

УДК 615.322+547.963.61.001.6

DOI 10.17021/2019.14.4.68.73

© В.М. Лахтин, В.А. Алешкин, М.В. Лахтин,
С.С. Афанасьев, С.Ю. Пчелинцев, А.В. Степанов,
Г.А. Дмитриев, Н.И. Леонтьева, Н.М. Грачева,
Е.А. Шмелева, Б.М. Мануйлов, А.С. Эйберман, 2019

СИСТЕМЫ МУКОЗАЛЬНЫХ ЛЕКТИНОВ ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ (КРАТКИЙ АНАЛИЗ)

Лахтин Владимир Михайлович, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Россия, 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, тел.: (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com.

Алешкин Владимир Андрианович, доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, научный руководитель, ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Россия, 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, тел.: (495) 452-18-16, e-mail: info@gabrich.com.

Лахтин Михаил Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Россия, 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, тел.: (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com.

Афанасьев Станислав Степанович, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник, ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Россия, 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, тел.: (495) 452-18-16, e-mail: afanasievss409.4@bk.ru.

Пчелинцев Сергей Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор, директор, ОАО «Институт инженерной иммунологии», Россия, 142380, Московская обл., Чеховский район, пос. Любучаны, тел.: 8-916-585-55-79, e-mail: serg.pch@yandex.ru.

Степанов Алексей Вячеславович, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии, ООО «НПО Петровакс Фарм», Россия, 123112, г. Москва, Пресненская набережная, д. 12, Башня Федерация Восток, этаж 38, тел.: 8-925-272-10-94, e-mail: stepanovav@petrovax.ru.

Дмитриев Георгий Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой биологии, ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Россия, 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, тел.: 8-903-186-52-10, e-mail: academicdmित्रиев@mail.ru.

Леонтьева Нина Ивановна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник, руководитель клинического отдела, ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Россия, 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, тел.: 8-926-502-12-31, e-mail: leonteva-nina@yandex.ru.

Грачева Нина Михайловна, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник клинического отдела, ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Россия, 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, тел.: 8-903-973-79-62, e-mail: leonteva-nina@yandex.ru.

Шмелева Елена Александровна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов, ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Россия, 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, тел.: 8-985-226-93-60, e-mail: lab4521814@yandex.ru.

Мануйлов Борис Михайлович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией медико-биологических исследований, НИИ детского питания – филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», Россия, 143500, Московская область, г. Истра, ул. Московская, д. 48, тел.: 8-926-905-77-88, e-mail: bmanuilov@yandex.ru.

Эйберман Александр Семенович, доктор медицинских наук, профессор кафедры госпитальной педиатрии и неонатологии, ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Большая Казачья, д. 112, тел.: 8-905-322-72-07, e-mail: aberman@bk.ru.

Дана оценка технологических перспектив лектинов мукозальных биотопов человека. Защитные лектины действуют как имитаторы клеток защиты, проявляют свойства носителей, доставщиков и распределителей гликополимеров (пребиотиков, лекарств, поверхностных декоров поддержки функционирования клеток, тканей и органов) против инфекций и опухолей. Распознающие синтетические муцинподобные гликополимеры и связывающие их системы лектинов перспективны для конструирования защитных консорциумов синбиотопа. Такие системы лектинов перспективны в качестве лекарственных форм поддержки пациентов. Предложена модель биореактора для оценки пребиотических свойств гликополимеров, лектинов и/или катионов металлов.

Ключевые слова: гликоконъюгаты, системы лектинов, пробиотики, синбиотики, мукозальный орган, мукозальный иммунитет, грамположительные бактерии, бифидобактерии, лактобациллы, дрожжеподобные грибы.

SYSTEMS OF THE MUCOSAL LECTINS FOR MEDICAL TECHNOLOGIES (BRIEF ANALYSIS)

Lakhtin Vladimir M., Dr. Sci. (Biol.), Chief Research Associate, Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology n. a. N.G. Gabrichevsky, 10 Admiral Makarov St., Moscow, 125212, Russia, tel: (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com.

Aleshkin Vladimir A., Dr. Sci. (Biol.), Professor, Honored Scientist, Scientific Director, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, 10 Admiral Makarov St., Moscow, 125212, Russia, tel.: (495) 452-18-16, e-mail: info@gabrich.ru.

Lakhtin Mikhail V., Cand. Sci. (Biol.), Senior Research Associate, Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology n. a. N.G. Gabrichevsky, 10 Admiral Makarov St., Moscow, 125212, Russia, tel: (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com.

Afanas'iev Stanislav S., Dr. Sci. (Med.), Professor, Honored Scientist, Chief Research Associate, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, 10 Admiral Makarov St., Moscow, 125212, Russia, tel.: 8-903-667-20-68, e-mail: afanasievss409.4@bk.ru.

Pchelintsev Sergey Yu., Dr. Sci. (Med.), Professor, Director, Institute for Immunological Engineering, Lyubuchany, 142380, Russia, tel: 8-916-585-55-79, e-mail: serg.pch@yandex.ru.

Stepanov Aleksey V., Dr. Sci. (Biol.), Professor, Chief Research Associate, NPO Petrovax Pharm, 12 Presnenskaya embankment, Federation Tower East, floor 38, Moscow, 123112, Russia, tel.: 8-925-272-10-94, e-mail: stepanovav@petrovax.ru.

Dmitriev Georgiy A., Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of Department, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, 10 Admiral Makarov St., Moscow, 125212, Russia, tel.: (495) 452-18-16, e-mail: info@gabrich.ru.

Leontieva Nina I., Dr. Sci. (Med.), Leading Research Associate, Head of Department, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, 10 Admiral Makarov St., Moscow, 125212, Russia, tel.: 8-926-502-12-31, e-mail: leonteva-nina@yandex.ru.

Gracheva Nina M., Dr. Sci. (Med.), Professor, Chief Research Associate, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, 10 Admiral Makarov St., Moscow, 125212, Russia, tel.: 8-903-973-79-62, e-mail: leonteva-nina@yandex.ru.

Shmeleva Elena A., Dr. Sci. (Biol.), Professor, Chief Research Associate, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, 10 Admiral Makarov St., Moscow, 125212, Russia, tel.: 8-985-226-93-60, e-mail: lab4521814@yandex.ru.

Manuilov Boris M., Dr. Sci. (Biol.), Chief of Laboratory, Child Nutrition Research Institute – Branch of Federal Publicly Funded Institution of Science “Federal Research Center of Nutrition and Biotechnology”, 48 Moskovskaya St., Istra, Moscow, 143500, Russia, tel.: 8-926-905-77-88, e-mail: bmanuilov@yandex.ru.

Eyberman Aleksandr S., Dr. Sci. (Med.), Professor of Department, Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, 112 Bol'shaya Kazach'ya St., Saratov, 410012, Russia, tel.: 8-905-322-72-07, e-mail: aberman@bk.ru.

An evaluation of technological prospects of mucosal lectins of the human mucosal biotope is presented. Protective lectins act as imitators of cells, reveal properties of carriers, deliveries, and distributors of glycopolymers (prebiotics, therapeutics, surface décors supporting functioning cells, tissues and organs) against infections and tumors. The lectin systems recognizing and binding synthetic sets of glycopolymers serve effective instruments for constructing biotope consortia. The model of a minimal bioreactor for testing prebiotic properties of glycopolymers, lectins and/or metal cations is proposed.

Key words: *glycoconjugates, lectin systems, probiotics, synbiotics, mucosal organ, mucosal immunity, Gram-positive bacteria, bifidobacteria, lactobacilli, yeast-like fungi.*

Системы лектинов (СЛ) биотопов, включающие лектины пробиотиков (ЛП) и метаболитные лектины врожденного иммунитета, распознающие и связывающие наборы синтетических и природных гликополимеров (ГП), практически не исследованы.

Цель краткого анализа: на основании собственных данных [1, 2, 3, 4, 5] акцентировать перспективность мукозальных лектинов в инновационном прикладном, технологическом направлении медицинской биотехнологии.

Материалы и методы исследования. Штаммы бактерий – продуценты лектинов, а также пробиотики на их основе были получены из коллекции микроорганизмов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора.

Бактерии выращивали на содержащих гидролизат казеина средах (например, казеин-дрожжевой среде – КД5с и Бифидум-среде). Полученные супернатанты после культивирования фракционировали, выделенные белки концентрировали.

Лектины идентифицировали, фракционировали, изолировали или иммобилизовывали на мембране с применением изоэлектрофокусирования в горизонтальной пластине полиакриламидного геля (ПААГ) с использованием оборудования Amersham Pharmacia Biotech Inc. (Швеция), предназначенного для препаративного электрофореза на охлаждаемой керамической платформе, и последующего полусухого электроблоттинга на графитовых пластинах насадки Novo к Multiphore II («SERVA Electrophoresis GmbH», Германия). ЛП выделяли из геля в соответствующих им областях с pI 4,0 – 4,5 (кислые лектины) и $pI > 7,0$ (щелочные лектины). ЛП лактобацилл не содержали оксидоредуктазных систем с pI 5,0 – 5,6.

Белки и лектины идентифицировали после электроблоттинга с пластины ПААГ на бислойный пористый мембранный фильтр, состоящий из прокладочного гидрофильного мембранного фильтра Durapore, наложенного на гидрофобный фильтр Immobilon-P («Merck Millipore», Германия). Белки на гидрофобной мембране обрабатывали красителем SYPRO Ruby Protein blot stain («Thermo Fisher Scientific», США) и подвергали флюоресцентному анализу. Распределение лектинов определяли биотинилированными ГП на основе полиакриламидного ядра с последующим проявлением стрептавидин-пероксидазой. Связавшийся фермент инкубировали с хемилюминесцентным субстратом BioWest («Pierce Chemical», США). Биолюминесценцию регистрировали в оптимизированном режиме живого изображения в камере EpiChemi II Darkroom системы BioChemi System («UVP Inc.», США) в ряду последовательных нелинейных экспозиций. В работе использовали пакет программ LabWorks Version 4 («UVP Inc.», США).

Результаты исследования и их обсуждение.

Лектиновые системы – базисная составляющая иммунитета. Основополагающим свойством защитных лектинов является их способность распознавать конфигурации углеводов и углеводных остатков (гликопаттернов) в составе сложных молекул, содержащих экспонированные ГП-мишени. Синтетические ГП с известной структурой, включающие 1–2 типа углевода или простые повторяющиеся элементы гликозида или гликопептида, позволяют однозначно судить о результатах и специфичности их взаимодействия с лектинами, направленно использовать СЛ в качестве носителей, надежно прогнозировать кофункционирование ГП и СЛ.

На примере ЛП установлена способность мукозальных лектинов различать (ранжировать) синтетические ГП с варьирующими последовательностями и комбинациями экспонированных на полиакриламидных ядрах остатками GalNAc в муцинподобных соединениях и антигенах. Также выявлен системный характер распознавания лектинами в отношении ГП и наоборот (лектин-ранжированная группа ГП, ГП-ранжированная группа лектинов).

Так, если один компонент СЛ не в состоянии распознать мишень, представляющую опасность и предмет надзора, то это «упущение» не только компенсируется наличием других адекватных

компонентов СЛ, но и допускается синергизм нескольких других компонентов в обнаружении и атаке мишени (доставки эффекторов к ней).

Для лектинов защиты как кофункционирующих (кофакторных, вспомогательных, поддерживающих) белков и пептидов характерен антипатогенный синергизм с другими типами распознающих эффекторов и антипатогенными факторами. Такие лектины (ЛП и другие рассматриваемые в работе) функционируют как сетевые метаболомбиотики (сеть-в-сети, сеть-на-сеть), способные выстраивать реакционную сеть, поддерживать ее инфраструктуру, влиять на узлы сети через взаимодействие с ферментами и цитокинами.

Мукозальные лектины (в том числе лектины мукозальных биотопов) функционируют как орган-зависимая система с варьирующими активностями. Они участвуют в типировании тканей и органов через создание в них устойчивых инфраструктур. При этом адаптационный характер функционирования, например ЛП, зависит от особенностей биотопа (специфики слизистой, распределения микроэкологических нишевых взаимоотношений локального микробиоценоза под влиянием лидерных симбиотических микроорганизмов и ЛП). Ключевой остается антипатогенная, антиинфекционная составляющая действия защитных мукозальных лектинов в биотопах. В частности, ЛП отражают свойства класса деструкторов биопленок дрожжей и грамположительных патогенов, участвуют в регуляции Quorum Sensing и Cross-Talking с системами врожденного иммунитета, например с системой комплемента.

Лектиновые продукты для поддержки иммунитета в бескислородных условиях. Из культур пробиотических штаммов бифидобактерий и лактобацилл человека получены субстанции кислых и щелочных лектинов, не содержащих выраженных оксидоредуктазных систем окислительного стресса, требующих присутствия кислорода. Это важно для биотопа в связи с тем, что окислительный стресс деструктивен в отношении окружающей среды в биотопе, может снижать эффективность био-препаратов.

Наблюдается кофункционирование лектиновых и оксидоредуктазных систем на штаммовом уровне консорциума. Так, показано, что в ацилакте штамм *Lactobacillus helveticus* NK1 выступает как преимущественный донор СЛ, который не содержит оксидоредуктазной системы в интервале рI 5,0 – 5,6), а другие штаммы – как доноры оксидоредуктазных систем. Такое межштаммовое распределение макроактивностей (один из ключевых принципов конструирования консорциумов) может реализовываться в технологических цветных реакциях, включая обесцвечивание пигментов. Процессы могут иметь перспективы для «осветления» кожи (при использовании косметических кремов), предотвращения появления и устранения раневых инфекций слизистой губ, формирования кожных пигментированных образований, защиты от солнечной радиации.

Использованные в работе синтетические ГП проявляли антиоксидантные свойства и защищали сборочные СЛ от деградации. Кислые ПЛ характеризовались как сборочные и мультифункциональные вещества, способные распознавать и связывать несколько типов синтетических ГП (ранжированных по выраженности сродства к лектинам).

Наблюдались общие закономерности взаимодействия белковых гормонов с ГП при сравнении с аналогичными свойствами ПЛ. Это является основанием для конструирования сочетанных синергистически действующих защитных СЛ разной природы, в том числе комбинаций с другими антимикробными агентами (антибиотиками, фитолектинами, компонентом С4 системы комплемента). СЛ культур пробиотических бактерий человека обладали способностью в процессах сборки запускать, заменять или переключать распознавание и последующее связывание ГП разных типов одним и тем же белком и группой белковых компонентов ЛП.

Технологические перспективы мукозальных лектинов. Мембранные технологии выделения лектинов могут быть основой для получения функционально активных, ориентированных в направлении объекта ЛП, лекарственных препаратов СЛ, связанных с белковыми гормонами человека, фармацевтических фитолектинов. Они перспективны как для диагностико-прогностического микроанализа, так и для сопроводительной терапии в виде биосовместимых материалов пролонгированного регенерирующего и поддерживающего действия в медицинской дерматологии и косметологии, гастроэнтерологии, урологии и гинекологии при временном реконструировании поддерживающей инфраструктуры мукозальных биотопов открытых полостей организма, коррекции изменений единой системы слизистых оболочек в организме.

Мембранные технологии выделения лектинов включают технологии использования аффинных пористых гидрофобных мембран с предсказуемо распределенными двумерными мозаиками высокоочищенных (с приближением к параметрам биосенсоров) полифункциональных (системных) наборов

ЛП с системной специфичностью к наборам ГП (с рассмотрением специфичности по типам «Один компонент СЛ – ранжированный по сродству и доступу набор ГП», «Один тип ГП – ранжированный набор компонентов СЛ»). Перспективы их использования – это противогрибковые и противогрибково-антибактериальные покрытия, комбинации с наборами антимикотиков; кофункционирующие в режиме реального времени хемилюминесцентные системы сверхчувствительной (биосенсорной) мониторинговой визуализации таких распознающих систем, как «Лактобациллярные СЛ – лактобациллярные оксидоредуктазы», «Бифидобактериальные СЛ – бифидобактериальные экзополимерные соединения», «Лактобациллярные или бифидобактериальные СЛ – лактобациллярные или бифидобактериальные биосурфактанты», «СЛ – сильнокислые ($pH < 3,8$) сериальные фитооксидоредуктазы или фито[глико]оксидазы», «Эритропозитиновые СЛ – иммунный сэндвич с моноклональными антителами и синтетическими ГП с имитирующими муцины и антигены свойствами».

Результаты представленных исследований показали соответствие специфичных взаимодействий модельных мембранных высокоочищенных систем ЛП с синтетическими ГП при сравнении с взаимодействием растворимых препаратов ЛП с эритроцитами группы крови А(II) с экспонированными остатками N-ацетил-D-галактозамина. Вышесказанное позволяет, с одной стороны, вводить дополнительный контроль действия высокоаффинных мембран со свойствами биочипов со стороны поверхностно-клеточного коммуникационного уровня, а, с другой стороны, обеспечивать создание на твердой фазе надежных, технологичных, клеточно-цитоклиновых, направленных функционально активных градиентов (в микропанели, на блоке, биогеях).

Кроме того, возможны клеточные модельные технологии защитного характера, позволяющие исследовать кофункционирование и синергизм в случае влияния на макрофаги со стороны ЛП и определенных синтетических ГП, специфически действующих в отношении рецепторной СЛ клеток врожденного иммунитета.

Аффинные мембраны, содержащие СЛ и/или ГП, перспективны и для визуализации гликома декоров и статуса мукозальных ландшафтов биотопов.

На основании собственных результатов была предложена минимизированная биореакторная система синбиотического взаимодействия ЛП и ГП. Предлагаемый мини-биореактор позволяет исследовать влияние микроэлементов на синбиотические процессы при фиксировании выбранных типов ЛП и ГП.

В целом, анализ результатов показывает, что СЛ биотопов и соответствующие им комплексы ГП способствуют надежности функционирования мукозальных органов. Системы ЛП – ГП технологичны как инфраструктурные, сигнальные, антимикробные, антивирусные в условиях сбалансированного биотопа, они кофункционируют с защитными системами человека.

Список литературы

1. Лахтин, М. В. Консорциумные и штаммовые пробиотические лектиновые системы мукозального иммунитета против мукозальных инфекций и опухолей : потенциал влияния на микробиоценозы посредством про/синбиотиков / М. В. Лахтин, В. М. Лахтин, С. С. Афанасьев, В. А. Алешкин // Проблемы научной мысли. – 2018. – Т. 12, № 7. – С. 25–44.
2. Лахтин, М. В. Пробиотические лектины для инноваций / М. В. Лахтин, В. М. Лахтин, В. А. Алешкин, С. С. Афанасьев // News of Science and Education. – 2018. – Vol. 10, № 3. – С. 117–129.
3. Lakhtin, M. V. Mucosal open cavities as the organ of increased resistance and effectiveness / M. V. Lakhtin, V. M. Lakhtin, S. S. Afanasiev, V. A. Aleshkin // Journal of Advances in Biology & Biotechnology (JABB). – 2016. – Vol. 10, № 3. – P. 1–10.
4. Lakhtin, V. Synbiotic minibioreactor regulating by probiotic lectins, metal cations and glycoconjugates / V. Lakhtin, M. Lakhtin, V. Aleshkin // Proceedings of the 19th European Carbohydrate Symposium EUROCARB (2–6 July 2017, Barcelona). Scientific Program and Abstract Book. – Barcelona, 2017. – P. 591.
5. Lakhtin, M. V. Metabolite multiprobiotic formulas for microbial health / M. V. Lakhtin, V. M. Lakhtin, V. A. Aleshkin, S. S. Afanasiev // Oral health by using probiotic products. – 2019. – 21 p. doi: 10.5772/intechopen.86449.

References

1. Lakhtin M. V., Lakhtin V. M., Afanas'ev S. S., Aleshkin V. A. Konsortiumnye i shtammovye probioticheskie lektinovyie sistemy mukozal'nogo immuniteta protiv mukozal'nykh infektsiy i opukholey: potentsial vliyaniya na mikrobiotsenozy posredstvom pro/sinbiotikov [Consortium and strain probiotic lectin systems of mucosal immunity against mucosal infections and tumors: potential impact on microbiocenoses through pro / synbiotic]. Problemy nauchnoy mysli [Problems of Scientific Thought], 2018, vol. 12, no. 7, pp. 25–44.

2. Lakhtin M. V., Lakhtin V. M., Aleshkin V. A., Afanas'ev S. S. Probioticheskie lektiny dlya innovatsiy [Probiotic Lectins for Innovation]. *News of Science and Education*, 2018, vol. 10, no. 3, pp. 117–129.
3. Lakhtin M. V., Lakhtin V. M., Afanas'ev S. S., Aleshkin V. A. Mucosal open cavities as the organ of increased resistance and effectiveness. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology (JABB)*, 2016, vol. 10, no. 3, pp. 1–10.
4. Lakhtin V., Lakhtin M., Aleshkin V. Synbiotic minibioreactor regulating by probiotic lectins, metal cations and glycoconjugates. *Proceedings of the 19th European Carbohydrate Symposium EUROCARB (2–6 July 2017, Barcelona)*. Scientific Program and Abstract Book, Barcelona, 2017, p. 591.
5. Lakhtin M. V., Lakhtin V. M., Aleshkin V. A., Afanas'ev S. S. Metabolite multiprobiotic formulas for microbial health. *Oral health by using probiotic products*, 2019, 21 p. doi: 10.5772/intechopen.86449.