

МЕМБРАННАЯ ЭКСПРЕССИЯ Hsp70 НА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ОБЪЕМНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В 3D-КУЛЬТУРАХ

Костенко В.В.^{1,2}, Бойко А.А.¹, Гречихина М.В.¹, Овсяникова О.В.^{1,2},
Сапожников А.М.¹

¹ ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»
Российской академии наук, Москва, Россия

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

Резюме. Белки теплового шока семейства 70 кДа (HSP70) относятся к внутриклеточным шаперонам, необходимым клетке для поддержания белкового гомеостаза. В цитозоле в нормальных условиях эти белки помогают правильному сворачиванию белков, предотвращая их агрегацию, участвуют в транспорте белков, выживании клеток. Среди HSP70 выделяют пул стресс-индуцируемых белков Hsp70, который заметно увеличивается в ответ на ряд стресс-факторов и способствует восстановлению клеток после стресса. Опухолевые клетки, в отличие от нормальных, характеризуются способностью представлять Hsp70 на поверхности клеточной мембраны. Мембраносвязанные Hsp70 могут выступать как сигналы опасности и способны усиливать или ингибировать иммунные реакции. Трехмерная модель клеточных культур в виде сфероидов в разной степени может имитировать структурную организацию солидных опухолей. В культурах многоклеточных сфероидов (3D) формируется гипоксия внутри сфероидов, градиенты питательных веществ, что может влиять на транслокацию Hsp70 на мембрану клеток. Целью данной работы был сравнительный анализ экспрессии Hsp70 на опухолевых клетках различного происхождения при культивировании в монослойном состоянии (2D) и 3D-культурах. Анализ экспрессии провели на линиях рака молочной и поджелудочной желез, карцином толстой кишки и простаты, лимфомах методами проточной цитометрии и конфокальной микроскопии. Культивирование в 3D-культурах проводили с использованием антиадгезивной подложки PolyHEMA. Показали, что карциномы различного происхождения не все экспрессируют Hsp70 как в 2D, так и в 3D-культурах. Для некоторых опухолевых линий характерна экспрессия Hsp70 только в 3D-культурах. Экспрессия Hsp70 была выявлена на клетках рака молочных желез BT20; карциномы толстой кишки SW837; поджелудочной железы PANC1 и простаты PC-3. Анализ Hsp70-положительных карцином различной локализации в 2D- и 3D-моделях может быть полезен для использования антител против Hsp70 в качестве вектора для доставки противоопухолевых препаратов.

Ключевые слова: Hsp70, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, карцинома толстой кишки, карцинома простаты, 2D-культуры, 3D-культуры, флуоресцентная визуализация, конфокальная микроскопия

Адрес для переписки:

Бойко Анна Александровна
ФГБУН «Институт биоорганической химии
имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»
Российской академии наук
117997, Россия, Москва, ГСП-7,
ул. Миклухо-Маклая, 16/10.
Тел.: 8 (916) 303-73-02.
E-mail: boyko_anna@mail.ru

Address for correspondence:

Anna A. Boyko
Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Science
16/10 Miklukho-Maklay St
Moscow, GSP-7
117997 Russian Federation
Phone: +7 (916) 303-73-02.
E-mail: boyko_anna@mail.ru

Образец цитирования:

В.В. Костенко, А.А. Бойко, М.В. Гречихина,
О.В. Овсяникова, А.М. Сапожников «Мембранная
экспрессия Hsp70 на опухолевых клетках при объемном
культивировании в 3D-культурах» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 4. С. 657-662.
doi: 10.15789/1563-0625-EOM-16750

© Костенко В.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

V.V. Kostenko, A.A. Boyko, M.V. Grechikhina,
O.V. Ovsyanikova, A.M. Sapozhnikov "Expression
of membrane HSP70 on tumor cells during cultivation
in 3D cultures", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 4, pp. 657-662.
doi: 10.15789/1563-0625-EOM-16750

© Kostenko V.V. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-EOM-16750

EXPRESSION OF MEMBRANE HSP70 ON TUMOR CELLS DURING CULTIVATION IN 3D CULTURES

Kostenko V.V.^{a,b}, Boyko A.A.^a, Grechikhina M.V.^a, Ovryanikova O.V.^{a,b}, Sapozhnikov A.M.^a

^a Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science, Moscow, Russian Federation

^b Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Heat shock proteins of the 70 kDa family (HSP70) are intracellular chaperones necessary for the cell to maintain protein homeostasis. In the cytosol, under normal conditions, these proteins promote the correct folding of proteins, preventing their aggregation, and are involved in protein transport and cell survival. Among the HSP70, there is a pool of stress-inducible proteins Hsp70, which significantly increases in response to a number of stress factors and facilitates cell recovery after stress. Tumor cells, unlike normal, are characterized by the ability to present Hsp70 on the surface of the cell membrane. Membrane-bound Hsp70 can be considered as a danger signal and enhance or inhibit immune responses. A three-dimensional model of cells in the spheroids in varying degrees simulates the structural organization of solid tumors. In cultures of multicellular spheroids (3D), hypoxia and nutrient gradients are formed within the spheroids, which can affect the translocation of Hsp70 to the cell membrane. The purpose of this work was a comparative analysis of Hsp70 expression on tumor cells of various origins when cultivated in a monolayer state (2D) and 3D cultures. Analysis was carried out on breast and pancreatic tumor cell lines, colon and prostate carcinomas, and lymphomas using flow cytometry and confocal microscopy methods. Cultivation in 3D cultures was performed using the anti-adhesive PolyHEMA substrate. The results showed that not all carcinomas from our panel express Hsp70 in both 2D and 3D cultures. Some tumor lines have membrane Hsp70 only in 3D cultures. Hsp70 expression was detected on: BT20 breast cancer cells; colon carcinoma SW837; pancreas PANC1; and prostate PC-3. Analysis of Hsp70-positive carcinomas of various localizations in 2D and 3D models may be useful for the application of antibodies against Hsp70 as a vector for the delivery of anticancer drugs.

Keywords: Hsp70, breast cancer, pancreatic cancer, colon carcinomas, prostate carcinomas, 2D cultures, 3D cultures, fluorescence imaging, confocal microscopy

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-15-00472).

Введение

Белки теплового шока (HSP) относятся к внутриклеточным шаперонам, необходимым клетке для поддержания белкового гомеостаза: они способствуют поддержанию нормальной конформации белков, предотвращают их агрегацию, они вовлечены в процессы транспорта и утилизации неправильно свернутых белков в нормальных условиях и при стрессе. Одну из групп HSP формирует семейство белков с молекулярной массой 70 кДа. Это семейство включает в себя конститутивно экспрессируемые белки (Hsc70, митохондриальный Hsp70), а также несколько стресс-индуцируемых белков (Hsp70), инициация накопления которых в клетке происходит в условиях гипертермии, окислительного стресса, токсического воздействия и др. [5]. Индуциру-

емые Hsp70, помимо внутриклеточной локализации, экспрессируются на поверхности клеток различных злокачественных опухолей, для нормальных/нетрансформированных клеток поверхностная экспрессия Hsp70 не характерна [7]. Такой локализации способствуют специфическими изменения в липидных компонентах мембран опухолевых клеток, связанных с присутствием глоботриаозилцерамида (Gb3) и фосфатидил серина [4]. Появление мембрано-ассоциированных Hsp70 на поверхности клетки можно рассматривать как сигнал опасности, стимулирующего распознавание опухолевых клеток иммуннокомпетентными клетками [1, 2, 3, 10]. С другой стороны, показано, что повышенная экспрессия Hsp70 на мембране опухолевых клеток ассоциирована с плохим прогнозом для пациентов [8]. Таким образом, опухоль-ассоциированную мембранную экспрессию Hsp70 можно рассматривать как мишень для доставки терапевтических препаратов к опухолевым клеткам.

Материалы и методы

В работе использовали линии клеток рака молочных желез BT20, BT474, HCC1395, MDA-MD-231; толстой кишки HCT116, HT29; аденокарцинома прямой кишки SW837; карциномы поджелудочной железы PANC1, AsPC1, COLO357; простаты Du145, PC-3; а также лимфом Raji, Daudi и лейкемии K562 (все линии из коллекции ИБХ РАН). Клетки инкубировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10%-ной фетальной телячьей сыворотки (FCS), L-глутамина, антибиотиков (все от НПП «ПанЭко», России) в инкубаторе с 5% CO₂ при температуре 37 °С. Клетки пассировали путем трипсинизации с использованием раствора трипсин/ЭДТА (НПП «ПанЭко», Россия) два раза в неделю.

Для получения 3D-культур на дно стерильных 12-луночных планшетов (Costar, США) вносили 700 мкл поли(2-гидроксиэтилметакрилата) (PolyHEMA) (5 мг/мл в 100% этаноле). Планшеты оставляли до полного испарения спирта. После промывки фосфатно-солевым буфером (ФБ) в лунки вносили клетки и оставляли инкубировать 24–36 ч.

Для анализа методом проточной цитометрии клетки из 2D-культур снимали трипсином, отмывали фосфатно-солевым буфером ФБ, переводили в ФБ с 1% бычьего альбумина и 0,05% азида натрия (ФБА). Клетки из 3D-культур разбивали на мелкие сфероиды интенсивным пипетированием и далее обрабатывали аналогично. Клетки разносили по 96-луночным круглодонным планшетам, добавляли антитела к Hsp70 (клон REA349, Miltenyi Biotec, Германия), меченные FITC или фикоэритрином (PE), инкубировали планшеты при +4 °С 1–2 ч, отмывали в ФБА и анализировали на проточном цитометре FACScalibur (BD, США). Результаты обработаны в программе FlowJo v.10 (BD, США).

Для получения 2D-культур клетки высевали на стерильные покровные стекла, помещенные в 6-луночные планшеты (Costar, США) и инкубировали в течение ночи. Затем клетки промывали в ФБ и инкубировали с антителом к Hsp70 (клон REA349, HSP70-PE, Miltenyi Biotec, Германия), меченным FITC или PE. Для анализа клеток в 3D-культурах сфероиды переносили в лунки 96-луночных круглодонных планшетов и окрашивали антителами к Hsp70. Ядра клеток окрашивали Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, США) 10–15 мин. Инкубацию проводили 1–2 ч, отмывали ФБА, фиксировали 2%-ным параформальдегидом и полимеризовали средой Mowiol 4.88 (Calbiochem, Германия). Слайды анализировали с помощью конфокального микроскопа Eclipse TE2000 (Nikon, Япония). Для обработки результатов использовалось программное обеспечение EZ-C1 FreeViewer (Nikon, Япония).

Графики были созданы с использованием программного обеспечения MS Excel. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SEM, по крайней мере для трех независимых экспериментов или как один репрезентативный эксперимент из трех. Статистический анализ проводился с использованием t-критерия Стьюдента. Уровни значимости $p < 0,05$ считались статистически достоверными.

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ экспрессии Hsp70 методом проточной цитометрии на поверхности опухолевых клеточных линий различного происхождения после культивирования в стандартных условиях в монослое (2D-культуры) показал, что не все клетки экспрессируют этот белок (рис. 1, 2). Клетки линий рака молочной железы BT-20 и HCC1395 характеризовались наличием мембрано-ассоциированных Hsp70, тогда как MDA-MB-231 и BT474 были негативными (рис. 1А). Среди анализируемых линий, выделенных из опухолей колоректального происхождения HCT116, SW837 и HT29 не было выявлено Hsp70-позитивных (рис. 1Г).

В условиях формирования сфероидов (3D-культуры) регистрировалось усиление представленности на поверхности мембраны Hsp70 для линии BT-20 (рис. 1А, стрелка); уровень экспрессии Hsp70 на мембранах HCC1395 не менялся, а линии MDA-MB-231 и BT474 оставались негативными в 3D-культурах, как в 2D-состоянии (рис. 1А).

Среди линий колоректального рака клеток усиление экспрессии Hsp70 в 3D-культурах наблюдалось на линиях HT29 и SW837 (рис. 1Г). Мембранная экспрессия Hsp70 в клетках HCT116 не появлялась в 3D-культурах (рис. 1Г).

Анализ поверхностной экспрессии Hsp70 методом конфокальной микроскопии показал, что усиление транслокации Hsp70 на мембрану клеток линии BT-20 наблюдается по поверхности сфероидов (рис. 1Б), тогда как в центре сфероида красное свечение отсутствовало (рис. 1Б, стрелка). Экспрессию Hsp70 на клетках MDA-MD-231 не наблюдали в 3D-культуре (рис. 1В), что согласуется с данными проточной цитометрии.

Аналогичные результаты были получены и на клетках колоректальных карцином. Экспрессия Hsp70 на положительных линиях HT29 и SW837 локализовалась по поверхности сфероидов (рис. 1Д, Ж) и отсутствовала на сфероидах HCT116 (рис. 1Е).

Данные анализа экспрессии Hsp70 на линиях рака поджелудочной железы PANC1, AsPC1 и COLO357 приведены только для 3D-культур. Показали, что все линии, на которых проводилось тестирование, положительно по мембранной

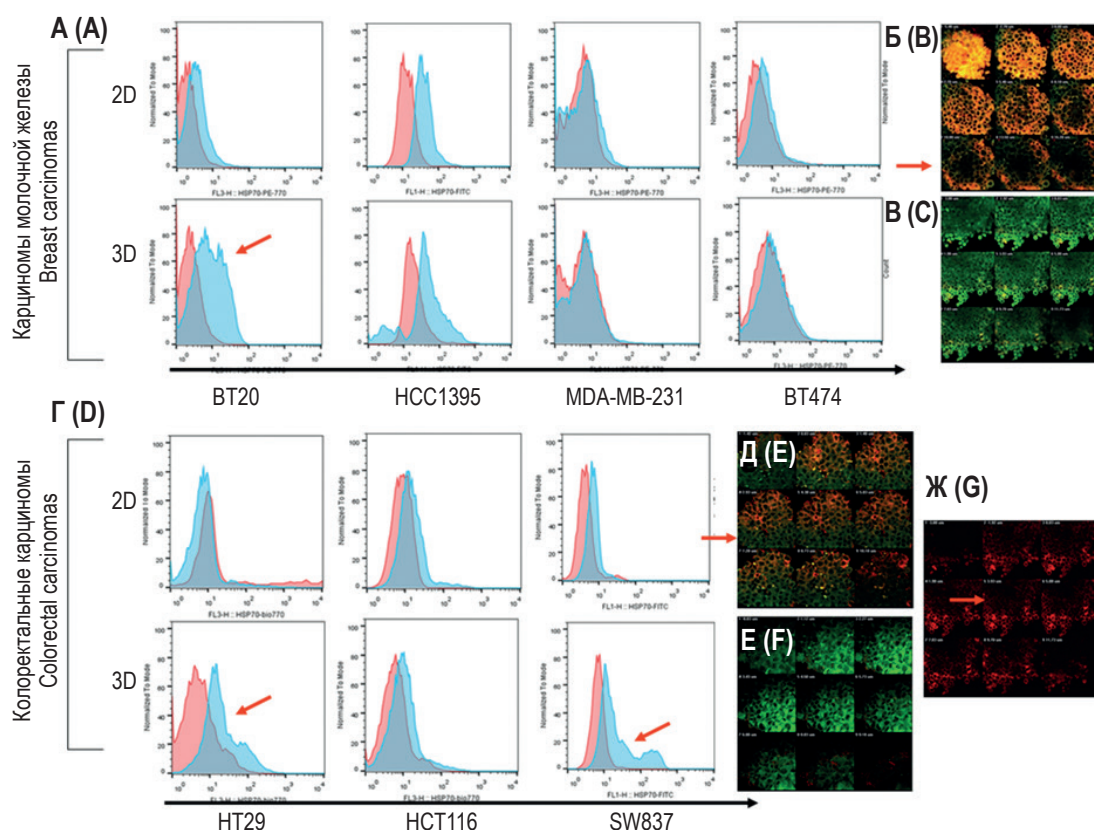


Рисунок 1. Экспрессия Hsp70 на клетках рака молочной железы BT20, BT474, HCC1395, MDA-MD-231 (А) и рака толстой кишки HT29, HCT116, SW837 (Г), культивируемых в 2D- и 3D-культурах, оцененная методами проточной цитометрии. Экспрессия (Z-срезы) Hsp70 (красный) на сфероиде BT20 (Б), MDA-MD-231 (В), HT29 (Д), HCT116 (Е) и SW837 (Ж)

Примечание. Окраска мембран Cer-BODIPY (зеленый). Шкала 15-20 мкм.

Figure 1. Expression of Hsp70 on breast cancer cells BT20, BT474, HCC1395, MDA-MD-231 (A) and colon cancer HT 29, HCT116, SW837 (D) cultured in 2D and 3D cultures assessed by flow cytometry. Expression of Hsp70 (red) on BT20 (B), MDA-MD-231 (C), HT29 (E), HCT116 (F) and SW837 (G) spheroids

Note. The membranes are stained with Cer-BODIPY (green). The scale bar 15-20 μ m.

ТАБЛИЦА 1. ЭКСПРЕССИЯ Hsp70 НА КЛЕТКАХ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КАРЦИНОМ И ЛИМФОМАХ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ КЛЕТОК В 2D- И 3D-УСЛОВИЯХ

TABLE 1. EXPRESSION OF Hsp70 ON EPITHELIAL CARCINOMA AND LYMPHOMA CELLS UNDER 2D AND 3D CONDITIONS

Линии клеток Cell lines	2D	3D	Линии клеток Cell lines	2D	3D
			Карциномы поджелудочной железы Pancreatic carcinomas		
Карциномы молочных желез Breast carcinomas			PANC1	+	+
BT20	+	++	AsPC1	–	±
BT474	–	–	COLO357	–	±
HCC1395	+	+	Карциномы простаты Prostate carcinomas		
MDA-MD-231	–	–	Du145	–	–
			PC-3	+	++
Карциномы толстой кишки Colon carcinomas			Лимфомы, лейкемия Lymphomas, leukemia		
HT29	–	+	Raji	–	–
HCT116	–	–	Daudi	–	–
SW837	–	+	K562	–	–

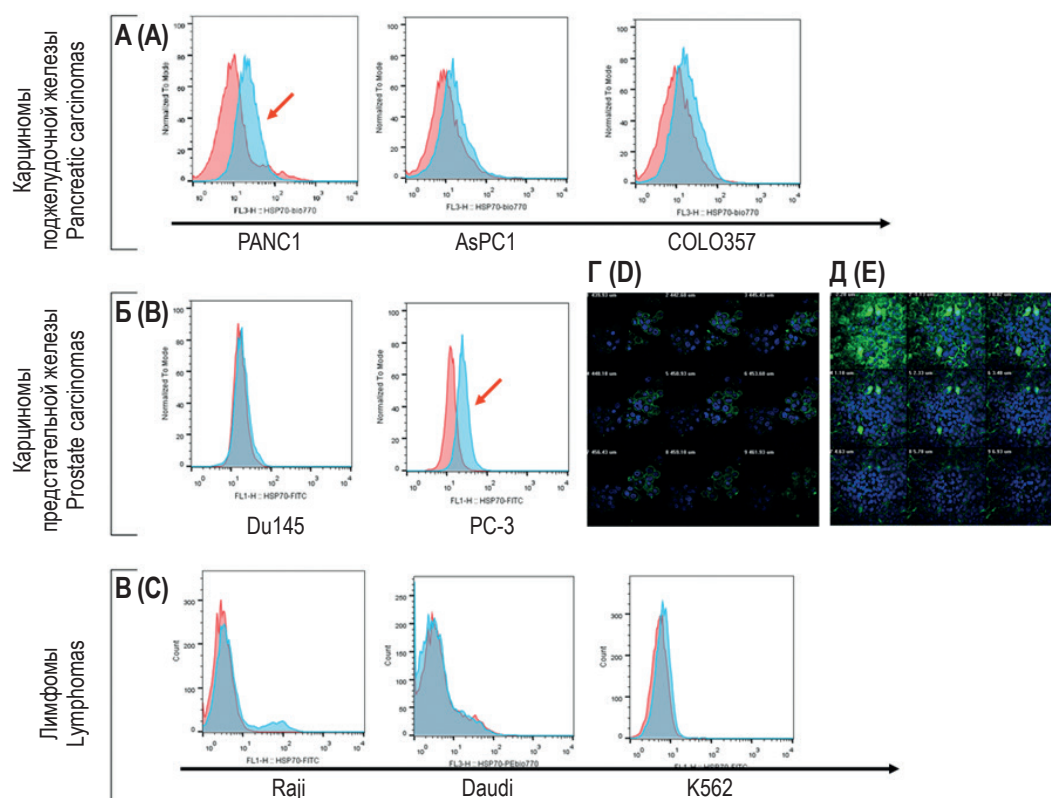


Рисунок 2. Экспрессия Hsp70 на клетках рака поджелудочной железы PANC1, AsPC1, COLO357 (А), карциномы простаты Du145, PC-3 (Б), лимфом Raji, Daudi и лейкомии K562 (В), культивируемых в 3D-культурах в проточной цитометрии. Конфокальная микроскопия экспрессии Hsp70 (зеленый) на сфероиде Du145 (Г) и PC-3 (Д)

Примечание. Ядра окрашены Hoechst 33258 (синий). Шкала 15-20 мкм.

Figure 2. Expression of Hsp70 on pancreatic cancer cells PANC 1, AsPC1, COLO357 (A), prostate carcinoma Du145, PC-3 (B), Raji, Daudi, K562 lymphomas (C) cultured in 3D conditions by flow cytometry method. Confocal microscopy of Hsp70 expression (green) on Du145 (D) and PC-3 (E) spheroids

Note. The nuclei are stained with Hoechst 33258 (blue). The scale bar 15-20 μm.

экспрессии Hsp70 (рис. 2А); на клетках PANC1 экспрессия была выше. На клетках карциномы простаты PC-3 экспрессия была очень высокой, а на клетках Du145 экспрессия отсутствовала или была очень низкой (рис. 2Б, В, Г, Д). Распределение повышенной экспрессии на линии PC-3 также наблюдалось в верхних слоях клеток сфероиде (рис. 2Д). Нельзя исключить, что различия в представленности Hsp70 на мембране клеток линий простаты связаны с потенциалом их метастазирования, поскольку прослежена связь между выживаемостью и путями метастазирования среди пациентов с разным фенотипом мембрано-ассоциированных Hsp70 на опухолях [9]. Известно, что клетки PC-3 обладают высоким метастатическим потенциалом по сравнению с клетками DU145, имеющими умеренный метастатический потенциал [6].

Суспензионные культуры лимфом и лейкомии также культивировали на антиадгезивной подложке. Клетки собирались в сферические

культуры, легко разбиваемые пипетированием. На клетках линий Daudi и K562 в 3D-культурах экспрессия Hsp70 полностью отсутствовала, а на клетках Raji регистрировалась отдельная популяция, возможно, апоптотических клеток (рис. 2В).

Суммарные данные по экспрессии Hsp70 на опухолевых клетках различного происхождения, культивируемых в 2D- и 3D-условиях, приведены в таблице 1.

Заключение

Таким образом, в модели многоклеточных сфероидов (3D-культуры), которая ближе воспроизводит функциональное состояние опухолевых клеток *in vivo*, показали, что в некоторых линиях стимулируется транслокация Hsp70, которая отсутствует в 2D-культурах. Маркирование опухолевых клеток Hsp70 можно использовать для направленной доставки противоопухолевых препаратов с помощью антител к Hsp70.

Список литературы / References

1. Albakova Z., Armeev G.A., Kanevskiy L.M., Kovalenko E.I., Sapozhnikov A.M. HSP70 multi-functionality in cancer. *Cells*, 2020, Vol. 9, no. 3, 587. doi: 10.3390/cells9030587.
2. Alekseeva L.G., Ovsyanikova O.V., Schulga A.A., Grechikhina M.V., Shustova O.A., Kovalenko E.I., Svirshchevskaya E.V., Deyev S.M., Sapozhnikov A.M. Targeted delivery of HSP70 to tumor cells via supramolecular complex based on HER2-specific DARPIn9_29 and the barnase:barstar pair. *Cells*, 2024, Vol. 13, 317. doi: 10.3390/cells13040317.
3. Gastpar R., Gehrman M., Bausero M.A., Asea A., Gross C., Schroeder J.A., Multhoff G. Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res.*, 2005, Vol. 65, no. 2, pp. 5238-5247.
4. Gehrman M., Liebisch G., Schmitz G., Anderson R., Steinem C., de Maio A., Pockley G., Multhoff G. Tumor-specific Hsp70 plasma membrane localization is enabled by the glycosphingolipid Gb3. *PLoS One*, 2008, Vol. 3, no. 4, e1925. doi: 10.1371/journal.pone.0001925.
5. Mayer M.P., Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol. Life Sci.*, 2005, Vol. 62, no. 6, pp. 670-684.
6. Molter C.W., Muszynski E.F., Tao Y., Trivedi T., Clouvel A., Ehrlicher A.J. Prostate cancer cells of increasing metastatic potential exhibit diverse contractile forces, cell stiffness, and motility in a microenvironment stiffness-dependent manner. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2022, Vol. 10, 932510. doi: 10.3389/fcell.2022.932510.
7. Multhoff G., Botzler C., Wiesnet M., Müller E., Meier T., Wilmanns W., Issels R.D. A Stress-inducible 72-kda heat-shock protein (Hsp72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *Int. J. Cancer*, 1995, Vol. 61, no. 2, pp. 272-279.
8. Murphy M.E. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*, 2013, Vol. 34, no. 6, pp. 1181-1188.
9. Pfister K., Radons J., Busch R., Tidball J.G., Pfeifer M., Freitag L., Feldmann H.-J., Milani V., Issels R., Multhoff G. Patient survival by Hsp70 membrane phenotype: association with different routes of metastasis. *J. Cancer*, 2007, Vol. 110, pp. 926-935.
10. Shevtsov M.A., Komarova E.Y., Meshalkina D.A., Bychkova N.V., Aksenov N.D., Abkin S.V., Margulis B.A., Guzhova I.V. Exogenously delivered heat shock protein 70 displaces its endogenous analogue and sensitizes cancer cells to lymphocytes-mediated cytotoxicity. *Oncotarget*, 2014, Vol. 5, pp. 3101-3114.

Авторы:

Костенко В.В. — студентка бакалавриата ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; инженер-исследователь отдела иммунологии ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Бойко А.А. — к.б.н., научный сотрудник, ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Гречихина М.В. — младший научный сотрудник, ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Овсяникова О.В. — аспирант ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; инженер-исследователь отдела иммунологии ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Сапожников А.М. — д.б.н., профессор, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории Клеточных взаимодействий, ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Authors:

Kostenko V.V., Undergraduate Student, Lomonosov Moscow State University; Research Engineer, Department of Immunology, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science, Moscow, Russian Federation

Boyko A.A., PhD (Biology), Research Associate, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science, Moscow, Russian Federation

Grechikhina M.V., Junior Research Associate, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science, Moscow, Russian Federation

Ovsyanikova O.V., Postgraduate Student, Lomonosov Moscow State University; Research Engineer, Department of Immunology, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science, Moscow, Russian Federation

Sapozhnikov A.M., PhD, MD (Biology), Professor, Chief Research Associate, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science, Moscow, Russian Federation

Поступила 29.03.2024
Отправлена на доработку 01.04.2024
Принята к печати 08.04.2024

Received 29.03.2024
Revision received 01.04.2024
Accepted 08.04.2024