

©Коллектив авторов

МИКРОБИОМ КИШЕЧНИКА КАК ПРЕДИКТОР УСПЕХА АНТИ-PD1 ТЕРАПИИ: АНАЛИЗ МЕТАГЕНОМНЫХ ДАННЫХ

Д.Е. Федоров^{1}, А.В. Павленко¹, Е.И. Олехнович¹, К.М. Климина¹,
И.А. Покатеев², А.И. Манолов¹, Д.Н. Конанов¹, В.А. Веселовский¹, Е.Н. Ильина¹*

¹Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА,
119435, Москва, Малая Пироговская ул., 1А; *эл. почта: fedorov.de@gmail.com

²Городская онкологическая клиническая больница №1,
105005, Москва, Бауманская ул., 17/1

Анти-PD1 иммунотерапия, направленная на белок 1 программируемой клеточной смерти (programmed cell death protein 1, PD1), оказала большое влияние на лечение рака, однако процент позитивных исходов терапии составляет 40-45% и зависит от множества факторов. Одним из факторов, влияющих на исход иммунотерапии, является состав микробиоты кишечника. Данный эффект был продемонстрирован как на модельных объектах, так и на клинических группах пациентов. Однако для выявления чётких причинно-следственных связей между микробиотой и ответом на анти-PD1 иммунотерапию необходимо расширять количество выборок и пациентов. В данной работе представлен анализ метагеномных данных, полученных в результате полногеномного секвенирования образцов кала от пациентов с меланомой (n=45), которые давали различный ответ на анти-PD1 терапию. Анализ экспериментальных данных продемонстрировал различие в составе микробиоты между экспериментальными группами. Полученные результаты свидетельствуют о наличии связи между составом микробиоты кишечника и исходом анти-PD1 терапии. Расширение исследований в данном направлении может помочь разработать дополнительные инструменты предсказания исхода анти-PD1 иммунотерапии рака, а также повысить её эффективность.

Ключевые слова: микробиота кишечника; меланома; полногеномное метагеномное секвенирование; микробные сообщества

DOI: 10.18097/PBMC20206606502

ВВЕДЕНИЕ

В 2018 году в России заболеваемость раком кожи составила 14,4% и вышла на первое место среди других злокачественных новообразований, опередив рак молочной железы и рак лёгкого [1]. При этом 12,5% случаев приходится на меланому кожи. Кроме того, есть значительная доля пациентов с меланомой слизистых, а также меланомой сосудистой оболочки глаза, которые не входят в официальную статистику в России. К счастью, несмотря на 43,5% рост заболеваемости меланомой в последние 10 лет, смертность от данного заболевания растёт не такими быстрыми темпами, составив 11,2% прироста за тот же период [1], что связано в первую очередь с развитием лекарственных методов лечения.

В настоящее время иммунотерапия является стандартом лечения меланомы кожи как в адъювантном режиме при III стадии опухолевого процесса, так и в качестве самостоятельного лечения при IV стадии [2]. Ингибиторы контрольных точек (или звена, переключающего иммунитет, КТ) необходимы для активации иммунного ответа. Например, ингибиторы КТ анти-PD1 блокируют торможение активации иммунной системы, повышая уровень активированных Т- и В-лимфоцитов и снижая уровень регуляторных Т лимфоцитов [3, 4]. Показания к назначению данного вида терапии не зависят от статуса биомаркеров, в том числе экспрессии лигандов PD-L1 или мутации в гене *BRAF*

(серин-протеинолиной протеинкиназы, участвующей в формировании внутриклеточных сигналов, направленных на клеточный рост) [2, 5]. Между тем, частота объективных эффектов при применении иммунотерапии составляет 40-45%. До половины пациентов имеют прогрессирование болезни на фоне иммунотерапии [5, 6], что поднимает вопрос необходимости поиска других предиктивных биомаркеров, позволяющих стратифицировать пациентов на иммунотерапию или другие варианты системного лечения.

В последнее время появляется всё больше свидетельств участия микробиоты кишечника в метаболических реакциях, важных для здоровья человека. Развитие технологий высокопроизводительного секвенирования и вычислительных методов анализа позволили изучать микробиом без необходимости культивации микроорганизмов, что открывает путь к изучению скрытого некультивируемого микробного разнообразия (то есть той части микробного сообщества, которая не может быть изучена классическими методами микробиологии в силу неясных или слишком сложных условий для культивирования). Активный поиск ассоциаций структуры микробиома кишечника с показателями здоровья человека показал связь с такими клиническими состояниями, как воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) [7], метаболический синдром [8], колоректальный рак [9] и др. В последние годы этот поиск вывел

ряд исследователей на рассмотрение связи между структурой микробиома кишечника и ответом пациентов на противоопухолевую терапию с помощью ингибиторов иммунных контрольных точек, в частности PD1 рецепторов [4, 10].

В доказательство правомочности этой теории были проведены эксперименты с использованием модельных объектов. Авторы заселяли микробиоту стерильных мышей микробиотой пациентов с различным ответом на анти-PD1 терапию с последующим введением раковых клеток и проведением терапии на мышах [11-13]. В этих экспериментах был показан лучший ответ мышей, заселённых микробиотой пациентов, ответивших на терапию.

В нашей работе мы представляем результаты анализа собственных данных, полученных в результате полногеномного секвенирования образцов кала от пациентов с меланомой, ответивших или не ответивших на последующую противоопухолевую анти-PD1 терапию.

МЕТОДИКА

Образцы биоматериала

Образцы кала (n=45) собирали от пациентов России и Беларуси старше 18 лет с нерезектабельной или метастатической меланомой в рамках клинического исследования MIRACULUM по оценке эффективности отечественного оригинального иммунобиологического препарата пролголимаб (Фортека®, “БИОКАД”, Россия), представляющего собой антитела к PD1 рецептору. Образцы кала отбирали до получения пациентом курса противоопухолевой терапии и хранили при -20°C.

Выделение ДНК из образцов кала и метагеномное секвенирование

Выделение ДНК из образцов проводили с помощью набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот (MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I) (“Roche”, Швейцария) согласно инструкции производителя. ДНК элюировали в 50 мкл прилагаемого к набору буфера и хранили при температуре -18°C. Для разделения микробной фракции и фракции хозяина проводили обогащение выделенной ДНК с помощью набора NEBNext Microbiome DNA Enrichment Kit (“New England Biolabs”, США) согласно инструкции производителя. После обогащения всю ДНК подвергали фрагментации на приборе Covaris S220 System (“Covaris”, США) согласно инструкциям производителя. Оценку финального размера фрагментированной ДНК образцов проводили на Agilent 2100 Bioanalyzer (“Agilent”, США) согласно инструкциям производителя; он составил приблизительно около 500 пн. Секвенирование обогащённой микробной ДНК проводили на приборе Illumina HiSeq (“Illumina”, США), используя набор парных прочтений 2×250 bp (Rapid Run) с добавлением 2% Phix в качестве контроля.

Биоинформатическая обработка результатов секвенирования

Фильтрацию низкокачественных прочтений осуществляли при помощи программы Trimmomatic [14]. Таксономическую аннотацию проводили с помощью программы MetaPhlan 3.0 [15]. В качестве статистического теста при анализе представленности применяли U-критерий Манна-Уитни с поправкой на множественное сравнение FDR; значимыми считали различия с уровнем p -value меньше 0,05. Биомаркер признавали пригодным к дальнейшему рассмотрению в случае, если значимое различие между группами сохранялось при удалении всех образцов, где была нулевая представленность биомаркера. Такой подход был выбран для контроля возможных артефактов анализа. В анализе использовали язык Python и библиотеки scikit-learn [16]. Дополнительно для валидации биомаркеров был использован алгоритм LefSe [17]. Визуализацию данных осуществляли в среде GNU/R.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сбор и секвенирование образцов

В исследование включены 45 образцов фекалий, отобранных от пациентов с меланомой перед курсом иммунотерапии анти-PD1 антителом пролголимаб (Фортека®). Собранные образцы от пациентов были разделены на две группы: пациенты с положительным (ответчики, n=27) и отрицательным (неответчики, n=18) исходом терапии. В результате полногеномного метагеномного секвенирования образцов суммарно получено 152040562 прочтений (в среднем 3455467 прочтений на образец).

Выявление различий таксономических профилей между группами пациентов с различным ответом на анти-PD1 терапию

Таксономическое профилирование метагеномных образцов было выполнено при помощи программы MetaPhlan 3.0. Распределение относительных представлений микробов на уровне семейств представлено на рисунке 1, который показывает отсутствие однозначной кластеризации между двумя тестируемыми группами. На втором этапе анализа полученные метагеномные профили были представлены в виде двумерной визуализации с использованием неметрического множественного шкалирования (NMDS), однако чёткие визуальные отличия между группами пациентов с различным ответом на анти-PD терапию также выявлены не были (рис. 2).

Следующий этап анализа включал выявление дифференциально представленных бактериальных видов. Согласно нашим данным, положительный исход иммунотерапии был ассоциирован с присутствием в микробиоте кишечника пациента 6 видов бактерий: *Bifidobacterium adolescentis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Barnesiella intestinihominis*, *Parabacteroides merdae*, *Ruminococcus bromii*, *Eubacterium eligens*. Присутствие *Bifidobacterium*

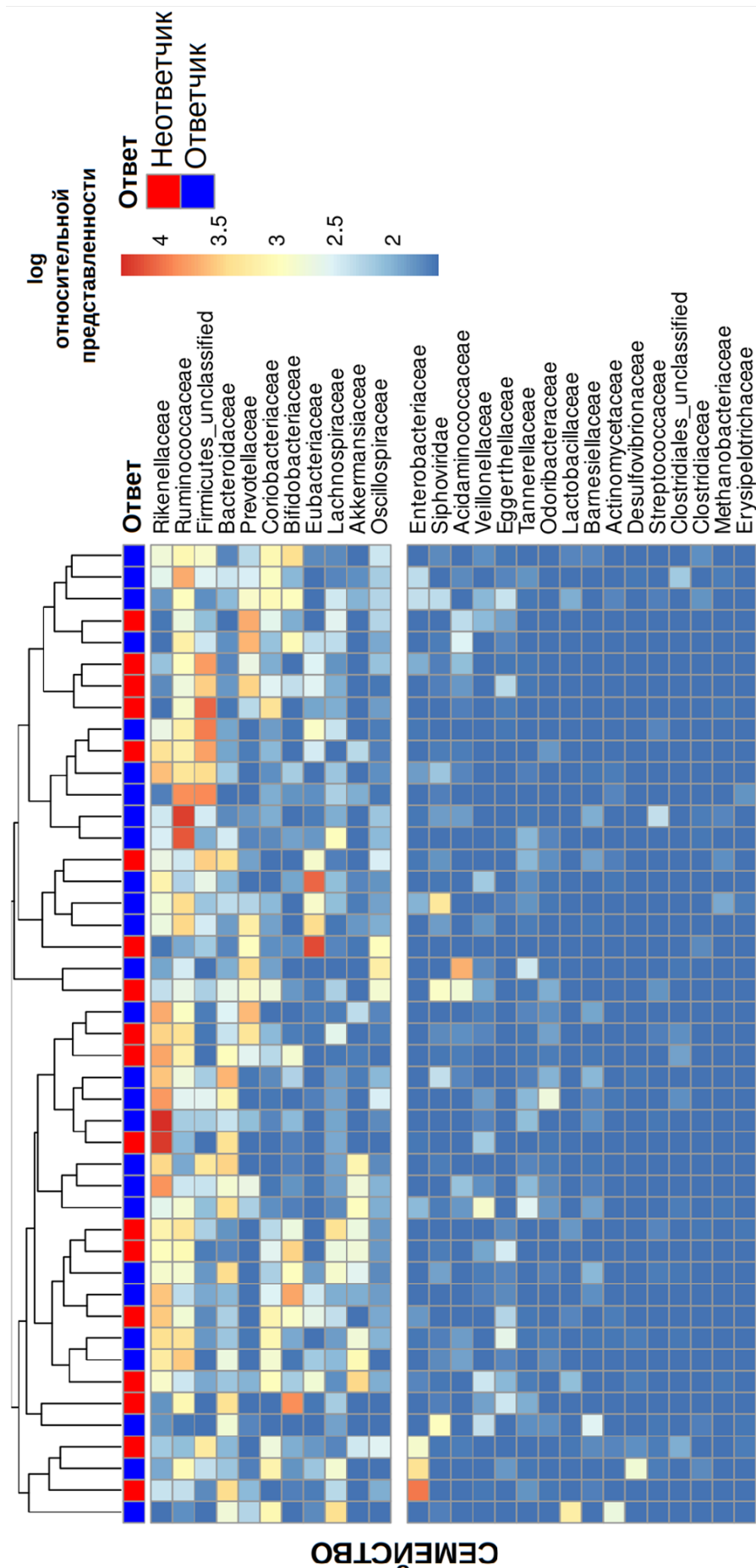


Рисунок 1. Тепловая карта относительных представлений таксонов, ассоциированных с ответом на анти-PD1 терапию. Верхней цветовой полосой закодированы группы пациентов. Красным цветом обозначены образцы от пациентов с негативным исходом иммунотерапии (n=18), синим — с положительным исходом (n=27). Горизонтальной линией отделены бактериальные семейства по распространенности в метагеномных образцах. Наиболее часто встречающиеся микробные семейства представлены в верхней части тепловой карты.

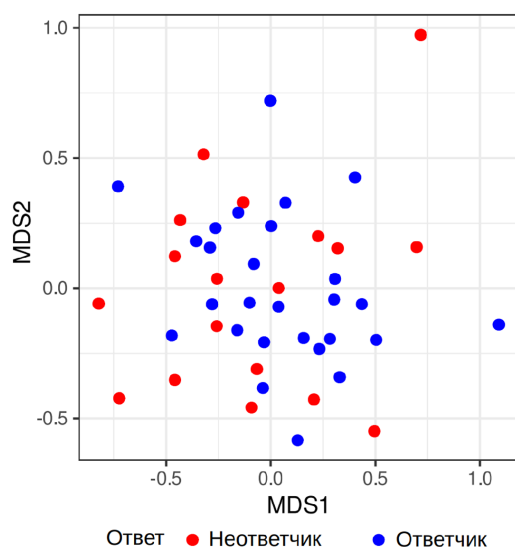


Рисунок 2. Двумерная визуализация таксономических профилей микробиоты кишечника пациентов с различным ответом на анти-PD1 иммунотерапию рака, полученная с использованием неметрического множественного шкалирования (NMDS). Красным цветом обозначены образцы от пациентов с негативным исходом иммунотерапии (n=18), синим — с положительным исходом (n=27).

longum, *Collinsella aerofaciens*, *Oscillibacter sp cag241*, *Ruminococcus bicirculans* было характерно для группы пациентов, не ответивших на проведённую терапию. Список бактерий был отсортирован в порядке убывания размера силы ассоциации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В данном исследовании были изучены особенности микробиоты кишечника пациентов с меланомой, продемонстрировавших различный ответ на анти-PD1 терапию. Следует отметить, что в мире проводятся исследования аналогичного дизайна, однако их крайне мало [4]. Наши результаты показывают существование взаимосвязи между микробиомом кишечника и ответом на иммунотерапию против PD-1 у пациентов с меланомой. В рамках исследования были идентифицированы микробные виды, такие как *Bifidobacterium adolescentis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Barnesiella intestinihominis*, *Parabacteroides merdae*, *Ruminococcus bromii*, *Eubacterium eligens*, ассоциированные с успешностью анти-PD1 терапии пациентов. Мы предполагаем, что пациенты с благоприятным микробиомом кишечника могут иметь усиленные системные и противоопухолевые иммунные ответы, опосредованные повышенной презентацией антигена и улучшенной функцией эффекторных Т-клеток в микроокружении опухоли. Из выявленных нами маркерных микроорганизмов *Bifidobacterium adolescentis* и *Parabacteroides merdae* были ассоциированы с ответом на анти-PD1 терапию в проведённых ранее исследованиях [11, 13].

Также была выявлена повышенная относительная представленность *Barnesiella intestinihominis* у пациентов с благоприятным исходом терапии.

Ранее отмечалось, что *B. intestinihominis* описана как одна из двух бактерий, необходимых для эффективности терапии при помощи иммуномодулятора циклофосфамида [18]. На мышиных моделях было показано, что колонизация либо повторяющееся пробиотическое применение данной бактерии увеличивает количество инфильтрирующих опухоль цитотоксических Т-клеток. Данный эффект наблюдается при воздействии циклофосфамидом, который увеличивает проникновение бактерий через эпителий кишечника и, соответственно, увеличивает вероятность распознавания и активации иммунного ответа [18]. С другой стороны, пациенты с неблагоприятным микробиомом кишечника (например, с более высоким содержанием условно-патогенной флоры) могут иметь нарушенные системные и противоопухолевые иммунные ответы, опосредованные ограниченной внутриопухолевой лимфоидной и миелоидной инфильтрацией и ослабленной способностью презентации антигена.

Таким образом, принимая во внимание результаты работ [11-13, 20], а также полученные нами результаты, можно сделать вывод, что влияние на успех анти-PD1 терапии оказывает скорее общая, более “здоровая” композиция микробиома, способствующая лучшему пищеварению и усвоению питательных веществ из пищи, в частности веществ растительного происхождения. Этот тезис подтверждается работой [21], где было показано, что пациенты, придерживающиеся диеты с высоким содержанием пищевых волокон имеют большие шансы на успех анти-PD1 терапии.

Полученные результаты подчеркивают терапевтический потенциал модуляции микробиома кишечника у пациентов, получающих иммунотерапию с блокадой контрольных точек, и требуют оперативной оценки у онкологических больных в ходе терапии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят компанию ЗАО “БИОКАД” (Россия) за сотрудничество в проведении данного исследования.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Разрешение на проведение клинических исследований BCD-100 №404 от 26.07.2017 г. Исследование проведено с соблюдением всех принятых Российских и международных этических стандартов. Одобрено Советом по этике Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол №148 от 30 мая 2017 г.). У всех пациентов предварительно было получено письменное информированное согласие.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования (соглашение № RFMEFI60419X0215).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. (2019) Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена, Москва. 250 с. [Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V. (2019) National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow. 250 p]
2. Меланома кожи и слизистых оболочек (2020) Клинические рекомендации Министерства Здравоохранения России (<http://cr.rosminzdrav.ru/#!/schema/766>). [Melanoma kozhi i slizistyh obolochek (2020). Klinicheskie rekomendacii Ministerstva Zdravooohraneniya Rossii (<http://cr.rosminzdrav.ru/#!/schema/766>)]
3. Shih K., Arkenau H.T., Infante J.R.. (2014) *Drugs*, **74**(17), 1993-2013.
4. Олехнович Е.И., Манолов А.И., Павленко А.В., Конанов Д.Н., Федоров Д.Е., Тихонова П.О., Глуценко О.Е., Ильина Е.Н. (2020) Биомедицинская химия, **66**(1), 54-63. [Olekhnovich E.I., Manolov A.I., Pavlenko A.V., Konanov D.N., Fedorov D.E., Tikhonova P.O., Glushchenko O.E., Ilina E.N. (2020) *Biomeditsinskaya Khimiya*, **66**(1), 54-63].
5. Wolchok J.D., Chiarion-Sileni V., Gonzalez R., Rutkowski P., Grob J.J., Cowey C.L., Lao C.D., Wagstaff J., Schadendorf D., Ferrucci P.F., Smylie M., Dummer R., Hill A., Hogg D., Haanen J., Carlino M.S., Bechter O., Maio M., Marquez-Rodas I., Guidoboni M., McArthur G., Lebbé C., Ascierto P.A., Long G.V., Cebon J., Sosman J., Postow M.A., Callahan M.K., Walker D., Rollin L., Bhore R., Hodi S., Larkin J. (2017) *N. Engl. J. Med.*, **377**(14), 1345-1356.
6. Caroline R., Ribas A., Schachter J., Arance A., Grob J.J., Mortier L., Daud A., Carlino M.S., McNeil C.M., Lotem M., Larkin J.M.G., Lorigan P., Neyns B., Blank C.U., Petrella T.M., Hamid O., Su S.C., Krepler C., Long G.V. (2019) *Lancet Oncology*, **20**(9), 1239-1251.
7. Lloyd-Price J., Arze C., Ananthakrishnan A.N., Schirmer M., Avila-Pacheco J., Poon T.W., Andrews E., Ajami N.J., Bonham K.S., Brislawn C.J., Casero D., Courtney H., Gonzalez A., Graeber T.G., Hall A.B., Lake K., Landers C.J., Mallick H., Plichta D.R., Prasad M., Rahnavard G., Sauk J., Shungin D., Vázquez-Baeza Y., White III R.A., IBDMDB Investigators, Braun J., Denson L.A., Jansson J.K., Knight R., Kugathasan S., McGovern D.P.B., Petrosino J.F., Stappenbeck T.S., Winter H.S., Clish C.B., Franzosa E.A., Vlamakis H., Xavier R.J., Huttenhower C. (2019) *Nature*, **569**(7758), 655-662.
8. Mazidi M., Rezaie P., Kengne A.P., Mobarhan M.G., Ferns G.A. (2016) *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, **10**(2), S150-S157.
9. Wirbel J., Pyl P.T., Kartal E., Zych K., Kashani A., Milanese A., Fleck J.S., Voigt A.Y., Pallega A., Ponnudurai R., Sunagawa S., Coelho L.P., Schrotz-King P., Vogtmann E., Habermann N., Niméus E., Thomas A.M., Manghi P., Gandini S., Serrano D., Mizutani S., Shiroma H., Shiba S., Shibata T., Yachida S., Yamada T., Waldron L., Naccarati A., Segata N., Sinha R., Ulrich C.M., Brenner H., Arumugam M., Bork P., Zeller G. (2019). *Nature Medicine*, **25**(4), 679-689.
10. Hamid O., Robert C., Daud A., Hodi F.S., Hwu W.J., Kefford R., Wolchok J.D., Hersey P., Joseph R.W., Weber J.S., Dronca R., Gangadhar T.C. (2013) *N. Engl. J. Med.*, **369**(2), 134-144.
11. Matson V., Fessler J., Bao R., Chongsuwat T., Zha Y., Alegre M.L., Luke J.J., Gajewski T.F. (2018) *Science*, **359**(6371), 104-108.
12. Gopalakrishnan V., Spencer C.N., Nezi L., Reuben A., Andrews M.C., Karpins T.V., Prieto P.A., Vicente D., Hoffman K., Wei S.C., Cogdill A.P., Zhao L., Hudgens C.W., Hutchinson D.S., Manzo T., Petaccia de Macedo M., Cotechini T., Kumar T., Chen W.S., Reddy S.M., Sloane S.R., Galloway-Pena J., Jiang H., Chen P.L., Shpall E.J., Rezvani K., Alousi A.M., Chemaly R.F., Shelburne S., Vence L.M., Okhuysen C., Jensen V.B., Swennes A.G., McAllister F., Marcelo Riquelme Sanchez E., Zhang Y., Le Chatelier E., Zitvogel L., Pons N., Austin-Breneman J.L., Haydu L.E., Burton E.M., Gardner J.M., Sirmans E., Hu J., Lazar A.J., Tsujikawa T., Diab A., Tawbi H., Glitza I.C., Hwu W.J., Patel S.P., Woodman S.E., Amaria R.N., Davies M.A., Gershenwald J.E., Hwu P., Lee J.E., Zhang J., Coussens L.M., Cooper Z.A., Futreal P.A., Daniel C.R., Ajami N.J., Petrosino J.F., Tetzlaff M.T., Sharma P., Allison J.P., Jenq R.R., Wargo J.A. (2018) *Science*, **359**(6371), 97-103.
13. Routy B., Gopalakrishnan V., Daillure R., Zitvogel L., Wargo J.A., Kroemer G. (2018) *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **15**(6), 382-396.
14. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. (2014) *Bioinformatics*, **30**(15), 2114-2120.
15. Truong D.T., Franzosa E.A., Tickle T.L., Scholz M., Weingart G., Pasolli E., Tett A., Huttenhower C., Segata N. (2015) *Nature Methods*, **12**(10), 902-903.
16. Segata N., Izard J., Waldron L., Gevers D., Miropolsky L., Garrett W.S., Huttenhower C. (2011) *Genome Biology*, **12**(6), 1-18.
17. Pedregosa F., Varoquaux G., Gramfort A., Michel V., Thirion B., Grisel O., Vanderplas J. (2011) *J. Machine Learning Res.*, **12**, 2825-2830.
18. Daillère R., Vétizou M., Waldschmitt N., Yamazaki T., Isnard C., Poirier-Colame V., Duong C.P.M., Flament C., Lepage P., Roberti M.P., Routy B., Jacquilot N., Apetoh L., Becharef S., Rusakiewicz S., Langella P., Sokol H., Kroemer G., Enot D., Roux A., Eggermont A., Tartour E., Johannes L., Woerther P.L., Chachaty E., Soria J.C., Golden E., Formenti S., Plebanski M., Madondo M., Rosenstiel P., Raoult D., Cattoir V., Boneca G.I., Chamaillard M., Zitvogel L. (2016) *Immunity*, **45**(4), 931-943.
19. Zheng Y., Wang T., Tu X., Huang Y., Zhang H., Tan D., Li P., Qin N., Fang W. (2019) *J. Immunother. Cancer*, **7**(1), 193. DOI: 10.1186/s40425-019-0650-9.
20. Gharaibeh R.Z., Jobin C. (2019) *Gut*, **68**(3), 385-388.
21. Spencer C.N., Gopalakrishnan V., McQuade J., Andrews M.C., Helmink B., Wadud Khan M.A., Sirmans E., Haydu L., Cogdill A., Burton E., Amaria R., Patel S., Glitza I., Davies M., Posada E., Hwu W.J., Diab A., Nelson K., Tawbi H., Wong M., Jenq R.R., Cohen L., Daniel-MacDougall C., Wargo J.A. (2019) *Cancer Res.*, **79**(13) 2838-2838.
22. ClinicalTrials.gov. National Library of Medicine (US). (2000, Feb 29 -). Identifier NCT03269565, (2017) [<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03269565>]

Поступила в редакцию: 20. 11. 2020.
После доработки: 02. 12. 2020.
Принята к печати: 04. 12. 2020.

INTESTINAL MICROBIOME AS A PREDICTOR OF THE ANTI-PD-1 THERAPY SUCCESS: METAGENOMIC DATA ANALYSIS

*D.E. Fedorov¹, E.I. Olekhovich¹, A.V. Pavlenko¹, K.M. Klimina¹,
I.A. Pokataev², A.I. Manolov¹, D.N. Konanov¹, V.A. Veselovsky¹, E.N. Ilina¹*

¹Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine,
1A Malaya Pirogovskaya, Moscow, 119435 Russia; *e-mail: fedorov.de@gmail.com

²Oncology Clinical Hospital No. 1, 17/1 Baumanskaya str., Moscow, 105005 Russia

Anti-PD-1 immunotherapy has a large impact on cancer treatment but the rate of positive treatment outcomes is 40-45% and depends on many factors. One of the factors affecting the outcome of immunotherapy is the gut microbiota composition. This effect has been demonstrated both in model objects and in clinical patients groups. However, in order to identify clear causal relationships between microbiota and anti-PD1 immunotherapy response, it is necessary to expand the number of patients and experimental samples. This work presents an analysis of metagenomic data obtained using whole-genome sequencing of stool samples from melanoma patients (n=45) with different responses to anti-PD1 therapy. The analysis of the differential representation of microbial species has shown a difference in the composition of the microbiota between the experimental groups. Results of this study indicate existence of a strong link between the composition of the gut microbiota and the outcome of anti-PD1 therapy. Expansion of similar research may help develop additional predictive tools for the outcome of anti-PD1 cancer immunotherapy, as well as increase its effectiveness.

Key words: gut microbiota; melanoma; whole genome metagenomic sequencing; microbial communities

Funding. This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education (No. RFMEFI60419X0215).

Received: 20.11.2020, revised: 02.12.2020, accepted: 04.12.2020.