

Ю.А. Зрилова<sup>1</sup>, А.К. Чигасова<sup>1,2,3</sup>, М.А. Игнатов<sup>1,2</sup>, Н.Ю. Воробьева<sup>1,2</sup>, А.А. Осипов<sup>2</sup>,  
В.О. Сабуров<sup>4</sup>, Е.И. Казаков<sup>4</sup>, С.Н. Корякин<sup>4</sup>, Ю.А. Федотов<sup>1,2</sup>, А.Ю. Бушманов<sup>1</sup>, А.Н. Осипов<sup>1,2</sup>

## НИЗКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕПАРАЦИИ ДНК В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, ОБЛУЧЕННЫХ *EX VIVO* НЕЙТРОНАМИ С ЭНЕРГИЕЙ 14,1 МЭВ

<sup>1</sup> Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва

<sup>3</sup> Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

<sup>4</sup> Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии»  
Минздрава России, Обнинск

Контактное лицо: Анdreян Николаевич Осипов, e-mail: andreyan.radbio@gmail.com

### РЕФЕРАТ

**Цель:** Оценка эффективности репарации ДНК в лимфоцитах периферической крови человека, облученных *ex vivo* нейтронами с энергией 14,1 МэВ.

**Материал и методы:** Для исследований использовалась периферическая кровь трех физически здоровых мужчин-доноров в возрасте 28–40 лет. Забор периферической крови проводили в К<sub>2</sub>ЭДТА-вакутейнеры (Vacuette). У всех доноров было получено согласие на проведение данного исследования. Выделение лимфоцитов проводили путем центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографин 1,077 г/см<sup>3</sup> (Histopaque, Sigma-Aldrich) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Облучение клеток проводили в МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиале ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России на нейтронном генераторе НГ-14 (ФГУП «ВНИИА», Россия), обеспечившим поток нейтронов с энергией 14,1 МэВ, и гамма-терапевтическом аппарате «РОКУС-АМ» (АО «Равенство», Россия; кобальт-60, мощность дозы 0,5 Гр/мин) в дозах 0,1, 0,25 и 0,5 Гр. Для оценки эффективности репарации ДНК использовался метод ДНК-комет в щелочных условиях. Исследование проводили непосредственно после облучения и через 15 мин инкубации клеток в полной культуральной среде при 37 °С. В качестве критерия поврежденности ДНК использовали момент хвоста и % ДНК в хвосте ДНК-комет. Статистическую значимость оценивали с использованием дисперсионного анализа (ANOVA).

**Результаты:** Продемонстрировано, что эффективность репарации ДНК в лимфоцитах периферической крови человека после воздействия нейтронов 14,1 МэВ ~ в 4–5 раз ниже, чем после воздействия гамма-излучения кобальта-60. Полученные результаты свидетельствуют, что в случае воздействия нейтронного излучения 14,1 МэВ вклад сложных, труднорепарируемых повреждений ДНК гораздо выше, чем при воздействии гамма-излучения, что и определяет высокую относительную биологическую эффективность нейтронного излучения.

**Ключевые слова:** быстрые нейтроны, лимфоциты, повреждения ДНК, репарация ДНК, метод ДНК-комет

**Для цитирования:** Зрилова Ю.А., Чигасова А.К., Игнатов М.А., Воробьева Н.Ю., Осипов А.А., Сабуров В.О., Казаков Е.И., Корякин С.Н., Федотов Ю.А., Бушманов А.Ю., Осипов А.Н. Низкая эффективность репарации ДНК в лимфоцитах периферической крови человека, облученных *ex vivo* нейтронами с энергией 14,1 МэВ // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2025. Т. 70. № 2. С. 23–26. DOI:10.33266/1024-6177-2025-70-2-23-26

Yu.A. Zrilova<sup>1</sup>, A.K. Chigasova<sup>1,2,3</sup>, M.A. Ignatov<sup>1,2</sup>, N.Yu. Vorobyeva<sup>1,2</sup>, A.A. Osipov<sup>2</sup>,  
V.O. Saburov<sup>4</sup>, E.I. Kazakov<sup>4</sup>, S.N. Koryakin<sup>4</sup>, Yu.A. Fedotov<sup>1,2</sup>, A.Yu. Bushmanov<sup>1</sup>, A.N. Osipov<sup>1,2</sup>

## Low Efficiency of DNA Repair in Human Peripheral Blood Lymphocytes Irradiated *ex vivo* by 14.1 MeV Neutrons

<sup>1</sup> A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

<sup>2</sup> N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>4</sup> A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research  
Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk

Contact person: A.N. Osipov, e-mail: andreyan.radbio@gmail.com

### ABSTRACT

**Purpose:** To evaluate the efficiency of DNA repair in human peripheral blood lymphocytes irradiated *ex vivo* by 14.1 MeV neutrons.

**Material and methods:** The peripheral blood of three physically healthy male donors aged 28–40 years was used for the study. The peripheral blood was collected in K<sub>2</sub>EDTA vacutainers (Vacuette). All donors gave their consent to conduct this study. Isolation of lymphocytes was performed by centrifugation in a ficoll-verografin density gradient of 1.077 g/cm<sup>3</sup> (Histopaque, Sigma-Aldrich) in accordance with the attached instructions. Cell irradiation was performed at the A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center on the NG-14 neutron generator (FSUE VNIIA, Russia), which provided neutron fluxes with an energy of 14.1 MeV, and the gamma-therapeutic device “ROKUS-AM”

(JSC Ravenstvo, Russia; cobalt-60, dose rate 0.5 Gy/min) at doses of 0.1, 0.25 and 0.5 Gy. To assess the effectiveness of DNA repair, the DNA comet method was used under alkaline conditions. The study was performed immediately after irradiation and after 15 min of cell incubation in complete culture medium at 37 °C. The tail moment and % DNA in the comet tail were used as a criterion for DNA damage. Statistical significance was assessed using analysis of variance (ANOVA).

**Results:** It was demonstrated that the efficiency of DNA repair in lymphocytes peripheral blood of a person after exposure to 14.1 MeV neutrons is ~ 4–5 times lower than after exposure to cobalt-60 gamma-radiation. The results obtained indicate that in the case of exposure to 14.1 MeV neutron radiation, the contribution of complex, difficult-to-repair DNA damage is much higher than when exposed to gamma radiation, which determines the high relative biological effectiveness of neutron radiation.

**Keywords:** fast neutrons, lymphocytes, DNA damage, DNA repair, DNA comet assay

**For citation:** Zrilova YuA, Chigasova AK, Ignatov MA, Vorobyeva NYu, Osipov AA, Saburov VO, Kazakov EI, Koryakin SN, Fedotov YuA, Bushmanov AYU, Osipov AN. Low Efficiency of DNA Repair in Human Peripheral Blood Lymphocytes Irradiated *ex vivo* by 14.1 MeV Neutrons. Medical Radiology and Radiation Safety. 2025;70(2):23–26. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2025-70-2-23-26

Высокоэнергетические (быстрые) нейтроны являются значительным компонентом вторичного излучения на борту космических аппаратов [1, 2]. В медицине быстрые нейтроны применяются для лечения неоперабельных и радиорезистентных злокачественных новообразований головного мозга, головы и шеи [3]. Быстрые нейтроны обладают очень высокой проникающей способностью за счет низкого сечения взаимодействия. При этом нейтроны сами по себе не вызывают ионизацию вещества, но взаимодействуя с атомами клеток и межклеточной среды, индуцируют каскады вторичных частиц (протонов, альфа-частиц и т.д.), которые формируют сложные повреждения клеточных структур, в том числе и ДНК [4]. Несмотря на последние существенные успехи в радиобиологии нейтронного излучения, их биологические эффекты пока изучены недостаточно, что связано как со сложностью дозиметрии нейтронов, так и ограниченным количеством имеющихся в наличии источников нейтронного излучения. При этом реакторы генерируют сложный энергетический спектр гамма-нейтронного излучения, что делает сложной интерпретацию изучаемых радиобиологических эффектов. Хорошо известно, что энергия нейтронов фактически определяет их биологическую эффективность [4]. В настоящее время существуют генераторы нейтронного излучения, способные генерировать поток моноэнергетических нейтронов. Примером таких генераторов являются портативные генераторы нейтронов, разработанные Всероссийским научно-исследовательским институтом автоматики им. Н.Л. Духова, и генерирующими мощный поток нейтронов с энергией 14,1 МэВ [5].

Цель работы: оценка эффективности репарации ДНК в лимфоцитах периферической крови человека, облученных *ex vivo* нейтронами 14.1 МэВ.

Для оценки эффективности репарации ДНК использовался электрофорез ДНК единичных клеток в геле агарозы. Свое второе название «ДНК-комет» метод получил из-за того, что ДНК иммобилизованных в агарозу и затем лизированных клеток после проведения электрофореза с последующей ее окраской флуоресцентными красителями, серебром или по Гимза выглядит под микроскопом подобно кометам звездного неба [6]. Высокомолекулярная неповрежденная ДНК образует «ядро» кометы, а релаксированные петли и фрагменты ДНК во время электрофореза мигрируют в геле агарозы к аноду, создавая своеобразный «хвост» [6, 7]. В работе была использована версия метода ДНК-комет с щелочной денатурацией и электрофорезом ДНК при  $pH > 13$ , позволяющая анализировать изменения относительного количества одностранных разрывов и щелочнолабильных сайтов ДНК при дозах ионизирующего излучения от 5–10 сГр [8, 9].

## Материал и методы

### Выделение лимфоцитов

Для исследований использовалась кровь трех физически здоровых мужчин-доноров в возрасте 28–40 лет. Забор периферической крови проводили в К<sub>2</sub>ЭДТА-вакутейнеры (Vacuette). У всех доноров было получено согласие на проведение данного исследования.

Выделение лимфоцитов крови человека проводили путем центрифугирования в градиенте плотности фикол-верографин 1,077 г/см<sup>3</sup> (Histopaque, Sigma-Aldrich) в соответствии с прилагаемой инструкцией. После выделения лимфоциты трижды отмывали и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (pH=7,4) до конечной концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл.

### Облучение

Облучение клеток проводили в МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиале ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России на нейтронном генераторе НГ-14 (ФГУП «ВНИИА», Россия), обеспечившим поток нейтронов с энергией 14,1 МэВ, и гамма-терапевтическом аппарате «РОКУС-АМ» (АО «Равенство», Россия; кобальт-60, мощность дозы 0,5 Гр/мин) в дозах 0,1, 0,25 и 0,5 Гр. Дозиметрия нейтронного поля осуществлялась с помощью радиометра быстрых нейтронов РБН (Частное учреждение «ИТЭР-Центр», Россия). Дозиметрия гамма-облучения выполнялась согласно методике TRS-398 rev.1 с Unidos Weblin и ионизационной камерой типа Farmer ТМ30013 (PTW, Германия). Погрешность дозиметрии нейтронного излучения не превышала 5 %. Погрешность дозиметрии гамма-излучения – 2 %.

### Метод ДНК-комет

200 мкл суспензии клеток смешивали с 600 мкл 1 % раствора легкоплавкой агарозы (тип IV) (Sigma-Aldrich, США) в фосфатно-солевом буфере (pH=7,4) при температуре 37,5 °C. 60 мкл полученной суспензии клеток в жидкой агарозе наносили на предварительно покрытые слоем 1 % нормоплавкой агарозы предметные стекла, накрывали покровными стеклами и оставляли на 10 мин при 4 °C до образования плотного геля.

Для индукции репарации ДНК полученные агарозные слайды с иммобилизованными в них клетками (далее агарозные слайды) инкубировали в течение 15 мин в культуральной среде RPMI-1640 (Gibco, США), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco, США), при температуре 37 °C.

Затем агарозные слайды (как без индукции репарации ДНК, так и с индукцией репарации ДНК) инкубировали 1 ч при 4 °C в лизирующем буфере (2,5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH = 10,0, 1 % Triton X-100) с добавлением 10 % ДМСО (AppliChem). Затем

слайды переносили в щелочной раствор (300 мМ NaOH, 1 мМ EDTA, pH > 13) и выдерживали 20 мин для расплетания (щелочной денатурации) нитей ДНК.

Электрофорез проводили в щелочном растворе (300 мМ NaOH, 1 мМ EDTA, pH > 13) при напряжении 1 В/см в течение 20 мин. После электрофореза проводили нейтрализацию для ренатурации (восстановления нативности) ДНК (трехкратная промывка в 0,4 М Трис-HCl буфере, pH = 7,4), после чего слайды слегка подсушивали и фиксировали в этаноле 70 % в течение 10 мин. Для окраски ДНК использовали йодистый пропидий (Invitrogen, США). Визуализацию ДНК-комет проводили на люминесцентном микроскопе Nikon Eclipse Ni-U (Nikon, Япония), оснащенном видеокамерой высокого разрешения ProgRes MFcool (Jenoptik AG, Германия), с использованием наборов светофильтров Y-2E/C (возбуждение 540–580 нм и эмиссия 600–660 нм). На каждом слайде регистрировали по 50 комет. Обработывали по 3 слайда от каждого донора на экспериментальную точку.

Для анализа и обработки микрофотоизображений ДНК-комет использовали программу CASP 1.2.2 (CASPlab). В качестве критерия поврежденности ДНК использовали момент хвоста (произведение % ДНК в хвосте на длину хвоста ДНК-кометы в условных единицах) и % ДНК в хвосте ДНК-комет.

#### Статистический анализ

Статистический и математический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.0.2.161 (GraphPad Software). Результаты представлены как среднее арифметическое результатов  $\pm$  стандартная погрешность среднего (SEM). Статистическую значимость проверяли с использованием дисперсионного анализа (ANOVA).

#### Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены результаты оценки момента хвоста ДНК-комет лимфоцитов сразу после облучения гамма-излучением или 14,1 МэВ нейтронами в дозе 0,5 Гр и после 15 мин инкубации в питательной среде при 37 °С (репарация). Видно, что воздействие гамма-излучения и нейтронов в дозе 0,5 Гр индуцирует статистически значимое ( $p < 0,001$ ) увеличение момента хвоста ДНК-комет  $\sim 7,7$  и  $7,1$  раза соответственно, по сравнению с контрольными значениями. При этом изначальные моменты хвоста ДНК-комет после воздействия гамма-излучения и нейтронов статистически значимо не различаются ( $p=0,395$ ). Ситуация меняется после 15 мин инкубации клеток в питательной среде при 37 °С, во время которой идут процессы репарации ДНК. После облучения клеток гамма-излучением репарации в течение 15 мин достаточно для уменьшения значений момента хвоста ДНК-комет в 5,2 раза по сравнению с изначальными значениями (рис. 1). В то время как после 15 мин инкубации клеток, облученных нейтронами 14,1 МэВ, значения момента хвоста ДНК-комет снижаются всего в 1,7 раза по сравнению с изначальными значениями (рис. 1).

Расчеты, выполненные с учетом разницы между значениями в облученных и контрольных клетках, показали, что через 15 мин репарации в гамма-облученных клетках остается  $\sim 5,9 \pm 3,0$  %, а в клетках облученных нейтронами  $\sim 30,4 \pm 13,5$  % от изначально индуцированных повреждений ДНК, влияющих на значения момента хвоста ДНК-комет.

Помимо момента хвоста при оценке результатов метода ДНК-комет часто используется более простой показатель % ДНК в хвосте. Момент хвоста учитыва-

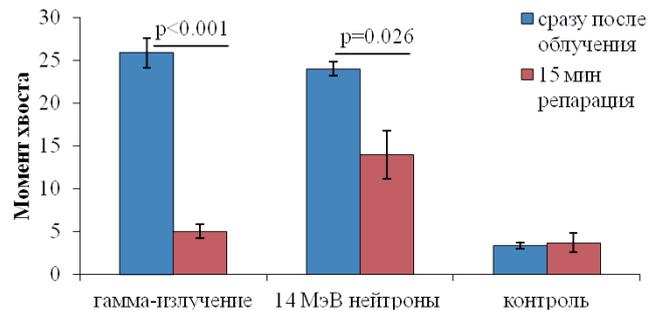


Рис. 1. Значения момента хвоста ДНК-комет лимфоцитов периферической крови человека непосредственно после облучения (гамма-излучения или 14,1 МэВ нейтроны) в дозе 0,5 Гр и после инкубации в полной культуральной среде при 37 °С

Fig. 1. Values of DNA comet tail moment of human peripheral blood lymphocytes immediately after irradiation (gamma radiation or 14.1 MeV neutrons) at a dose of 0.5 Gy and after incubation in complete culture medium at 37 °C

ет как долю ДНК, мигрировавшей во время электрофореза в область хвоста, так и относительное расстояние ее миграции. Тогда как % ДНК в хвосте учитывает только долю ДНК, мигрировавшей во время электрофореза в область хвоста. Принципиальные различия между этими двумя показателями заключаются в том, что в случае использования % ДНК важно количество ДНК в хвосте, а не расстояние ее «пробега». Результаты оценки % ДНК в хвосте ДНК-комет лимфоцитов сразу после облучения гамма-излучением или нейтронами в дозе 0,5 Гр и после 15 мин инкубации в питательной среде при 37 °С (репарация) представлены на рис. 2. Интересно, что если использование разных показателей практически не влияет на результаты, полученные на лимфоцитах, облученных гамма-излучением, то в случае воздействия нейтронов выбор показателя важен. Во-первых, в клетках, облученных нейтронами, изначальные значения % ДНК в хвосте  $\sim 1,6$  раз ( $p < 0,001$ ) ниже, чем в клетках облученных гамма-излучением. Во-вторых, хотя после 15 мин инкубации после облучения нейтронами и наблюдается некоторое ( $\sim 1,3$  раза) снижение % ДНК в хвосте, оно не является статистически значимым ( $p = 0,063$ ). По всей видимости, спектры повреждений ДНК при воздействии нейтронного и гамма-излучений существенно отличаются с учетом того факта, что на % ДНК в хвосте существенно влияют на замедляющие электрофоретическую подвижность петель ДНК повреждения ДНК, такие как сшивки.

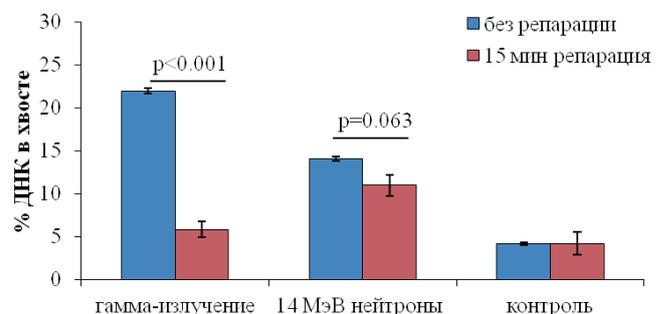


Рис. 2. % ДНК в хвосте ДНК-комет лимфоцитов периферической крови человека непосредственно после облучения (гамма-излучение или нейтроны) в дозе 0,5 Гр и после инкубации в полной культуральной среде при 37 °С

Fig. 2. % DNA in the tail of DNA comets of human peripheral blood lymphocytes immediately after irradiation (gamma radiation or neutrons) at a dose of 0.5 Gy and after incubation in complete culture medium at 37 °C

ДНК-ДНК и ДНК-белок [10]. Целесообразно в будущем провести исследования индукции этих повреждений при воздействии нейтронного излучения.

Так же как и в случае момента хвоста ДНК-комет, для % ДНК в хвосте были проведены расчеты относительных изменений этого показателя за вычетом контрольных значений. Показано, что через 15 мин репарации в гамма-облученных клетках остается  $\sim 7,5 \pm 1,0$  %, а клетках, облученных нейтронами  $\sim 32,4 \pm 13,8$  % от изначально индуцированных повреждений ДНК, влияющих на значения момента хвоста ДНК-комет. В целом, полученные значения близки к тем, которые были получены при анализе момента хвоста ДНК-комет.

### Заключение

Основываясь на данных метода ДНК-комет в щелочных условиях можно заключить, что эффективность репарации ДНК в лимфоцитах периферической крови человека после воздействия нейтронов 14,1 МэВ  $\sim$  в 4–5 раз ниже, чем после воздействия гамма-излучения кобальта-60. Полученные результаты свидетельствуют, что в случае воздействия нейтронного излучения вклад сложных, труднорепазируемых повреждений ДНК гораздо выше, чем при воздействии гамма-излучения, что и определяет высокую относительную биологическую эффективность нейтронного излучения.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

1. Litvak M.L., Sanin A.B., Mitrofanov I.G., Bakhtin B., Jun I., Martinez-Sierra L.M., et al. Mars Neutron Radiation Environment from HEND/Odyssey and DAN/MSL Observations. *Planetary and Space Science*. 2020;184. doi: 10.1016/j.pss.2020.104866.
2. Bartlett D.T., Hager L.G., Tanner R.J., Steele J.D. Measurements of the High Energy Neutron Component of Cosmic Radiation Fields in Aircraft Using Etched Track Dosimeters. *Radiation Measurements*. 2001;33;3:243-53. doi: 10.1016/s1350-4487(00)00098-6.
3. Gordon K., Gulidov I., Fatkhudinov T., Koryakin S., Kaprin A. Fast and Furious: Fast Neutron Therapy in Cancer Treatment. *International Journal of Particle Therapy*. 2022;9;2:59-69. doi: 10.14338/ijpt-22-00017.
4. Baiocco G., Barbieri S., Babini G., Morini J., Alloni D., Friedland W., et al. The Origin of Neutron Biological Effectiveness as a Function of Energy. *Scientific Reports*. 2016;6;1. doi: 10.1038/srep34033.
5. Mikerov V., Barmakov Y.N., Bogolubov E., Ryzhkov V. Portable Neutron Generators of Vniia and Their Applications. *Proceedings of International Workshop on Fast Neutron Detectors and Applications – PoS(FNDA2006)2007*. DOI:10.22323/1.025.0023
6. Osipov A., Arkhangel'skaya E., Vinokurov A., Smetanina N., Zhavoronkov A., Klokov D. DNA Comet Giemsa Staining for Conventional Bright-Field Microscopy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15;4:6086-95. doi: 10.3390/ijms15046086.
7. Osipov A.N., Smetanina N.M., Pustovalova M.V., Arkhangel'skaya E., Klokov D. The Formation of DNA Single-Strand Breaks and Alkali-Labile Sites in Human Blood Lymphocytes Exposed to 365-nm UVA Radiation. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014;73:34-40. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.027.
8. Osipov A.N., Elakov A.L., Puchkov P.V., Pomerantseva M.D., Ramaiya L.K., Klokov D.Y., et al. The Estimation of Molecular and Cytogenetic Effects in Mice Exposed to Chronic Low Dose-Rate Gamma-Radiation. *Russian Journal of Genetics*. 2002;38;10:1140-1144. doi: 10.1023/a:1020644619267.
9. Osipov A.N., Klokov D.Y., Elakov A.L., Rozanova O.M., Zaichkina S.I., Aptikaeva G.F., et al. Comparison In Vivo Study of Genotoxic Action of High- Versus Very Low Dose-Rate  $\gamma$ -Irradiation. *Nonlinearity in Biology, Toxicology, Medicine*. 2004 Jul;2;3:223-232 doi: 10.1080/15401420490507521.
10. Grekhova A.K., Gorbacheva L.B., Ivanova N.A., Efimenko I.A., Osipov A.N. Comparative Studies of the Genotoxic Activity of a New Palladium (II) Acidocomplex and Cisplatin in Human Blood Lymphocytes in vitro. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2013;7;3:226-30. doi: 10.1134/s1990750813030050.

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

**Финансирование.** Исследования выполнены в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 1023112000035-8, шифр «Космос-ДНК»).

**Участие авторов.** Статья подготовлена с равным участием авторов.

**Поступила:** 20.12.2024. **Принята к публикации:** 25.01.2025.

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

**Financing.** The research was carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (No. 1023112000035-8, code "Cosmos-DNA").

**Contribution.** Article was prepared with equal participation of the authors.

**Article received:** 20.12.2024. **Accepted for publication:** 25.01.2025.