

Научная статья

УДК 619:612.12

doi: 10.34655/bgsha.2022.67.2.013

ВЛИЯНИЕ ВОДНОГО РАСТВОРА ФУЛЛЕРЕНА НА ПРОЦЕССЫ ПРО-И АНТИОКСИДАЦИИ В ОРГАНИЗМЕ БЕЛЫХ КРЫС

Николай Александрович Пудовкин¹, Сергей Дмитриевич Клюкин²,
Алексей Александрович Алексеев³, Владимир Васильевич Салаутин⁴

^{1,2,3,4}Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова,
Саратов

Автор, ответственный за переписку: Николай Александрович Пудовкин, niko-pudovkin@yandex.ru

Благодарности: Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-26-00019 «Разработка антиоксидантных и противоопухолевых ветеринарных препаратов на основе нанофуллеренов».

Аннотация. Фуллерены и их производные хорошо известны как новые классы антиоксидантов и они высокоактивны к некоторым свободным радикалам, они являются перспективными соединениями для практического использования в качестве антиоксидантов. Однако такая возможность функционализированных фуллеренов к расщеплению свободных радикалов системно не была изучена, и разработка более эффективных и легкодоступных антиоксидантных производных фуллеренов является актуальной и своевременной задачей в ветеринарной медицине. Целью работы явилось изучение влияния водного раствора фуллерена C_{60} в различных дозах на процессы перекисного окисления липидов и состояние антиоксидантной системы организма белых крыс. Соединение вводили в дозе 1, 2 и 3 мл (5 мг/кг, 10 мг/кг и 15 мг/кг по действующему веществу соответственно) подкожно. Умерщвление белых крыс проводили на 7-е сутки после введения соединения с целью взятия крови и тканей органов для биохимических исследований. Определение содержания малонового диальдегида проводили тиобарбитуровым методом. Определение диеновых конъюгатов в сыворотке крови определяли спектрометрическим методом. Антиоксидантную обеспеченность организма оценивали по активности фермента каталазы в сыворотке крови и гомогенатах. Установлено, что после введения водного раствора фуллерена C_{60} в дозах 1 и 2 мл концентрация диеновых конъюгатов повысилась на 34,3 и 30,4% соответственно относительно контроля. При введении водного раствора фуллерена C_{60} в дозе 3 мл достоверной разницы с контролем не установлено. Водный раствор фуллерена C_{60} вызывает ингибирование образования малонового диальдегида в органах и тканях организма. Наибольший эффект достигается после введения соединения в дозе 2 мл (10 мг/кг массы тела). Антиоксидантная система защиты отвечает активацией каталазы в организме.

Ключевые слова: водный раствор фуллерена, процессы перекисного окисления липидов, антиоксидантная система, малоновый диальдегид, каталаза, диеновые конъюгаты.

Original article

INFLUENCE OF AN AQUEOUS SOLUTION OF FULLERENE ON THE PROCESSES OF PRO-AND ANTIOXIDATION IN BODIES OF WHITE RATS

Nikolai A. Pudovkin¹, Sergey D. Klyukin², Alexey A. Alekseev³, Vladimir V. Salautin⁴

^{1,2,3,4} Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov, Saratov

Corresponding author: Nikolai A. Pudovkin, niko-pudovkin@yandex.ru

Acknowledgements: The work was carried out with the support of the RSF grant No. 22-26-00019 "Development of antioxidant and antitumor veterinary drugs based on nanofullerenes".

Abstract. Fullerenes and their derivatives are well known as new classes of antioxidants, and they are highly active to some free radicals. They are promising compounds for practical use as antioxidants. However, such a possibility of functionalized fullerenes to cleave free radicals has not been systematically studied, and the development of more effective and readily available antioxidant derivatives of fullerenes is an urgent and timely task in veterinary medicine. The aim of the work was to study the effect of an aqueous solution of fullerene C₆₀ in various doses on the processes of lipid peroxidation and the state of the antioxidant system of the body of white rats. The compound was administered at a dose of 1 ml, 2 ml and 3 ml (5 mg/kg, 10 mg/kg and 15 mg/kg according to the active substance, respectively) subcutaneously. Killing of white rats was carried out on the 7th day after the introduction of the compound in order to take blood and organ tissues for biochemical studies. Determination of the content of malondialdehyde was carried out by the thiobarbitur method. Determination of diene conjugates in blood serum was determined by spectrometric method. The antioxidant security of the body was assessed by the activity of the catalase enzyme in blood serum and homogenates. It was found that after the introduction of an aqueous solution of fullerene C₆₀ in doses of 1 ml., 2 ml. the concentration of diene conjugates increased by 34.3% and 30.4%, respectively, relative to the control. When an aqueous solution of fullerene C₆₀ was administered at a dose of 3 ml. there was no significant difference with the control. An aqueous solution of fullerene C₆₀ causes inhibition of the formation of malondialdehyde in the organs and tissues of the body. The greatest effect is achieved after the introduction of the compound in a dose of 2 ml (10 mg/kg body weight). The antioxidant defense system is responsible for catalase activation in the body.

Keywords: fullerene aqueous solution, lipid peroxidation processes, antioxidant system, malondialdehyde, catalase, diene conjugates.

Введение. Фуллерены и их производные хорошо известны как новые классы антиоксидантов и они высокоактивны к некоторым свободным радикалам, особенно к таким, как активные формы кислорода (АФК), супероксид, гидроксильный радикал, пероксильные радикалы и оксид азота. Эти вредные радикалы атакуют липиды, белки, ДНК и другие биологические ткани и органы [1, 7, 10].

Таким образом, водорастворимые фуллерены, в том числе комплексы включения «хозяин-гость», являются перспективными соединениями для практического использования в качестве антиоксидантов. Однако такая возможность функционализированных фуллеренов к расщеплению свободных радикалов систем-

но не была изучена, и разработка более эффективных и легкодоступных антиоксидантных производных фуллеренов является актуальной и своевременной задачей в ветеринарной медицине.

Цель – изучить влияние водного раствора фуллерена C₆₀ в различных дозах на процессы перекисного окисления липидов и состояние антиоксидантной системы организма белых крыс.

Методика исследований. Исследования проведены в 2022 году в лаборатории кафедры морфологии, патологии животных и биологии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова».

Исследования проводили на беспородных белых крысах массой 180-200 г.

Соединение вводили в дозе 1, 2 и 3 мл (5 мг/кг, 10 мг/кг и 15 мг/кг по действующему веществу соответственно) подкожно. Умерщвление белых крыс проводили на 7-е сутки после введения соединения с целью взятия крови и тканей органов для биохимических исследований. Эвтаназия достигалась путем одномоментной декапитации согласно рекомендациям по деонтологии медико-биологического эксперимента. Из собранной крови стандартным методом готовилась сыворотка.

Определение содержания малонового диальдегида (МДА) проводили тиобарбитуровым методом. Определение диеновых конъюгатов (ДК) в сыворотке крови определяли спектрометрическим методом. Антиоксидантную обеспеченность

организма оценивали по активности фермента каталазы в сыворотке крови и гомогенатах.

Полученный цифровой материал подвергали статистической обработке на персональном компьютере с использованием стандартной программы вариационной статистики Microsoft Excel. Для оценки значимости различий использовали коэффициент Стьюдента при критическом уровне значимости 0,05.

Результаты и их обсуждение. Первым этапом наших исследований было определение уровня диеновых конъюгатов в сыворотке крови белых крыс. Диеновые конъюгаты являются первичными продуктами перекисного окисления липидов. Результаты исследований представлены на рисунке 1.

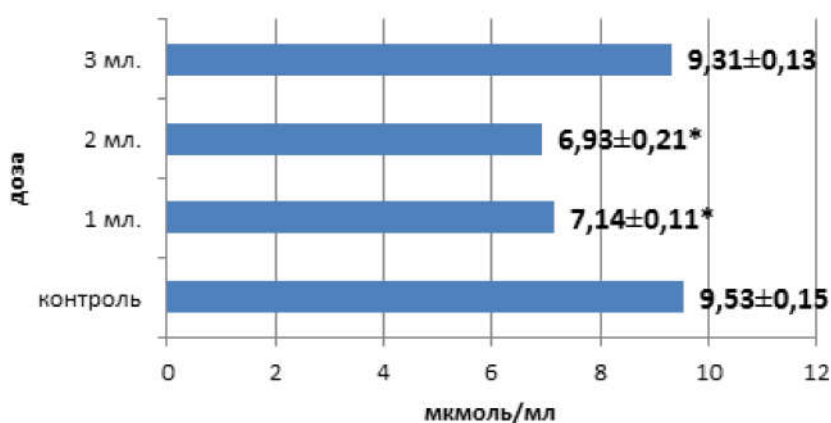


Рисунок 1. Содержание диеновых конъюгатов (мкмоль/мл) в сыворотке крови белых крыс (n=6)

Анализируя полученные результаты, установлено, что после введения водного раствора фуллерена C_{60} в дозах 1 и 2 мл концентрация ДК повысилась на 34,3 и 30,4% соответственно относительно контроля (рис. 1). При введении водного раствора фуллерена C_{60} в дозе 3 мл достоверной разницы с контролем не установлено.

Окисление липопротеинов включает перекисное окисление их полиненасыщенных жирных кислот и дает большое количество продуктов перекисного окисления липидов, таких как сопряженные гидропероксиды диена. При расщеплении этих продуктов образуются альдегиды, такие как малоновый диальдегид, которые дей-

ствуют как токсические мессенджеры в процессах образования повреждений клеток [2-4]. Перекисное окисление начинается только тогда, когда израсходованы молекулы антиоксидантов, в частности витамин Е, присутствующие в липопротеиновой частице. Это время задержки представляет собой устойчивость липопротеинов к перекисному окислению липидов [4, 5].

Анализируя результаты, представленные в таблице 2, установлено, что после введения водного раствора фуллерена C_{60} в дозах 1 и 2 мл концентрация МДА понизилась на 20,8 и 23,3% соответственно относительно контроля. При введении изучаемого соединения в дозе 3 мл дос-

Таблица 1 – Содержание малонового диальдегида (нмоль/г) в сыворотке крови и тканях внутренних органов белых крыс после введения водного раствора фуллерена C₆₀

№ п/п	Показатель	Контроль	Доза, мл		
			1	2	3
1	Сыворотка крови	7,66±0,73	6,34±0,21*	6,21±0,28*	7,13±0,33
2	Головной мозг	16,58±0,33	12,87±0,59*	12,00±0,35*	14,42±0,32*
3	Легкие	15,02±0,49	12,03±0,17*	11,25±0,31*	12,40±0,77*
4	Почки	13,00±0,07	11,41±0,31*	12,52±0,72	13,04±0,40
5	Печень	15,47±0,24	12,63±0,37*	12,31±0,23*	14,54±0,76
6	Сердце	8,05±0,24	7,04±0,13*	6,54±0,20*	7,51±0,14
7	Скелетные мышцы	5,21±0,13	5,00±0,38	4,91±0,18	5,05±0,24
8	Толстый кишечник	7,21±0,43	6,53±0,32*	6,23±0,28*	6,33±0,18*
9	Тонкий кишечник	7,42±0,36	6,77±0,16*	6,59±0,16*	7,00±0,58
10	Желудок	7,91±0,52	7,45±0,24	6,87±0,16*	6,54±0,13*

Примечание: (*) P ≤ 0,050

товерных различий относительно контроля не установлено.

В тканях головного мозга содержание МДА понизилось на 28,8, 38,2 и 15,0% после введения водного раствора фуллерена C₆₀ в дозах 1, 2 и 3 мл соответственно относительно контроля.

В ткани легких максимальное снижение концентрации МДА установлено после введения водного раствора фуллерена C₆₀ в дозе 2 мл (-35,5%), при введении водного раствора фуллерена C₆₀ в дозах 1 и 3 мл содержание малонового диальдегида снижалось на 24,8%.

Достоверное снижение МДА в тканях почек установлено при введении изучаемого соединения в дозе 1 мл на 13,9%. В остальных случаях различий не установлено.

В печени произошло достоверное снижение МДА после введения водного раствора фуллерена C₆₀ лишь в дозах 1 и 2 мл на 24,6 и 25,7% соответственно относительно контроля.

Исходный уровень МДА в миокарде составил 8,05±0,24 нмоль/г, после введения водного раствора фуллерена C₆₀ в дозах 1, 2 и 3 мл произошло снижение концентрации МДА до 7,04±0,13 (-14,3%), 6,54±0,20 (-23,1%) и 7,51±0,14 нмоль/г (-7,1%) соответственно относительно контрольных значений.

В скелетной мускулатуре достоверных различий в уровнях МДА не установлено.

В ткани толстого отдела кишечника концентрация МДА понизилась на 10,4 (1 мл), 15,7 (2 мл) и 13,9% (3 мл) относительно контроля.

В ткани тонкого отдела кишечника также произошло понижение МДА после введения водного раствора фуллерена C₆₀ в дозах 1 и 2 мл на 9,6 и 12,6% соответственно относительно контроля.

В ткани желудка произошло достоверное снижение МДА после введения водного раствора фуллерена C₆₀ в дозах 2 (-15,1%) и 3 мл (-20,9%) относительно контрольных значений.

Малоновый диальдегид представляет собой высокореактивный трехуглеродный диальдегид, образующийся как побочный продукт перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот и арахидоновой кислоты, он также является биологическим маркером окислительного стресса в организме. МДА образуется из полиненасыщенных липидов после деградации активными формами кислорода. Малоновый диальдегид также образуется после реакции с дезоксиаденозином и дезоксигуанозином в ДНК. Это происходит в тканях животных, особенно в условиях дефицита антиоксидантов [6].

Недавние исследования подтвердили

наличие значительного количества МДА в некоторых тканях организма, где он, по-видимому, возникает в результате окисления арахидоновой кислоты в клеточных мембранах.

Среди побочных продуктов процессов перекисного окисления липидов МДА является одним из наиболее часто встречающихся биомаркеров, позволяющий установить общий уровень перекисного окисления липидов в организме [8].

Таким образом, обобщая полученные результаты, можно констатировать, что

водный раствор фуллерена C_{60} вызывает ингибирование образования малонового диальдегида в органах и тканях организма. Наибольший эффект достигается после применения соединения в дозе 2 мл (10 мг/кг массы тела).

Следующим этапом наших исследований было изучение активности каталазы в тканях и органах после введения водного раствора фуллерена C_{60} в организме белых крыс. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Активность каталазы (ммоль/л) в сыворотке крови и тканях внутренних органов белых крыс после введения водного раствора фуллерена C_{60}

№ п/п	Показатель	Контроль	Доза, мл		
			1	2	3
1	Сыворотка крови	19,72±0,33	20,54±0,32	22,50±0,71*	20,99±0,54
2	Головной мозг	11,69±0,21	12,03±0,14	13,00±0,38*	13,05±0,32*
3	Легкие	39,54 ±1,13	40,52 ±0,21	43,54 ±1,03*	41,99 ±1,15
4	Почки	63,54±2,41	65,94 ±1,54	68,04 ±2,00*	66,17 ±1,61
5	Печень	65,92 ±2,71	68,93 ±2,04	70,43 ±1,40*	67,93 ±2,01
6	Сердце	22,74 ±1,03	24,71 ±1,73*	25,41 ±1,16*	24,98 ±1,03*
7	Скелетные мышцы	27,98 ±1,05	27,93 ±0,39	28,05 ±1,00	28,24 ±0,32
8	Толстый кишечник	18,05 ±0,32	19,03 ±0,72	20,42 ±0,03*	20,73 ±0,51*
9	Тонкий кишечник	18,33 ±0,65	20,21 ±0,66*	21,04 ±0,73*	20,65 ±0,54*
10	Желудок	18,00 ±0,43	20,61 ±0,65*	20,89 ±0,54*	19,96 ±0,28*

Примечание: (*) $P \leq 0,050$

Установлено, что активность каталазы в сыворотке крови достоверно повысилась только после введения водного раствора фуллерена C_{60} в дозе 2 мл (+14,1%) (табл. 2).

В ткани головного мозга активность каталазы после введения водного раствора фуллерена C_{60} повысилась на 11,2 – 11,6% относительно контрольного значения.

После введения водного раствора фуллерена C_{60} в дозе 2 мл активность фермента в ткани легких повысилась на 10,1%, почек и печени – на 7,0% относительно контроля. После введения остальных изучаемых доз достоверных отличий в активности каталазы в этих тканях не установлено.

В ткани сердца после введения вод-

ного раствора фуллерена C_{60} в дозах 1, 2 и 3 мл активность каталазы повысилась на 8,6, 11,7 и 9,8% соответственно относительно контроля.

В скелетной мускулатуре достоверных различий в активности каталазы не установлено.

В ткани толстого отдела кишечника активность каталазы повысилась на 13,3 (2 мл) и 14,8% (3 мл) относительно контроля.

В ткани тонкого отдела кишечника активность каталазы повысилась в диапазоне 10,2 – 14,7% после введения водного раствора фуллерена C_{60} .

Исходная активность каталазы в ткани желудка составила 18,00±0,43 ммоль/л, после введения водного раствора фул-

лерена C_{60} в дозе 1 мл составила $20,61 \pm 0,65$ ммоль/мл (+14,5%), в дозе 2 мл – $20,89 \pm 0,54$ ммоль/мл (16,1%), в дозе 3 мл – $19,96 \pm 0,28$ ммоль/мл (+10,8%) относительно контроля.

Существует множество ферментов, способных нейтрализовать перекись водорода. Эти ферменты включают каталазу, глутатионпероксидазу и другие пероксидазы, такие как цитохром С-пероксидаза и НАДН-пероксидаза [9].

Каталаза является ключевым ферментом, использующим в качестве субстрата перекись водорода, нерадикальную АФК. Каталаза расщепляет две молекулы перекиси водорода на одну молекулу кислорода и две молекулы воды в двухстадийной реакции. Этот фермент отвечает за нейтрализацию путем разложения перекиси водорода, тем самым поддерживая оптимальный уровень молекулы в клетке, что также необходимо для клеточных сигнальных процессов [6, 11].

Таким образом, после введения водного раствора фуллерена C_{60} происходит активизация антиоксидантной системы защиты организма. Наиболее эффективная доза установлена в 2 мл (10 мг/кг массы тела).

Заключение. Таким образом, водный раствор фуллерена C_{60} вызывает ингибирование образования малонового диальдегида в органах и тканях организма. Наибольший эффект достигается после введения соединения в дозе 2 мл (10 мг/кг массы тела). Антиоксидантная система защиты отвечает активацией каталазы в организме.

Список источников

1. Алексеев А.А., Пудовкин Н.А., Салаутин В.В. Изменение белково-азотистого обмена у лабораторных животных под влиянием водного раствора фуллерена C_{60} // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана. 2021. Т. 247. № 3. С. 6-10.
2. Воронцова О.А., Алексеев А.А. Динамика накопления диеновых конъюгатов в сыворотке крови кошек с заболеваниями нижних мочевыводящих путей // Актуальные проблемы ветеринарной медицины и биологии : материалы Национальной научно-прак-

тической конференции с международным участием, посвященной 90-летию факультета ветеринарной медицины ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный аграрный университет». Оренбург, 2020. С. 48–50.

3. Воронцова О.А., Пудовкин Н.А., Салаутин В.В., Ключкин С.Д. Особенности процессов перекисного окисления липидов в организме кошек с заболеваниями мочевыводящих путей // Аграрный научный журнал. 2021. № 4. С. 37 - 40.

4. Дежаткина С.В., Проворов А.С., Проворова Н.А. Характеристика липидно-углеводного обмена на фоне введения каротиноидов в рацион свиней: монография. Ульяновск : УлГАУ, 2020. 144 с.

5. Каримова Р.Г., Белова А.А. Активность нитроксидергической системы у кошек и собак при хронической почечной недостаточности // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2020. Т. 241. №1. С. 99-103.

6. Луцкий М.А., Куксова Т.В., Смелянец М.А., Лушников Ю.П. Свободнорадикальное окисление липидов и белков – универсальный процесс жизнедеятельности организма // Успехи современного естествознания. 2014. № 12-1. С. 24-28.

7. Мокшин Д.А., Пудовкин Н.А. Особенности свободнорадикальных процессов в организме белых крыс при введении фосфорсодержащего вещества // Естественные науки. 2018. №1(62). С. 44 – 48.

8. Павлова О.Н., Гуленко О.Н., Каримова Р.Г., Борискин П.В. и др. Взаимосвязь распределения концентрации малонового диальдегида в сыворотке крови и тканях экспериментальных животных // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2019. Т. 238. № 2. С. 150-154.

9. Павлова О.Н., Гуленко О.Н., Каримова Р.Г., Гондарева Л.Н. и др. Исследование динамики активности каталазы в сердце и мышечной ткани крыс при механическом воздействии на гематоофтальмический барьер // Генетика и разведение животных. 2020. № 3. С. 106-113.

10. Пиотровский Л.Б., Киселев О.И. Фуллерены в биологии. СПб.: Росток, 2006. 336 с.

11. Пудовкин Н.А., Салаутин В.В., Прохорова Т.М. Влияние различных стресс-факторов на свободнорадикальное окисление липидов и поведение белых крыс // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2017. № 3 (35). С. 3-7.

References

1. Alekseev A.A., Pudovkin N.A., Salautin V.V. Changes in protein-nitrogen metabolism in laboratory animals under the action of an aqueous solution of fullerene C60. *Uchenyye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny imeni N.E. Baumana*. 2021;247(3):6-10 (In Russ.)
2. Vorontsova O.A., Alekseev A.A. Dynamics of accumulation of diene conjugates in the blood serum of cats with diseases of the lower urinary tract. *Aktualnyye problemy veterinarnoy meditsiny i biologii [Actual problems of veterinary medicine and biology. Proc. of Nat. Sci. and Pract. Conf.]*. Orenburg, 2020. Pp. 48–50 (In Russ.)
4. Vorontsova O.A., Pudovkin N.A., Salautin V.V., Klyukin S.D. Features of lipid peroxidation processes in cats with urinary tract diseases. *The agrarian scientific journal*. 2021;4:37-40 (In Russ.)
5. Karimova R.G., Belova A.A. Activity of the nitroxidergic system in cats and dogs with chronic renal failure. *Uchenyye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny im. N.E. Baumana*. 2020;241(1):99-103 (In Russ.)
6. Lutsky M.A., Kuksova T.V., Smelyanets M.A., Lushnikova Yu.P. Free radical oxidation of lipids and proteins is a universal process of vital activity of the body. *Uspekhi sovremennogo yestestvoznaniya*. 2014;12(1):24-28 (In Russ.)
7. Mokshin D.A., Pudovkin N.A. Features of free radical processes in the body of white rats with the introduction of a phosphorus-containing substance. *Yestestvennyye nauki*. 2018;1(62):44–48 (In Russ.)
8. Pavlova O.N., Gulenko O.N., Karimova R.G., Boriskin P.V., etc. The relationship between the distribution of malondialdehyde concentration in blood serum and tissues of experimental animals. *Uchenyye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny im. N.E. Baumana*. 2019;238(2):150-154 (In Russ.)
9. Pavlova O.N., Gulenko O.N., Karimova R.G., Gondareva L.N. Study of the dynamics of catalase activity in the heart and muscle tissue of rats under mechanical action on the blood-ophthalmic barrier. *Genetika i razvedeniye zhivotnykh*. 2020;3:106-113 (In Russ.)
10. Piotrovsky L.B., Kiselev O.I. Fullerenes in biology. St. Petersburg: Rostock, 2006. P. 336 (In Russ.)
11. Pudovkin N.A., Salautin V.V., Prokhorova T.M. The influence of various stress-factors at free radical lipidization of oxides and at behavior of white rats. *Aktualnyye voprosy veterinarnoy biologii*. 2017;3(35):3-7 (In Russ.)

Информация об авторах

Николай Александрович Пудовкин – доктор биологических наук, доцент, и.о. заведующего кафедрой «Морфология, патология животных и биология»;

Сергей Дмитриевич Клюкин – кандидат ветеринарных наук, ассистент кафедры «Морфология, патология животных и биология», klyukin15@mail.ru;

Алексей Александрович Алексеев – аспирант кафедры «Морфология, патология животных и биология», aleksey_alekseev_98@bk.ru;

Владимир Васильевич Салаутин – доктор ветеринарных наук, профессор, профессор кафедры «Морфология, патология животных и биология, salautin60@mail.ru

Information about the authors

Nikolai A. Pudovkin – Doctor of Science (Biology), Associate Professor, Acting Head, Chair of Morphology, Pathology of Animals and Biology;

Sergey D. Klyukin – Candidate of Science (Veterinary), Assistant, Chair of Morphology, Animal Pathology and Biology, klyukin15@mail.ru

Aleksey A. Alekseev – Post-graduate student, Chair of Morphology, Animal Pathology and Biology, aleksey_alekseev_98@bk.ru

Vladimir V. Salautin – Doctor of Science (Veterinary), Professor, Professor of the Chair of Morphology, Animal Pathology and Biology, salautin60@mail.ru

Статья поступила в редакцию 13.04.2022; одобрена после рецензирования 28.04.2022; принята к публикации 05.05.2022.

The article was submitted on 13.04.2022; approved after reviewing on 28.04.2022; accepted for publication on 05.05.2022.