

ДИНАМИКА УРОВНЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК ПРИ ХИМИОЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ЛИМФОМЫ ХОДЖКИНА

Мушкарina Т.Ю.¹, Кузьмина Е.Г.¹, Гривцова Л.Ю.¹, Богатырева Т.И.¹,
Иванов С.А.^{1, 2}, Каприн А.Д.^{2, 3, 4}

¹ Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия

⁴ Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии», Минздрава России, Москва, Россия

Аннотация

Введение: Лимфома Ходжкина (ЛХ) – распространённое злокачественное заболевание лимфатической системы, характеризующееся сложным опухолевым микроокружением, где регуляторные Т-клетки (Treg) играют ключевую роль в индукции иммуносупрессии. **Цель:** изучение динамики циркулирующих Treg-клеток в ответ на химиолучевую терапию ЛХ. **Материалы и методы:** В исследование включены следующие категории пациентов: 37 первичных пациентов с ЛХ; 9 пациентов, получавших химиотерапию по схемам ABVD/BEACOPP; и 10 пациентов, которым проводилась последующая консолидирующая лучевая терапия. Процентное содержание Treg-клеток (CD45+CD4+CD25+CD127low/-) определено методом многоцветной проточной цитометрии в ходе химиолучевой терапии ЛХ. Контрольную группу составили 40 практически здоровых людей. Статистическая обработка данных проведена с использованием U-критерия Манна-Уитни программе «STATISTICA 8.0». **Результаты:** Исходно у пациентов с ЛХ выявлено статистически значимое 1,5-кратное повышение относительного уровня Treg-клеток по сравнению с контрольной группой ($5,71 \pm 2,26\%$ против $3,69 \pm 1,89\%$, $p < 0,05$), при сохранении абсолютного числа в пределах нормы ($0,027 \pm 0,023 \cdot 10^9$ кл/л против $0,031 \pm 0,017 \cdot 10^9$ кл/л, $p > 0,05$). После химиотерапии относительный уровень Treg-клеток статистически значимо увеличился ($9,09 \pm 2,34$, $p < 0,05$), в то время как их абсолютное количество существенно не изменилось ($0,037 \pm 0,019 \cdot 10^9$ кл/л, $p > 0,05$), что указывает на высокую устойчивость к использованным химиотерапевтическим препаратам. Консолидирующая лучевая терапия привела к статистически значимому снижению абсолютного количества Treg-клеток (в 1,9 раза, $0,019 \pm 0,010 \cdot 10^9$ кл/л, $p < 0,05$) при стабильном высоком относительном уровне ($9,13 \pm 4,03\%$, $p > 0,05$), демонстрируя их большую чувствительность к облучению по сравнению с химиотерапией. **Заключение:** Циркулирующие Treg-клетки играют значимую роль в патогенезе ЛХ. Выявленная устойчивость Treg-клеток к химиотерапии и их относительная устойчивость к консолидирующей лучевой терапии имеют важное значение для оптимизации лечебных стратегий при ЛХ и могут служить дополнительными критериями оценки эффективности проводимой терапии. Необходимы дальнейшие исследования молекулярных механизмов резистентности Treg-клеток и разработка стратегий модуляции их численности и функции.

Ключевые слова:

регуляторные Т-клетки, лимфома Ходжкина, химиолучевая терапия.

DYNAMICS OF CIRCULATING REGULATORY T-CELL LEVELS IN CHEMORADIOTHERAPY OF HODGKIN'S LYMPHOMA

Mushkarina T.Yu.¹, Kuzmina E.G.¹, Grivtsova L.Yu.¹, Bogatyreva T.I.¹,
Ivanov S.A.^{1, 2}, Kaprin A.D.^{2, 3, 4}

¹ A.Tsyb Medical Radiological Research Centre – branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia;

² Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia;

³ National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia;

⁴ P. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Abstract

Introduction: Hodgkin's lymphoma (HL) is a common malignant disease of the lymphatic system characterized by a complex tumor microenvironment, where regulatory T cells (Treg) play a key role in the induction of immunosuppression.

Purpose: to study the dynamics of circulating Treg cells in response to chemoradiotherapy with HL. **Materials and methods:** The study included the following categories of patients: 37 primary patients with HL; 9 patients who received chemotherapy according to the ABVD/BEACOPP regimens; and 10 patients who underwent subsequent consolidation radiotherapy. The percentage of Treg cells (CD45+CD4+CD25+CD127low/-) was determined by multicolored flow cytometry during chemoradiotherapy of HL. The control group consisted of 40 practically healthy people. Statistical data processing was performed using the Mann-Whitney U-test in the STATISTICA 8.0 program. **Results:** Initially, patients with HL showed a statistically significant 1.5-fold increase in the relative level of Treg cells compared with the control group ($5.71 \pm 2.26\%$ vs. $3.69 \pm 1.89\%$, $p < 0.05$), while maintaining the absolute number within the normal range ($0.027 \pm 0.023 \cdot 10^9$ cells/l vs. $0.031 \pm 0.017 \cdot 10^9$ cells/l, $p > 0.05$). After chemotherapy, the relative level of Treg cells increased statistically significantly (9.09 ± 2.34 , $p < 0.05$), while their absolute number did not change significantly ($0.037 \pm 0.019 \cdot 10^9$ cells/l, $p > 0.05$), indicating a high resistance to the chemotherapeutic drugs used. Consolidating radiation therapy led to a statistically significant decrease in the absolute number of Treg cells (by 1.9 times, $0.019 \pm 0.010 \cdot 10^9$ cells/l, $p < 0.05$) at a stable high relative level ($9.13 \pm 4.03\%$, $p > 0.05$), demonstrating their greater sensitivity to radiation compared with chemotherapy. **Conclusion:** Circulating Treg cells play a significant role in the pathogenesis of HL, the revealed resistance of Treg cells to chemotherapy and their relative resistance to consolidating radiation therapy are important for optimizing treatment strategies for HL and can serve as additional criteria for evaluating the effectiveness of therapy. Further studies of the molecular mechanisms of Treg cell resistance and the development of strategies for modulating their abundance and function are needed.

Keywords:

regulatory T cells, Hodgkin's lymphoma, chemoradiotherapy

Введение

Лимфома Ходжкина (ЛХ) является распространенным злокачественным заболеванием лимфатической системы в развитых странах. По статистическим данным на ее долю приходится 15% среди всех злокачественных новообразований людей молодого возраста и до 30% среди всех лимфом [1]. ЛХ представляет собой опухолевое заболевание, где высокоактивные опухолевые клетки Ходжкина и Рид-Штернберга, составляющие в среднем 0,1–10% от всей неопластической массы находятся в тесном непосредственном контакте с клетками микроокружения [2, 3]. Незлокачественный компартмент представлен плазматическими клетками, эозинофилами, макрофагами, нейтрофилами, В-клетками и различными субпопуляциями Т-лимфоцитов [4]. Дисфункция иммунных механизмов при ЛХ способствует ее патогенезу и прогрессированию [5]. Воспалительная инфильтрация иммунными клетками содействует выживанию и росту клеткам Ходжкина и Рид-Штернберга, где наибольшая и важная роль в этом процессе принадлежит Th2-клеткам и регуляторным Т-клеткам (Treg) [3, 6].

Treg-клетки являются минорной популяцией лимфоцитов, которая играет ключевую роль в регуляции иммунного ответа. Эти клетки подавляют патогенную аутореактивную агрессию собственных клеток, поддерживая тем самым гомеостаз иммунной системы. При чрезмерном функционировании Treg-клеток происходит нежелательное угнетение эффекторных и антигенпрезентирующих клеток, в связи с чем снижается противоопухолевый иммунитет [7].

Многие исследователи показали, что повышенное содержание инфильтрирующих опухоль Treg-клеток коррелирует с неблагоприятным прогнозом при большинстве солидных опухолей: раке молочной железы, раке яичников, почечно-клеточном раке, раке шейки матки, раке легкого, гепатоцеллюлярной карциноме, раке поджелудочной железы, меланоме и т.д. Плохой прогноз можно объяснить иммуносупрессивными свойствами этих клеток. Однако имеются данные противоположного характера при колоректальном раке, раке пищевода и раке головы и шеи. Относительно предикторной значимости Treg-клеток при лимфомах сведения противоречивы. В некоторых источниках литературы сообщено о благоприятном прогнозе при увеличении численности супрессорных клеток, в других – о плохом, а в части научных работ ставится под сомнение влияние их уровня на исход заболевания, что требует дальнейших исследований в этом направлении [8, 9, 10]. Данные о влиянии современных методов лечения онкологических заболеваний на Treg-клетки также ограничены. Учитывая ключевую роль Treg-клеток в индукции иммуносупрессии и их потенциальное влияние на эффективность противоопухолевой терапии, детальное изучение их динамики в процессе лечения представляет собой актуальную задачу. Это позволит оптимизировать существующие терапевтические стратегии и способствовать разработке новых комбинированных подходов, в частности, с применением иммунотерапии, для улучшения эффективности лечения онкологических пациентов.

Цель данного исследования - изучение реакции циркулирующих Treg-клеток в ответ на химиолучевую терапию ЛХ. Основными задачами исследования являлись определение исходного уровня Treg-клеток и мониторинг их динамики в процессе лечения ЛХ.

Материалы и методы

В группе пациентов с ЛХ выполнено 57 исследований: в дебюте заболевания – 37, после химиотерапии – 9; после консолидирующей лучевой терапии – 10. Исходно обследовано 12 мужчин (32,4%) и 25 женщин (67,6%), средний возраст пациентов составил 30 ± 9 лет (от 18 до 55 лет). В соответствии с критериями классификации Ann Arbor с ранними стадиями было 10 человек, с распространенными стадиями – 27. Преобладал гистологический вариант нодулярного склероза, выявленный у 33 пациентов. Пациенты получили лечение по программам ABVD или BEACOPP с добавлением консолидирующего облучения в суммарной очаговой дозе 20-24 Гр ($23,9 \pm 3,6$ Гр).

Контролем служили данные периферической крови 40 практически здоровых людей по клинико-лабораторным данным (доноры крови) в возрасте от 22 до 57 (39 ± 10) лет. Женщин было на 10% больше, чем мужчин (55% против 45% соответственно).

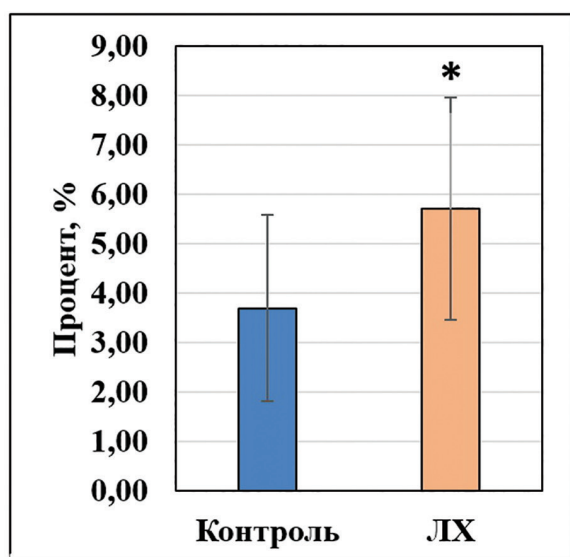
Анализ субпопуляций лимфоцитов, в том числе Treg-клеток, проводили методом многоцветной проточной цитометрии. Исследование выполнено на цитофлуориметре FACS Canto II (BD

Biosciences, США) с помощью программного обеспечения FACSDiva Software 6.0 (BD Biosciences, США). Идентификация Treg-клеток произведена на основе их специфического иммунофенотипа CD45+CD4+CD25+CD127low/-. Для определения других основных популяций лимфоцитов применяли соответствующие моноклональные антитела: Т-клетки (CD3+CD19-), В-клетки (CD19+CD3-), NK-клетки (CD16+CD3-), Т-хелперы (CD3+CD4+) и Т-цитотоксические клетки (CD3+CD8+). Расчет абсолютного числа клеток осуществлен двухплатформенным методом с использованием данных о количестве лимфоцитов, полученных на гематологическом анализаторе UniCel DxH 800 (Beckman Coulter, США).

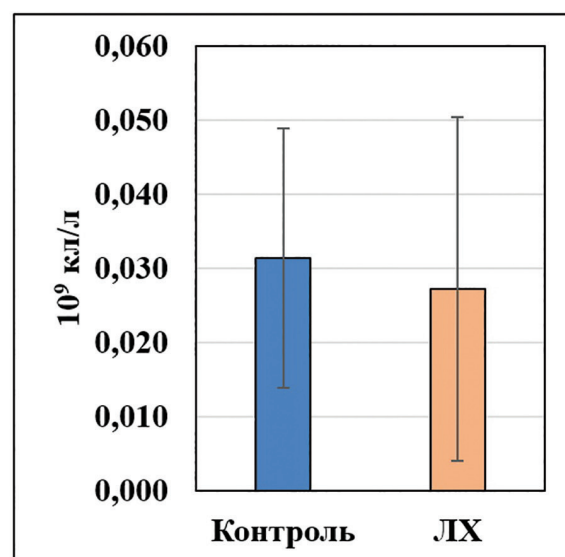
Для статистической обработки полученных данных применяли программное обеспечение «STATISTICA 8.0» (StatSoft). Количественные показатели представлены в виде среднего значения с указанием стандартного отклонения ($M \pm \sigma$). Оценка межгрупповых различий проведена с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Статистически значимыми считались различия при уровне $p < 0,05$.

Результаты

В дебюте ЛХ среднее значение относительного уровня Treg-клеток составило $5,71 \pm 2,26\%$, превышая контрольное значение в 1,5 раза ($3,69 \pm 1,89\%$, $p < 0,05$). Абсолютное значение ($0,027 \pm 0,023 \cdot 10^9$ кл/л) соответствовало значениям контрольной группы ($0,031 \pm 0,017 \cdot 10^9$ кл/л, $p > 0,05$), рис. 1. А, Б.



А



Б

Рис. 1. Относительный (А) и абсолютный (Б) уровень Treg-клеток у первичных пациентов с ЛХ

*Статистически значимые отличия от нормы, $p < 0,05$

Увеличение только процента Treg-клеток при отсутствии возрастания их абсолютного количества могло бы указывать на ограниченное участие данной популяции в формировании и развитии ЛХ. Однако в анализируемой группе первичных пациентов почти у половины из них (43%) присутствовала абсолютная лимфоцитопения ($<1,0 \cdot 10^9$ кл/л), которая обуславливала снижение Т- и В-лимфоидных популяций, в том числе подмножеств Т-клеток (табл. 1). Число Т-хелперов было снижено в 1,8 раза ($p < 0,05$), тогда как количество Treg-клеток, являющихся субпопуляцией Т-хелперов, уменьшилось лишь в 1,1 раза ($p > 0,05$), что свидетельствует об относительном увеличении доли Treg-клеток среди других подмножеств Т-хелперов (Th1, Th2 и Th17 и т.д.) при ЛХ. Таким образом, относительное возрастание Treg-клеток отражает иммуносупрессорные процессы на си-

стемном уровне при развитии ЛХ, указывая на участие этих клеток в патогенезе заболевания.

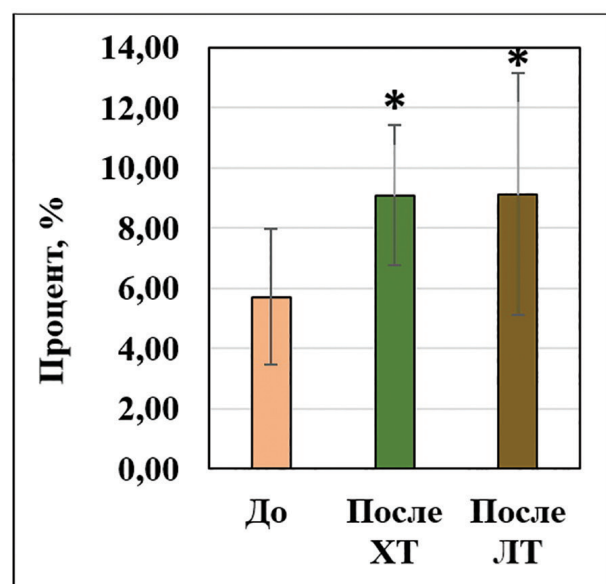
На первоначальном этапе лечения пациентам с ЛХ была проведена химиотерапия, после которой процент Treg-клеток статистически значимо возрос до $9,09 \pm 2,34\%$, $p < 0,05$; абсолютное количество осталось приблизительно на том же уровне ($0,037 \pm 0,019 \cdot 10^9$ кл/л, $p > 0,05$), рис. 2. А и Б. Это свидетельствует о устойчивости Treg-клеток к использованным химиотерапевтическим препаратам и режимам их применения. Динамика относительного и абсолютного числа Treg-клеток после консолидирующей лучевой терапии показала большую чувствительность этих клеток к облучению, чем к химиотерапии: несмотря на то, что процент супрессорных Treg-клеток определялся в постлучевом периоде на уровне $9,13 \pm 4,03\%$ ($p > 0,05$), близком к их доле после химиотерапии,

Таблица 1

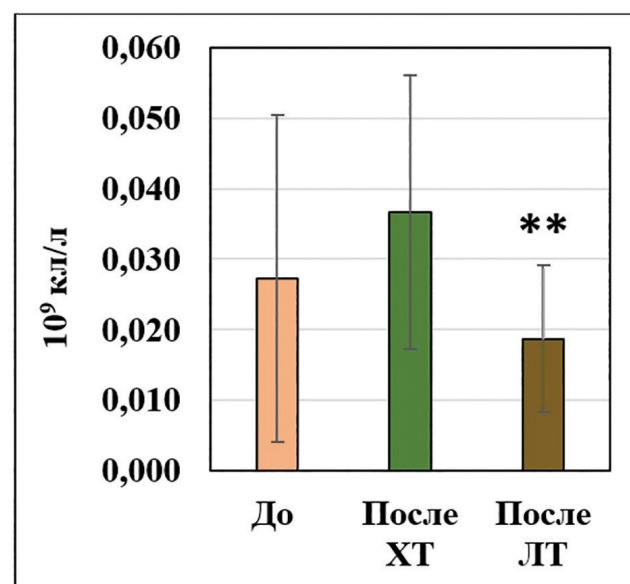
Абсолютные значения субпопуляций лимфоцитов у первичных пациентов с ЛХ

Показатели, $\cdot 10^9$ кл/л	Контроль, n=40	ЛХ, n=37
Т-клетки	$1,36 \pm 0,40$	$0,85 \pm 0,47^*$
Т-хелперы	$0,85 \pm 0,29$	$0,47 \pm 0,31^*$
Т-цитотоксические лимфоциты	$0,48 \pm 0,21$	$0,33 \pm 0,21^*$
В-лимфоциты	$0,14 \pm 0,07$	$0,06 \pm 0,03^*$
НК-клетки	$0,20 \pm 0,14$	$0,19 \pm 0,09$

*Статистически значимые отличия от нормы, $p < 0,05$



А



Б

Рис. 1. Относительный (А) и абсолютный (Б) уровень Treg-клеток в ходе химиолучевого лечения ЛХ
ХТ—химиотерапия; ЛТ—лучевая терапия

*Статистически значимые отличия от исходных значений, $p < 0,05$,

**Статистически значимые отличия от значений после химиотерапии ЛХ, $p < 0,05$

абсолютное их количество статистически значительно снизилось до $0,019 \pm 0,010 \cdot 10^9$ кл/л (в 1,9 раза), $p < 0,05$. То есть, отмечена относительная устойчивость Treg-клеток при снижении их абсолютного числа в ответ на консолидирующее облучение. Возможно, воздействие консолидирующей компоненты обусловлено не только её непосредственным эффектом, но и взаимодействием с последствиями предшествующей химиотерапии.

Обсуждение

Фундаментальная важность Treg-клеток в поддержании иммунного гомеостаза и их патогенная роль в микроокружении опухоли были настолько убедительно доказаны за последние 30 лет, что Нобелевский комитет в 2025 году присудил премию по физиологии и медицине за открытие и характеристику этой уникальной субпопуляции лимфоцитов. Это знаковое событие подчеркивает актуальность исследований, посвященных пониманию функций Treg-клеток в развитии злокачественных процессов и их терапии.

В нашем исследовании у первичных пациентов с ЛХ выявленное статистически значимое повышение относительной доли Treg-клеток на фоне выраженной лимфоцитопении, характерной для этой группы пациентов, согласуется с литературными данными об их участии в патогенезе заболевания [11, 12]. Это указывает на формирование системной иммуносупрессорной среды, подавляющей противоопухолевый иммунитет и приводящей к неблагоприятным клиническим исходам [13].

После проведения химиотерапии обнаружено дальнейшее увеличение относительного количества Treg-клеток при сохранении их абсолютного числа. Этот результат свидетельствует о высокой устойчивости Treg-клеток к действию химиотерапевтических агентов в примененных схемах лечения. В литературе имеются немногочисленные данные о влиянии лекарственной терапии онкологических заболеваний на численность Treg-клеток и их функциональную активность. В некоторых исследованиях показано, что Treg-клетки более чувствительны к применению низких доз циклофосфамида, чем Т-хелперы, Т-цитотоксические лимфоциты, NK-клетки и популяция лимфоцитов в целом [14, 15]. При лечении хронического лимфолейкоза схемами с флударабином у большинства пациентов выявлено снижение количества и супрессорной функции Treg-клеток [16]. Также на небольшой группе больных ХЛЛ обнаружено редуцирующее действие леналидомида на популяцию регуляторов, но результаты требуют подтвержде-

ния на репрезентативной выборке [17]. Зафиксировано подавляющее действие препарата гем-цитабина в определенной дозировке на величину Treg-клеток и их ингибирующую функцию [18].

Последующее проведение консолидирующей лучевой терапии снизило абсолютное количество Treg-клеток, в то время как их относительный уровень остался высоким. Это указывает на большую, по сравнению с химиотерапией, чувствительность Treg-клеток к облучению, хотя и свидетельствует об их относительной устойчивости. Данные о влиянии облучения на Treg-клетки крайне противоречивы и недостаточны, что не позволяет уверенно судить об их радиочувствительности, поскольку отсутствует необходимая доказательная база. Однако на основе обобщения накопленной информации предположено, что тотальное или локальное облучение, как правило, приводит к возрастанию уровня Treg-клеток у людей и мышей, хотя отдельные исследования указывают на противоположные эффекты [19].

Заключение

Данные работы свидетельствуют о значимой роли циркулирующих Treg-клеток в патогенетических механизмах развития ЛХ, что проявляется в их относительном увеличении на фоне общей лимфоцитопении обследованных пациентов. Выявленные особенности ответа Treg-клеток на различные виды терапии (устойчивость к химиотерапии и относительная устойчивость к лучевой терапии) имеют важное значение для оптимизации лечебных подходов при ЛХ и могут потенциально использоваться в качестве дополнительных критериев оценки эффективности проводимой терапии.

Дальнейшие исследования должны быть направлены на изучение молекулярных механизмов резистентности Treg-клеток к методам противоопухолевого лечения и разработку стратегий по модуляции функции данной субпопуляции лимфоцитов.

Литература

1. Pavlovic A., Glavina Durdov M., Capkun V. et al. Classical Hodgkin Lymphoma with Positive Epstein-Barr Virus Status is Associated with More FOXP3 Regulatory T Cells. *Med Sci Monit.* 2016;22:2340-6. doi: 10.12659/msm.896629.
2. Павлов В.В., Алещенко А.В., Антощина М.М. и др. Молекулярная и клеточная характеристики лимфоцитов крови при лимфоме Ходжкина. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2010;50(5):508-513.
3. Küppers R. Molecular biology of Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009;

- 491-6. doi: 10.1182/asheducation-2009.1.491.
4. Mathas S., Hartmann S., Küppers R. Hodgkin lymphoma: Pathology and biology. *Semin Hematol.* 2016;53(3):139-47. doi: 10.1053/j.seminhematol.2016.05.007.
 5. Dehghani M., Kalani M., Golmoghaddam H., et al. Aberrant peripheral blood CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells/T helper-17 number is associated with the outcome of patients with lymphoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2020;69(9):1917-1928. doi: 10.1007/s00262-020-02591-y.
 6. Poppema S. Immunobiology and pathophysiology of Hodgkin lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2005:231-8. doi: 10.1182/asheducation-2005.1.231.
 7. Sakaguchi S., Mikami N., B.Wing J. et al. Regulatory T cells and human disease. *Annu. Rev. Immunol.* 2020;38:541-566. doi: 10.1146/annurev-immunol-042718-041717.
 8. Peng F., Qin Y., Mu S. et al. Prognostic role of regulatory T cells in lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2020;146(12):3123-3135. doi: 10.1007/s00432-020-03398-1.
 9. Takeuchi Y., Nishikawa H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *Int Immunol.* 2016;28(8):401-9. doi: 10.1093/intimm/dxw025.
 10. Maharaj K., Uriepero A., Sahakian E. et al. Regulatory T cells (Tregs) in lymphoid malignancies and the impact of novel therapies. *Front Immunol.* 2022;13:943354. doi: 10.3389/fimmu.2022.943354. PMID: 35979372.
 11. Bogatyreva T.I., Terekhova A.Yu., Afanasov A.O. et al. Impact of the pre-treatment CD4+ T-lymphocyte deficiency in the peripheral blood on the results of chemoradiotherapy in patients with Hodgkin's lymphoma. *Russian journal of hematology and transfusiology.* 2019;64(3):317-330. doi: org/10.35754/0234-5730-2019-64-3-317-330/
 12. Ouyang S., Han G., Wu X. et al. Accelerated progression of Hodgkin's-like lymphomas in golli deficient SJL mice. *Cell Immunol.* 2016;302:41-49. doi: 10.1016/j.cellimm.2016.01.006.
 13. Wang J., Ke X.Y. The four types of Tregs in malignant lymphomas. *J Hematol Oncol.* 2011;4:50. doi: 10.1186/1756-8722-4-50.
 14. Heylmann D., Bauer M., Becker H. et al. Human CD4+CD25+ regulatory T cells are sensitive to low dose cyclophosphamide: implications for the immune response. *PLoS One.* 2013;8(12):e83384. doi: 10.1371/journal.pone.0083384.
 15. de Rezende L.C., Silva I.V., Rangel L.B. et al. Regulatory T cell as a target for cancer therapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2010;58(3):179-90. doi: 10.1007/s00005-010-0075-0.
 16. Beyer M., Kochanek M., Darabi K. et al. Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood.* 2005;106(6):2018-25. doi: 10.1182/blood-2005-02-0642.
 17. Idler I., Giannopoulos K., Zenz T. et al. Lenalidomide treatment of chronic lymphocytic leukaemia patients reduces regulatory T cells and induces Th17 T helper cells. *Br J Haematol.* 2010;148(6):948-50. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.08014.x.
 18. Zheng Y., Dou Y., Duan L. et al. Using chemo-drugs or irradiation to break immune tolerance and facilitate immunotherapy in solid cancer. *Cell Immunol.* 2015;294(1):54-9. doi: 10.1016/j.cellimm.2015.02.003.
 19. McKelvey K.J., Hudson A.L., Back M., Eade T., Diakos C.I. Radiation, inflammation and the immune response in cancer. *Mamm Genome.* 2018;29(11-12):843-865. DOI: 10.1007/s00335-018-9777-0. PMID: 30178305.

Контакты авторов:

Мушкарina Татьяна Юрьевна

e-mail: jeweltany@gmail.com

Конфликт интересов: отсутствует