

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.137.140>**ПОЛИМОРФИЗМ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ – TLR4 (ASP299GLY) И TLR6 (SER249PRO) У ПАЦИЕНТОВ С ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ**

Научная статья

**Байке Е.Е.<sup>1,\*</sup>, Богодухова Е.С.<sup>2</sup>, Байке Д.Е.<sup>3</sup>**<sup>1</sup> ORCID : 0000-0003-1813-785X;<sup>1, 2, 3</sup> Читинская государственная медицинская академия, Чита, Российская Федерация

\* Корреспондирующий автор (eugenij.bee[at]mail.ru)

**Аннотация**

В данной статье исследуется влияние полиморфизма генов TLR4 (*Asp299Gly*) и TLR6 (*Ser249Pro*) на течение туберкулезного процесса в легких. Группа больных – 120 пациентов обоих полов, популяционный контроль – 30 людей. Материал – ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической венозной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь» (ООО НТП «Литех», г. Москва). В настоящем исследовании у большинства пациентов с туберкулезом нами выявлено носительство ассоциированных с развитием заболевания полиморфизмов генов Toll - подобных рецепторов по «высокопродуцирующему» аллелю генотипа *Asp/Asp* гена TLR 4 (*Asp299Gly*), *Ser/Ser* гена TLR 6 (*Ser249Pro*) и гетерозиготного *Asp/Gly* гена TLR 4 (*Asp299Gly*), а так же мутантного полиморфизма *Pro/Pro* гена TLR 6 (*Ser249Pro*).

**Ключевые слова:** TOLL – подобные рецепторы, туберкулез, генетический полиморфизм.**POLYMORPHISM OF TOLL-LIKE RECEPTORS – TLR4 (ASP299GLY) AND TLR6 (SER249PRO) IN PATIENTS WITH LUNG TUBERCULOSIS**

Research article

**Baike E.E.<sup>1,\*</sup>, Bogodukhova Y.S.<sup>2</sup>, Bayke D.Y.<sup>3</sup>**<sup>1</sup> ORCID : 0000-0003-1813-785X;<sup>1, 2, 3</sup> Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation

\* Corresponding author (eugenij.bee[at]mail.ru)

**Abstract**

This article studies the influence of polymorphism of TLR4 (*Asp299Gly*) and TLR6 (*Ser249Pro*) genes on the course of tuberculosis process in the lungs. Patient group – 120 patients of both sexes, population control – 30 people. Material – DNA isolated from leukocytes of peripheral venous blood using the reagent "DNA-express-blood" (LLC NTP "Litech", Moscow). In the present study, in the majority of patients with tuberculosis, we revealed the carriage of Toll-like receptor polymorphisms associated with the development of the disease in the "high-producing" allele of the *Asp/Asp* genotype of the TLR 4 gene (*Asp299Gly*), *Ser/Ser* of TLR 6 gene (*Ser249Pro*) and heterozygous *Asp/Gly* of TLR 4 gene (*Asp299Gly*), as well as mutant polymorphism *Pro/Pro* of TLR 6 gene (*Ser249Pro*).

**Keywords:** TOLL-like receptors, tuberculosis, genetic polymorphism.**Введение**

Туберкулез (ТБ) – относится к категории особо опасных инфекционных заболеваний и уносит ежедневно жизни более 4500 тысяч человек по всему земному шару. Наиболее подвержены заражению лица, испытывающие социально-экономические трудности, работающие и проживающие в условиях высокого риска инфицирования, малоимущие и обездоленные граждане. На территории Российской Федерации в последние несколько лет отмечается тенденция к снижению уровня заболеваемости, распространенности, смертности и инвалидизации населения от туберкулеза [1, С. 15-16]. Кроме того, туберкулез, в большинстве случаев, развивается на фоне сниженного иммунологического ответа организма, и, при отсутствии адекватной химиотерапии, приводит к утяжелению и хронизации воспалительного процесса, что усугубляет дальнейшее снижение местного и системного иммунитета [2, С. 15].

Врожденный иммунитет является первой линией защиты восприимчивого организма от инфекционных агентов [3, С. 148]. Распознавание патогенов происходит через многочисленные рецепторные структуры. Особую группу рецепторов составляют «паттерн – распознающие рецепторы» (PRRs) (от англ. Pattern – recognition receptor) [4, С. 2].

Одним из наиболее значимых представителей семейства PRRs считаются Toll – подобные рецепторы, функции и экспрессия которых очень широко изучается как в норме, так и в патологии [5, С. 14].

Толл – подобные рецепторы (англ. Toll – like receptor, TLR) – класс клеточных рецепторов с одним трансмембранным компонентом, который распознает составные части бактерий и активирует клеточный иммунитет, в итоге эти рецепторы выполняют главную роль в первичном иммунном ответе [6, С. 98].

В настоящее время идентифицированы 13 представителей семейства TLR, среди которых TLR 1-9 – выявляются у мышей и человека, TLR 10 - только у человека, TLR 11, 12, 13, только у мышей [2], [5]. В качестве факторов транскрипции выступают консервативные структуры многих патогенов, липотейхоевые и маннуроновые кислоты, липополисахарид (LPS), липопротеиды, пептидогликаны, флагеллин и др. [6, С. 101]. Под действием эндогенных лигандов наблюдается гиперактивация TLRs, что может приводить к развитию чрезмерного воспалительного ответа,

сопровождается повреждением тканей, что может рассматриваться как один из основных звеньев иммунопатогенеза многих патологий [7, С. 225].

Учитывая вышесказанное, в настоящее время нам кажутся перспективными исследования о функционировании системы Toll – подобных рецепторов, а так же влияние полиморфизмов генов человека на этиопатогенез туберкулеза.

### Методы и принципы исследования

Цель исследования: изучить влияние полиморфизма генов *TLR4 (Asp299Gly)* и *TLR6 (Ser249Pro)* на течение туберкулезного процесса в легких. В работе приведены данные результатов комплексного изучения 120 пациентов с установленным диагнозом «Туберкулез органов дыхания» состоящих на учете у фтизиатра в период 2014-2015 гг.

Критериями включения явились наличие подтвержденного диагноза туберкулеза органов дыхания. Критериями исключения послужили: больные с неустановленным диагнозом туберкулеза, с тяжелой коморбидной патологией (сахарный диабет обоих типов, опухоли легких).

Контрольную группу составили 30 исследуемых в возрасте  $38,5 \pm 3,5$  лет никогда не болевших туберкулезом и не состоящих на учете в фтизиопульмонологическом центре. Все исследуемые – жители Забайкалья, сопоставимы по возрасту и полу.

Всеми участниками подписано информированное согласие на включение в исследование № 69/2014 от 24 декабря 2014 года, которое было одобрено на заседании этического комитета ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия».

Молекулярно-генетическое исследование проведено в НИИ Молекулярной медицины ЧГМА. В качестве биологического материала для исследования полиморфных маркеров использовали цельную кровь. Определение полиморфизма генов *TLR4 Asp299Gly (rs4986790, A896G)*, *TLR6 Ser249Pro (rs5743794, C745T)* осуществлялось методом ПЦР с использованием праймеров ООО «Литех» (г. Москва). Анализ подвергалась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь», затем проводилась реакция амплификации с двумя парами аллель-специфичных праймеров.

Этап: цельная кровь с ЭДТА (антикоагулянт ЭДТА К3 / ЭДТА К2) центрифугировалась, после удалялась плазма, форменные элементы замораживались при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Затем содержимое пробирки размораживалось при комнатной температуре, и добавлялся реактив «ДНК-экспресс-кровь» равный по объему количеству форменных элементов в пробирке. Содержимое пробирки тщательно перемешивалось в течение 10 сек, и пробирка устанавливалась в предварительно прогретый до  $98^{\circ}\text{C}$  термостат на 10 мин. Затем центрифугировалась со скоростью 8000-12000 об/мин в течение 15 мин. Полученный супернатант использовали в качестве образца ДНК.

1 этап: Из компонентов комплекта готовили рабочие смеси с реакционной смесью норма и патология. После приготовления смеси разносили по 20 мкл в соответствующие пробирки и добавляли по 5 мкл супернатанта. Содержимое пробирок центрифугировали со скоростью 15003000 об/мин 3-5 сек и устанавливали в подогретый до  $+94^{\circ}\text{C}$  программируемый термостат.

2 этап: Разделение продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза.

3 этап: Разделение продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза.

4 этап: Анализ результатов. Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся полос (рис. 1).

Результаты анализа позволили дать три типа заключений: нормальная гомозигота, гетерозигота, мутантная гомозигота.

Распределение генотипов по исследуемым полиморфным локусам сравнивали на соответствие равновесию Харди - Вайнберга. Сравнение частот распределения генотипов в группах исследования проводили с помощью критерия  $\chi^2$  (Пирсона) с поправкой Йейтса на непрерывность с использованием 4-польной таблицы сопряженности; если ожидаемых явлений в одной из ячеек было меньше 5, применяли точный критерий Фишера. Для оценки ассоциации изучаемых полиморфных вариантов генов с риском развития туберкулеза рассчитывали отношение шансов (Odds Ratio – OR) с доверительным интервалом 95%, причем  $\text{OR}=1$  трактовали как «отсутствие ассоциаций»;  $\text{OR}>1$  – как «положительную ассоциацию»,  $\text{OR}<1$  – как «отрицательную ассоциацию» генотипа с туберкулезом. Математическую обработку полученных результатов проводили методами непараметрической статистики на персональном компьютере при помощи Statistica 10 и с использованием online-калькулятора (<http://gen-exp.ru/calculatoror.php>).

### Основные результаты

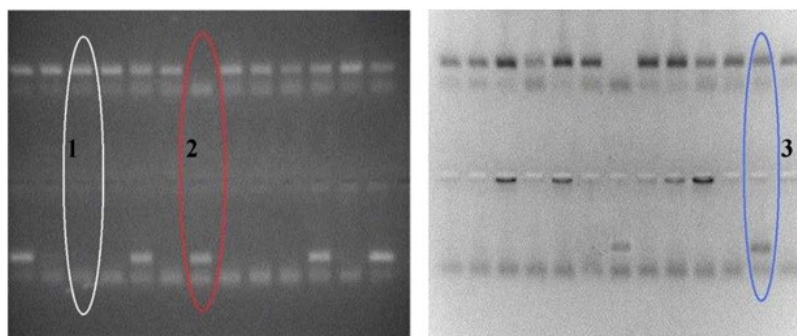


Рисунок 1 - Электрофореграммы продуктов амплификации (позитив и негатив):

1 - нормальная гомозигота; 2 - гетерозигота; 3 - мутантная гомозигота

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.137.140.1>

В процессе исследования обнаружены все искомые аллели в гомо- и гетерозиготном состоянии. Распределение SNP (single nucleotide polymorphism) генов в исследованных группах соответствовало закону Харди-Вайнберга. Полиморфизм гена TLR 4 (*Asp299Gly*) по гомозиготному варианту генотипа *Asp/Asp*, в группе больных туберкулезом был в 20,9 раза ниже по сравнению с его частотой в контроле. Однако, носители гетерозиготного *Asp/Gly* исследуемого гена в группе здоровых реципиентов встречались на 18,4% чаще, чем обладатели этого же генотипа среди больных (табл.1).

Таблица 1 - Частота распределения генотипов гена TLR 4 (*Asp299Gly*) у больных туберкулезом органов дыхания и группе контроля

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.137.140.2>

Полимо рфизм генов	Больные туберкулезом n = 120		Здоровые доноры n = 30		x <sup>2</sup>	p	OR <sub>1</sub>	CI 95%
	Абс.	%	Абс.	%				
<i>Asp/Asp</i>	91*	75,8*	29	96,7	6,510	0,009	0,108	0,014- 0,830
<i>Asp/Gly</i>	26*	21,7*	1	3,3	5,273	0,009	9,242	1,205- 70,851
<i>Gly/Gly</i>	3	2,50	0	0	0	0	0	0

Примечание: \* - уровень значимости по сравнению с группой здоровых доноров ( $p < 0,05$ )

Ген TLR4(CD284) расположен на хромосоме 9q32-33, экспрессируется как внутриклеточно, так и экстраклеточно, запускает иммунный ответ по MyD88-независимому пути. Полиморфный маркер *Asp299Gly* гена TLR4 представляет собой однонуклеотидную замену А → G в положении +896 в экзоне 3, приводящую к аминокислотной замене аспарагиновой кислоты на глицин в положении 299 полипептидной цепи во внеклеточном домене рецептора. Выявлено, что полиморфизм *Asp299Gly* гена TLR4 тесно связан с развитием гематогенного остеомиелита и системного кандидоза, бактериальных инфекций, передающихся половым путем, респираторно-синцитиальной инфекции у детей младшего возраста и новорожденных, 26 сепсиса, вызванного грамотрицательными бактериями, атопической патологии [8, С. 78]. Vidyant S. et al. (2018) показали, что полиморфизм гена TLR4 (*Asp299Gly*) является фактором риска восприимчивости к ВИЧ-1, тогда как между полиморфизмом *Thr399Ile* и ВИЧ-инфекцией не обнаружено никакой связи [9, С. 4].

При анализе распределения частоты генотипов полиморфизма гена TLR 6 (*Ser249Pro*) у пациентов с туберкулезом выявлено снижение количества гетерозиготного генотипа *Ser/Pro* (в 4,2 раза) и увеличение числа носителей гомозиготного генотипа *Ser/Ser* (в 21,7 раза) по сравнению с таковыми в контрольной группе.

Гомозиготный вариант генотипа по мутантному полиморфизму *Pro/Pro* гена TLR 6 обнаруживался у 15 больных туберкулезом (12,5% исследуемых) соответственно (табл. 2).

Таблица 2 - Частота распределения генотипов гена TLR6 (*Ser249Pro*) у больных туберкулезом органов дыхания и группе контроля

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.137.140.3>

Полимо рфизм генов	Больные туберкулезом n = 120		Здоровые доноры n = 30		x <sup>2</sup>	p	OR <sub>1</sub>	CI 95%
	Абс.	%	Абс.	%				
<i>Ser/Ser</i>	62*	51,7*	9	30,0	4,520	0,041	2,494	1,056- 5,889
<i>Ser/Pro</i>	43	35,8	12	40,0	0,179	0,677	0,730	0,369- 1,902
<i>Pro/Pro</i>	15*	12,5*	9	30	5,469	0,026	0,333	0,129- 0,862

Примечание: \* - уровень значимости по сравнению с группой здоровых доноров ( $p < 0,05$ )

Полученные данные согласуются с расчетами отношения шансов, которое свидетельствует в пользу того, что носительство гетерозиготного варианта *Asp/Gly* гена TLR 4 (*Asp299Gly*) (OR=9,942 [95% CI: 1,205 – 70,851]) и

гомозиготного генотипа *Ser/Ser* полиморфизма гена TLR 6 (*Ser249Pro*)(OR=2,494 [95% CI: 1,056 – 5,889]) могут быть ассоциированы с развитием туберкулеза органов дыхания и рассматриваются как факторы риска развития заболевания (табл. 1).

Ген TLR6(CD286) локализован в хромосоме 4p13, по данным исследователей из Кореи с ишемическим инсультом ассоциированы некоторые SNP в гене TLR6 (*Ser249Pro*) в корейской нации, так же предполагают, что они влияют на тяжесть инсульта [10].

По результатам расчета критериев Крамера ( $V$ ) и критерия Чупрова ( $K$ ) выявлено, что наличие у жителей Забайкальского края гомозиготного генотипа *Asp/Asp* гена TLR 4 (*Asp299Gly*)( $\varphi=0,2$ ), полиморфизма *Ser/Ser* гена TLR 6 (*Ser249Pro*) ( $\varphi=0,1$ ) и гетерозиготного *Asp/Gly* гена TLR 4 (*Asp299Gly*) ( $\varphi=0,3$ ) и мутантного полиморфизма *Pro/Pro* гена TLR6 (*Ser249Pro*) связано с риском развития туберкулеза, так как является фактором предрасположенности к болезни (табл. 3).

Таблица 3 - Критерии оценки силы связи между фактором риска и исходом

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.137.140.4>

Полиморфизм генов генотипы	Наименование критерия Критерий $\varphi$ Критерий $V$ Крамера* Критерий $K$ Чупрова**	Сила связи
TLR4 ( <i>Asp299Gly</i> )		
<i>Asp/Asp</i>	0,208	Средняя
<i>Asp/Gly</i>	0,208	Средняя
TLR 6 ( <i>Ser249Pro</i> )		
<i>Ser/Ser</i>	0,174	Слабая
<i>Ser/Pro</i>	0,035	Несущественная
<i>Pro/Pro</i>	0,191	Слабая

Примечание: \* - интерпретация полученных значений статистических критериев согласно рекомендациям Rea&Parker; \*\* - для четырехпольной таблицы, используемой в данном калькуляторе, все три критерия ( $\varphi$ , Крамера, Чупрова) принимают одно и то же значение

### Заключение

В настоящем исследовании у большинства пациентов с туберкулезом нами выявлено носительство ассоциированных с развитием заболевания полиморфизмов генов Toll-подобных рецепторов по «высокопродукующему» аллелю генотипа *Asp/Asp* гена TLR 4 (*Asp299Gly*), *Ser/Ser* гена TLR 6 (*Ser249Pro*) и гетерозиготного *Asp/Gly* гена TLR 4 (*Asp299Gly*), а так же мутантного полиморфизма *Pro/Pro* гена TLR 6 (*Ser249Pro*).

Результаты исследования показывают, что индивидуальное носительство различных вариантов полиморфизмов генов TLR оказывает влияние на характер течения патологического процесса в легочной ткани, что в будущем, вероятно, позволит прогнозировать тяжесть течения и исход заболевания.

### Конфликт интересов

Не указан.

### Рецензия

Сообщество рецензентов Международного научно-исследовательского журнала

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.137.140.5>

### Conflict of Interest

None declared.

### Review

International Research Journal Reviewers Community

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.137.140.5>

### Список литературы / References

1. Нечаева О.Б. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в России / О.Б. Нечаева // Туберкулёз и болезни лёгких. — 2018. — 8. — с. 15-24. DOI: 10.21292/2075-1230-2018-96-8-15-24.
2. Богодухова Е.С. Полиморфизм генов Toll-подобных рецепторов как возможный фактор предрасположенности к развитию туберкулеза / Е.С. Богодухова, Е.Е. Байке // Туберкулёз и болезни лёгких. — 2018. — 9. — с. 11-16. DOI: 10.21292/2075-1230-2018-96-9-11-16.
3. Ковальчук Л.В. Роль Toll-подобных рецепторов в патогенезе инфекционных заболеваний человека / Л.В. Ковальчук, О.А. Свитич, Л. В. Ганковская, А. М. Мироншиченкова, В. А. Ганковский // Человек и его здоровье. — 2012. — 2. — с. 147-153.
4. Takeda K. Toll-like receptors in innate immunity / K. Takeda, S. Akira // International Immunology. — 2005. — 1. — p. 1-14. DOI: 10.1093/intimm/dxh186.

5. Крохалева Ю.А. Генетический полиморфизм TOLL - рецепторов у больных ишемическим инсультом в Забайкальском крае / Ю.А. Крохалева, Н.Н. Страмбовская, А.Е. Алферова // Забайкальский медицинский вестник. — 2014. — №4. — URL: <http://zabmedvestnik.ru/arhiv-nomerov/nomer-4-za-2014-god/geneticheskij-polimorfizm-toll-receptorov-u-bolnyh-ishemicheskim-insultom-v-zabajkalskom-krae> (дата обращения: 20.09.2023)
6. Kawasaki T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways / T. Kawasaki, T. Kawai // *Frontiers in Immunology*. — 2014. — 5. — p. 461. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00461.
7. Кетлинский, С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев — Санкт-Петербург: Фолиант, 2008. — 552 с.
8. Барбараш О. Л. Роль полиморфизма генов Toll-подобных рецепторов в развитии осложнений атеросклероза / О. Л. Барбараш, А. С. Головкин, А. В. Понасенко, А. Г. Кутихин, И. И. Жидкова // *Российский кардиологический журнал*. — 2015. — 12. — с. 72-79. DOI: 10.15829/1560-4071-2015-12-72-79.
9. Vidyant S. A single-nucleotide polymorphism in TLR4 is linked with the risk of HIV-1 infection / S. Vidyant, A. Chatterjee, T.N. Dhole // *Br. J. Biomed.* — 2019. — 76. — p. 59-63. DOI: 10.1080/09674845.2018.1559486.
10. Lutz H. Association of a common TLR-6 polymorphism with coronary artery disease – implications for healthy ageing? / H. Lutz, A. Koch, S. Sur, N. Hoefer, C. Glaeser, S. Schulz. — 2013. — №43. — URL: <https://immunityageing.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-4933-10-43> (accessed: 20.09.2023) DOI: 10.1186/1742-4933-10-43.

### Список литературы на английском языке / References in English

1. Nechaeva O.B. Epidemicheskaja situatsija po tuberkulezu v Rossii [TB situation in Russia] / O.B. Nechaeva // *Tuberculosis and Lung Diseases*. — 2018. — 8. — p. 15-24. DOI: 10.21292/2075-1230-2018-96-8-15-24. [in Russian]
2. Bogoduhova E.S. Polimorfizm genov Toll-podobnyh retseptorov kak vozmozhnyj faktor predispozitsionnosti k razvitiyu tuberkuleza [Polymorphism of genes of Toll-like receptors as a potential factor of predisposition to tuberculosis] / E.S. Bogoduhova, E.E. Bajke // *Tuberculosis and Lung Diseases*. — 2018. — 9. — p. 11-16. DOI: 10.21292/2075-1230-2018-96-9-11-16. [in Russian]
3. Koval'chuk L.V. Rol' Toll-podobnyh retseptorov v patogeneze infektsionnyh zabolevanij cheloveka [The role Toll-like receptors in pathogenesis of human infections Man and his health] / L.V. Koval'chuk, O.A. Svitich, L. V. Gankovskaja, A. M. Mironshchenkova, V. A. Gankovskij // *Man and his health*. — 2012. — 2. — p. 147-153. [in Russian]
4. Takeda K. Toll-like receptors in innate immunity / K. Takeda, S. Akira // *International Immunology*. — 2005. — 1. — p. 1-14. DOI: 10.1093/intimm/dxh186.
5. Krohaleva Ju.A. Geneticheskij polimorfizm TOLL - retseptorov u bol'nyh ishemicheskim insultom v Zabajkal'skom krae [Genetic polymorphism of TOLL receptors in patients with ischemic stroke in zabaykalsky krai] / Ju.A. Krohaleva, N.N. Strambovskaja, A.E. Alferova // *Transbaikalian Medical Bulletin*. — 2014. — №4. — URL: <http://zabmedvestnik.ru/arhiv-nomerov/nomer-4-za-2014-god/geneticheskij-polimorfizm-toll-receptorov-u-bolnyh-ishemicheskim-insultom-v-zabajkalskom-krae> (accessed: 20.09.2023) [in Russian]
6. Kawasaki T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways / T. Kawasaki, T. Kawai // *Frontiers in Immunology*. — 2014. — 5. — p. 461. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00461.
7. Ketlinskij, S.A. Tsitokiny [Cytokines] / S.A. Ketlinskij, A.S. Simbirtsev — Sankt-Peterburg: Foliant, 2008. — 552 p. [in Russian]
8. Barbarash O. L. Rol' polimorfizma genov Toll-podobnyh retseptorov v razvitii oslozhnenij ateroskleroza [The role of polymorphism of Toll-like receptor genes in the development of atherosclerosis complications] / O. L. Barbarash, A. S. Golovkin, A. V. Ponasenko, A. G. Kutihin, I. I. Zhidkova // *Russian Journal of Cardiology*. — 2015. — 12. — p. 72-79. DOI: 10.15829/1560-4071-2015-12-72-79. [in Russian]
9. Vidyant S. A single-nucleotide polymorphism in TLR4 is linked with the risk of HIV-1 infection / S. Vidyant, A. Chatterjee, T.N. Dhole // *Br. J. Biomed.* — 2019. — 76. — p. 59-63. DOI: 10.1080/09674845.2018.1559486.
10. Lutz H. Association of a common TLR-6 polymorphism with coronary artery disease – implications for healthy ageing? / H. Lutz, A. Koch, S. Sur, N. Hoefer, C. Glaeser, S. Schulz. — 2013. — №43. — URL: <https://immunityageing.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-4933-10-43> (accessed: 20.09.2023) DOI: 10.1186/1742-4933-10-43.