

МИКРОБИОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 579.24

doi: 10.17072/1994-9952-2022-3-235-240.

Изучение влияния лецитина и глюкозы на ростовые свойства штаммов *Streptococcus pneumoniae*

Никита Геннадьевич Сидоров^{1✉}, Александр Владимирович Поддубиков²

^{1,2} Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

^{1✉} deel@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1257-8718>

² poddubikov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>

Аннотация. Представлены результаты оценки влияния добавления в среду культивирования (сердечно-мозговой бульон) глюкозы и лецитина на скорость и накопление биомассы различных штаммов *Streptococcus pneumoniae*: № 3405, серотип 4 (К-4); № 16082, серотип 14 (К-14); № 3391, нестабильный в образовании капсулы (R-форма). Наблюдалось увеличение накопления биомассы штамма № 3405 (К-4) на 10% в варианте с добавлением лецитина; увеличение биомассы на 64% и удлинение стационарной фазы у штамма № 16082 (К-14) при выращивании с добавлением глюкозы; увеличение прироста биомассы штамма № 3391 (R-форма) на 37.5% и продление длительности стационарной фазы происходили при выращивании с лецитином. Показано, что лецитин и глюкоза по-разному влияли на рост исследованных штаммов пневмококка. Наиболее перспективным и технологичным оказался штамм № 16082 (К-14), который имел более стабильный рост в течение трех пассажей и во всех трех случаях идентифицировался с высоким коэффициентом достоверности («score value» 2>) при проведении MALDI-TOF масс-спектрометрии, обладал более высоким уровнем накопления биомассы, отличался наиболее плотным осадком биомассы. В результате проведенных исследований отобран штамм, определены оптимальный состав питательной среды и соответствующие условия культивирования с целью получения наиболее высокого выхода биомассы *S. pneumoniae*.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, пневмококк, лецитин, фосфотидилхолин, глюкоза

Для цитирования: Сидоров Н. Г., Поддубиков А. В. Изучение влияния лецитина и глюкозы на ростовые свойства штаммов *Streptococcus pneumoniae* // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2022. Вып. 3. С. 235–240. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2022-3-235-240>.

Благодарности: исследование выполнено с использованием научного оборудования центра коллективного пользования «НИИВС им. И.И. Мечникова» при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Минобрнауки России, Соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021.

MICROBIOLOGY

Original article

Studying effects of lecithin and glucose on the growth properties of *Streptococcus pneumoniae* strains

Nikita G. Sidorov^{1✉}, Alexander V. Poddubikov²

^{1,2} I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

^{1✉} deel@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1257-8718>

² poddubikov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>

Abstract. The article presents the results of evaluating the effect of the addition of glucose and lecithin to the culture medium (Brain Heart Infusion Broth) on the rate and accumulation of biomass of various *Streptococcus pneumoniae* strains: No. 3405, serotype 4 (K-4); No.16082, serotype 14 (K-14); No. 3391, unstable in capsule formation (R-form). There was an increase in the biomass accumulation of strain No. 3405 (K-4) by 10% in the variant with the addition of lecithin; an increase in biomass by 64% and an elongation of the stationary phase in strain No. 16082 (K-14) when grown with the addition of glucose. There was an increase in the biomass growth of strain No. 3391 (R-form) by 37.5% and an extended duration of the stationary phase occurred when grown with lecithin. Based on the results obtained, it can be noted that lecithin and glucose had different effects on the growth of the studied strains of pneumococcus. The obtained data showed that strain No. 16082 (K-14) was the most promising and technologically advanced. Strain No. 16082 (K-14) had a more stable growth during three

passages and in all three cases was identified with a high score value ($2>$) by MALDI-TOF mass spectrometry, had a higher level of biomass accumulation, and possessed a denser sediment of biomass. The study resulted in the selection of strain, optimal composition of the growth medium and suitable cultivation conditions to obtain a higher yield of *S. pneumoniae* biomass.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, pneumococcus, lecithin, phosphatidylcholine, glucose

For citation: Sidorov N. G., Poddubikov A. V. [Studying effects of lecithin and glucose on the growth properties of *Streptococcus pneumoniae* strains]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 3 (2022): pp. 235-240. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2022-3-235-240>.

Acknowledgments: the study was carried out using the scientific equipment of the Collective Usage Center "I.I. Mechnikov NIIVS", Moscow, Russia, with the financial support of the project by the Russian Federation represented by the Ministry of Education and Science of Russia, Agreement No. 075-15-2021-676.

Введение

Streptococcus pneumoniae (пневмококк) бессимптомно колонизирует носоглотку человека, у детей и иммунокомпрометированных лиц он способен являться причиной ряда тяжелых заболеваний: пневмония, менингит, бактериемия, средний отит и др. [Маянский и др., 2014; Brooks, Mias, 2018; Luck, Tettelin, Orihuela, 2020; Masomian et al., 2020; Agnew et al., 2022].

Бескапсульные формы и оптохинрезистентные изоляты *S. pneumoniae*, которые имеют значение в развитии пневмококковых инфекций, не всегда позволяют осуществить идентификацию с помощью существующих диагностических методов [Ing et al., 2012; Magamani et al., 2014; Keller, Robinson, McDaniel, 2016; Varghese, Jayaraman, Veeraraghavan, 2017; Chen et al., 2020; Jia et al., 2022;].

Использование видоспецифических антигенов *S. pneumoniae* является перспективным направлением для создания методов диагностики пневмококка. Одними из видоспецифических антигенов пневмококка являются уникальные по своей структуре тейхоевые кислоты (ТК) и липотейхоевые кислоты (ЛТК), которые могут рассматриваться в качестве кандидатов для создания диагностических средств [Denpaite et al., 2012; Сидоров, Поддубиков, 2021].

Пневмококк требователен к условиям культивирования [Лабораторная диагностика ..., 2017; Oktari et al., 2019], поэтому было важным отобрать штамм, который способен расти в условиях искусственного выращивания без потери первоначальных биологических свойств, обладает стабильным ростом и отличается высоким уровнем выхода биомассы.

Известно, что рост и модификации клеточной стенки пневмококка зависят от холина [Maestro, Sanz, 2016; Bärland et al., 2022]. По данным литературы, фосфотидилхолин (лецитин) является поставщиком холина, и при внесении 0.01 г/л лецитина в питательный бульон происходит индукция размножения и экспрессия синтеза клеточных тейхоевых кислот пневмококка [Кветная, Железнова, 2014].

Исходя из литературных данных, *S. mutans*, выращенный в присутствии 0.5%-ного раствора глюкозы содержал повышенное количество ЛТК. Принимая во внимание тот факт, что глюкоза входит в состав повторяющихся цепей ТК и ЛТК пневмококка, в дальнейших экспериментах было важно оценить влияние глюкозы на ростовые свойства *S. pneumoniae* [Jacques et al., 1979].

Цель исследования – изучение влияния лецитина и глюкозы на ростовые свойства штаммов *S. pneumoniae* при выращивании клеток на полноценных питательных средах.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись штаммы *S. pneumoniae*: № 3405 (К-4), № 16082 (К-14), № 3391 (R-форма), полученные из Коллекции микроорганизмов III и IV групп патогенности ЦКП НИИВС им. И.И. Мечникова. Принадлежность использованных штаммов к виду *S. pneumoniae* подтверждали на основании исследования морфологических и культуральных свойств с помощью масс-спектрометрии с использованием прибора «MALDI Biotyper sirius RUO System» (Bruker, США). Для подтверждения серотиповой принадлежности применяли специфические пневмококковые антисыворотки (Statens Serum Institut, Дания).

Получение рабочих культур и оценку стабильности роста проводили путем проведения трех последовательных пассажей на кровяной агар с 5%-ным содержанием лошадиной дефибринированной крови (ЭКОлаб, Россия).

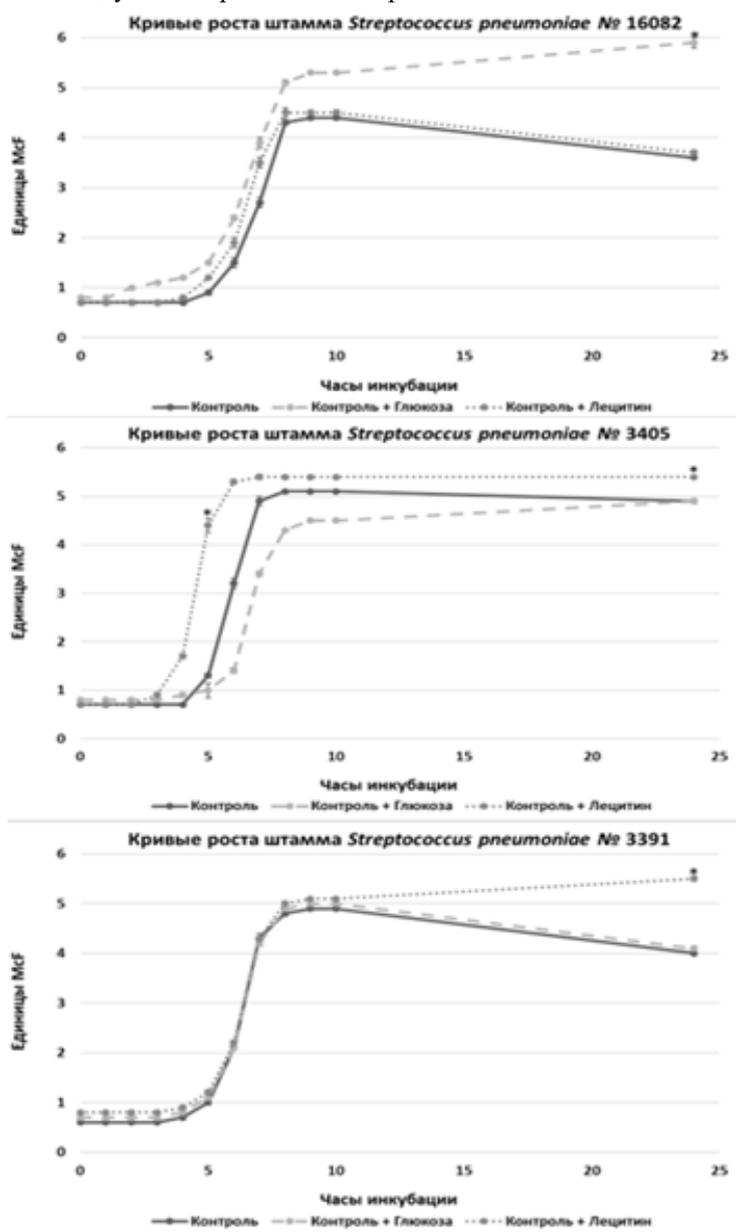
В качестве среды для культивирования использовали сердечно-мозговой бульон (Mast Group, Великобритания), в качестве дополнительных компонентов применяли глюкозу (Агат, Россия) или лецитин (AppliChem, Германия).

В ходе исследования были приготовлены три варианта питательной среды. В первые три контрольных флакона помещали 300 мл среды. В последующие три флакона добавляли 285 мл среды и 15 мл 10% глюкозы. В последние три флакона вносили 300 мл среды и 0.003 г лецитина. В каждый флакон вносили

1 мл бактериальной суспензии соответствующего штамма с показателем мутности 0.8 ед. МакФарланда (McF).

Штаммы культивировали в течение 24 ч. при температуре 37°C в инкубаторе с 5%-ным содержанием CO₂ и постоянным перемешиванием на шейкере «Elpan laboratory shaker type 358S» (Elpan, Польша). Каждый час в течение 10 ч. и по окончании инкубации – 24 ч., производили оценку динамических показателей роста на приборе «Densi-La-Meter» (PLIVA-Lachema Diagnostika, Словакия).

По истечении 24 ч. инкубации образцы проверяли на микробиологическую чистоту путем посева 100 мкл из каждого флакона на кровяной агар с 5%-ным содержанием лошадиной дефибринированной крови с изучением фенотипических признаков. Идентификацию осуществляли с помощью MALDI TOF масс-спектрометрии. Оценка влияния добавления в среду культивирования глюкозы и лецитина на скорость и накопление биомассы различных штаммов *S. pneumoniae* выявляли путем сравнения показателя мутности исследуемых вариантов с контролем.



Кривые роста штаммов *S. pneumoniae*. Контроль — сердечно-мозговой бульон; * — $p < 0.01$ по сравнению с контролем

[Growth curves of *Streptococcus pneumoniae* strains. Standart — Brain Heart Infusion Broth; * — $p < 0.01$ compared to control]

Эксперимент по инкубированию штаммов был воспроизведён трижды. На основе полученных средних значений строили графики с кривыми роста для трех различных штаммов *S. pneumoniae* при культивировании в средах различного состава. Все данные подвергались статистическому анализу. Результаты обрабатывали с помощью стандартного программного пакета Microsoft Excel для Windows. Данные на графиках представляли как среднее (M) ± квадратичное отклонение (SD). Корреляционный анализ проведен с применением коэффициента t Стьюдента. Критический уровень значимости статистических различий принимали равным 0.01.

Результаты и их обсуждение

В результате оценки влияния добавления в среду культивирования глюкозы и лецитина на скорость и накопление биомассы различных штаммов *S. pneumoniae* было отмечено несколько основных моментов (рисунок). Штамм *S. pneumoniae* № 16082 (К-14) в присутствии глюкозы выходил на стационарную фазу при более высоком показателе мутности по сравнению с контролем и с вариантом с добавлением лецитина. При этом фаза стационарного роста была более продолжительной, в то время как два других варианта на момент 24 ч. уже находились в фазе отмирания. Увеличение биомассы на 64% происходило именно в варианте с добавлением глюкозы.

Для штамма *S. pneumoniae* № 3405 (К-4) более эффективным ростовым фактором оказался лецитин. Лецитин оказывал влияние на время роста и увеличивал накопление биомассы на 10%.

При культивировании штамма *S. pneumoniae* № 3391 (R-форма) происходило увеличение накопления биомассы на 37.5% при выращивании с лецитином. В присутствии лецитина заметно увеличивалась продолжительность стационарной фазы роста бактериальных клеток. Следует отметить, что на 24 ч. инкубации штамм не вступил в фазу отмирания в варианте с добавлением лецитина в отличие от двух других вариаций культивирования.

Исходя из полученных результатов, следует отметить, что лецитин и глюкоза по-разному влияли на рост штаммов пневмококка.

Заключение

Полученные результаты проведенных экспериментальных исследований показали, что наиболее перспективным и технологичным оказался штамм № 16082 (K-14). Штамм № 16082 (K-14) имел более стабильный рост в течение трех пассажей и во всех трех случаях идентифицировался с высоким коэффициентом достоверности («score value» >2) при проведении MALDI-TOF масс-спектрометрии, отличался более высоким уровнем накопления биомассы, обладал наиболее плотным осадком биомассы.

В результате выполненной работы отобран штамм, определены оптимальный состав питательной среды и подходящие условия культивирования для получения более высокого выхода биомассы *S. pneumoniae*.

Список источников

1. Кветная А.С., Железова Л.И. Стимулирующее влияние фосфотидилхолина (лецитина) на патогенные свойства пневмококка // Ученые записки Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова. 2014. Т. 21, № 1. С. 48–51. doi: 10.24884/1607-4181-2014-21-1-48-51.
2. Лабораторная диагностика внебольничной пневмонии пневмококковой этиологии: метод. рекомендации. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2017. 64 с.
3. Маянский Н.А. и др. Серотиповое разнообразие и резистентность пневмококков // Вестник Российской академии медицинских наук. 2014. Т. 69, № 7–8. С. 38–45. doi: 10.15690/vramn.v69i7-8.1108.
4. Микробиология: возбудители бактериальных воздушно-капельных инфекций / под общ. ред. Л.И. Кафарской. М.: Юрайт, 2020. 115 с.
5. Сидоров Н.Г., Поддубиков А.В. Видоспецифические антигены *Streptococcus pneumoniae* как перспектива создания диагностических средств // Инфекционные болезни. 2021. Т. 19, № 4. С. 73–78. doi: 10.20953/1729-9225-2021-4-73-78.
6. Agnew H.N. et al. *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from a single pediatric patient display distinct phenotypes // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2022. Vol. 12. Article 866259. doi: 10.3389/fcimb.2022.866259.
7. Bärländ N. et al. Mechanistic basis of choline import involved in teichoic acids and lipopolysaccharide modification // Science Advances. 2022. Vol. 8(9). Article eabm1122. doi:10.1126/sciadv.abm1122.
8. Brooks L.R.K., Mias G.I. *Streptococcus pneumoniae*'s virulence and host immunity: Aging, diagnostics, and prevention // Frontiers in Immunology. 2018. Vol. 9. Article 1366. doi:10.3389/fimmu.2018.01366.
9. Chen H.H. et al. Non-typeable *Streptococcus pneumoniae* infection in a medical center in Taiwan after wide use of pneumococcal conjugate vaccine // Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 2020. Vol. 53(1). P. 94–98. doi:10.1016/j.jmii.2018.04.001.
10. Denapaite D. et al. Biosynthesis of teichoic acids in *Streptococcus pneumoniae* and closely related species: lessons from genomes // Microbial Drug Resistance. 2012. Vol. 18(3). P. 344–358. doi: 10.1089/mdr.2012.0026.
11. Ing J. et al. Characterization of nontypeable and atypical *Streptococcus pneumoniae* pediatric isolates from 1994 to 2010 // Journal of Clinical Microbiology. 2012. Vol. 50(4). P. 1326–1330. doi:10.15690/10.1128/jcm.05182-11.
12. Jacques N.A. et al. Effect of carbohydrate source and growth conditions on the production of lipoteichoic acid by *Streptococcus mutans* Ingbritt // Infection and Immunity. 1979. Vol. 26(3). P. 1079–1087. doi:10.1128/iai.26.3.1079-1087.1979.
13. Jia J. et al. Identification and molecular epidemiology of routinely determined *Streptococcus pneumoniae* with negative Quellung reaction results // Journal of Clinical Laboratory Analysis. 2022. Vol. 36(4). Article 24293. doi: 10.1002/jcla.24293.
14. Keller L.E., Robinson D.A., McDaniel L.S. Nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae*: Emergence and pathogenesis // mBio. 2016. Vol. 7(2). Article e01792. doi:10.1128/mBio.01792-15.
15. Luck J.N., Tettelin H., Orihuela C.J. Sugar-Coated Killer: Serotype 3 pneumococcal disease // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2020. Vol. 10. Article 613287. doi: fcimb.2020.613287.

16. Maestro B., Sanz J.M. Choline binding proteins from *Streptococcus pneumoniae*: A dual role as enzymatic and targets for the design of new antimicrobials // *Antibiotics* (Basel). 2016. Vol. 5(2). Article 21. doi:10.3390/antibiotics5020021.
17. Magomani V. et al. Challenges of using molecular serotyping for surveillance of pneumococcal disease // *Journal of Clinical Microbiology*. 2014. Vol. 52(9). Article 3271-6. doi: 10.1128/JCM.01061-14.
18. Masomian M. et al. Development of Next Generation *Streptococcus pneumoniae* Vaccines Conferring Broad Protection // *Vaccines* (Basel). 2020. Vol. 8(1). Article 132. doi: 10.3390/vaccines8010132.
19. Oktari A. et al. The optimization of Human Blood Agar (HBA) for *Streptococcus pneumoniae* growth // *Journal of Physics Conference Series*. 2019. Vol. 1280(2). Article 02200. doi: 10.1088/1742-6596/1280/2/022002.
20. Varghese R., Jayaraman R., Veeraraghavan B. Current challenges in the accurate identification of *Streptococcus pneumoniae* and its serogroups/serotypes in the vaccine era // *Journal of Microbiological Methods*. 2017. Vol. 141. P. 48–54. doi: 10.1016/j.mimet.2017.07.015.

References

1. Kvetnaya A.S., Zhelezova L.I. [Phosphatidylcholine (lecithin) stimulating effect on pathogenic properties of pneumococcus]. *Učenyje zapiski Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta imeni akademika I.P. Pavlova*. V. 21, No 1 (2014): pp. 48-51. doi: 10.24884/1607-4181-2014-21-1-48-51. (In Russ.).
2. *Laboratornaja diagnostika vnebol'ničnoj pnevmonii pnevmokokkovoj etiologii* [Laboratory diagnosis of community-acquired pneumonia of pneumococcal etiology: Guidelines]. Moscow, Federal'naja služba po nadzoru v sfere zaščity prav potrebitelej i blagopolučija čeloveka Publ., 2017. 64 p. (In Russ.).
3. Mayanskii N.A., Alyab'eva N.M., Lazareva A.V., Katosova L.K. [Serotype diversity and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae*]. *Vestnik Rossijskoj akademii medicinskih nauk*. V. 69, No 7-8 (2014): pp. 38-45. doi: 10.15690/vramn.v69i7-8.1108. (In Russ.).
4. Kafarskaya L.I. (ed.) *Mikrobiologija: vozбудiteli bakterial'nych vozdušnokapel'nych infekcij* [Microbiology: causative agents of bacterial airborne infections]. Moscow, Jurait Publ., 2020. 115 p. (in Russ.).
5. Sidorov N.G., Poddubikov A.V. [Species-specific antigens of *Streptococcus pneumoniae* as an outlook for new diagnostic systems]. *Infekcionnye bolezni*. V. 19, No 4 (2021): pp. 73-78. (In Russ.).
6. Agnew H.N. et al. *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from a single pediatric patient display distinct phenotypes. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. V. 12 (2022): Article 866259. doi: 10.3389/fcimb.2022.866259.
7. Bärland N. et al. Mechanistic basis of choline import involved in teichoic acids and lipopolysaccharide modification. *Science Advances*. V. 8(9) (2022): Article eabm1122. doi:10.1126/sciadv.abm1122.
8. Brooks L.R.K., Mias G.I. *Streptococcus pneumoniae*'s virulence and host immunity: Aging, diagnostics, and prevention. *Frontiers in Immunology*. V. 9 (2018): Article 1366. doi: 10.3389/fimmu.2018.01366.
9. Chen H.H. et al. Non-typeable *Streptococcus pneumoniae* infection in a medical center in Taiwan after wide use of pneumococcal conjugate vaccine. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. V. 53(1) (2020): pp. 94-98. doi: 10.1016/j.jmii.2018.04.001.
10. Denapante D. et al. Biosynthesis of teichoic acids in *Streptococcus pneumoniae* and closely related species: lessons from genomes. *Microbial Drug Resistance*. V. 18(3) (2012): pp. 344-358. doi: 10.1089/mdr.2012.0026.
11. Ing J. et al. Characterization of nontypeable and atypical *Streptococcus pneumoniae* pediatric isolates from 1994 to 2010. *Journal of Clinical Microbiology*. V. 50(4) (2012): pp. 1326-1330. doi: 10.15690/10.1128/jcm.05182-11.
12. Jacques N.A. et al. Effect of carbohydrate source and growth conditions on the production of lipoteichoic acid by *Streptococcus mutans* ingbritt. *Infection and Immunity*. V. 26(3) (1979): pp. 1079-1087. doi: 10.1128/iai.26.3.1079-1087.1979.
13. Jia J. et al. Identification and molecular epidemiology of routinely determined *Streptococcus pneumoniae* with negative Quellung reaction results. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. V. 36(4) (2022): Article e24293. doi: 10.1002/jcla.24293.
14. Keller L.E., Robinson D.A., McDaniel L.S. Nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae*: Emergence and pathogenesis. *mBio*. V. 7(2) (2016): Article e01792. doi: 10.1128/mBio.01792-15.
15. Luck J.N., Tettelin H., Orihuela C.J.. Sugar-Coated Killer: Serotype 3 pneumococcal disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. V. 10 (2020): Article 613287. doi: fcimb.2020.613287.
16. Maestro B., Sanz J.M. Choline binding proteins from *Streptococcus pneumoniae*: A dual role as enzymatic and targets for the design of new antimicrobials. *Antibiotics* (Basel). V. 5(2) (2016): Article 21. doi: 10.3390/antibiotics5020021.
17. Magomani V. et al. Challenges of using molecular serotyping for surveillance of pneumococcal disease. *Journal of Clinical Microbiology*. V. 52 (2014): Article 3271-6. doi: 10.1128/JCM.01061-14.

18. Masomian M., Ahmad Z., Gew L.T., Poh C.L. Development of next generation *Streptococcus pneumoniae* vaccines conferring broad protection. *Vaccines* (Basel). V. 8(1) (2020): Article 132. doi: 10.3390/vaccines8010132.

19. Oktari A. et al. The optimization of Human Blood Agar (HBA) for *Streptococcus pneumonia* growth. *Journal of Physics Conference Series*. V. 1280(2). (2019): Article 02200. doi: 10.1088/1742-6596/1280/2/022002.

20. Varghese R., Jayaraman R., Veeraraghavan B. Current challenges in the accurate identification of *Streptococcus pneumoniae* and its serogroups/serotypes in the vaccine era. *Journal of Microbiological Methods*. V. 141 (2017): pp. 48-54. doi: 10.1016/j.mimet.2017.07.015.

Статья поступила в редакцию 08.07.2022; одобрена после рецензирования 26.08.2022; принята к публикации 29.09.2022.

The article was submitted 08.07.2022; approved after reviewing 26.08.2022; accepted for publication 29.09.2022.

Информация об авторах

Н. Г. Сидоров – аспирант лаборатории микробиологии условно-патогенных бактерий;

А. В. Поддубиков – кандидат медицинских наук, зав. лабораторией микробиологии условно-патогенных бактерий.

Information about the authors

N. G. Sidorov – post-graduate student of the laboratory of opportunistic pathogenic bacteria;

A. V. Poddubikov – Candidate of Medical Sciences, The Head of laboratory of opportunistic pathogenic bacteria.

Вклад авторов:

Сидоров Н. Г. – концепция исследования; написание исходного текста; статистическая обработка материала; итоговые выводы.

Поддубиков А. В. – научное руководство; развитие методологии; доработка текста; итоговые выводы.

Contribution of the authors:

Sidorov N. G. – research concept; writing the draft; statistical processing of the material; final conclusions.

Poddubikov A. V. – scientific management; methodology development; revision of the text; final conclusions.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interests.