

## Морфологические особенности изменений органов-мишеней при фармакологическом монокроталин-индуцированном моделировании легочной гипертензии у крыс в условиях предварительного стимулирования ферментативных систем печени

А.В. Загребельная, О.В. Щеблыкина, А.А. Болгов

Белгородский государственный национальный исследовательский университет  
308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

### Резюме

Легочная гипертензия – состояние, характеризующееся прогрессирующим повышением давления в малом круге кровообращения. Наиболее простой и распространенной экспериментальной моделью легочной гипертензии является монокроталиновая модель. В ее основе лежит процесс превращения цитохромом P450 в печени монокроталина в эндотелиотоксичный монокроталинпиррол, который в свою очередь, повреждая эндотелий сосудов легких, ведет к расстройству кровообращения в малом круге и формированию легочной гипертензии. Таким образом, дополнительная предварительная стимуляция цитохрома P450 может повысить стабильность и репрезентативность монокроталиновой модели. Целью данной работы было определение различий в морфологических изменениях миокарда и легочных сосудов крыс, у которых при помощи монокроталина моделировали легочную гипертензию с дополнительным стимулированием печеночных ферментов и без нее. **Материал и методы.** Исследование проводилось на 24 половозрелых крысах-самцах линии Wistar. Животные были разделены на 4 группы по 6 крыс. Группа 1 была представлена интактными животными. В группах 2, 3 и 4 моделирование легочной гипертензии у крыс проводилось однократным подкожным введением водно-спиртового раствора монокроталина в дозе 60 мг/кг. С целью индукции цитохрома P450 в группах 3 и 4 животным внутривенно вводили фенобарбитал в течение одного и трех дней соответственно. **Результаты и их обсуждение.** Площадь ядер кардиомиоцитов в группах с одно- и трехдневным предварительным стимулированием печеночных ферментов составила  $22,78 \pm 3,4$  и  $23,63 \pm 3,72$  мкм<sup>2</sup> соответственно, достоверно отличаясь от соответствующих величин групп контроля и группы 2. Сходные результаты выявлены и при определении индекса толщины средней оболочки легочных артерий мелкого калибра –  $58,32 \pm 10,02$  и  $76,44 \pm 18,55$  % в группах с одно- и трехдневным предварительным стимулированием соответственно. Помимо количественных изменений отмечались и качественные: при дополнительной активации цитохрома P450 в миокарде более интенсивно формировались интерстициальный фиброз и миокардит, а в легких стремительнее возникали и прогрессировали признаки «монокроталинового синдрома». **Заключение.** На основании полученных данных можно предположить, что предварительное введение цитохрома P450 обуславливает повышение стабильности, воспроизводимости и тяжести морфологических изменений монокроталиновой модели легочной гипертензии.

**Ключевые слова:** легочная гипертензия, эндотелиальная дисфункция, монокроталин, патологическая анатомия, экспериментальная модель.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение № FZWG-2021-0016.

**Автор для переписки:** Болгов А.А., e-mail: toxabolgovv@mail.ru

**Для цитирования:** Загребельная А.В., Щеблыкина О.В., Болгов А.А. Морфологические особенности изменений органов-мишеней при фармакологическом монокроталин-индуцированном моделировании легочной гипертензии у крыс в условиях предварительного стимулирования ферментативных систем печени. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2024;44(3):135–141. doi: 10.18699/SSMJ20240315

# Morphological features of changes in target organs during pharmacological monocrotaline-induced modeling of pulmonary hypertension in rats under conditions of preliminary stimulation of liver enzymatic systems

A.V. Zagrebelnaya, O.V. Shcheblykina, A.A. Bolgov

Belgorod State National Research University  
308015, Belgorod, Pobedy st., 85

## Abstract

Pulmonary hypertension is a condition characterized by a progressive increase in pressure in the pulmonary circulation. The simplest and most common experimental model of pulmonary hypertension is the monocrotaline model. It is based on the process of transformation of monocrotaline in the liver by cytochrome P450 into endothelial toxic monocrotaline pyrrole, which in turn, damaging the endothelium of the pulmonary vessels, leads to circulatory disorders in the pulmonary circulation and the formation of pulmonary hypertension. Thus, additional prestimulation of cytochrome P450 may increase the stability and representativeness of the monocrotaline model. The purpose of this work was to determine differences in morphological changes in the myocardium and pulmonary vessels of rats in which pulmonary hypertension was modeled using monocrotaline with and without additional stimulation of liver enzymes. **Material and methods.** The study was conducted on 24 mature male Wistar rats. The animals were divided into 4 groups of 6 rats. Group 1 was represented by intact animals. In groups 2, 3 and 4, modeling of pulmonary hypertension in rats was carried out with a single subcutaneous injection of an aqueous-alcohol solution of monocrotaline at a dose of 60 mg/kg. In order to induce cytochrome P450 in groups 3 and 4, animals were intragastrically administered phenobarbital for one and three days, respectively. **Results and discussion.** The area of cardiomyocyte nuclei in the groups with one- and three-day preliminary stimulation of liver enzymes was  $22.78 \pm 3.4$  and  $23.63 \pm 3.72 \mu\text{m}^2$ , respectively, significantly different from the corresponding values of the control group and group 2. Similar results were revealed when determining the index of the thickness of the medial membrane of small-caliber pulmonary arteries –  $58.32 \pm 10.02$  and  $76.44 \pm 18.55$  % in the groups with one- and three-day preliminary stimulation, respectively. In addition to quantitative changes, qualitative changes were also noted: with additional activation of cytochrome P450, interstitial fibrosis and myocarditis more intensively formed in the myocardium, and signs of “monocrotaline syndrome” more rapidly arose and progressed in the lungs. **Conclusions.** Based on the data obtained, it can be assumed that preliminary cytochrome P450 causes an increase in the stability, reproducibility and severity of morphological changes in the monocrotaline model of pulmonary hypertension.

**Key words:** pulmonary hypertension, endothelial dysfunction, monocrotaline, pathological anatomy, experimental model.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Financing.** The work was carried out with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, agreement No. FZWG-2021-0016.

**Correspondence author:** Bolgov A.A., e-mail: toxabolgovv@mail.ru

**Citation:** Zagrebelnaya A.V., Shcheblykina O.V., Bolgov A.A. Morphological features of changes in target organs during pharmacological monocrotaline-induced modeling of pulmonary hypertension in rats under conditions of preliminary stimulation of liver enzymatic systems. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2024;44(3):135–141. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20240315

## Введение

Легочная гипертензия (ЛГ) – состояние, характеризующееся прогрессирующим повышением давления в малом круге кровообращения и, как следствие, легочного сосудистого сопротивления с последующей правожелудочковой недостаточностью. В силу тяжести, распространенности и зачастую необратимости этой патологии на протяжении многих десятилетий возникают все но-

вые и новые научные работы, посвященные ее исследованию. Такие работы неразрывно связаны с проведением различного рода экспериментов, требующих подробно разработанной методологии, и в частности – экспериментальных моделей.

Наиболее используемой моделью ЛГ в настоящее время является монокроталиновая модель (МКТ-модель). Эффект МКТ реализуется через его метаболит – монокроталинпиррол (МКТП),

который, избирательно поражая эндотелиоциты легочных сосудов, потенцирует развитие эндотелиальной дисфункции в них с последующим формированием ЛГ [1–3]. Известно, что образование МКТП из МКТ происходит в печени с участием цитохрома P450 [4]. В ряде работ для повышения воспроизводимости и стабильности МКТ-модели ЛГ перед введением собственно МКТ экспериментальным животным производят определенного рода стимуляцию метаболической активности печени, тем самым усиливая образование пневмотоксичного МКТП [5]. Как правило, в виде такого индуктора используют фенобарбитал, поскольку доказана его способность к потенцированию микросомальных монооксигеназ печени [6].

Рутинное использование предварительной стимуляции цитохрома P450 может позволить минимизировать популяционные различия, обусловленные неодинаковой активностью печеночных ферментативных систем у разных индивидов. Более того, в случае обнаружения дозозависимости морфофункциональных изменений станет возможно стабильное моделирование тяжелых и далеко зашедших вариантов ЛГ без трудоемких оперативных вмешательств.

## Материал и методы

Работа выполнена на базе НИИ фармакологии живых систем Белгородского государственного национального исследовательского университета. Все этапы экспериментального исследования одобрены этическим комитетом ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», протокол № 02и/23 от 09.01.2023.

Исследование проводилось на 24 половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой  $200 \pm 20$  г. Животные были разделены на 4 группы по 6 крыс. Группа 1 была представлена интактными животными. В группах 2, 3 и 4 ЛГ у крыс моделировали однократным подкожным введением водно-спиртового раствора МКТ в дозе 60 мг/кг (Sigma-Aldrich, Германия). В группе 2 дополнительной стимуляции печеночных ферментов не проводилось, в группах 3 и 4 с целью индукции цитохрома P450 до назначения МКТ крысам внутрижелудочно вводили фенобарбитал: крысы группы 3 получали фенобарбитал в дозе 50 мг/кг однократно непосредственно перед введением МКТ, крысы группы 4 – фенобарбитал ежедневно в течение трех дней в разовой дозе 50 мг/кг [4].

Раствор МКТ готовили путем разведения сухого вещества в 60%-м водном растворе этилового спирта из расчета 0,3 мл на 100 г массы тела лабораторного животного. Инъекции осуществляли

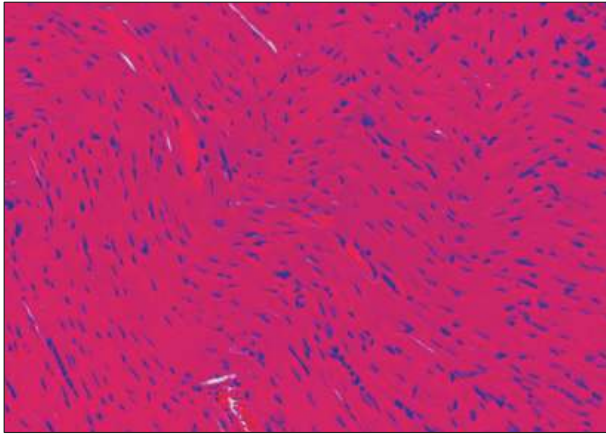
подкожно инсулиновым шприцем (игла 26G) на холке и в нижней трети спины над задними лапами, объем одной инъекции не превышал 0,3 мл. Контрольная группа получала эквивалентный объем растворителя. На 28-й день эксперимента животных подвергали эвтаназии посредством передозировки хлоралгидратом. Для морфологического исследования забирали органокомплекс «сердце–легкие». Органы отделяли, промывали в изотоническом растворе хлорида натрия. После от сердца удаляли предсердия, а желудочки вместе с правыми легкими фиксировали в 10%-м растворе забуференного нейтрального формалина («Биовитрум», Россия) в течение 24–48 ч. Обезживание образцов проводили в серии спиртов на аппарате TP 1020 (Leica Microsystems GmbH, ФРГ). Для заливки использовали парафиновую среду Histomix («Биовитрум») с формированием по два парафиновых блока от каждого животного – желудочки сердца и правое легкое. Из каждого блока изготавливали по два гистологических среза с помощью полуавтоматического ротационного микротомы HM 340E (Microm International GmbH, ФРГ), толщина среза составляла 4–5 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Обзорную микроскопию и морфометрический анализ микропрепаратов проводили с помощью микроскопа Eclipse Ni (Nikon, Япония) и программного обеспечения Nis-Elements BR 4.60.00 (Nikon).

Морфометрическое исследование заключалось в измерении индекса толщины средней оболочки (ИТСО) легочных артерий, а также площади ядер кардиомиоцитов. По пять легочных артериальных сосудов в срезах от каждого животного были случайным образом отобраны и проанализированы при увеличении  $\times 200$ . ИТСО рассчитывался по формуле [7]:

$$\text{ИТСО} = \frac{\text{Толщина мышечной оболочки} \times 2}{\text{Диаметр просвета}} \times 100.$$

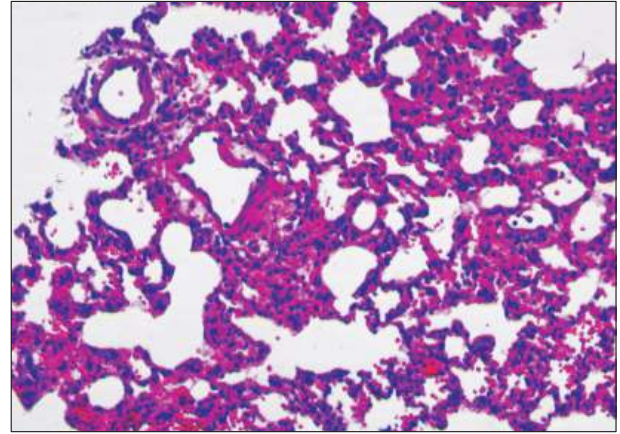
Морфометрическое исследование площади ядер кардиомиоцитов проводили в тридцати случайно отобранных из различных срезов внутри группы мышечных клетках сердца при увеличении  $\times 200$ .

Полученные данные подвергались статистической обработке с определением типа распределения с использованием критерия Шапиро – Уилка. Ввиду выявленного нормального распределения переменные представлены в виде среднего арифметического и ошибки среднего арифметического, сравнение между группами осуществлялось методом ANOVA с учетом поправки Бонферрони.



**Рис. 1.** Миокард крыс группы 2 после однократного введения МКТ в дозировке 60 мг/кг. Гематоксилин + эозин,  $\times 200$

**Fig. 1.** Myocardium of group 2 rats after a single administration of monocrotaline at a dosage of 60 mg/kg. Hematoxylin + eosin,  $\times 200$



**Рис. 2.** Легкие крыс группы 2 после однократного введения МКТ в дозировке 60 мг/кг. Гематоксилин + эозин,  $\times 200$

**Fig. 2.** Lungs of group 2 rats after a single injection of monocrotaline at a dosage of 60 mg/kg. Hematoxylin + eosin,  $\times 200$

## Результаты

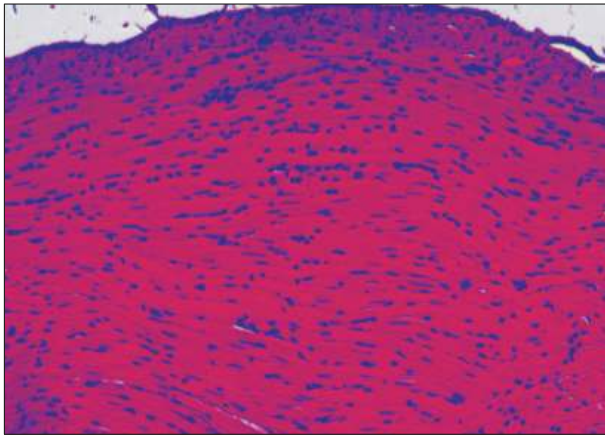
В миокарде правого желудочка группы 2 отмечались изменения в виде гипертрофии кардиомиоцитов (рис. 1), проявляющейся увеличением площади ядер ( $20,34 \pm 3,05$  мкм<sup>2</sup> при  $16,98 \pm 2,37$  мкм<sup>2</sup> в группе контроля,  $p < 0,05$ ). Морфологические изменения легких при обзорной микроскопии заключались в полнокровии, отеке и фиброзе интерстиция межальвеолярных перегородок и периваскулярных пространств (рис. 2). ИТСО в группе 2 составил  $28,82 \pm 7,39$  % (при  $16,75 \pm 2,24$  % в группе контроля,  $p < 0,05$ ).

В группе 3 после введения МКТ в условиях предварительного стимулирования печеночного цитохрома Р450 микроскопически в сердце отмечались, помимо гипертрофии кардиомиоцитов (площадь ядер  $22,78 \pm 3,4$  мкм<sup>2</sup>), диффузный интерстициальный фиброз с умеренной мононуклеарной инфильтрацией, а также начальные явления миоцитолита и фрагментации миокардиальных волокон (рис. 3). В легких животных морфологическая картина характеризовалась более значительной гипертрофией средней оболочки артериол (ИТСО составил  $58,32 \pm 10,02$  %), а также выраженным утолщением межальвеолярных перегородок, в которых отмечались интенсивный фиброз, мононуклеарная инфильтрация, периваскулярный отек и кровоизлияния (рис. 4).

При микроскопии препаратов миокарда крыс группы 4 отмечались сходные с обнаруженными в группе 3 изменения в виде гипертрофии кардиомиоцитов, что проявлялось повышенной площадью гиперхромных сигарообразных ядер

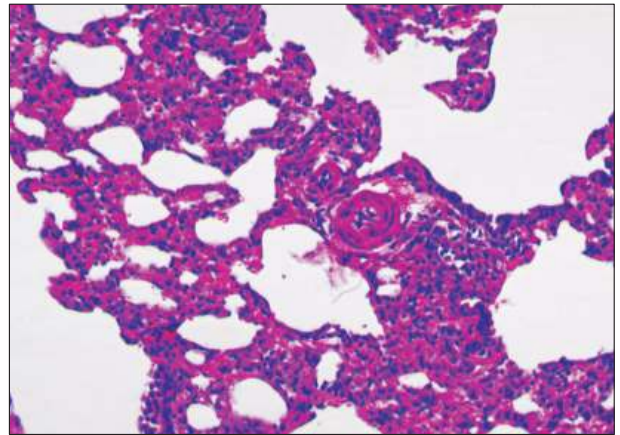
( $23,63 \pm 3,72$  мкм<sup>2</sup>). Однако в данной группе определялись значительно более выраженные явления интерстициального и периваскулярного фиброза миокарда с рассеянной мононуклеарной инфильтрацией миокарда как левого, так и правого желудочка. Более того, в различных отделах миокарда отмечались множественные очаги миоцитолита и геморрагического пропитывания (рис. 5). При гистологическом исследовании легких в просветах альвеол отмечался тотальный внутриальвеолярный отек с большим количеством лимфоцитов, сегментоядерных нейтрофилов и альвеолярных макрофагов. Межальвеолярные перегородки были значительно утолщены, полнокровны вплоть до очагового геморрагического пропитывания с интерстициальной и периваскулярной мононуклеарной инфильтрацией. Часть межальвеолярных перегородок приобретала гомогенный эозинофильный вид по типу «гиалиновых мембран». Отмечался также интерстициальный и периваскулярный отек (рис. 6). В стенках легочных артерий определялась выраженная гипертрофия мышечной оболочки с субтотальным сужением просвета, ИТСО составил  $76,44 \pm 18,55$  %.

Статистическая обработка полученных данных позволила выявить достоверность отличий величины ИТСО и площади кардиомиоцитов групп 2, 3 и 4 от соответствующих значений как группы контроля, так и друг друга (за исключением площади ядер кардиомиоцитов в группах с одно- и трехдневным предварительным стимулированием печеночных ферментов, различия которых не были статистически значимыми).



**Рис. 3.** Миокард крыс группы 3 после однократного введения МКТ в дозировке 60 мг/кг при предварительной стимуляции цитохрома P450 внутрижелудочным однократным введением 50 мг/кг фенобарбитала. Гематоксилин + эозин,  $\times 200$

**Fig. 3.** Myocardium of group 3 rats after a single injection of monocrotaline at a dosage of 60 mg/kg with preliminary stimulation of cytochrome P450 with a single intragastric injection of 50 mg/kg phenobarbital. Hematoxylin + eosin,  $\times 200$



**Рис. 4.** Легкие крыс группы 3 после однократного введения монокроталина в дозировке 60 мг/кг при предварительной стимуляции цитохрома P450 внутрижелудочным однократным введением 50 мг/кг фенобарбитала. Гематоксилин + эозин,  $\times 200$

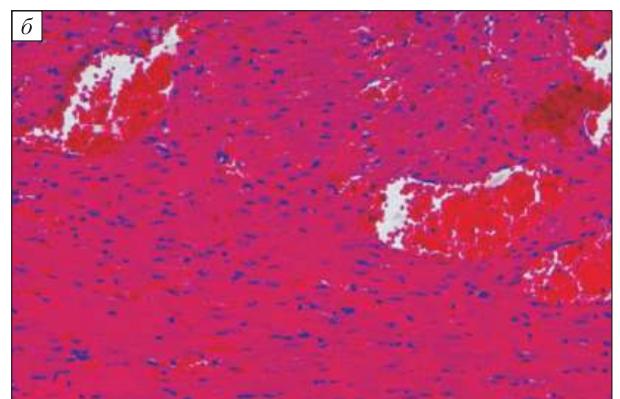
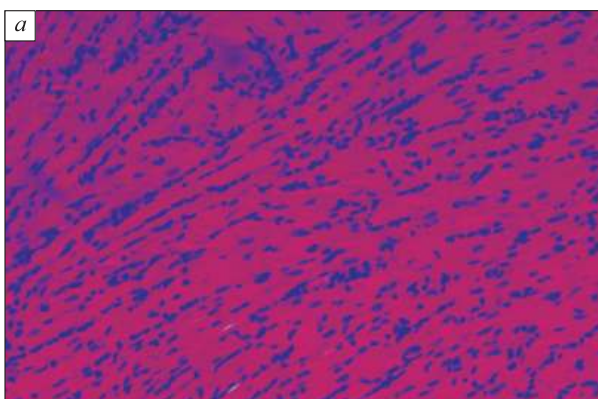
**Fig. 4.** Lungs of rats of group 3 after a single injection of monocrotaline at a dosage of 60 mg/kg with preliminary stimulation of cytochrome P450 with a single intragastric injection of 50 mg/kg phenobarbital. Hematoxylin + eosin,  $\times 200$

### Обсуждение

Полученные морфологические данные позволяют заключить, что предварительная стимуляция печеночного цитохрома P450 посредством внутрижелудочного введения фенобарбитала обуславливает дозозависимое утяжеление течения ЛГ при ее моделировании с использованием МКТ.

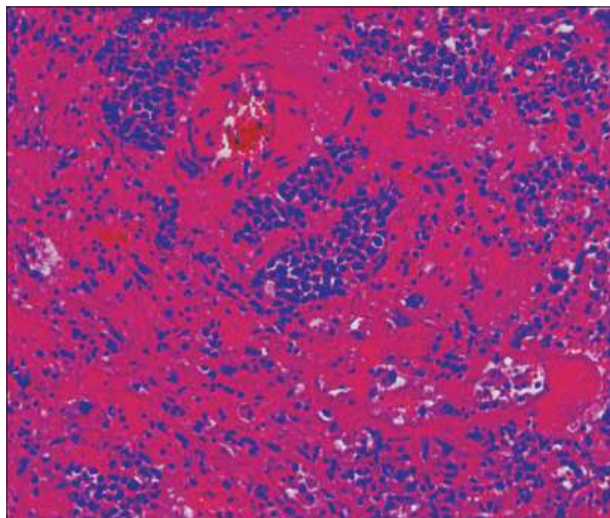
Так, без предварительной активации ферментов печени введение МКТ на 28-й день эксперимента приводило лишь к начальным изменениям

в сердце и легких: незначительной гипертрофии миокарда правого желудочка и утолщению средней оболочки легочных артерий. Та же самая модель в условиях предварительного введения однократного внутрижелудочного введения фенобарбитала характеризовалась более значительными изменениями: в миокарде помимо более выраженной гипертрофии обнаруживались признаки диффузного фиброза и миокардита; в легких определялось более значительное утолщение



**Рис. 5.** Миокард крыс группы 4 после однократного введения МКТ в дозировке 60 мг/кг при предварительной трехдневной стимуляции цитохрома P450 фенобарбиталом в дозе 50 мг/кг: а – интерстициальный миокардит, б – миоцитоллиз с геморрагическим пропитыванием. Гематоксилин + эозин,  $\times 200$

**Fig. 5.** Myocardium of group 4 rats after a single injection of monocrotaline at a dose of 60 mg/kg with preliminary three-day stimulation of cytochrome P450 with phenobarbital at a dose of 50 mg/kg: а – interstitial myocarditis, б – myocytolysis with hemorrhagic impregnation. Hematoxylin + eosin,  $\times 200$



**Рис. 6.** Легкие крыс группы 4 после однократного введения МКТ в дозировке 60 мг/кг при предварительной трехдневной стимуляции цитохрома P450 фенобарбиталом в дозе 50 мг/кг. Гематоксилин + эозин,  $\times 200$

**Fig. 6.** Lungs of group 4 rats after a single injection of monocrotaline at a dosage of 60 mg/kg with a preliminary three-day stimulation of cytochrome P450 with phenobarbital at a dose of 50 mg/kg. Hematoxylin + eosin,  $\times 200$

средней оболочки артерий, фиброз и интерстициальное воспаление в межальвеолярных перегородках. Трехдневное же предварительное введение фенобарбитала при аналогичных условиях приводило к формированию тяжелого «МКТ-синдрома» [5], характеризующегося интерстициальным миокардитом, гипертрофией правых отделов сердца, гипертрофией средней оболочки легочных артерий, легочным васкулитом, а также острым легочным повреждением с формированием гиалиновых мембран.

Следует также отметить, что между показателями гипертрофии ядер кардиомиоцитов групп с одно- и трехдневным предварительным стимулированием отсутствуют статистически достоверные различия. Однако в группе 4 значительно усугублялись другие признаки «МКТ-синдрома» – миокардит, фиброз и миоцитолит. Эти данные, а также тот факт, что такие изменения обнаруживались во всем миокарде, позволяют заключить, что гипертрофия миокарда правого желудочка в МКТ-модели носит вторичный характер относительно первичных, обусловленных МКТ, поражений легких. Следствием этого является их меньшая зависимость от МКТП и, как следствие, активности цитохрома P450. В то же время другие диффузные изменения миокарда, явно зависящие от активности печеночных

ферментных систем, вероятно, являются следствием первичной кардиотоксичности МКТП.

## Заключение

На основании полученных данных можно сделать вывод, что предварительное стимулирование печеночных ферментов за счет потенцирования образования эндотелиотоксичного МКТП из МКТ обуславливает повышение стабильности, воспроизводимости и тяжести морфологических изменений МКТ-модели ЛГ. Регулярное использование подобной методики в будущем может не только облегчить проведение экспериментов с моделированием ЛГ, но и предоставить альтернативу методологически трудоемким комбинированным моделям тяжелой и запущенной ЛГ.

## Список литературы / References

1. Koklin I.S., Danilenko L.M. Combined use of arginase II inhibitors and tadalafil for the correction of monocrotaline pulmonary hypertension. *Research Results in Pharmacology*. 2019;5(3):79–85. doi: 10.3897/rrpharmacology.5.39522
2. Gomez-Arroyo J.G., Farkas L., Alhusaini A.A., Farkas D., Kraskauskas D., Voelkel N.F., Bogaard H.J. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2012;302(4):363–369. doi: 10.1152/ajplung.00212.2011
3. Dumitrascu R., Köbrich S., Traupe H., Dony E., Pullamsetti S., Savai R., Samidurai A., Weissmann N., Ghofrani A., Grimminger F., Seeger W., Schermuly R. Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury. *BMC Pulm. Med.* 2008;8:25. doi: 10.1186/1471-2466-8-25
4. Забродский П.Ф., Киричук В.Ф., Лим В.Г., Яфарова И.Х. Активация p-450-зависимых монооксигеназ изменяет иммунотоксичность фосфорорганических соединений в зависимости от характера их метаболизма. *Sarat. науч.-мед. ж.* 2010;6(1):46–48. Zabrodsky P.F., Kirichuk V.F., Lim V.G., Yafarova I.Kh. Activation of p-450-dependend monooxygenases changing immunotoxicity of phosphoroorganic compounds due to their metabolism character. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Saratov Journal of Medical Scientific Research*. 2010;6(1):46–48. [In Russian].
5. Zagrebelnaya A.V., Korokina L.V., Malorodova T.N., Shcheblykina O.V., Avtina T.V., Bolgov A.A., Malyutina E.S., Simonov V.I., Travkin V.A., Dmitriev A.A., Aripov A.A., Shcheblykin D.V. Pulmonary hypertension: modern methods of treatment and ways of their long-term development. *Research Results in Pharmacology*. 2023;9(2):37–54. doi: 10.18413/rrpharmacology.9.10026

6. Kay J.M., Smith P., Heath D., Will J.A. Effects of phenobarbitone, cinnarizine, and zoxazolamine on the development of right ventricular hypertrophy and hypertensive pulmonary vascular disease in rats treated with monocrotaline. *Cardiovasc. Res.* 1976;10(2): 200–205.

7. Хугаев Г.А., Шмальц А.А. Морфологическая оценка сосудов легких при легочной гипертензии, обусловленной врожденными пороками сердца.

*Арх. патол.* 2021;83(5):49–57. doi: 10.17116/patol20218305149

Khugaev G.A., Shmalts A.A., Morphological assessment of pulmonary vessels in pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease. *Arkhir patologii = Archive of Pathology.* 2021;83(5):49–57. [In Russian]. doi: 10.17116/patol20218305149

#### **Сведения об авторах:**

**Загребельная Анна Владимировна**, ORCID: 0009-0002-5647-6000, e-mail: Zagrebelnaya@bsu.edu.ru

**Щеблыкина Олеся Викторовна**, к.м.н., ORCID: 0000-0003-0346-9835, e-mail: sheolvi31@gmail.com

**Болгов Антон Алексеевич**, ORCID: 0000-0001-9708-8181, e-mail: toxabolgovv@mail.ru

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

**Anna V. Zagrebelnaya**, ORCID: 0009-0002-5647-6000, e-mail: Zagrebelnaya@bsu.edu.ru

**Olesya V. Shcheblykina**, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0003-0346-9835, e-mail: sheolvi31@gmail.com

**Anton A. Bolgov**, ORCID: 0000-0001-9708-8181, e-mail: toxabolgovv@mail.ru

*Поступила в редакцию 02.11.2023*

*После доработки 20.11.2023*

*Принята к публикации 20.02.2024*

*Received 02.11.2023*

*Revision received 20.11.2023*

*Accepted 20.02.2024*