

## ВЕТЕРИНАРИЯ И ЗООТЕХНИЯ

Научная статья

УДК 619:616-076

doi: 10.55471/19973225\_2022\_7\_3\_46

### ФАРМАКОПРОФИЛАКТИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО ГЕПАТОЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КАРНИТИНСОДЕРЖАЩЕГО ПРЕПАРАТА

Сергей Владимирович Петровский<sup>1✉</sup>, Елена Ивановна Большакова<sup>2</sup> Матеша Анна Александровна<sup>3</sup>

<sup>1, 2, 3</sup>Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины, Витебск, Республика Беларусь

<sup>1</sup>vsavm\_sergey@tut.by✉, <https://orcid.org/0000-0001-5912-7258>

<sup>2</sup>elena\_bolshakova\_58@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0972-1280>

<sup>3</sup>annamatesha@yandex.by, <https://orcid.org/0000-0002-4456-7725>

*Цель исследований – обоснование проведения фармакопрофилактических мероприятий в отношении лекарственного гепатоза у моногастричных животных для повышения их продуктивности. В условиях клиники кафедры внутренних незаразных болезней животных проведено моделирование лекарственного гепатоза у белых мышей. Сформировано три группы животных (по 5 особей в каждой). Мыши контрольной группы получали обычный рацион кормления, мыши опытных групп с кормом получали антибактериальный препарат амоксициллин и препарат, обладающий жаропонижающим, противовоспалительным и обезболивающим действием, парацетамол. Препараты задавались в максимальных терапевтических дозах. Дополнительно мышам второй опытной группы задавался препарат «Карнивет», содержащий карнитина гидрохлорид, магния сульфат и сорбитол. Опыт продолжался 25 дней. Оценивалось клиническое состояние лабораторных животных и изменение их живой массы. Диагноз гепатоз (или его отсутствие) подтверждался результатами макро- и микроскопических исследований печени после убоя белых мышей. Клиническое состояние мышей первой опытной группы характеризовалось угнетением и периодически возникающей агрессией. Среднесуточные приросты живой массы оказались наиболее высокими у мышей второй опытной группы и превысили данный показатель по отношению к контрольной группе на 28,6%, а по сравнению с первой опытной – на 426,3%. При послеубойном вскрытии мышей первой опытной группы в печёночной ткани обнаружены типичные дистрофические изменения (зернистая и вакуольная дистрофия, кариолизис) и слабо выраженная воспалительная реакция. В печени мышей контрольной группы подобных изменений обнаружено не было. В печени животных второй опытной группы выявлялись слабо выраженные очаговая зернистая и вакуольная дистрофии. Кроме того, установлены выраженные «восстановительные» процессы, характеризующиеся периваскулитами и единичными мелкими гранулемами, а также увеличением доли двухъядерных гепатоцитов. Сделано заключение о профилактической эффективности препарата «Карнивет» в отношении токсического гепатоза.*

**Ключевые слова:** лекарственный гепатоз, белые мыши, среднесуточный прирост живой массы, дистрофические изменения в печени, карнитина гидрохлорид, профилактика.

**Для цитирования:** Петровский С. В., Большакова Е. И., Матеша А. А. Фармакопрофилактика лекарственного гепатоза с использованием карнитинсодержащего препарата // Известия Самарской государственной сельскохозяйственной академии. 2022. №3. С. 46–53. doi: 10.55471/19973225\_2022\_7\_3\_46

Original article

## PHARMACOPROPHYLAXIS OF DRUG HEPATOSIS WITH PREPARATION CONTAINING CARNITINE

Siarhei V. Piatrouski<sup>1✉</sup>, Elena I. Bolshakova<sup>2</sup> Hanna A. Matesha<sup>3</sup>

<sup>1, 2, 3</sup>Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

<sup>1</sup>vsavm\_sergey@tut.by✉, <https://orcid.org/0000-0001-5912-7258>

<sup>2</sup>elena\_bolshakova\_58@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0972-1280>

<sup>3</sup>annamatesha@yandex.by, <https://orcid.org/0000-0002-4456-7725>

The purpose of the research is to substantiate the implementation of pharmacoprophylactic measures in relation to drug hepatosis in monogastric animals to increase their productivity. In the conditions of the clinic of the Department of Internal Non-infectious Animal Diseases, a simulation of drug hepatosis in white mice was carried out. Three groups of animals were formed (5 individuals each). The mice of the control group received the usual feeding diet, the mice of the experimental groups received the antibacterial drug amoxicillin and a drug with antipyretic, anti-inflammatory and analgesic effects, paracetamol. The drugs were given in maximum therapeutic doses. Additionally, the second experimental group was given the drug «Carnivet» containing carnitine hydrochloride, magnesium sulfate and sorbitol. The experiment lasted 25 days. The clinical condition of laboratory animals and changes in their live weight were evaluated. The diagnosis of hepatosis (or its absence) was confirmed by the results of macro- and microscopic studies of the liver after slaughter of white mice. The clinical condition of the mice of the first experimental group was characterized by depression and intermittent aggression. The average daily gains in live weight were the highest in the mice of the second experimental group and exceeded this indicator in relation to the control group by 28.6%. In the mice of the first experimental group, receiving amoxicillin and paracetamol, by the end of the experiment, live weight plumb lines were established. Post-slaughter autopsy of mice of the first experimental group revealed typical dystrophic changes in the liver tissue (granular and vacuole dystrophy, karyolysis) and a weakly pronounced inflammatory reaction. No such changes were found in the liver of the control group mice. Weakly expressed focal granular and vacuole dystrophy were detected in the liver of animals of the second experimental group. In addition, pronounced «restorative» processes characterized by perivascularitis and single small granulomas as well as an increase in the proportion of binucleated hepatocytes have been established. A conclusion was made about the preventive efficacy of the drug «Carnivet» in relation to toxic hepatosis.

**Keywords:** drug-induced hepatosis, white mice, average daily weight gain, dystrophic changes in the liver, carnitine hydrochloride, prevention.

**For citation:** Petrovsky, S. V., Bolshakova, E. I. & Matesha, A. A. (2022). Pharmacoprophylaxis of drug hepatosis with preparation containing carnitine. *Izvestiia Samarskoi gosudarstvennoi selskokhoziaistvennoi akademii (Bulletin Samara state agricultural academy)*, 3, 46–53. doi: 10.55471/19973225\_2022\_7\_3\_46

В условиях промышленной технологии производства на свиноматок воздействуют многочисленные экзо- и эндотоксины (микотоксины, свободные радикалы, соли тяжёлых металлов и т.д.)

[1-4]. Экзотоксинами, оказывающими «повреждающее» действие на печень, могут стать и лекарственные препараты, особенно при нарушении сроков их использования и дозировок. Болезни печени, имеющие лекарственное, а по сути, токсическое происхождение, моделировались на поросятах-отъёмышках. Данные исследования указывали на серьёзную опасность, которую представляет для свиней бесконтрольное применение лекарственных веществ [5, 6].

Применение препаратов, обладающих гепатопротекторными свойствами, назначаемых в схеме комплексных терапевтических мероприятий, позволит снизить негативный эффект, оказываемый различными токсинами [7, 8].

**Цель исследований** – обоснование проведения фармакопрофилактических мероприятий в отношении токсического (лекарственного) гепатоза у моногастричных животных для повышения их продуктивности и сохранности.

**Задача исследований** – провести моделирование токсического (лекарственного) гепатоза у моногастричных (лабораторных) животных – белых мышей; изучить клиническое состояние, характер роста, биохимические показатели крови, а также макро- и микроскопические (патогистологические) изменения в печени названных животных, животных контрольной группы и опытной, в которой с профилактической целью применялся комплексный препарат с гепатопротекторным действием.

**Материал и методы исследований.** При проведении исследований осуществлено моделирование токсического (лекарственного) гепатоза у нелинейных беспородных белых мышей посредством применения максимальных терапевтических доз лекарственных средств, а также оценка профилактической эффективности гепатопротекторного препарата «Карнивет». Опыт продолжался 25 дней. В условиях стационара кафедры внутренних незаразных болезней животных Витебской ГАВМ были сформированы 3 группы белых мышей: контрольная и две опытных. В состав каждой группы было включено по 5 животных. Условия кормления и содержания мышей каждой группы идентичны. Мыши первой опытной группы дополнительно к рациону получали амоксициллин и парацетамол, второй опытной – названные препараты и гепатопротекторный препарат «Карнивет».

Парацетамол задавался исходя из дозировки 7,5 мг на группу животных, амоксициллин – 2,5 мг на группу животных. Препараты для удобства дозирования смешивались с сахаром и задавались групповым способом внутрь с кормом. Препарат «Карнивет» задавался с питьевой водой в дозе 0,75 мл на группу.

Механизм гепатотоксического действия парацетамола связан с его метаболизмом, около 5% ацетаминофена подвергается окислению изоферментами цитохрома P-450 с образованием N-ацетил-p-бензохинонимина (NAPQI), который, связываясь с глутатионом, превращается в неактивное соединение и выводится почками. При увеличении дозы парацетамола возрастает количество NAPQI, при этом возникает дефицит глутатиона, а NAPQI соединяется с нуклеофильными группами белков гепатоцитов, что приводит к некрозу ткани печени. Этим же механизмом объясняется способность парацетамола вызывать некроз почечных канальцев (в почках тоже содержатся ферменты, окисляющие препарат).

Амоксициллин – полусинтетический антибиотик широкого спектра действия группы пенициллинов для лечения бактериальных инфекций. Метаболизм происходит в печени, поэтому при превышении оптимальных доз может обладать выраженной гепатотоксичностью и проявляться гепатоцеллюлярным поражением.

В исследовании использовался препарат «Карнивет» производства ООО «Рубикон» (Республика Беларусь, г. Витебск), содержащий L-карнитина гидрохлорид, магния сульфат семиводный, сорбитол (как вспомогательное вещество).

Известно, что L-карнитин участвует в процессах обмена веществ в качестве переносчика жирных кислот через клеточные мембраны из цитоплазмы в митохондрии, где эти кислоты подвергаются процессу  $\beta$ -окисления с образованием большого количества метаболической энергии (в форме АТФ). Препарат нормализует белковый (замедляет распад белковых молекул) и жировой обмен, восстанавливает щелочной резерв крови, угнетает образование кетокислот и анаэробный гликолиз, уменьшает степень лактацидоза, увеличивает двигательную активность и повышает переносимость физических нагрузок, при этом способствует экономному расходованию гликогена и увеличению его запасов в печени. Мобилизует жир из жировых депо (благодаря наличию трёх лабильных метильных групп). Конкурентно вытесняя глюкозу, включает жирнокислотный метаболический шунт, активность которого не лимитирована кислородом (в отличие от аэробного гликолиза), в связи с чем препарат эффективен в условиях острой гипоксии (в том числе мозга) и других критических состояниях.

Сорбитол, накапливаясь в печени в форме гликогена, участвует в энергетическом обмене, обладает диуретическими свойствами. Магния сульфат улучшает пищеварение, умеренно стимулирует перистальтику кишечника, обладает желчегонными свойствами.

В начале и в конце опыта было проведено взвешивание мышей и определён среднесуточный прирост живой массы.

По окончании опыта был проведен убой мышей и отбор образцов печёночной ткани. Для проведения гистологического исследования образцы тканей печени мышей фиксировали в 10%

нейтральном растворе формалина. Обезвоживание тканей осуществлялось в этиловом спирте. Затем проводили заливку материала в затвердевающие среды (парафин). После заливки парафиновых блоков были изготовлены гистосрезы на микротоме. Приготовленные срезы окрашивались гематоксилин-эозином по Эрлиху и изучались микроскопически с использованием компьютерной программы «Биоскан».

По итогам исследований было сделано заключение о влиянии препарата с гепатопротекторными свойствами «Карнивет» на степень развития в печени подопытных животных дистрофических изменений и его потенциальной профилактической эффективности.

**Результаты исследований.** В результате клинического наблюдения за поведением и общим состоянием мышей контрольной и опытных групп были выявлены некоторые различия между группами. В первой опытной группе животные были вялыми, малоподвижными, «сбивались в кучу» и постоянно сидели в тёмном углу, при посторонних звуках могли нападать друг на друга, их аппетит был значительно ниже, чем мышей контрольной и второй опытной групп. В тоже время мыши, получавшие амоксициллин и парацетамол и одновременно с ними препарат «Карнивет», характеризовались хорошим аппетитом, были подвижными и любопытными, охотно пили воду с добавленным в неё препаратом (рис. 1).



а



б

Рис. 1. Мыши первой (а) и второй (б) опытных групп. Изменения поведения

По окончании опыта были определены среднесуточные приросты живой массы мышей контрольной и опытной групп (табл. 1).

Таблица 1

Среднесуточные приросты живой массы лабораторных мышей и их сохранность

| Показатель                                 | Группы животных |                |                |
|--------------------------------------------|-----------------|----------------|----------------|
|                                            | Контрольная     | Первая опытная | Вторая опытная |
| Средняя масса в начале опыта, г            | 24,8±3,834      | 29,2±1,643     | 25,2±5,263     |
| Средняя масса в конце опыта, г             | 27,6±5,273      | 29,75±2,986    | 28,8±2,280     |
| Валовая масса в начале опыта, г            | 124             | 146            | 126            |
| Валовая масса живых мышей в конце опыта, г | 138             | 119            | 144            |
| Масса павших мышей, г                      | -               | 29,9           | -              |
| Количество кормодней                       | 125             | 106            | 125            |
| Среднесуточный прирост, г                  | 0,112           | 0,03           | 0,144          |
| Сохранность, %                             | 100             | 80*            | 100            |

Примечание. \* – одна мышь пала на седьмой день опыта.

Среднесуточный прирост живой массы мышей второй опытной группы оказался на 28,6% выше, чем контрольной (табл. 1). По сравнению с показателем первой опытной группы среднесуточный прирост у мышей контрольной и второй опытной групп оказался выше в 3,73 и в 5,26 раза.

Заключительным этапом исследований стала аутопсия мышей, макроскопическое исследование печени мышей контрольной и опытных групп, гистологическое изучение полученных

образцов печёночной ткани.

После вскрытия в печени мышей первой опытной группы были выявлены характерные для токсической дистрофии изменения. Макроскопическое исследование показало, что у мышей этой группы печень была увеличена в размере, дряблой консистенции (легко разрывалась на части), пёстрого вида: на красно-коричневом фоне отмечались участки бледно-серого цвета (рис. 2).

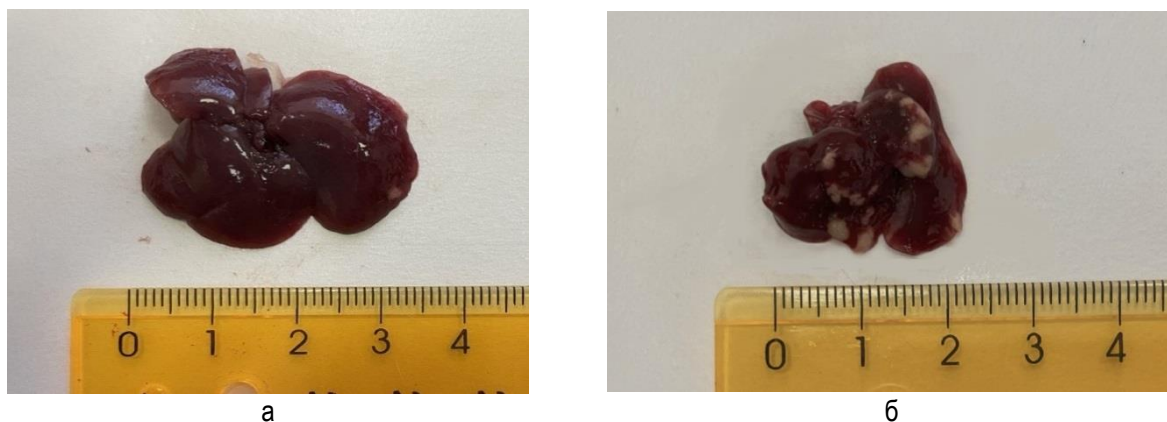


Рис. 2. Гепатомегалия (а) и пёстрая окраска печени (б) у мышей первой опытной группы

У мышей контрольной группы подобных изменений не обнаружили. У мышей второй опытной группы макроскопические изменения (в виде незначительной гепатомегалии) были обнаружены в двух случаях.

С целью подтверждения наличия токсических поражений печени было проведено гистологическое исследование образцов печёночной ткани.

В печени мышей первой опытной группы при гистологическом исследовании выявлялось сглаживание дольчатого строения печеночной ткани, дисконфлексация печеночных балок. Ядра печеночных клеток, особенно центра долек, находились в состоянии кариопикноза, кариолизиса, вакуолизации и лизиса цитоплазмы, что говорит о формировании явлений цитолиза. На периферии дольки встречались бесструктурные гепатоциты в виде мелкозернистых масс, между которыми выявлялась слабая и умеренная лейко- и лимфоцитарная инфильтрация. Кроме того, в печени мышей первой опытной группы обнаруживали зернистую и вакуольную дистрофию, отёк стенок кровеносных сосудов со слабо выраженной воспалительной реакцией в виде лимфоидных периваскулитов и мелких единичных гранулем (рис. 3).

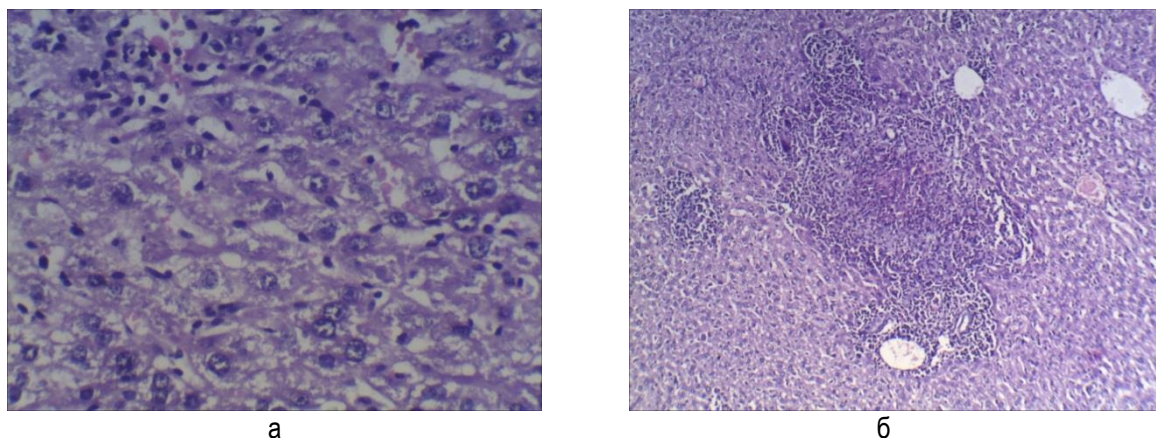
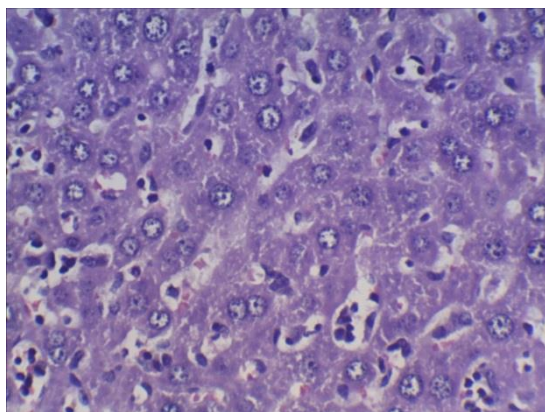


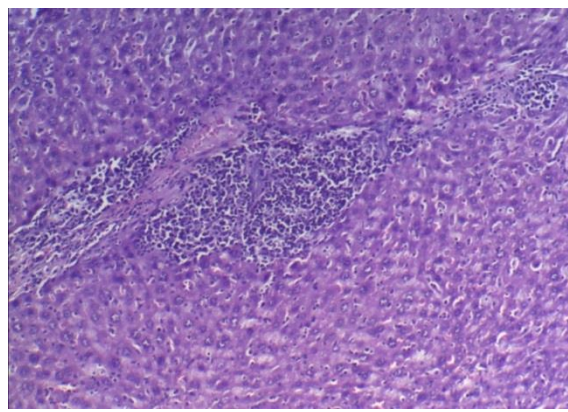
Рис. 3. Печень мыши первой опытной группы (микрофото):

а – жировая дистрофия и некроз гепатоцитов (гематоксилин-эозин, Биомед-6, ув. x 480);

б – очаги некроза с лимфоидной инфильтрацией на периферии (гематоксилин-эозин, Биомед-6, ув. x 120)



в



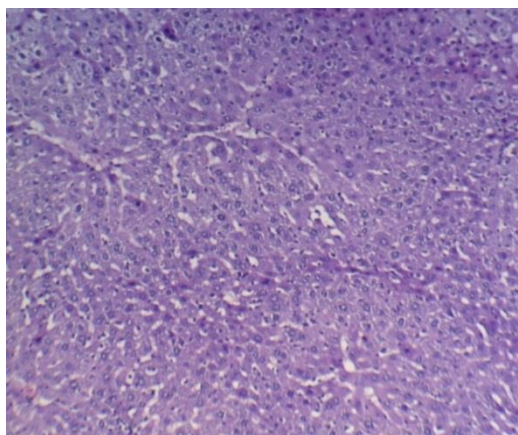
г

Рис. 3. Окончание (начало см. на с. 50):

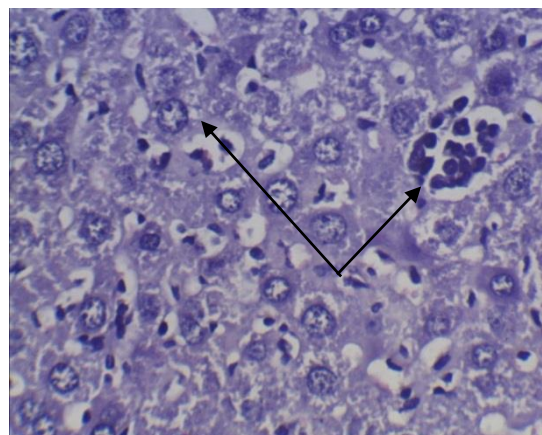
в – зернистая дистрофия и отек стенок кровеносных сосудов (гематоксилин-эозин, Биомед-6, ув. x 480);

г – интерстициальный гепатит (гематоксилин-эозин, Биомед-6, ув. x 120)

При микроскопическом исследовании в печени мышей, получавших препарат «Карнивет», наблюдали сохранение дольчатого и балочного строения паренхимы органа. Гепатоциты во всех полях зрения полигональной формы с четкими контурами и ядрами, с умеренным количеством двухъядерных гепатоцитов преимущественно на периферии печеночной дольки. В незначительных участках некоторых печеночных клеток обнаруживали зернистую и вакуольную дистрофии, периваскулиты и мелкие единичные гранулемы (рис. 4).



а



б

Рис. 4. Печень мышей второй опытной группы (микрофото):

а – печеночные дольки (гематоксилин-эозин, Биомед-6, ув. x 120); б – зернистая дистрофия и лимфоидная гранулема (гематоксилин-эозин, Биомед-6, ув. x 480)

Таким образом, более тяжелые патоморфологические изменения в печени мышей возникают при «обработке» их парацетамолом и амоксициллином. Данные изменения характеризуются преобладанием альтеративных и дистрофических (зернистой, вакуольной и очаговой жировой дистрофии) процессов, наличием немногочисленных мелких очагов некроза. Проллиферативные процессы в печени мышей первой опытной группы выражены гораздо слабее.

У мышей второй опытной группы, получавших дополнительно препарат «Карнивет», дистрофические процессы были представлены очаговой зернистой и вакуольной дистрофией. Однако помимо процессов «разрушения» в печени данных мышей обнаружены и «восстановительные» процессы, характеризующиеся периваскулитами и единичными мелкими гранулемами, а также увеличением доли двухъядерных гепатоцитов. Данные изменения свидетельствуют об активизации механизмов регенерации в паренхиме печени.

**Заключение.** Изменения клинического состояния мышей при токсическом гепатозе,

смоделированном энтеральным введением амоксициллина и парацетамола, характеризовались вялостью, малоподвижностью, вынужденными положениями, повышенной возбудимостью и агрессивностью при воздействии внешних раздражителей, снижением аппетита. Макро- и микроскопические изменения в печени у данных животных были типичными для токсического гепатоза.

Препарат «Карнивет», применённый совместно с парацетамолом и амоксициллином, значительно снизил токсическое действие парацетамола и амоксициллина на печень, что характеризовалось восстановлением аппетита мышей, их удовлетворительным состоянием, отсутствием агрессии по отношению к другим мышам, повышением среднесуточных приростов живой массы по сравнению и с животными контрольной и первой опытной групп. Препарат «Карнивет», применённый с целью фармакопрофилактики токсического гепатоза, успешно предотвратил развитие выраженных дегенеративных изменений в печени и стимулировал процессы регенерации.

Полученные результаты указывают на высокий профилактический эффект, оказываемый препаратом «Карнивет» при применении у лабораторных животных. Данные результаты могут быть использованы при проведении профилактических мероприятий в отношении токсического гепатоза и у продуктивных животных (в том числе, и у свиней).

#### Список источников

1. Пугатина А. Е., Грачева О. А. Биохимический контроль лечения при токсической дистрофии печени поросят // Вестник Марийского государственного университета. 2019. Т. 5, № 1. С. 35–41. (Серия: Сельскохозяйственные науки. Экономические науки).
2. Стрельников С. А. Лечение и профилактика жировой дистрофии печени у поросят с применением гепатовекса : автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук. Белгород – п. Майский, 2011.
3. Великанов В. В. Интенсивность перекисного окисления липидов и активность антиоксидантной системы поросят при токсической гепатодистрофии // Учёные записки Витебской государственной академии ветеринарной медицины. 2017. Т. 53, Вып.1. С. 39–41.
4. Петровский С. В., Дубина И. Н., Хлебус Н. К. Биохимические показатели крови и репродукция свиноматок при хронических микотоксикозах // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы : сборник научных трудов. Гродно : Гродненский ГАУ, 2010. Т. 2. Агрономия. Ветеринария.
5. Сенько А. В., Емельянов В. В. Медикаментозные поражения печени у поросят // Ветеринарная медицина Беларуси. 2001/2002. № 4/1. С. 30–31.
6. Емельянов В. В., Севрюк И. З. Лекарственный гепатит у поросят // Учёные записки Витебской государственной академии ветеринарной медицины. 2005. Т. 41, Вып. 1. С. 46–49.
7. Великанов В. В., Курдеко А. П., Петровский С. В., Хлебус Н. К., Сандул П. А. Фармакопрофилактика болезней печени у свиней и цыплят-бройлеров. Горки : БГСХА, 2021.
8. Хлебус Н. К. Профилактика токсической гепатодистрофии у супоросных свиноматок с использованием комплексного гепатопротекторного препарата. Вклад молодых ученых в аграрную науку : материалы международной научно-практической конференции. Кинель : РИЦ Самарской ГСХА, 2016

#### References

1. Pugatina, A. E. & Gracheva, O. A. (2019). Biochemical control of treatment for toxic piglet liver dystrophy. *Vestnik Mariiskogo gosudarstvennogo universiteta (Vestnik of the Mari State University)*, 5, 1, 35–41. (Series: Agricultural Sciences. Economic sciences) (in Russ.).
2. Strelnikov, S. A. (2011). Treatment and prevention of fatty liver dystrophy in piglets with the use of hepatovex. *Extended abstract of candidate's thesis*. Belgorod – P. Maysky (in Russ.).
3. Velikanov, V. V. (2017). Intensity of lipid peroxidation and activity of the antioxidant system of piglets with toxic hepatodystrophy. *Uchenie zapiski uchrezhdeniia obrazovaniia Vitebskaia ordena Znak pocheta gosudarstvennaia akademiia veterinarnoi medicini (Scientific notes of educational institutions Vitebsk Order Badge of Honor State Academy of Veterinary Medicine)*, 53, 1, 39–41 (in Russ.).
4. Pyatrouski, S. U., Dubina, I. M. & Khlebus, N. K. (2010). Biyakhimichnyya pakazchyki kryvi i repraduktsiya svinamatak pry khranichnykh mikataksikozakh. *Agriculture – problems and prospects : collection of scientific papers*. Grodno : Grodno State Agrarian University. Vol. 2. Agronomy. Veterinary medicine (in Russ.).
5. Senko, A. V. & Emelyanov, V. V. (2001/2002). Drug-induced liver lesions in piglets. *Veterinarnaya medicina Belarusi (Veterinary medicine of Belarus)*, 4/1, 30–31 (in Russ.).
6. Emelyanov, V. V. & Sevryuk, I. Z. (2005). Drug hepatitis in piglets. *Uchenie zapiski uchrezhdeniia obrazovaniia Vitebskaia ordena Znak pocheta gosudarstvennaia akademiia veterinarnoi medicini (Scientific notes of educational*

*institutions Vitebsk Order Badge of Honor State Academy of Veterinary Medicine*), 41, 1, 46–49 (in Russ.).

7. Velikanov, V. V., Kurdeko, A. P., Petrovsky, S. V., Khlebus, N. K. & Sandul, P. A. (2021). *Pharmacoprophylaxis of liver diseases in pigs and broiler chickens*. Gorki : Belarusian State Agricultural Academy BGSHA (in Russ.).

8. Khlebus, N. K. (2016). Prevention of toxic hepatodystrophy in pregnant sows with the use of a complex hepatoprotective drug. Contribution of young scientists to agricultural science '16: *materials of the international scientific and practical conference*. Kinel : PC Samara State Agricultural Academy (in Russ.).

#### **Информация об авторах:**

С. В. Петровский – кандидат ветеринарных наук, доцент;

Е. И. Большакова – кандидат ветеринарных наук, доцент;

А. А. Матеша – магистр ветеринарных наук.

#### **Information about the authors:**

S. V. Piatrouski – Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor;

E. I. Bolshakova – Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor;

H. A. Matesha – Master of Veterinary Science.

**Вклад авторов:** все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Contribution of the authors:** the authors contributed equally to this article. The authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 12.03.2022; одобрена после рецензирования 6.05.2022; принята к публикации 8.06.2022.

The article was submitted 12.03.2022; approved after reviewing 6.05.2022; accepted for publication 8.06.2022.