кроме того, глиальный рубец может как способствовать, так и препятствовать регенерации повреждённой ткани [6, 13].

Процессы, происходящие при нейровоспалении, характеризуются изменением уровней определённых веществ в биологических жидкостях в зависимости от объёма повреждения, количества вовлечённых в воспаление клеток и других факторов, эти вещества могут рассматриваться в качестве биомаркеров нейровоспаления и черепно-мозговой травмы.

БИОМАРКЕРЫ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ И НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ

После черепно-мозговой травмы происходит активация различных клеточных элементов и, как следствие, усиленная выработка хемокинов, цитокинов и других факторов, обладающих как провоспалительными, так и противовоспалительными свойствами. По изменению концентрации этих веществ в биологических жидкостях

можно делать прогнозы и выводы о состоянии пациента, то есть использовать в качестве биомаркеров.

Интерлейкин-1 β

Представляет собой провоспалительный цитокин семейства интерлейкина-1, секретируется активированными клетками микроглии и макрофагами [14] и регулирует продукцию других цитокинов, индуцирует лихорадку, стимулирует фагоцитоз и апоптоз клеток [15]. Активная секреция интерлейкина-1 β после черепно-мозговой травмы способствует повышению возбудимости и эксайтотоксичности через глутамат-эргический и ГАМК-эргический механизмы и изменению концентрации ионов кальция, что потенциально может привести к развитию эпилепсии [16]. Другой источник также подтверждает взаимосвязь повышенного уровня интерлейкина-1 β в спинномозговой жидкости/сыворотке с повышенным риском развития посттравматической эпилепсии [14].

В статье T. Rodney et al. [15] были описаны противоречивые результаты: по данным одного исследования, проведённого в группе из 32 человек (женщины и мужчины с тяжёлой черепно-мозговой травмой), более низкий уровень интерлейкина-1 β в спинномозговой жидкости в течение 5 дней после травмы означал более благоприятные неврологические последствия в течение 6 месяцев после травмы; по данным другого исследования, уровень интерлейкина-1 β не показал значительных различий в крови при оценке у мужчин в течение 48 часов после тяжёлой черепно-мозговой травмы по сравнению с контрольной группой (люди без черепно-мозговой травмы), а также умершими пациентами [15].

Таким образом, невозможно сделать однозначные выводы о корреляции между уровнем интерлейкина-1 β и развитием неблагоприятных неврологических последствий, но исследования, подтверждающие данную взаимосвязь, существуют.

Интерлейкин-6

Продукция интерлейкина-6 активированной микроглией и астроцитами повышается при нейровоспалении, при этом в опытах на крысах было показано, что интерлейкин-6 выполняет нейропротективную функцию [15]. Интерлейкин-6 функционирует путём образования комплекса с мембраносвязанными или растворимыми белками, что приводит к активации сигнала по пути JAK/STAT [14]. Интерлейкин-6 вырабатывается повсеместно в организме, поэтому его концентрацию в сыворотке следует определять с осторожностью, так как повреждения за пределами центральной нервной системы также могут вызывать повышение данного биомаркера [14], что не позволяет объективно оценивать данный показатель при сочетанной травме.

В исследовании D.B. Yang et al. [17] определялись сывороточные концентрации нескольких цитокинов, в том числе интерлейкина-6 в сыворотке у пациентов с тяжёлой черепно-мозговой травмой. По сравнению с контрольной группой показатели данных определяемых веществ были значительно повышены [17].

В работе M.J. Feng et al. [18] показано, что более высокий уровень сывороточного интерлейкина-6 у пациентов с тяжёлой черепно-мозговой травмой связан с повышенным уровнем летальности (в первые 30 дней) и повышением риска развития посттравматических осложнений.

Данные статьи T. Rodney et al. [15] подтверждают, что повышение уровня интерлейкина-6 в крови в течение 48 часов после тяжёлой черепно-мозговой травмы связано с худшими отдалёнными исходами [15]. Авторы данного исследования также рассматривали сывороточный интерлейкин-6 в качестве возможного биомаркера-кандидата для прогнозирования повышения внутричерепного давления после изолированной черепно-мозговой травмы [15].

Следовательно, повышенный уровень интерлейкина-6 в сыворотке крови при черепно-мозговой травме, может быть использован в качестве показателя клинического исхода, риска развития осложнений.

Интерлейкин-8

Интерлейкин-8 вырабатывается различными иммунными клетками (моноцитами, макрофагами и другими тканевыми клетками) и обладает свойствами хемоаттрактанта. Он привлекает в очаг воспаления нейтрофилы, что опосредует воспалительный процесс [15].

По данным T. Rodney et al. [15] повышенный уровень интерлейкина-8 в плазме крови в течение 24 часов после тяжёлой черепно-мозговой травмы коррелирует с летальностью: «повышение уровня интерлейкина-8 в плазме в течение 10 часов после черепно-мозговой травмы точно предсказывало летальность в течение следующего месяца» [15]. Более высокие уровни интерлейкина-8 как в спинномозговой жидкости, так и в плазме крови у пациентов со средней или тяжёлой черепно-мозговой травмой, полученные через 6–24 часов после травмы, коррелируют с плохими исходами, представленными в расширенной шкале исходов Глазго от 1 до 4 баллов в 6 месяцев после травмы [15].

В обзоре T. Vagoslovsky et al. [16] показана связь уровня интерлейкина-8 в сыворотке с часовыми значениями внутричерепного давления и церебрального перфузионного давления у пациентов с тяжёлой черепно-мозговой травмой ($n = 24$, госпитализация при шкале комы Глазго < 9). Таким образом, повышение уровня интерлейкина-8 может спрогнозировать внутричерепную гипертензию и церебральную гипоперфузию до их проявления в клинике [16].

Концентрация интерлейкина-8 через 6 часов после тяжёлой черепно-мозговой травмы является пиковой, её значение в 3,5 раза превышает значения таковой у здоровых людей контрольной группы. В крови умерших пациентов концентрация интерлейкина-8 была более чем в 2 раза выше, чем у выживших пациентов [19].

На основании данных исследований можно сделать вывод: повышенный уровень интерлейкина-8 в сыворотке коррелирует с летальностью, показателями расширенной шкалы исхода Глазго, развитием внутричерепного давления и церебрального перфузионного давления, а также даёт возможность прогнозировать вторичное повреждение головного мозга при черепно-мозговой травме.

Интерлейкин-10

Интерлейкин-10 является мощным противовоспалительным цитокином, способным уменьшать синтез провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли- α , интерлейкин-6 и интерлейкин-1, и подавлять активацию рецепторов цитокинов [15]. Повышение уровня интерлейкина-10 в сыворотке в первые сутки после повреждения коррелирует с тяжестью черепно-мозговой

травмы и с уровнем летальности [15]. Однако обзорная статья T. Rodney et al. [15] показывает, что уровни интерлейкина-10 не имели значимых различий у пациентов с благоприятными и неблагоприятными исходами. Исследование A.P. Di Battista et al. [19] подтверждает повышение уровня интерлейкина-10 через 6, 12 и 24 часа после черепно-мозговой травмы у пациентов с неблагоприятными последствиями и у пациентов с летальным исходом. «Интерлейкин-10 был самым достоверным предиктором смерти из всех проанализированных цитокинов (пик, 6 часов; отношение шансов – 2,82; 95% доверительный интервал 1,63–4,87)» [19].

В исследовании L. Lagerstedt et al. [20] определялась связь нескольких маркеров с результатами компьютерной томографии у пациентов с лёгкой черепно-мозговой травмой. Анализ данных показал, что интерлейкин-10 может быть интересным и клинически полезным диагностическим инструментом, способным различать положительные и отрицательные результаты компьютерной томографии у пациентов с лёгкой черепно-мозговой травмой и может конкурировать с S100B – наиболее изученным белком диагностики черепно-мозговой травмы. «Специфичность S100B при чувствительности 100 % составляла 18 % (95% доверительный интервал 10,8–25,2), тогда как интерлейкин-10 достигал специфичности 27 % (95% доверительный интервал 18,9–35,1)» [20].

Согласно приведённым данным, мы можем рассматривать связь уровня интерлейкина-10 с неблагоприятными исходами черепно-мозговой травмы и летальностью.

Фактор некроза опухоли- α

В головном мозге фактор некроза опухоли- α в норме участвует во многих процессах, но при травме его концентрация увеличивается и вызывает прогрессирование заболевания, воспаление и другие процессы [15]. Механизм действия фактора некроза опухоли- α на клеточном уровне обусловлен активацией им рецепторов TNF-R1 (p55) и TNF-R2 (p75). Запуск дальнейших каскадных реакций приводит к гибели клеток путём апоптоза [14].

При черепно-мозговой травме значение фактора некроза опухоли- α выше, чем в контрольной группе [17]. При этом пик наблюдается в первые часы после травмы [21]. Уровень фактора некроза опухоли- α у пациентов с тяжёлой черепно-мозговой травмой коррелирует с летальностью [18] и полиорганной недостаточностью [14, 21]. Повышенные показатели фактора некроза опухоли- α через 6 и 12 часов после травмы были связаны с неблагоприятными неврологическими исходами у пациентов [19]. В исследовании посмертных образцов людей мужского пола была обнаружена связь уровня фактора некроза опухоли- α с повышенным внутричерепным давлением, но не установлена существенная связь с тяжестью травмы [15]. Корреляцию уровня фактора некроза опухоли- α с риском развития внутричерепного давления подтверждают данные статьи M.M. Vanoei et al. [21].

Следовательно, повышение концентрации фактора некроза опухоли- α в очаге воспаления приводит к активации процессов гибели нейронов и к нейродегенерации, а также коррелирует с тяжестью травмы и летальностью.

C-реактивный белок

Уровень C-реактивного белка повышается при тяжёлой черепно-мозговой травме [17, 18], при этом значение

данного показателя выше у пациентов с летальным исходом и у пациентов с неблагоприятными событиями после травмы [18].

В исследовании R.P. Anada et al. [22] для оценки степеней тяжести травмы, наряду с шкалой комы Глазго, определяли уровень С-реактивного белка, который был выше у пациентов с черепно-мозговой травмой лёгкой, средней и тяжёлой степени по сравнению с контрольной группой. При этом в зависимости от степени тяжести уровень С-реактивного белка был различен, что позволяет использовать его для более объективной диагностики пациентов с черепно-мозговой травмой [22].

Однако С-реактивный белок не является маркером, специфичным только для черепно-мозговой травмы, поэтому при наличии других травм или патологий, вызывающих изменение уровня С-реактивного белка, оценка полученных результатов не будет объективна [22].

Тканевой ингибитор металлопротеиназ-1

В экспериментах на мышах показана нейропротективная роль тканевого ингибитора металлопротеиназ-1, в то время как данные пациентов с тяжёлой черепно-мозговой травмой указывают на связь с тяжестью травмы [14] и летальностью [14, 23]. В большинстве случаев более высокая летальность в течение 30 дней наблюдалась при уровне тканевого ингибитора металлопротеиназ-1 выше 220 нг/мл [14, 21].

Таким образом, роль тканевого ингибитора металлопротеиназ-1 при черепно-мозговой травме изучена не в полной мере, чтобы установить его связь с тяжестью черепно-мозговой травмы и летальностью.

Трансформирующий фактор роста-β

При черепно-мозговой травме происходит нарушение гематоэнцефалического барьера, вследствие чего становится возможным поступление фибриногена в головной мозг. Это, в свою очередь, приводит к активации сывороточного трансформирующего фактора роста-β [14]. Активированный трансформирующий фактор роста-β обладает аутоиндукцией в астроцитах, то есть обеспечивает собственный синтез [14]. Помимо этого, происходит выделение трансформирующего фактора роста-β активированной микроглией М1-типа (провоспалительной) [10].

Можно сделать вывод, что трансформирующий фактор роста-β, являясь возможным маркером летального исхода и возникновения посттравматической эпилепсии [21], на данный момент времени требует дальнейшего изучения. Хотя данных о связи клинического исхода и уровня трансформирующего фактора роста-β у людей нет, у мышей в условиях травмы головы было определено более высокое соотношение уровня трансформирующего фактора роста-β в спинномозговой жидкости и сыворотке, что указывало на повышенный риск развития посттравматической эпилепсии [7].

Вещество Р

Вещество Р – белок, содержащий 11 аминокислот [24, 25], относится к семейству тахикининов [14, 24, 25]. В организме человека вещество Р можно обнаружить в центральной и периферической нервной системе и нейронах кишечника [24, 25]. В головном мозге вещество Р находится в ядрах и в чувствительных к капсаицину сенсорных нейронах [25]. По большей части – в сером

веществе мозга [24]. Предполагают, что вещество Р, связанное с эндотелиальной стенкой сосудов головного мозга, обеспечивает увеличение проницаемости гематоэнцефалического барьера и развитие вазогенного отёка [25].

Вещество Р связывается преимущественно с рецептором NK1 [14, 25], обладая к данному рецептору большим сродством, чем к NK2 и NK3 [24, 25], и усиливает транскрипцию матричных рибонуклеиновых кислот интерлейкина-12, интерлейкина-10, интерлейкина-6 и интерлейкина-8 [14]. Вещество Р повышает экспрессию молекулы межклеточной адгезии-1, что увеличивает проницаемость гематоэнцефалического барьера для лейкоцитов. Помимо этого, вещество Р вызывает активацию микроглии, астроцитов [14] и тучных клеток [24] с их дальнейшей секрецией различных факторов.

При черепно-мозговой травме концентрация вещества Р в сыворотке повышена и коррелирует с тяжестью травмы и уровнем летальности [14, 25]. Уровень вещества Р в сыворотке пациентов, превышающий значение 299 мкг/мл, связан с более высокой 30-дневной летальностью [14, 21], а также с повышением риска развития отёка головного мозга, нарушения двигательных и когнитивных функций [25]. При применении антагониста рецептора NK1 у лабораторных животных наблюдалось снижение проницаемости гематоэнцефалического барьера, отёка мозга и нарушения когнитивных функций [25].

Данные исследований представляют, что высокий уровень вещества Р приводит к увеличению проницаемости гематоэнцефалического барьера и к активации синтеза некоторых цитокинов, что приводит к усилению нейровоспаления и отеку головного мозга.

Моноцитарный хемоаттрактантный белок-1

Относится к хемокинам, при черепно-мозговой травме продуцируется астроцитами [23]. Роль моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 при нейровоспалении заключается в привлечении моноцитов и макрофагов к месту травмы [23]. Исследование J.R. Huie et al. [23] показало, что моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 обладает высокой чувствительностью и специфичностью при черепно-мозговой травме. У пациентов с тяжёлой и средней степенями тяжести черепно-мозговой травмы уровень моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 повышен [19]. Моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 может использоваться как прогностический маркер, так как его уровень повышен в первые сутки у пациентов с неблагоприятным исходом [19].

В исследовании лёгкой черепно-мозговой травмы при сравнении положительных и отрицательных результатов компьютерной томографии пациентов с уровнем маркеров, при чувствительности 100 % специфичность составляла 7 %, что было ниже, чем показатель для интерлейкина-10 (при чувствительности 100 % специфичность составляла 31 %) [20].

То есть, концентрация моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 коррелирует с тяжестью черепно-мозговой травмы и даёт возможность прогнозировать исход травмы.

Фактор торможения миграции макрофагов

Фактор торможения миграции макрофагов является хорошо известным провоспалительным цитокином.

D.B. Yang et al. [17] стремились продемонстрировать связь концентрации фактора торможения миграции макрофагов в сыворотке крови с воспалением, степенью тяжести травмы, осложнениями после черепно-мозговой травмы и прогнозом. По сравнению с контролем концентрации фактора торможения миграции макрофагов и ряда других маркеров в сыворотке были значительно увеличены у пациентов, перенёсших черепно-мозговую травму [17]. Концентрации фактора торможения миграции макрофагов коррелировали с количеством лейкоцитов, концентрацией С-реактивного белка, интерлейкина-6, фактора некроза опухоли- α и шкалой комы Глазго [17]. Повышенные концентрации фактора торможения миграции макрофагов также были связаны с тяжестью полученной травмы. Но роль фактора торможения миграции макрофагов в отношении прогноза остаётся неясной [17]. Кроме того, нельзя с точностью сказать, что изменение концентрации фактора торможения миграции макрофагов имеет прогностическую ценность для определения 6-месячного неблагоприятного исхода внутричерепной травмы [17].

Таким образом, хотя концентрация фактора торможения миграции макрофагов в крови и коррелирует с тяжестью травмы, количеством лейкоцитов и концентрацией других компонентов воспаления, она не даёт возможности оценить прогноз черепно-мозговой травмы.

Матриксные металлопротеиназы

Матриксные металлопротеиназы – семейство кальций-зависимых цинксодержащих эндопептидаз, которые выполняют разнообразные физиологические и патологические функции, включая деградацию внеклеточного матрикса, регуляцию цитокинов, хемокинов, расщепление поверхностных рецепторов и другие [26]. Они подразделяются на категории в зависимости от субстрата: коллагеназы (матриксные металлопротеиназы-1, -8 и -13), эластазы (матриксные металлопротеиназы-7, -12), желатиназы (матриксные металлопротеиназы-2, -9), стромелизины (матриксные металлопротеиназы-3, -10, -11), и матриксные металлопротеиназы мембранного типа (матриксные металлопротеиназы-14, -15, -16, -17, матриксные металлопротеиназы мембранного типа) [14].

В течение первых 7 суток после черепно-мозговой травмы уровни металлопротеиназ повышаются в сыворотке и внеклеточной жидкости мозга [14]. Уровни различных металлопротеиназ в некоторых случаях могут служить в качестве биомаркера воспаления. Активация матриксных металлопротеиназ изменяет белки внеклеточного матрикса и способствует изменению проницаемости гематоэнцефалического барьера и дисфункции нервно-сосудистой системы [13]. Анализ внеклеточной мозговой жидкости у пациентов с тяжёлой черепно-мозговой травмой показал, что в первую очередь повышается экспрессия матриксных металлопротеиназ-8, -9, затем матриксных металлопротеиназ-2, -3 и, наконец, матриксной металлопротеиназы-7 [26]. Экспрессия нейтрофильной коллагеназы, матриксной металлопротеиназы-8, повышалась с увеличением внутричерепного давления [26]. Её концентрация была выше у пациентов с летальным исходом после черепно-мозговой травмы [26].

В результате первичного повреждения головного мозга активируется матриксная металлопротеиназа-9, которая увеличивает проницаемость гематоэнцефалического барьера [6]. Опыты на лабораторных мышах,

нокаутных по матриксной металлопротеиназе-9, и мышам, получавших ингибиторы матриксной металлопротеиназы-9, демонстрируют меньшее функциональное нарушение и клеточную дегенерацию после черепно-мозговой травмы [14]. Количественное определение металлопротеиназ у пациентов с черепно-мозговой травмой выявило повышенную экспрессию матриксной металлопротеиназы-9 в течение 72 часов после травмы [26]. У пациентов с тяжёлой черепно-мозговой травмой концентрации матриксной металлопротеиназы-9 и клеточного фибронектина в плазме через 6, 12, 24 и 48 часов после травмы коррелировали с летальностью [16]. Но не удаётся окончательно определить, является ли матриксная металлопротеиназа-9 нейропротекторным или повреждающим агентом [26].

Предполагается, что посттравматические воспалительные цитокины, включая интерлейкин-1 α , интерлейкин-2 и фактор некроза опухоли- α , усиливают транскрипцию матриксных металлопротеиназ-8 и -9 в центральной нервной системе [14]. В статье V. Dinet et al. [13] показано, что уровни матриксных металлопротеиназ-9 и -2 резко повышаются после черепно-мозговой травмы у грызунов [13]. Активность матриксной металлопротеиназы-3 увеличивается после черепно-мозговой травмы. Возможно, она принимает участие в синаптическом ремоделировании [13].

Это означает, что при черепно-мозговой травме изменяются уровни экспрессии разных типов матриксных металлопротеиназ. Наиболее изученной является матриксная металлопротеиназа-9. Увеличение её экспрессии после черепно-мозговой травмы способствует повышению проницаемости гематоэнцефалического барьера и связано с летальным исходом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Черепно-мозговая травма является одним из наиболее распространённых заболеваний в мире и характеризуется разнообразными проявлениями и последствиями. Большинство процессов, происходящих при черепно-мозговой травме, взаимосвязаны, они дополняют и усиливают действие друг друга. Неблагоприятные последствия и осложнения внутричерепных травм связаны с вторичным повреждением и развитием нейровоспаления. Процессы нейровоспалительной реакции опосредованы активацией клеточных элементов (глиальных клеток, клеток иммунной системы) и секрецией различных веществ (цитокинов, хемокинов и т. д.). Механизмы развития нейровоспаления очень сложны – события развиваются одно за другим, образуя каскадные реакции, которые порой замыкаются в порочный круг. Поэтому очень важно изучение и понимание происходящих процессов в организме после черепно-мозговой травмы, уровни каких веществ изменяются в биологических жидкостях, и определение наиболее специфичных из них. Выявление биомаркеров помогает оценить тяжесть травмы и риски отдалённых последствий, а также повышает эффективность терапии пациентов с черепно-мозговой травмой и нейровоспалением.

Финансирование

Работа выполнена в рамках госзадания ИИФ УрО РАН (регистрационный номер НИОКТР № АААА-А18-118020590108-7).

ЛИТЕРАТУРА

1. Menon DK, Schwab K, Wright DW, Maas AI, et al. Position statement: definition of traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 2010; 91(11): 1637-1640. doi: 10.1016/j.apmr.2010.05.017
2. Yilmaz C, Karali K, Fodelianaki G, Gravanis A, Chavakis T, Charalampopoulos I, et al. Neurosteroids as regulators of neuroinflammation. *Front Neuroendocrinol.* 2019; 55: 100788. doi: 10.1016/j.yfrne.2019.100788
3. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Социально-значимые заболевания населения России в 2018 году (статистические материалы). М.; 2019.
4. Лихтерман Л.Б. Классификация черепно-мозговой травмы. Часть II. Современные принципы классификации ЧМТ. *Судебная медицина.* 2015; 1(3): 37-48.
5. Saatman KE, Duhaime AC, Bullock R, Maas AIR, Valadka A, Manley GT, et al. Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. *J Neurotrauma.* 2008; 25(7): 719-738. doi: 10.1089/neu.2008.0586
6. Schimmel SJ, Acosta S, Lozano D. Neuroinflammation in traumatic brain injury: A chronic response to an acute injury. *Brain Circ.* 2017; 3(3): 135-142. doi: 10.4103/bc.bc_18_17
7. Ladak AA, Enam SA, Ibrahim MT. A Review of the molecular mechanisms of traumatic brain injury. *World Neurosurg.* 2019; 131: 126-132. doi: 10.1016/j.wneu.2019.07.039
8. Sahel DK, Kaira M, Raj K, Sharma S, Singh S. Mitochondrial dysfunctioning and neuroinflammation: recent highlights on the possible mechanisms involved in traumatic brain injury. *Neurosci Lett.* 2019; 710: 134347. doi: 10.1016/j.neulet.2019.134347
9. Nasr IW, Chun Y, Kannan S. Neuroimmune responses in the developing brain following traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 2019; 320: 112957. doi: 10.1016/j.expneurol.2019.112957
10. Needham EJ, Helmy A, Zanier ER, Jones JL, Coles AJ, Menon DK. The immunological response to traumatic brain injury. *J Neuroimmunol.* 2019; 332: 112-125. doi: 10.1016/j.jneuroim.2019.04.005
11. Pearn ML, Niesman IR, Egawa J, Sawada A, Almenar-Queralt A, Shah SB, et al. Pathophysiology associated with traumatic brain injury: current treatments and potential novel therapeutics. *Cell Mol Neurobiol.* 2017; 37(4): 571-585. doi: 10.1007/s10571-016-0400-1
12. Russo MV, McGavern DB. Inflammatory neuroprotection following traumatic brain injury. *Science.* 2016; 353(6301): 783-755. doi: 10.1126/science.aaf6260
13. Dinet V, Petry KG, Badaut J. Brain-immune interactions and neuroinflammation after traumatic brain injury. *Front Neurosci.* 2019; 13: 1178. doi: 10.3389/fnins.2019.01178
14. Casault C, Al Sultan AS, Banoei M, Couillard P, Kramer A, Winston BW. Cytokine responses in severe traumatic brain injury: where there is smoke, is there fire? *Neurocrit Care.* 2019; 30(1): 22-32. doi: 10.1007/s12028-018-0522-z
15. Rodney T, Osier N, Gill J. Pro- and anti-inflammatory biomarkers and traumatic brain injury outcomes: A review. *Cytokine.* 2018; 110: 248-256. doi: 10.1016/j.cyto.2018.01.012
16. 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; 6(4): 37. doi: 10.3390/diagnostics6040037
17. Yang DB, Yu WH, Dong XQ, Zhang ZY, Du Q, Zhu Q, et al. Serum macrophage migration inhibitory factor concentrations correlate with prognosis of traumatic brain injury. *Clin Chim Acta.* 2017; 469: 99-104. doi: 10.1016/j.cca.2017.03.030
18. Feng MJ, Ning W Bin, Wang W, Lv ZH, Liu XB, Zhu Y, et al. Serum S100A12 as a prognostic biomarker of severe traumatic brain injury. *Clin Chim Acta.* 2018; 480: 84-91. doi: 10.1016/j.cca.2018.01.044
19. Di Battista AP, Rhind SG, Hutchison MG, Hassan S, Shiu MY, Inaba K, et al. Inflammatory cytokine and chemokine profiles are associated with patient outcome and the hyperadrenergic state following acute brain injury. *J Neuroinflammation.* 2016; 13: 40. doi: 10.1186/s12974-016-0500-3
20. Lagerstedt L, Egea-Guerrero JJ, Rodríguez-Rodríguez A, Bustamante A, Montaner J, El Rahal A, et al. Early measurement of interleukin-10 predicts the absence of CT scan lesions in mild traumatic brain injury. *PLoS One.* 2018; 13(2): e0193278. doi: 10.1371/journal.pone.0193278
21. Banoei MM, Casault C, Metwaly SM, Winston BW. Metabolics and biomarker discovery in traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2018; 35(16): 1831-1848. doi: 10.1089/neu.2017.5326
22. Anada RP, Wong KT, Jayapalan JJ, Hashim OH, Ganesan D. Panel of serum protein biomarkers to grade the severity of traumatic brain injury. *Electrophoresis.* 2018; 39(18): 2308-2315. doi: 10.1002/elps.201700407
23. Huie JR, Diaz-Arrastia R, Yue JK, Sorani MD, Puccio AM, Okonkwo DO, et al. Testing a multivariate proteomic panel for traumatic brain injury biomarker discovery: a TRACK-TBI pilot study. *J Neurotrauma.* 2019; 36(1): 100-110. doi: 10.1089/neu.2017.5449
24. Corrigan F, Mander KA, Leonard AV, Vink R. Neurogenic inflammation after traumatic brain injury and its potentiation of classical inflammation. *J Neuroinflammation.* 2016; 13(1): 264. doi: 10.1186/s12974-016-0738-9
25. Vink R, Gabrielian L, Thornton E. The role of substance P in secondary pathophysiology after traumatic brain injury. *Front Neurol.* 2017; 8: 304. doi: 10.3389/fneur.2017.00304
26. Jassam YN, Izzy S, Whalen M, McGavern DB, El Khoury J. Neuroimmunology of traumatic brain injury: time for a paradigm shift. *Neuron.* 2017; 95(6): 1246-1265. doi: 10.1016/j.neuron.2017.07.010

REFERENCES

1. Menon DK, Schwab K, Wright DW, Maas AI, et al. Position statement: definition of traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 2010; 91(11): 1637-1640. doi: 10.1016/j.apmr.2010.05.017
2. Yilmaz C, Karali K, Fodelianaki G, Gravanis A, Chavakis T, Charalampopoulos I, et al. Neurosteroids as regulators of neuroinflammation. *Front Neuroendocrinol.* 2019; 55: 100788. doi: 10.1016/j.yfrne.2019.100788
3. Ministry of Health of the Russian Federation. *Socially significant diseases of the Russian population in 2018 (statistical materials)*. М.; 2019. (In Russ.)
4. Lichterman L.B. Classification of cranial trauma. *Sudebnaya meditsina.* 2015; 1(3): 37-48. (In Russ.)
5. Saatman KE, Duhaime AC, Bullock R, Maas AIR, Valadka A, Manley GT, et al. Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. *J Neurotrauma.* 2008; 25(7): 719-738. doi: 10.1089/neu.2008.0586
6. Schimmel SJ, Acosta S, Lozano D. Neuroinflammation intraumatic brain injury: A chronic response to an acute injury. *Brain Circ.* 2017; 3(3): 135-142. doi: 10.4103/bc.bc_18_17
7. Ladak AA, Enam SA, Ibrahim MT. A Review of the molecular mechanisms of traumatic brain injury. *World Neurosurg.* 2019; 131: 126-132. doi: 10.1016/j.wneu.2019.07.039
8. Sahel DK, Kaira M, Raj K, Sharma S, Singh S. Mitochondrial dysfunctioning and neuroinflammation: recent highlights on the possible mechanisms involved in traumatic brain injury. *Neurosci Lett.* 2019; 710: 134347. doi: 10.1016/j.neulet.2019.134347
9. Nasr IW, Chun Y, Kannan S. Neuroimmune responses in the developing brain following traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 2019; 320: 112957. doi: 10.1016/j.expneurol.2019.112957
10. Needham EJ, Helmy A, Zanier ER, Jones JL, Coles AJ, Menon DK. The immunological response to traumatic brain injury. *J Neuroimmunol.* 2019; 332: 112-125. doi: 10.1016/j.jneuroim.2019.04.005
11. Pearn ML, Niesman IR, Egawa J, Sawada A, Almenar-Queralt A, Shah SB, et al. Pathophysiology associated with traumatic brain injury: current treatments and potential novel therapeutics. *Cell Mol Neurobiol.* 2017; 37(4): 571-585. doi: 10.1007/s10571-016-0400-1
12. Russo MV, McGavern DB. Inflammatory neuroprotection following traumatic brain injury. *Science.* 2016; 353(6301): 783-755. doi: 10.1126/science.aaf6260

13. Dinet V, Petry KG, Badaut J. Brain-immune interactions and neuroinflammation after traumatic brain injury. *Front Neurosci*. 2019; 13: 1178. doi: 10.3389/fnins.2019.01178
14. Casault C, Al Sultan AS, Banoei M, Couillard P, Kramer A, Winston BW. Cytokine responses in severe traumatic brain injury: where there is smoke, is there fire? *Neurocrit Care*. 2019; 30(1): 22-32. doi: 10.1007/s12028-018-0522-z
15. Rodney T, Osier N, Gill J. Pro- and anti-inflammatory biomarkers and traumatic brain injury outcomes: A review. *Cytokine*. 2018; 110: 248-256. doi: 10.1016/j.cyto.2018.01.012
16. 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; 6(4): 37. doi: 10.3390/diagnostics6040037
17. Yang DB, Yu WH, Dong XQ, Zhang ZY, Du Q, Zhu Q, et al. Serum macrophage migration inhibitory factor concentrations correlate with prognosis of traumatic brain injury. *Clin Chim Acta*. 2017; 469: 99-104. doi: 10.1016/j.cca.2017.03.030
18. Feng MJ, Ning W Bin, Wang W, Lv ZH, Liu XB, Zhu Y, et al. Serum S100A12 as a prognostic biomarker of severe traumatic brain injury. *Clin Chim Acta*. 2018; 480: 84-91. doi: 10.1016/j.cca.2018.01.044
19. Di Battista AP, Rhind SG, Hutchison MG, Hassan S, Shiu MY, Inaba K, et al. Inflammatory cytokine and chemokine profiles are associated with patient outcome and the hyperadrenergic state following acute brain injury. *J Neuroinflammation*. 2016; 13: 40. doi: 10.1186/s12974-016-0500-3
20. Lagerstedt L, Egea-Guerrero JJ, Rodríguez-Rodríguez A, Bustamante A, Montaner J, El Rahal A, et al. Early measurement of interleukin-10 predicts the absence of CT scan lesions in mild traumatic brain injury. *PLoS One*. 2018; 13(2): e0193278. doi: 10.1371/journal.pone.0193278
21. Banoei MM, Casault C, Metwaly SM, Winston BW. Metabolomics and biomarker discovery in traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2018; 35(16): 1831-1848. doi: 10.1089/neu.2017.5326
22. Anada RP, Wong KT, Jayapalan JJ, Hashim OH, Ganesan D. Panel of serum protein biomarkers to grade the severity of traumatic brain injury. *Electrophoresis*. 2018; 39(18): 2308-2315. doi: 10.1002/elps.201700407
23. Huie JR, Diaz-Arrastia R, Yue JK, Sorani MD, Puccio AM, Okonkwo DO, et al. Testing a multivariate proteomic panel for traumatic brain injury biomarker discovery: a TRACK-TBI pilot study. *J Neurotrauma*. 2019; 36(1): 100-110. doi: 10.1089/neu.2017.5449
24. Corrigan F, Mander KA, Leonard AV, Vink R. Neurogenic inflammation after traumatic brain injury and its potentiation of classical inflammation. *J Neuroinflammation*. 2016; 13(1): 264. doi: 10.1186/s12974-016-0738-9
25. Vink R, Gabrielian L, Thornton E. The role of substance P in secondary pathophysiology after traumatic brain injury. *Front Neurol*. 2017; 8: 304. doi: 10.3389/fneur.2017.00304
26. Jassam YN, Izzy S, Whalen M, McGavern DB, El Khoury J. Neuroimmunology of traumatic brain injury: time for a paradigm shift. *Neuron*. 2017; 95(6): 1246-1265. doi: 10.1016/j.neuron.2017.07.010

Сведения об авторах

Зудова Алевтина Игоревна – студентка, Институт естественных наук и математики Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, e-mail: tina.zudova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0086-1201>

Сухоросова Анна Георгиевна – студентка, Институт естественных наук и математики Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, e-mail: suhorosovaa@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9850-9387>

Соломатина Лилия Владимировна – кандидат медицинских наук, старший преподаватель кафедры медицинской биохимии и биофизики, Институт естественных наук и математики Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, e-mail: slv10@list.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4900-5019>

Information about the authors

Alevtina I. Zudova – Student, Institute of Natural Sciences and Mathematics, Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, e-mail: tina.zudova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0086-1201>

Anna G. Sukhorosova – Student, Institute of Natural Sciences and Mathematics, Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, e-mail: suhorosovaa@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9850-9387>

Liliya V. Solomatina – Cand. Sc. (Med.), Senior Lecturer of the Department of Medical Biochemistry and Biophysics of the Institute of Natural Sciences and Mathematics, Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, e-mail: slv10@list.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4900-5019>

Статья получена: 10.06.2020. Статья принята: 02.09.2020. Статья опубликована: 26.10.2020.

Received: 10.06.2020. Accepted: 02.09.2020. Published: 26.10.2020.