

Аспекты иммунного ответа при инфекции, вызванной вирусом Западного Нила

А. А. Истин, О. Н. Красноруцкая, А. С. Безлепкин, В. И. Шевцова, Г. Г. Саломяхин

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет имени Н. Н. Бурденко»
Минздрава России, Воронеж, Россия

РЕЗЮМЕ

Лихорадка Западного Нила (ЛЗН) – это зоонозная инфекция, вызванная вирусом Западного Нила (WNV), который относится к семейству Flaviviridae и роду Flavivirus. Вирус передаётся человеку через укусы инфицированных комаров, чаще всего из рода Culex. Актуальность данной инфекции остается на высоком уровне из-за распространения по миру и поражения центральной нервной системы. Также не разработаны методы специфической диагностики и лечения данного заболевания. Исследование иммунной системы может помочь в решении этих проблем. Иммунный ответ на вирус Лихорадки Западного Нила представляет собой сложное взаимодействие врождённых и адаптивных механизмов. В то время как иммунная система обычно эффективно контролирует инфекцию, в некоторых случаях чрезмерное воспаление или недостаточный иммунный ответ могут приводить к тяжёлым последствиям, включая поражение ЦНС. Понимание этих механизмов имеет ключевое значение для разработки вакцин и терапевтических подходов к лечению ЛЗН.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: лихорадка Западного Нила, иммунитет, клеточные механизмы, гуморальный ответ, цитокины, интерфероны.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Aspects of the immune response in West Nile virus infection

A. A. Istin, O. N. Krasnorutskaya, A. S. Bezlepin, V. I. Shevtsova, G. G. Salomakhin

Voronezh State Medical University named after N. N. Burdenko Voronezh, Russia

SUMMARY

West Nile fever (WNF) is a zoonotic infection caused by West Nile virus (WNV), which belongs to the family Flaviviridae and the genus Flavivirus. The virus is transmitted to humans through the bites of infected mosquitoes, most often from the genus Culex. The relevance of this infection remains at a high level due to its worldwide spread and damage to the central nervous system. Also, methods of specific diagnosis and treatment of this disease have not been developed. Research on the immune system can help solve these problems. The immune response to West Nile virus is a complex interaction of innate and adaptive mechanisms. While the immune system usually effectively controls infection, in some cases excessive inflammation or an insufficient immune response can lead to severe consequences, including damage to the central nervous system. Understanding these mechanisms is of key importance for the development of vaccines and therapeutic approaches to the treatment of WNF.

KEYWORDS: West Nile fever, immunity, cellular mechanisms, humoral response, cytokines, interferons

CONFLICT OF INTEREST. The authors declare no conflict of interest.

Вирус Западного Нила (ВЗН) – это одноцепочечный РНК-вирус, относящийся к серокомплексу японского энцефалита, роду Flavivirus и семейству Flaviviridae [1]. Его жизненный цикл преимущественно включает птиц и комаров, в то время как люди, лошади и другие позвоночные считаются лишь случайными хозяевами [1].

Впервые вирус Западного Нила (ВЗН) был обнаружен в 1937 году в Уганде у женщины с недиагностированной лихорадкой. С тех пор он неоднократно вызывал вспышки относительно лёгких лихорадочных заболеваний в регионах Африки, Ближнего Востока, Азии и Австралии. [1, 2, 3]

Однако в 1990-х годах эпидемиология инфекции изменилась. Появились новые вспышки в Восточной Европе, и они характеризовались более высоким уровнем тяжёлых неврологических проявлений. В 1999 году ВЗН проник в Северную Америку, где стал причиной семи смертельных случаев в районе Нью-Йорка, а также значительного количества смертей птиц и лошадей. С тех пор он распространился на все 48 штатов Соединённых Штатов, а также на части Канады, Мексики, Карибского бассейна и Южной Америки. [3]

Риск развития тяжёлой инфекции, вызываемой вирусом Западного Нила (ВЗН), особенно высок у людей старшего

возраста и тех, кто страдает от ослабленного иммунитета [3]. В двух исследованиях было выявлено 20-кратное увеличение риска нейроинвазивных заболеваний и смертности у людей старше 50 лет [3].

Помимо возраста, существует несколько генетических факторов, которые могут сделать человека более уязвимым к инфекции ВЗН. Одним из таких факторов является дефицит хемокинового рецептора CCR 5. В исследованиях, где рассматривались люди с инфекцией ВЗН, была обнаружена более высокая частота (4,2 %) гомозигот CCR5Δ32 с утратой функции по сравнению с общей популяцией (1,0 %) [3].

Также существует мутация в гене, который кодирует изоформу 2'-5'-олигоаденилатсинтетазы/L1 (OAC), что делает лабораторных мышей более восприимчивыми к ВЗН [18]. Кроме того, гипоморфный аллель человеческого ортолога OAS1 связан как с манифестной, так и с бессимптомной лихорадкой Западного Нила (ЛЗН) [3]. Наконец, было выявлено, что однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) также могут быть связаны с ЛЗН. Эти полиморфизмы были обнаружены в генах, отвечающих за врожденный иммунный ответ, таких как IRF3 и Mx1, а также в эффекторных генах [3]. Таким образом, генетические вариации

в пути ответа на интерферон (ИФН), по-видимому, связаны с риском развития ЛЗН у людей.

Геном вируса Западного Нила (ВЗН) транслируется в один полипептид, который подвергается ко- и посттрансляционной модификации, образуя десять белков (рис. 1):

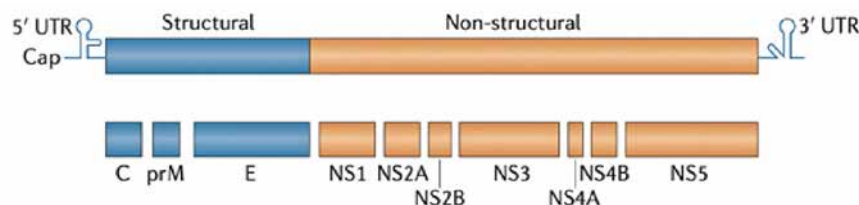


Рисунок 1. Белки генома ВЗН

1. Три структурных белка – капсид С, мембранный предшественник prM и оболочка Е – формируют вирион.
2. Семь неструктурных белков – NS 1, NS 2A, NS 2B, NS 3, NS 4A, NS 4B и NS 5 – участвуют в цикле репликации вируса, помогают ему «уклоняться» от врожденного иммунитета хозяина и влияют на патогенез ВЗН [3].
3. Пептид 2K – играет важную роль в перестройке цитоплазматических мембран и транспортировке белка NS 4A по пути Гольджи.

Восприимчивость к ВЗН значительно различается у разных видов хозяев [4, 5]. У большинства людей инфекция проходит бессимптомно или в легкой форме, проявляясь головной болью, слабостью и/или лихорадкой. Тем не менее, у небольшого процента пациентов, инфицированных ВЗН (менее 1%), развивается нейроинвазивное заболевание (менингит, энцефалит или острый вялый паралич). В таких случаях смертность составляет 10–30%. У 30–60% пациентов с клиническим развитием болезни могут возникнуть долгосрочные физические и нейрокогнитивные последствия, такие как астения, миалгии, потеря памяти или слуха, депрессия и двигательные нарушения.

Патогенез ЛЗН включает три основных этапа:

1. Первичная репликация в месте укусов комаров.
2. Репликация в лимфоузлах и проникновение в кровь.
3. Поражение эндотелия сосудов, оболочек и вещества мозга,

Чтобы противостоять ВЗН, организм использует несколько механизмов защиты: врожденный иммунитет на ранней стадии и адаптивный (гуморальный и клеточный) иммунитет на более поздних этапах.

Врожденный иммунный ответ

Последние исследования показали, что макрофаги играют важнейшую роль в борьбе с инфекцией, вызванной ВЗН. Эти клетки способны ограничить распространение вируса напрямую уничтожая вирус; увеличивая презентацию антигена для В- и Т-клеток; а также продуцируя провоспалительные или противовирусные цитокины и хемокины.

Защитная функция макрофагов подтверждается экспериментами на мышах, которые подтвердили, что при селективном истощении этих клеток заболевание обостряется [5].

В ответ на инфекцию, вызванную ВЗН, макрофаги активизируются, что приводит к выделению различных цитокинов, включая интерферон (ИФН) I типа, фактор некроза опухоли (ФНО-α), интерлейкин-1β (ИЛ-1β), интер-

лейкин-8 (ИЛ-8) и другие. Некоторые из этих цитокинов обладают противовирусными свойствами и способны подавлять репликацию вируса, по крайней мере, в лабораторных условиях [5].

Однако, несмотря на свою защитную роль в запуске механизмов врожденного иммунитета, макрофаги также могут стать мишенями для ВЗН [5].

На основе функциональных и поверхностных маркеров можно выделить две субпопуляции дендритных клеток: плазматоцитоподобные (pDC) и миелоидные (mDC).

pDC не обладают способностью к фагоцитозу и менее эффективны в захвате и представлении антигенов Т-клеткам. Однако они продуцируют высокие уровни интерферона I типа в присутствии вирусов или бактерий, что делает их ключевыми участниками противовирусного иммунитета [5].

В pDC наблюдаются низкие уровни репликации ВЗН, но провоспалительные цитокины вырабатываются быстро и могут накапливаться до значительных уровней. Этот цитокиновый ответ зависит не от репликации вируса, а от эндосомального TLR 7 и может быть индуцирован РНК очищенных вирионов флавивируса [5, 6].

Моноцитарные дендритные клетки (mDC) распределены по всему организму и постоянно циркулируют в нем, что позволяет им переносить антигены из мест инфекции на периферии в лимфоидные ткани. Как антигенпрезентирующие клетки, они передают сигналы о наличии инфекции В- и Т-клеткам, способствуя быстрому развитию адаптивных иммунных реакций.

В отличие от пассивно функционирующих дендритных клеток (pDC), mDC легче заражаются вирусом Западного Нила и, как полагают, играют ключевую роль как в распространении вируса, так и в раннем включении иммунной системы. Например, ВЗН эффективно инфицирует mDC в лабораторных условиях, вызывая продукцию интерферона (ИФН) и провоспалительных цитокинов, которая может быть нарушена при старении [5, 6, 7].

Цитокины являются важными медиаторами воспалительных процессов, которые контролируют различные иммунные реакции в организме.

Цитокины представляют собой сигнальные белки, которые вырабатываются как иммунными, так и неиммунными клетками млекопитающих. Их активация и регуляция играют ключевую роль в раннем этапе репликации вируса Западного Нила (ВЗН) [6, 7]. Эти цитокины участвуют во всех механизмах защиты от ВЗН, но также могут способствовать иммунопосредованному повреждению мозговых тканей.

Среди множества цитокинов ключевыми в формировании иммунитета против ВЗН являются интерлейкины (ИЛ), хемокины и лиганды суперсемейства факторов некроза опухоли. Это подтверждается транскриптомным профилированием инфицированных ВЗН клеток и тканей с использованием ДНК-микрочипов или секвенирования РНК [6, 7].

Все больше доказательств свидетельствует о том, что иммунный ответ хозяина, опосредованный цитокинами, играет ключевую роль в лихорадке Западного Нила (ЛЗН) и их исходе.

Во-первых, клинические данные подтверждают, что различные цитокиновые профили, которые зависят от пола, состояния здоровья и полиморфизмов человека в иммунокодирующих генах, коррелируют с разными исходами инфекции. Это открывает путь к использованию родственных биомаркеров для прогнозирования тяжести заболевания ЛЗН в клинических условиях [5, 6, 7].

Во-вторых, применение цитокинов в качестве агонистов или блокирование их эффектов с помощью фармацевтических или генетических средств на моделях мышей продемонстрировало их способность значительно изменять фенотипы заболеваний, связанных с ВЗН. Таким образом, более глубокое понимание роли цитокинов в развитии воспалительных заболеваний нервной системы (ВЗН) может не только улучшить диагностику и прогнозирование, но и стать основой для разработки новых иммуномодулирующих методов лечения неврологических расстройств, вызванных ВЗН.

Интерлейкины (ИЛ) представляют собой белки, регулирующие рост, дифференцировку и активацию клеток в процессе противовирусной защиты. На данный момент были подробно изучены ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-17А, ИЛ-22 и ИЛ-23, в то время как о роли остальных ИЛ в иммунном ответе на ВЗН известно гораздо меньше.

Хемокины – это специальные молекулы, которые играют ключевую роль в процессе движения клеток. Они взаимодействуют с рецепторами, связанными с G-белком, что способствует направленному перемещению клеток в ходе гомеостаза и воспаления. Эти белки делятся на четыре подсемейства: С-хемокины, СС-хемокины, СХС-хемокины и СХ3С-хемокины. Они различаются по количеству и расположению консервативных N-концевых остатков цистеина. [9, 10]

В ответ на инфекцию ВЗН на моделях млекопитающих были замечены изменения в экспрессии хемокинов и их рецепторов. Исследования, посвященные рецепторам хемокинов, таким как Ccr2, Ccr5, Ccr7, Cxcr2, Cxcr3, Cxcr4 и Cx3cr1, в моделях, инфицированных ВЗН, позволили понять, насколько важны хемокины в разные периоды и в разных органах. Однако следует отметить, что каждый из этих рецепторов может связываться с несколькими хемокинами, и на данный момент существует ограниченное количество информации о роли конкретных хемокинов в инфекции ВЗН, включая CCL2, CCL7 и CXCL10. Таким образом, чтобы понять точное значение различных хемокинов в процессе ЛЗН, необходимы дополнительные исследования. [9, 10, 11]

Гуморальный ответ

Интерфероны (ИФН) типа I играют ключевую роль в контроле репликации вируса Западного Нила (ВЗН) и защите от инфекции. Исследования, проведенные в 1950-х годах, продемонстрировали, что ИФН I типа обладает мощным противовирусным действием в отношении ВЗН.

Более поздние исследования подтвердили, что передача сигналов ИФН I типа необходима для защиты, контроля репликации вируса и ограничения его тропизма к тканям [11]. Мыши, лишенные способности вырабатывать ИФН- β , проявляют повышенную восприимчивость, сопровождающуюся неконтролируемой репликацией вируса как на периферии, так и в центральной нервной системе (ЦНС) [8, 9].

Помимо своей роли во врожденном иммунитете, передача сигналов ИФН I типа способствует ранней активации В-клеток формированию эффекторных ответов CD 8+ Т-клеток против ВЗН [9] и контролирует регуляторные ответы Т-клеток [9]. Хотя, по-видимому, ИФН I типа обладают более выраженной противовирусной активностью, в одном исследовании также было выявлено, что ИФН- λ , ИФН III типа, также участвует в борьбе с ВЗН *in vitro*. ИФН- λ , по-видимому, играет незначительную роль в предотвращении инфицирования клеток вирусоподобными частицами ВЗН (VLP), но, по-видимому, не способен эффективно ингибировать репликацию вируса [12].

В качестве защитного механизма ВЗН применяет различные стратегии, направленные на подавление сигналов, инициируемых интерферонами (ИФН) типов I и III. [12, 13, 14]

Было выявлено несколько механизмов, блокирующих ответы на ИФН I типа:

1. Ингибирование фосфорилирования Tyc2.
2. Лизосомальная и протеосомальная деградация IFNAR 1.
3. Перераспределение клеточного холестерина.
4. Активация развернутого белкового ответа.

NS 2A, NS 2B, NS 3, NS 4A и NS 4B, как предполагается, блокируют фосфорилирование STAT1 и STAT2, предотвращая их перемещение в ядро и последующую выработку ISG [12, 13, 14]. NS 5 также принимает участие в ингибировании фосфорилирования STAT1 и, возможно, дополнительно участвует в деградации STAT2 [8, 9].

Недавно было показано, что синтез вирусной некодирующей субгеномной РНК (sfRNA) подавляет передачу сигналов ИФН I типа, хотя механизм действия этого процесса остается не до конца ясным. ВЗН, по всей видимости, обладает мощным блокирующим действием на передачу сигналов ИФН- λ . Он препятствует индуцированному ИФН- λ фосфорилированию Tyc2, STAT1 и STAT2. Существует предположение, что это торможение может происходить на уровне рецепторов ИФН- λ , однако для подтверждения этой гипотезы необходимы дальнейшие исследования.

Заключение

Лихорадка Западного Нила продолжает оставаться проблемой здравоохранения во всем мире. Изучение характеристик цитокинов является важным этапом в понимании общей регуляции иммунных реакций, вызванных вирусом Западного Нила (ВЗН).

Цитокины IL-1 β , IL-23, IL-17A, CCL7, CXCL10, TRAIL, CD40L и BAFF защищают мышей от острой инфекции ВЗН. В то же время, IL-10 и IL-22 способствуют развитию ВЗН. IL-6 и IL-12 не оказывают видимого эффекта во время инфекции, а роли CCL2, TNF- α и FasL остаются неясными.

Выявление точной функции конкретного цитокина может быть непростой задачей. В этом обзоре мы хотим подчеркнуть два ключевых вывода:

1. На экспрессию и функции этих веществ влияют различные биологические факторы, такие как источник клеток, мишень, стадия иммунного ответа, а также наличие одних или отсутствие других цитокинов.
2. Разнообразные условия эксперимента, включая штаммы вирусов, методы лабораторных исследований и время сбора образцов, могут объяснить противоречивые и даже парадоксальные результаты, связанные с ролью цитокинов во время инфекции.

Исход инфекции, вызванной вирусом Западного Нила, зависит не только от скорости уничтожения вируса, но и от силы воспалительной реакции, вызванной цитокинами. Исследования на людях и лабораторных животных показывают, что провоспалительные цитокины, такие как интерлейкин-1 β , фактор некроза опухоли- α , интерлейкин-12p70, CXCL10 и интерлейкин-6, могут оставаться повышенными даже после выздоровления от инфекции.

Это значит, что успешное лечение должно включать в себя использование противовоспалительных препаратов. Они помогут справиться с обострением воспалительного процесса во время острой фазы и предотвратить развитие долгосрочных неврологических нарушений.

Эксперименты на мышах показали, что терапия, направленная на модуляцию нейровоспалительных процессов, может улучшить исход инфекции ЛЗН. Эти исследования были проведены Getts et al. в 2012 году и McCandless et al. в 2008 году.

Однако, учитывая сложность нейровоспалительных процессов, необходимо разработать специальные методы лечения, которые позволят максимально использовать

нейропротекторные свойства иммунной системы, одновременно минимизируя риски развития иммунопатологии [16].

Для понимания их роли в иммунопатогенезе ЛЗН требуются дополнительные исследования, направленные на анализ значения важных цитокинов, которые были описаны в клинических исследованиях на людях, таких как IL-15, CCL8, CCL11, CCL13 и CCL20.

Список литературы / References

1. Gould EA, Solomon T. Pathogenic flaviviruses. *Lancet* 2008; 371 (9611): 500–9.
2. Lindenbach, B.D.; Rice, C.M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Knipe, H.P., editor. *Fields Virology*. Lippincott, Williams, & Wilkins; Philadelphia: 2001. p. 991–1041.DM
3. Rossi SL, Ross TM, Evans JD. West Nile virus. *Clin Lab Med*. 2010 Mar; 30 (1): 47–65. DOI: 10.1016/j.cll.2009.10.006. PMID: 20513541; PMCID: PMC2905782.
4. Quicke, K. M., & Suthar, M. S. (2013). The innate immune playbook for restricting West Nile virus infection. *Viruses*, 5 (11), 2643–2658. <https://doi.org/10.3390/v5112643>
5. Diamond, M. S., & Gale, M., Jr (2012). Cell-intrinsic innate immune control of West Nile virus infection. *Trends in immunology*, 33 (10), 522–530. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.05.008>
6. Quicke, K. M., & Suthar, M. S. (2013). The innate immune playbook for restricting West Nile virus infection. *Viruses*, 5 (11), 2643–2658. <https://doi.org/10.3390/v5112643>
7. Zimmerman, M. G., Bowen, J. R., McDonald, C. E., Pulendran, B., & Suthar, M. S. (2019). West Nile Virus Infection Blocks Inflammatory Response and T Cell Costimulatory Capacity of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Journal of virology*, 93 (23), e00664–19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00664-19>
8. Suthar MS, Diamond MS, Gale M Jr. West Nile virus infection and immunity. *Nat Rev Microbiol*. 2013 Feb; 11 (2): 115–28. DOI: 10.1038/nrmicro2950. PMID: 23321534.
9. Fredericksen B. L. (2014). The neuroimmune response to West Nile virus. *Journal of neurovirology*, 20 (2), 113–121. <https://doi.org/10.1007/s13365-013-0180-z>
10. Luo, H., & Wang, T. (2018). Recent advances in understanding West Nile virus host immunity and viral pathogenesis. *Fl000Research*, 7, 338. <https://doi.org/10.12688/f1000research.13362.1>
11. Benzarti E, Murray KO, Ronca SE. Interleukins, Chemokines, and Tumor Necrosis Factor Superfamily Ligands in the Pathogenesis of West Nile Virus Infection. *Viruses*. 2023 Mar 22; 15 (3): 806. DOI: 10.3390/v15030806. PMID: 36992514; PMCID: PMC10053297.
12. Thackray, L. B., Shrestha, B., Richner, J. M., Miner, J. J., Pinto, A. K., Lazear, H. M., Gale, M., Jr, & Diamond, M. S. (2014). Interferon regulatory factor 5-dependent immune responses in the draining lymph node protect against West Nile virus infection. *Journal of virology*, 88 (19), 11007–11021. <https://doi.org/10.1128/JVI.01545-14>
13. Daffis S., Samuel M. A., Suthar M. S., Keller B. C., Gale M., Jr., Diamond M. S. Interferon regulatory factor IRF-7 induces the antiviral alpha interferon response and protects against lethal West Nile virus infection. *J. Virol*. 2008; 82: 8465–8475. DOI: 10.1128/JVI.00918-08.
14. Samaan, Z., McDermaid Vaz, S., Bawor, M., Potter, T. H., Eskandarian, S., & Loeb, M. (2016). Neuropsychological Impact of West Nile Virus Infection: An Extensive Neuropsychiatric Assessment of 49 Cases in Canada. *PloS one*, 11 (6), e0158364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158364>

Статья поступила / Received 02.04.2025

Получена после рецензирования / Revised 10.05.2025

Принята в печать / Accepted 22.07.2025

Сведения об авторах

Истин Александр Александрович, ординатор кафедры инфекционных болезней и клинической иммунологии. SPIN-код: 3811–1840. ORCID:0009-0005-5123-2076

Красноруцкая Ольга Николаевна, д.м.н., доцент, заведующая кафедрой инфекционных болезней и клинической иммунологии. SPIN-код: 3953–4656. AuthorID: 727938. ORCID: 0000-0003-4796-7334

Безлепкин Антон Сергеевич, ординатор кафедры инфекционных болезней и клинической иммунологии.

Шевцова Вероника Ивановна, к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней и клинической иммунологии. ORCID: 0000-0002-1707-436X

Саломакхин Георгий Георгиевич, к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней и клинической иммунологии. SPIN-код: 3155–9939. AuthorID: 690475

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко» Минздрава России, Воронеж, Россия

Автор для переписки: Истин Александр Александрович. E-mail: istin2013@yandex.ru

About authors

Istin Alexander A., resident at Dept of Infectious Diseases and Clinical Immunology. SPIN-code: 3811–1840. ORCID:0009-0005-5123-2076

Krasnorutskaya Olga N., DM Sci (habil), associate professor, head of Dept of Infectious Diseases and Clinical Immunology. SPIN-code: 3953–4656. AuthorID: 727938. ORCID: 0000-0003-4796-7334

Bezlepkin Anton S., resident at Dept of Infectious Diseases and Clinical Immunology.

Shevtsova Veronika I., PhD Med, associate professor at Dept of Infectious Diseases and Clinical Immunology. ORCID: 0000-0002-1707-436X

Salomakhin Georgy G., PhD Med, associate professor at Dept of Infectious Diseases and Clinical Immunology. SPIN-code: 3155–9939. AuthorID: 690475

Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko Voronezh, Russia

Corresponding author: Istin Alexander A. E-mail: istin2013@yandex.ru

Для цитирования: Истин А.А., Красноруцкая О.Н., Безлепкин А.С., Шевцова В.И., Саломакхин Г.Г. Аспекты иммунного ответа при инфекции, вызванной вирусом Западного Нила. *Медицинский алфавит*. 2025; (16): 64–67. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2025-16-64-67>

For citation: Istin A. A., Krasnorutskaya O. N., Bezlepkin A. S., Shevtsova V. I., Salomakhin G. G. Aspects of the immune response in West Nile virus infection. *Medical alphabet*. 2025; (16): 64–67. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2025-16-64-67>