

<https://doi.org/10.29188/2222-8543-2021-14-4-10-19>

Сравнительная оценка фармакологической активности хвойного провитамина концентрата и экстракта *Serenoa repens* (*Sabal serrulatum*) на модели доброкачественной гиперплазии предстательной железы, индуцированной тестостероном у крыс

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

А.А. Кужанов, Я.Г. Муразов, А.О. Нюганен, В.А. Александров, А.С. Артемьева, А.Н. Стуков
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; д. 68, ул. Ленинградская, Санкт-Петербург, пос. Песочный, 197758, Россия

Контакт: Муразов Ярослав Геннадьевич, yaroslav84@yandex.ru

Аннотация:

Введение. Растительные средства играют значимую роль в лечении пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ).

Цель. Оценить фармакологическую активность комплекса биологически активных веществ, выделенных из древесной зелени *Picea abies* L. и *Pinus sylvestris* L. (хвойный провитаминовый концентрат, ХПК), в сравнении с экстрактом *S. repens* (ПростамолУно®, Германия) на модели ДГПЖ, индуцированной пролонгированным препаратом тестостерона (ПТТ) у крыс.

Материал и методы. Эксперимент был проведен на 82 половозрелых самцах крыс Wistar. Для индукции ДГПЖ у животных производилась хирургическая кастрация и последующее (через неделю после кастрации) курсовое введение ПТТ – п/к в дозе 0,1 мл/кг через день в течение 14 дней. ХПК (400 мг/кг) и экстракт *S. repens* (200 мг/кг) вводили крысам *per os* (с помощью зонда). Начало их введения зависело от задачи: при лечебном режиме – одновременно с первой инъекцией тестостерона, а при лечебно-профилактическом режиме – за 14 дней до кастрации животных. Длительность введения агентов в лечебном режиме составила 28 дней, в лечебно-профилактическом – 49 дней. Конечные точки исследования включали оценку простатического индекса (ПИ) и расчетных параметров на его основе, объем дорсалатерального отдела предстательной железы (ПЖ) и уровень тестостерона сыворотки крови на момент эвтаназии животных.

Результаты. Фармакологические эффекты ХПК на ДГПЖ, индуцированную тестостероном, были сопоставимы с влиянием экстракта *S. repens*. Кроме того, имелась тенденция к более выраженной активности у ХПК, вводимого в лечебно-профилактическом режиме.

Выводы. ХПК – перспективное растительное средство для комплексной терапии ДГПЖ, которое может рассматриваться как альтернатива лечению синтетическими препаратами у мужчин со слабыми или умеренными симптомами нижних мочевых путей.

Ключевые слова: доброкачественная гиперплазия предстательной железы; хвойный провитаминовый концентрат; *Serenoa repens*; доклиническое исследование.

Для цитирования: Кужанов А.А., Муразов Я.Г., Нюганен А.О., Александров В.А., Артемьева А.С., Стуков А.Н. Сравнительная оценка фармакологической активности хвойного провитамина концентрата и экстракта *Serenoa repens* (*Sabal serrulatum*) на модели доброкачественной гиперплазии предстательной железы, индуцированной тестостероном у крыс. *Экспериментальная и клиническая урология* 2021;14(4):10-19; <https://doi.org/10.29188/2222-8543-2021-14-4-10-19>

<https://doi.org/10.29188/2222-8543-2021-14-4-10-19>

Comparative evaluation of the pharmacological activity of coniferous provitamin concentrate and *Serenoa repens* (*Sabal serrulatum*) extract using a model of testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in rats

EXPERIMENTAL STUDY

A.A. Kuzhanov, Ya.G. Murazov, A.O. Nyuganen, V.A. Alexandrov, A.S. Artemyeva, A.N. Stukov
The Federal State Budgetary Institution «N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation; 68 Leningradskaya St., Pesochnyi Settlement, 197758 Saint Petersburg, Russian Federation

Contacts: Yaroslav G. Murazov, yaroslav84@yandex.ru

Summary:

Introduction. Phytotherapy continues to play an important role in the treatment of patients with benign prostatic hyperplasia (BPH).

Aim. To evaluate the pharmacological activity of a complex of biologically active compounds isolated from the foliage of *Picea abies* L. and *Pinus sylvestris* L. (coniferous provitamin concentrate, CPC) in comparison with *S. repens* extract (Prostamol®Uno, Germany) using the testosterone-induced BPH model in rats.

Material and methods. The experiment was carried out on 82 mature male Wistar rats. BPH was induced by subcutaneous administration of a prolonged testosterone preparation at a dose 0,1 ml/kg on alternate days for 14 days following surgical castration of animals. The first injection was performed one week after castration. CPC (400 mg/kg *per os* daily) and *S. repens* (200 mg/kg *per os* daily) treatment was started either together with the first injection of testosterone (treatment regimen)

or 14 days before castration (preventive therapy regimen). The duration of the administration of agents in the therapeutic regimen was 28 days, in the preventive therapy regimen – 49 days. The study endpoints included the assessment of the prostatic index (PI) and the calculated parameters based on it, the volume of the dorsolateral prostate and the serum testosterone level at the time of euthanasia of the animals.

Results. The pharmacological effects of CPC on testosterone-induced BPH were comparable to *S. repens* extract. Furthermore, there was a trend towards more pronounced pharmacological activity of CPC, administered in a preventive therapy regimen.

Conclusion. CPC is a promising herbal agent for the complex therapy of BPH and a possible alternative to a synthetic drug treatment in men with mild to moderate lower urinary tract symptoms.

Key words: benign prostatic hyperplasia; coniferous provitamin concentrate; *Serenoa repens*; preclinical trials.

For citation: Kuzhanov A.A., Murazov Ya.G., Nyuganen A.O., Alexandrov V.A., Artemyeva A.S., Stukov A.N. Comparative evaluation of the pharmacological activity of coniferous provitamin concentrate and *Serenoa repens* (*Sabal serrulatum*) extract using a model of testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in rats. *Experimental and Clinical Urology*, 2021;14(4):10-19; <https://doi.org/10.29188/2222-8543-2021-14-4-10-19>

ВВЕДЕНИЕ

Доброкачественная гиперплазия предстательной железы (ДГПЖ) является одним из наиболее частых заболеваний предстательной железы (ПЖ) у мужчин пожилого возраста и наиболее частой причиной симптомов нижних мочевыводящих путей (СНМП). Распространенность гистологически подтвержденной ДГПЖ по данным исследований аутопсийного материала существенно увеличивается с возрастом, достигая 90% у мужчин в возрасте 81–90 лет [1]. ДГПЖ и СНМП оказывают значительное влияние на здоровье пожилых мужчин и на расходы здравоохранения в целом. По мере старения населения мира заболеваемость и распространенность ДГПЖ и СНМП быстро увеличиваются [2]. В статье О.И. Аполихина с соавт. сообщается, что, если экстраполировать мировые данные на мужское население России, можно рассчитать, что более 13 млн. мужчин старше 18 лет могут иметь ту или иную степень ДГПЖ, которая часто протекает бессимптомно [3].

В настоящее время основными целями лечения ДГПЖ являются облегчение СНМП, улучшение качества жизни, подавление прогрессирования заболевания и снижение частоты осложнений. Кроме того, в ближайшее время предстоит ответить на вопрос, может ли своевременная диагностика и лечение ДГПЖ повлиять на риск развития рака предстательной железы (РПЖ)? Варианты лечения ДГПЖ зависят от выраженности симптомов заболевания и включают выжидательную тактику, медикаментозное и хирургическое лечение [4, 5]. Лекарственная терапия ДГПЖ направлена на устранение двух основных компонентов заболевания: динамического (тонус гладкой мускулатуры предстательной железы (ПЖ) и шейки мочевого пузыря) и статического (увеличение объема ПЖ, вызывающее механическую обструкцию). Основные группы лекарственных препаратов для лечения ДГПЖ хорошо известны: α 1-адреноблокаторы, ингибиторы 5 α -редуктазы, ингибиторы фосфодиэстеразы 5-го типа, м-холиноблокаторы, агонисты β 3-адренорецепторов [6, 7]. Многочисленные крупномасштабные клинические исследования также показали преимущества комбинации α 1-адреноблокаторов и ингибиторов 5 α -редуктазы для лечения СНМП, вызванных ДГПЖ [8]. Следует отметить, что современная терапия ДГПЖ нередко сопровождается раз-

витием нежелательных явлений, особенно у мужчин старшей возрастной группы [9].

В лечении ДГПЖ и СНМП применяются также методы комплементарной и альтернативной медицины. К ним можно отнести средства растительного происхождения. По данным A. Kehn и соавт. в США 40% мужчин, выбирающих безоперационное лечение ДГПЖ, используют добавки, содержащие растительные компоненты, как самостоятельный метод лечения или в комбинации с лекарственными препаратами выбора [10].

Клинические руководства профессиональных сообществ как правило не содержат рекомендаций по применению растительных средств при СНМП. Однако многие пациенты часто остаются недовольными синтетическими препаратами первой линии и предпочитают растительные средства из-за их низкой токсичности [11]. Фитотерапия может рассматриваться как дополнительный метод лечения ДГПЖ у мужчин со слабыми или умеренными СНМП. В качестве лекарственного растительного сырья наиболее часто применяются *Serenoa repens*, *Hypoxis rooperi*, *Secale cereale*, *Pygeum africanum*, *Urtica dioica*, *Curcubita pepo*. В недавно опубликованном систематическом обзоре и мета-анализе T. Cai и соавт. пришли к заключению, что *S. repens* при применении в течение 6 мес. и более оказывает такой же эффект при лечении ДГПЖ как и тамсулозин, если оценивать по шкале IPSS (International Prostate Symptom Score), качеству жизни и остаточному объему мочи [12]. Однако по данным Кохрейновского систематического обзора, выпущенного еще в 2012 г., было установлено, что *S. repens* даже в двух- и трехкратных дозах не влияет на никтурию, не улучшает показатели потока мочи, симптоматику или размер ПЖ у мужчин с ДГПЖ и СНМП [13]. Следует отметить, что *S. repens* (*Sabal serrulatum*) произрастает в основном в США, а на отечественном фармацевтическом рынке данная группа препаратов представлена средствами, производимыми в основном за рубежом (Франция, Германия), что, безусловно, отражается на их высокой цене. В этой связи остается актуальной разработка отечественных эффективных растительных средств для лечения ДГПЖ.

Целью настоящей работы является сравнительная доклиническая оценка фармакологической активности комплекса биологически активных веществ, выделенных из древесной зелени хвойных пород (хвойный

провитаминный концентрат, ХПК) с экстрактом *S. repens* (ПростамолУно®, Каталент Германия Эбербах ГмБХ, Германия) на модели ДГПЖ у половозрелых самцов крыс Wistar, индуцированной смесью эфиров тестостерона (ППТ). Ранее нами впервые на модели ДГПЖ, индуцированной сульпиридом у самцов крыс, было проведено сравнительное изучение простатотропных эффектов ХПК и известного фитопрепарата для лечения ДГПЖ (*Serenoa repens fructuum extract*, Простамол®Уно) [14]. На основании полученных данных целесообразно продолжить изучение ХПК в качестве перспективного лечебного и лечебно-профилактического средства фитотерапии ДГПЖ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Их содержание и использование. Исследование проведено на аутбредных половозрелых крысах самцах Wistar, полученных из ФГУП Питомник лабораторных животных «Рапполово» (Россия, Ленинградская область). Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом. Уход и все манипуляции с животными выполнялись в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123) и Директивой Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС о защите животных, использующихся для научных целей. Животные содержались в конвенциональном виварии в стандартных условиях: температура воздуха 21–24°C, относительная влажность 52–60%, 12-часовой цикл светлого/темного времени суток. Крысы получали полнорационный брикетированный комбикорм для лабораторных грызунов (рецептура ПК-120, ООО «Лабораторкорм», Россия) и водопроводную питьевую воду *ad libitum*.

Препараты и реактивы. В исследовании использовали ХПК, производства ООО НПО «Тихвинская ЭКО Фабрика (г. Тихвин, Россия), поставляемый в виде густого маслянистого продукта ярко-оранжевого цвета со специфическим хвойным запахом. ХПК представляет собой неомыляемые вещества древесной зелени из *Picea abies L.* и *Pinus sylvestris L.*, содержит фитол, фитостерины, полипренолы, каротиноиды, витамин Е. Экстракт *S. repens* извлекали из капсул лекарственного препарата Простамол® Уно. В одной капсуле содержится спиртового экстракта плодов пальмы ползучей (*Serenoa repens fructuum extract*) 320 мг. Перед введением крысам нужную навеску ХПК и экстракта *S. repens* растворяли в носителе (растительное масло). ППТ Омнадрен 250® представляет собой стерильный масляный раствор, в 1 мл которого содержится: тестостерона пропионата 30,0 мг, тестостерона фенилпропионата 60,0 мг, тестостерона изокапроната 60,0 мг, тестостерона капроната 100,0 мг, бензилового спирта 50,0 мг, арахисового масла для инъекций до 1,0 мл. Производитель: «Jelfa» (Польша).

Индукция ДГПЖ. Крысам выполнялась хирургическая кастрация под изофлурановым наркозом. Введение Омнадрена 250® начинали через неделю после операции. Препарат вводили подкожно через день в дозе 0,1 мл/кг. Исходный раствор перед введением разводили стерильным персиковым маслом до нужной концентрации. Всего выполнялось 7 инъекций.

Дизайн исследования. Исследование состояло из двух серий экспериментов. В первой серии были изучены эффекты ХПК и экстракта *S. repens* на ДГПЖ, вводимых в лечебном режиме (начало введения вместе с первой инъекцией препарата тестостерона). Длительность эксперимента составила 35 дней, длительность введения агентов – 28 дней. Были сформированы следующие группы:

I. Интактный контроль (n=10) – животные получали носитель (растительное масло) по 0,5 мл на крысу *per os* ежедневно до конца эксперимента.

II. Омнадрен-контроль (n=10) – индукция ДГПЖ + носитель (*per os* 0,5 мл на крысу ежедневно).

III. Омнадрен + ХПК (n=10) – индукция ДГПЖ + ХПК *per os* 400 мг/кг ежедневно.

IV. Омнадрен + *S. repens* (n=11) – индукция ДГПЖ + экстракт *S. repens per os* 200 мг/кг ежедневно.

Во второй серии были изучены эффекты ХПК и экстракта *S. repens* на ДГПЖ, вводимых в лечебно-профилактическом режиме (начало введения за две недели до кастрации). Длительность эксперимента составила 49 дней. Длительность введения агентов – 49 дней. Были сформированы следующие группы:

I. Интактный контроль (n=10) – животные получали носитель (растительное масло) по 0,5 мл на крысу *per os* ежедневно до конца эксперимента.

II. ДГПЖ-контроль (n=10) – индукция ДГПЖ + носитель (*per os* 0,5 мл на крысу ежедневно).

III. ДГПЖ-ХПК (n=11) – индукция ДГПЖ + ХПК *per os* 400 мг/кг ежедневно.

IV. ДГПЖ-*S. repens* (n=10) – индукция ДГПЖ + экстракт *S. repens per os* 200 мг/кг ежедневно.

Оцениваемые параметры. Плановую эвтаназию выполняли через день после последнего введения тестируемого агента и носителя. Перед эвтаназией у животных выполняли забор крови методом кардиопункции. Уровень тестостерона в образцах сыворотки определяли с использованием коммерческого набора Testosterone ELISA (582,701; Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA) в соответствии с протоколом производителя. Крысы подвергались эвтаназии (камера с CO₂+цервикальная дислокация). На аутопсии ПЖ у крыс выделялась в виде комплекса дорсолатерального отдела (ДЛП, dorsolateral prostate) и двух вентральных долей ПЖ (ВП, ventral prostate). Отдельно забирались два семенных пузырька с передними долями железы, после чего передние доли отделялись от семенных пузырьков. После стандартной гистологической обработки готовились се-

рийно-ступенчатые срезы отделов ПЖ (по 5 мкм каждый) с шагом микротома 500 мкм. Минимум выполнялось четыре среза каждой доли ПЖ. Полученные парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной программе, после чего анализировались патологом вслепую.

Во время вскрытия животных все отделы ПЖ каждой крысы взвешивались. Для всей ПЖ и ее отделов (дорсолатеральный, две вентральные и две передние доли) рассчитывали простатический индекс (ПИ) по формуле:

$$\text{ПИ} = \frac{\text{МП}}{\text{МТ}} \times 100, \text{ где}$$

ПИ – простатический индекс, мг на 100 г массы тела животного

МП – масса ПЖ, мг

МТ – масса тела животного, г.

Увеличение ПИ (в %) рассчитывали по формуле:

$$\frac{\text{ПИ}_{\text{опыт}}}{\text{ПИ}_{\text{контроль}}} \times 100\%$$

Торможение увеличения ПИ (в %) рассчитывали по формуле:

$$100 - \frac{\text{ПИ}_{\text{опыт}} - \text{ПИ}_{\text{интактный контроль}}}{\text{ПИ}_{\text{контроль}} - \text{ПИ}_{\text{интактный контроль}}} \times 100$$

Степень восстановления ПИ (в %) определяли по формуле:

A – B, где

A – увеличение ПИ в % в контрольной группе

B – увеличение ПИ в % в опытной группе

Объем дорсолатерального отдела ПЖ рассчитывали

по формуле:

$$V = \frac{a \cdot b^2}{2}, \text{ где}$$

V – объем дорсолатерального отдела, мм³

a – наибольшее линейное измерение дорсолатерального отдела, мм

b – наименьшее перпендикулярное к a измерение, мм

Статистическая обработка результатов исследования

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью пакета GraphPad Prism версии 8.0 и jamovi версии 1.6.12. Количественные данные представлены в виде среднего (mean) и ошибки среднего (standard error of the mean, SEM). Для сравнения количественных данных двух групп применяли t-критерий Стьюдента для независимых выборок. Однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с post-hoc тестом Тьюки (Tukey's test) или тестом Даннета (Dunnett's test) использовался для множественных сравнений количественных данных. В случае множественных сравнений приведено скорректированное значение уровня значимости (adjusted P, Padj). Все критерии были двусторонними. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ


В I и II серии все животные дожили до конца эксперимента. Значимого различия в динамике массы тела крыс в контрольных группах, и группах, получавших ХПК и экстракт *S. repens* в различных режимах, 

Таблица 1. Сравнение основных параметров изменений предстательной железы после индукции ДГПЖ и применения ХПК и экстракта *S. repens* в различных режимах

Table 1. Comparison of the main parameters of changes in the prostate after BPH induction and the administration of coniferous provitamin concentrate (CPC) and *S. repens* extract in different regimens

Группа Group	Масса тела, г Body weight, g	ПИ, мг/100 г массы тела* Prostatic index (PI), mg/100 g body weight*	Увеличение ПИ, % Increase in PI, %	Торможение уве- личения ПИ, % Inhibition of increase in PI, %	Степень восстановления ПИ, % Recovery rate, %
Лечебный режим Therapeutic regimen					
Интактный контроль (n=10) Intact control (n=10)	316,3±10,9	332,7±22,0	-	-	-
Омнадрен-контроль (n=10) Omnadren-control (n=10)	312,2±6,5	589,5±24,5	100	-	-
Омнадрен-ХПК (n=10) Omnadren-CPC (N=10)	305,5±10,8	460,0±15,1	78,0	50,4	22,0
Омнадрен- <i>S. repens</i> (n=11) Omnadren- <i>S. repens</i> (n=11)	293,9±6,6	501,0±24,9	85,0	34,5	15,0
Лечебно-профилактический режим Preventive therapy regimen					
Интактный контроль (n=10) Intact control (n=10)	391,4±13,9	269,0±31,0	-	-	-
ДГПЖ-контроль (n=10) BPH-control (n=10)	371,2±11,5	686,2±28,5	100	-	-
ДГПЖ-ХПК (n=11) BPH-CPC (n=11)	357,4±8,9	450,4±19,6	65,6	56,5	34,4
ДГПЖ- <i>S. repens</i> (n=10) BPH- <i>S. repens</i> (n=10)	349,3±12,8	535,3± 27,5	78,0	36,2	22,0

Примечание: *множественное сравнение ПИ проводилось для четырех групп, получивших ХПК и экстракт *S. repens* в лечебном и лечебно-профилактическом режиме; one-way ANOVA, $p = 0,0414$; post-hoc тест Тьюки при попарном сравнении групп статистически значимых различий не выявил

Note: * multiple comparison of PI was performed for the four groups receiving CPC and *S. repens* administered in a therapeutic and preventive therapy regimen; one-way ANOVA, $p = 0.0414$; Tukey's post-hoc test did not reveal any statistically significant differences in pairwise comparison of groups

не было. В таблице 1 представлены сводные данные о влиянии тестируемых агентов на ПИ и расчетные параметры на его основе. Статистически значимых различий при множественном сравнении ПИ между группами, получавшими ХПК и экстракт *S. gerens* в лечебном или лечебно-профилактическом режиме, достигнуть не удалось, по-видимому, из-за малого объема выборки.

Результаты сравнения величин ПИ для каждого отдела ПЖ животных, подвергнутых экспериментальным воздействиям, отображены на рисунке 1. ХПК и

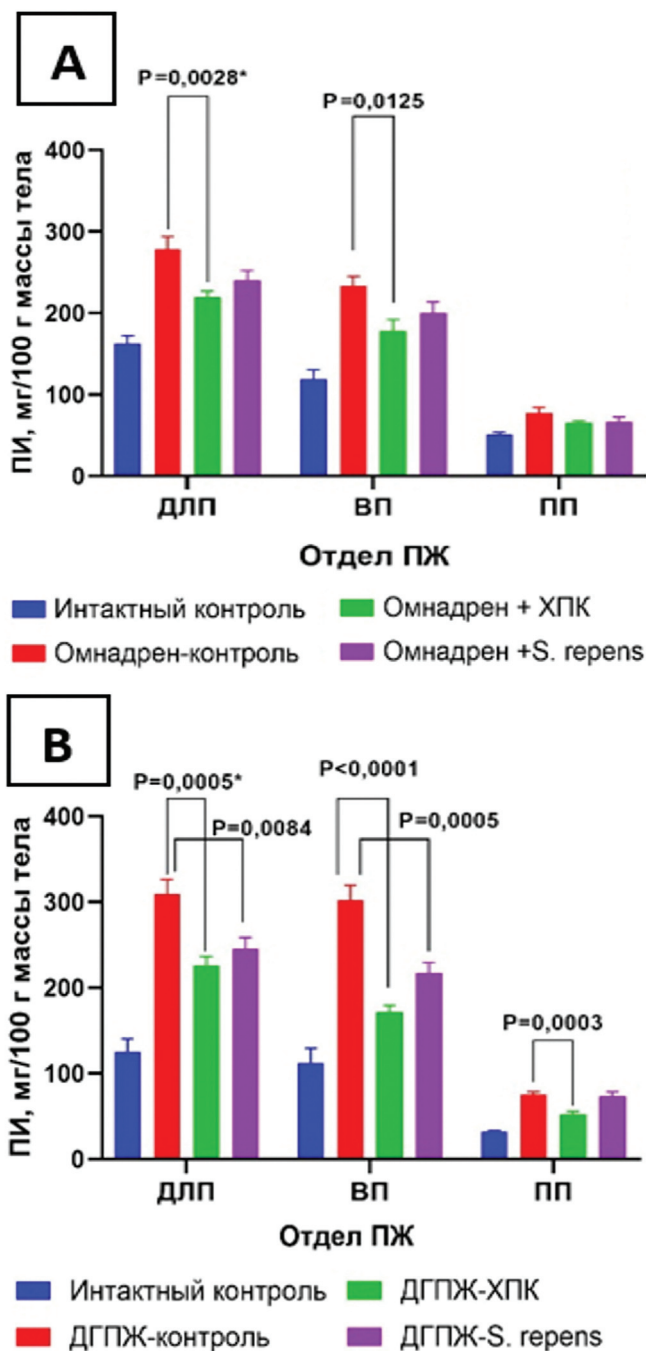


Рис. 1. ПИ всех отделов ПЖ у крыс с ДГПЖ, индуцированной Омнадреном250®. Парные сравнения проводились с группой «Омнадрен-контроль». *Приведены значения скорректированного P_{adj} для post-hoc теста Даннета при условии one-way ANOVA $p < 0,05$. А – лечебный режим введения. В – лечебно-профилактический режим введения.

Fig. 1. PI of all prostate lobes in rats with Omnadren250®-induced BPH. Pairwise comparisons were made with the «Omnadren-control» group.

* The adjusted p-values (P_{adj}) for Dunnett's post-hoc test where one-way ANOVA $p < 0,05$. A – treatment regimen. B – preventive therapy regimen

экстракт *S. gerens* проявили более выраженный эффект при введении в лечебно-профилактическом режиме (рис. 1В). Обращает на себя внимание отсутствие статистически значимых различий величины ПИ между контрольной группой и группой, получавшей экстракт *S. gerens* в лечебном режиме (рис. 1А).

Результаты оценки влияния тестируемых агентов на объем ДЛП приведены на рисунке 2.

Из рисунка 2 видно, что различия в объеме ДЛП у животных, получавших ХПК и экстракт *S. gerens* в лечебном режиме, в сравнении с лечебно-профилактическим режимом введения были статистически значимыми. ХПК, вводимый в лечебном и лечебно-профилактическом режиме, оказал более выраженное действие на объем ДЛП чем экстракт *S. gerens*, вводимый в лечебно-профилактическом режиме. Следует отметить, что выявленные различия в объеме ДЛП могут быть связаны и с тем, что животные, получавшие ХПК и экстракт *S. gerens* в лечебно-профилактическом режиме на момент ввода в эксперимент, были старше и имели большую массу тела в сравнении с лечебным режимом ($367,5 \pm 6,2$ г. против $303,6 \pm 4,8$, t-критерий $p < 0,0001$) так как эксперименты по лечебному и ле-

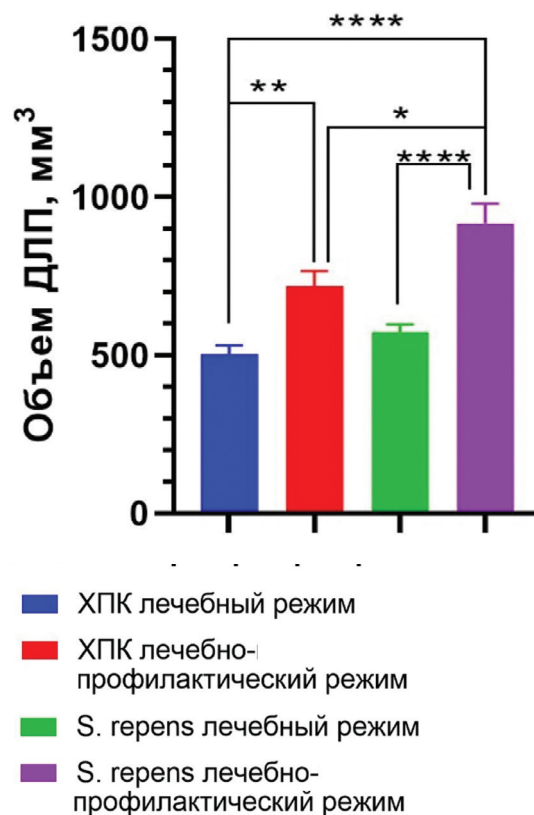


Рис. 2. Влияние ХПК и экстракта *S. gerens*, вводимых в лечебном и лечебно-профилактическом режиме, на объем дорсолатерального отдела ПЖ у крыс с ДГПЖ, индуцированной Омнадреном250®. Различия между группами статистически значимы, one-way ANOVA, $p < 0,0001$; post-hoc тест Тьюки: **** $p < 0,0001$; ** $p = 0,0061$; * $p = 0,0115$

Fig. 2. Influence of CPC and *S. gerens* extract administered in a therapeutic and preventive therapy regimen on the dorsolateral prostate volume in rats with Omnadren250®-induced BPH. Differences between groups are statistically significant, one-way ANOVA, $p < 0,0001$; post-hoc Tukey test: **** $p < 0,0001$; ** $p = 0,0061$; * $p = 0,0115$

чебно-профилактическому введению тестируемых агентов проводили не параллельно.

На рисунке 3 показан уровень тестостерона сыворотки животных на момент окончания эксперимента.

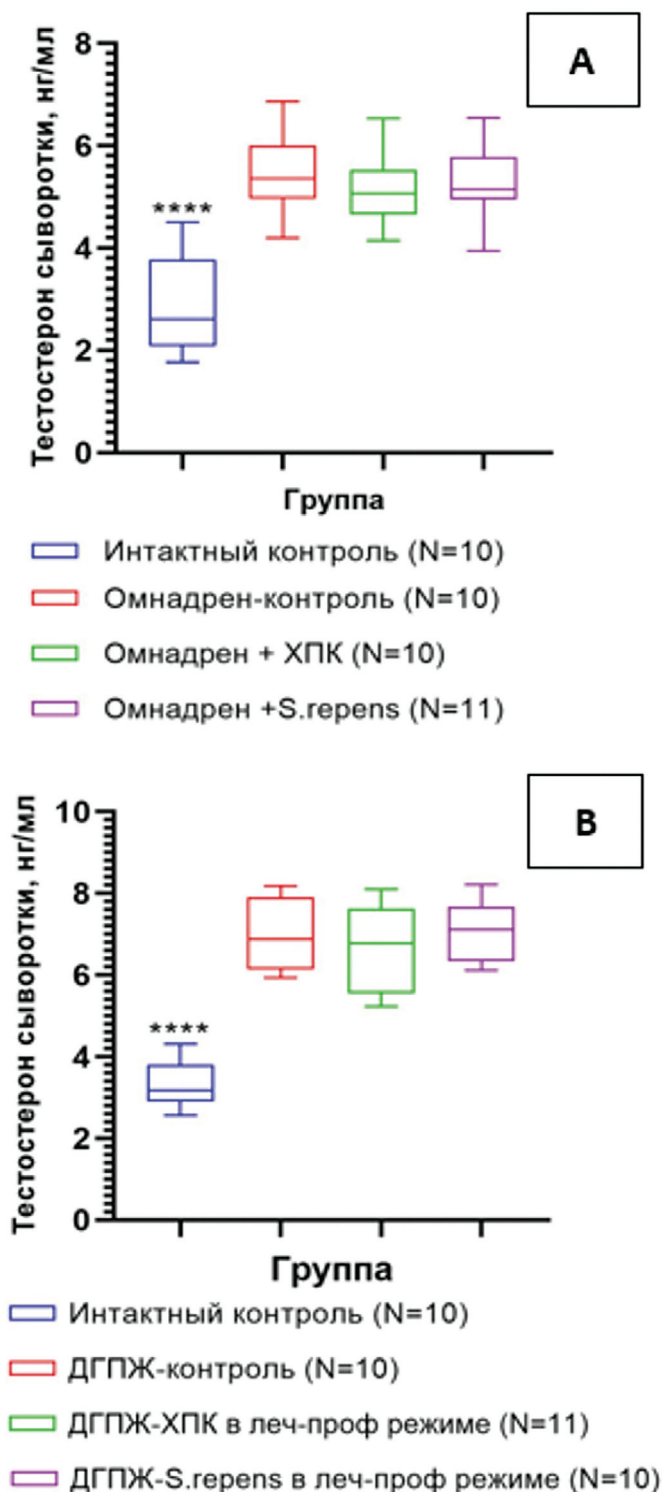


Рис. 3. Уровень тестостерона сыворотки в конце эксперимента у животных, получавших ХПК и *S. repens* в лечебном и лечебно-профилактическом режиме. Различия между группами статистически значимы, one-way ANOVA, $p < 0,0001$; ****различия с группой «Омнадрен-контроль» статистически значимы, post-hoc тест Даннета, $p < 0,0001$. А – лечебный режим введения. В – лечебно-профилактический режим введения

Fig. 3. Serum testosterone level at the end of the experiment in animals treated with CPC and *S. repens* in a therapeutic and preventive therapy regimen. Differences between groups are statistically significant, one-way ANOVA, $p < 0,0001$; **** differences with the «Omnadren control» group are statistically significant, Dunnett's post-hoc test, $p < 0,0001$. A - treatment regimen. B - preventive therapy regimen

Многokратное подкожное введение ППТ значительно повышало его концентрацию в сыворотке по сравнению с интактными животными. При этом ни ХПК, ни экстракт *S. repens*, вводимые в двух режимах, не оказывали значимого влияния на этот показатель.

На рисунке 4 показаны гистологические изменения ткани ПЖ животных. На фоне введения ППТ у крыс наблюдалась выраженная гиперплазия простатического эпителия по сравнению с интактным контролем. В группах животных, получавших ХПК и экстракт *S. repens*, выраженность гиперплазии была менее выражена.

ОБСУЖДЕНИЕ

В некоторых странах ЕС и США растительные средства играют значимую роль в лечении пациентов с СНМП легкой и средней степени тяжести. В соответствии с Рекомендациями Европейской ассоциации урологов (EAU) гексановый экстракт *S. repens*, может быть предложен мужчинам с СНМП, которые хотят избежать любых потенциальных побочных эффектов, особенно связанных с сексуальной функцией (степень рекомендации – низкая). При этом необходимо сообщить пациенту, что степень эффективности этого лечения может быть невысокой (степень рекомендации – высокая) [6]. Результаты клинических исследований свидетельствуют о том, что экстракты растений могут обеспечивать облегчение симптомов, сравнимое с эффектом синтетических лекарственных средств. Таким образом, для пациентов без риска прогрессирования фитопрепараты могут быть даже полезны, потому что они хорошо переносятся и не имеют противопоказаний или значимых лекарственных взаимодействий [11].

Экстракты из плодов *S. repens* (*Sabal serrulatum*) достаточно давно используются в урологической практике для лечения ДГПЖ и СНМП. Поскольку большинство безрецептурных препаратов, содержащих экстракты *S. repens*, различаются по методу экстракции, качеству, составу и дозировке не удивительно, что использование таких не стандартизированных продуктов привело к неоднозначным результатам [15]. Расхождения в полученных результатах клинического изучения экстракта *S. repens* могли быть связаны с различием в дизайнах протоколов исследований, а также из-за разнородной популяции включаемых пациентов (возраст, степень выраженности СНМП и др).

Андроген-индуцированные модели ДГПЖ на животных с использованием различных режимов введения гормональных препаратов хорошо отработаны на крысах, мышах и собаках. Крысы являются наиболее распространенным видом для моделирования ДГПЖ. Обычно индукция ДГПЖ у крыс проводится путем подкожной инъекции препаратов тестостерона

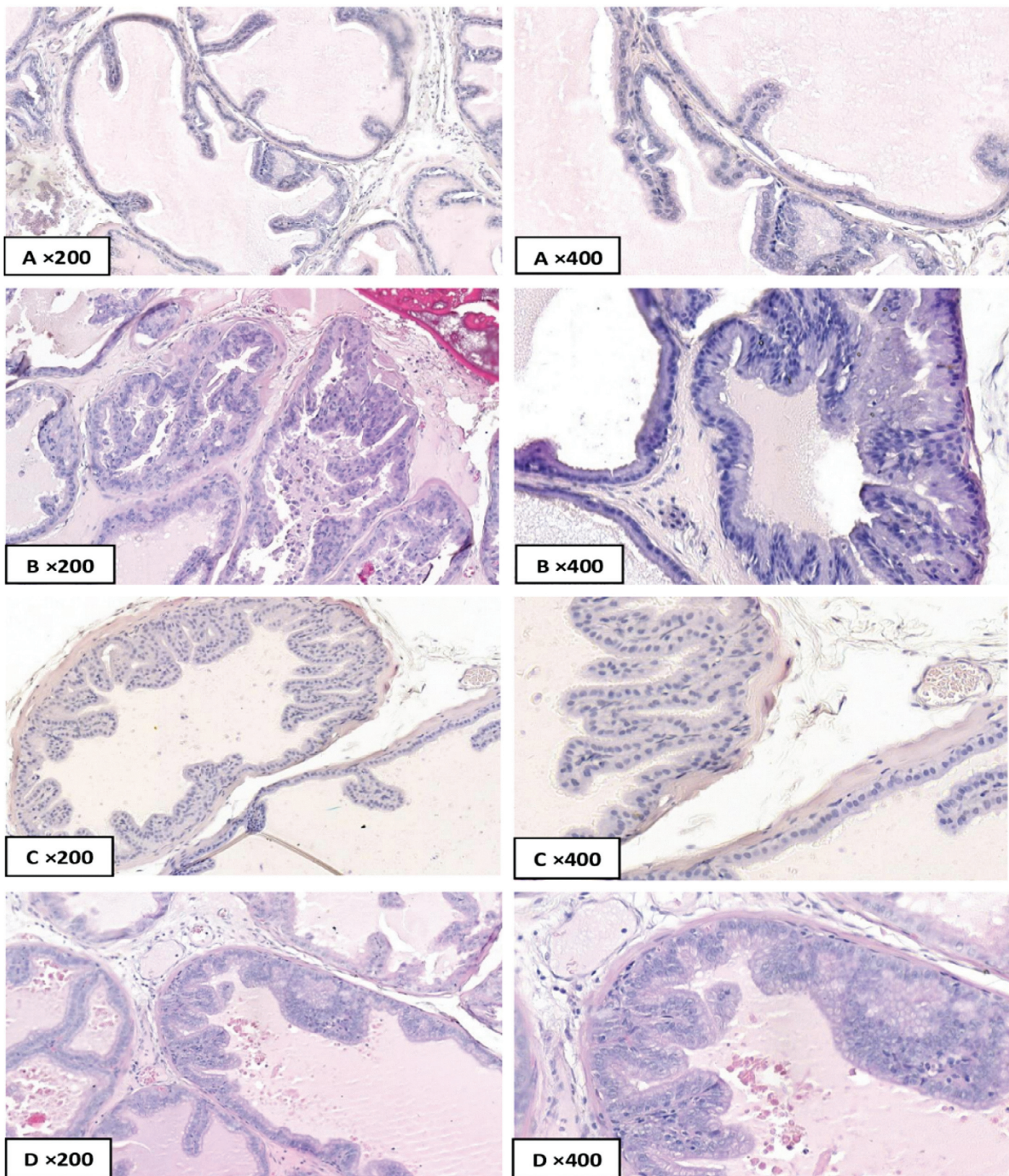


Рис. 4. Влияние ХПК и экстракта *S. repens* на гистологические изменения ткани ПЖ у крыс с ДГПЖ, индуцированной омнадреном250®, гематоксилин/эозин. А – интактный контроль. Железы ацинарного строения, выстланные однослойным призматическим эпителием с базально ориентированным ядром и нормальным ядерно-цитоплазматическим соотношением. В – ДГПЖ, индуцированная омнадреном250®. Железы увеличены в размере, сильно ветвятся. Наблюдается выраженное уменьшение площади просвета акцинов и наличие многочисленных складок в их просвете. Количество эпителиальных клеток увеличено, выражен их полиморфизм. С – ДГПЖ на фоне лечения ХПК. Железы увеличены в размере, расширен их просвет. Ядерный полиморфизм выражен умеренно. D – ДГПЖ на фоне лечения экстрактом *S. repens*. Железы увеличены в размере, количество клеток увеличено не значительно, полиморфизм умеренно выражен

Fig. 4. Effect of CPC and *S. repens* extract on histological changes of the prostate tissues in rats with BPH induced by omnadren250®, haematoxylin and eosin staining. A – intact control. Glands of acinar structure, lined with a single-layer prismatic epithelium. Cells with the basal position of nuclei and a normal nucleo-cytoplasmic ratio. B – BPH induced by omnadren250®. The enlarged glands are highly branched with partially obliterated gland lumen. There is a pronounced decrease in the area of the lumen of the prostatic acini. Furthermore, presence of numerous folds into prostatic lumen was noted. The number of epithelial cells with exceptional polymorphism is increased. C – BPH treated with CPC. The glands are enlarged, their lumen is widened. D – BPH treated with *S. repens* extract. The glands are enlarged, but the number of cells is not significantly increased, and polymorphism is moderately expressed

после кастрации или без кастрации животных [16]. Одним из преимуществ кастрации является то, что можно исключить эффекты «внутреннего» тестостерона [17]. При гистологическом анализе серийно-ступенчатых срезов ПЖ у крыс с тестостерон-индуцированной ДГПЖ нами были выявлены следующие морфологические изменения: гиперпролиферация железистого эпителия и стромы, очаговые интралюминальные папиллярные складки и наполненные простатическим секретом расширенные протоки. Такие изменения характерны и для человека. Модели ДГПЖ, индуцированные половыми гормонами, представляют собой простой, не затратный по времени и недорогой способ изучения данной патологии и средств терапии [16].

В нашем исследовании фармакологическая активность ХПК была сопоставима с экстрактом *S. repens*. Отсутствие значимого влияния исследуемых агентов на уровень тестостерона сыворотки у крыс в двух экспериментах свидетельствует о том, что эффекты *S. repens* и ХПК в отношении ДГПЖ реализуются по-видимому не только через андрогенную ось регуляции. Следует учесть, что уровень тестостерона сыворотки у интактных самцов крыс Wistar существенно различается в течение дня и между животными. Это затрудняет оценку терапевтической активности тестируемых средств и дифференциацию от физиологических колебаний в норме [18]. Кроме того, неоднократно было показано, что уровень сывороточных андрогенов плохо коррелирует с их интрапростатическим уровнем как при ДГПЖ, так и при РПЖ [19].

Есть основания полагать, что фармакологическая активность ХПК обусловлена эффектами входящих в его состав биологически активных веществ. В частности, фитол (дитерпен, состоящий из длинноцепочечных ненасыщенных ациклических спиртов) и некоторые из его производных, включая фитановую кислоту. Эти вещества обладают широким спектром биологических эффектов: анксиолитическим, метаболит-модулирующим, цитотоксическим, антиоксидантным, стимулирующим аутофагию и апоптоз, антиноцицептивным, противовоспалительным, иммуномодулирующим и антимикробным [20]. Фитол, поступающий с пищей, и его полиметилированные метаболиты жирных кислот с разветвленной цепью (фитановая и пристановая кислоты), привлекают внимание исследователей по химиопрофилактике рака (особенно РПЖ) из-за их способности служить естественными лигандами для рецепторов, активируемых пероксисомными пролифераторами PPAR- α , PPAR- γ и ретиноидного рецептора X (RXR). Эти рецепторы являются факторами транскрипции, обеспечивающими нисходящую регуляцию метаболизма, клеточной пролиферации и апоптоза. Кроме того, они повышают

экспрессию α -метилацил-КоА рацемазы (AMACR), особенно в ткани опухолей ПЖ [21]. Фитостерины (стероиды растительного происхождения) обладают множеством фармакологических свойств. Они снижают общий уровень холестерина и холестерин липопротеинов низкой плотности. Фитостерины регулируют воспаление; обладают антиоксидантным, противовоспалительным, иммуномодулирующим, антибактериальным и противогрибковым действием. Они стимулируют заживление ран и ингибируют агрегацию тромбоцитов [22]. По данным Кохрейновского обзора β -ситостерин улучшает симптомы мочеиспускания и скоростные показатели потока мочи [23]. Каротиноиды – это окрашенные жирорастворимые пигменты. Существует более 600 каротиноидов, которые делятся на каротины, ксантофиллы и ликопин. Описан целый ряд биологических эффектов каротиноидов: антиоксидантная активность, активация иммунитета, антиканцерогенный и ингибирование мутагенеза. Наибольшие надежды в плане лечения и профилактики заболеваний ПЖ возлагались на ликопин. Однако сегодня невозможно однозначно поддерживать использование ликопина для профилактики или лечения ДГПЖ или РПЖ из-за ограниченного числа рандомизированных контролируемых исследований и различного качества этих исследований [24]. Полипrenoлы – природные длинноцепочечные изопреноидные спирты, являются предшественниками долихолов. Фосфорилированные долихолы выступают в роли липидного переносчика сахаров на ранних стадиях N-гликозилирования белков. Полипренол-содержащие соединения обеспечивают стабильность клеточных мембран. Высокие количества долихолов обнаружены в яйцках и гипофизе человека [25]. Ранее на модели канцерогенеза ПЖ, индуцированного N-метил-N-нитрозомочевинной и Омнадреном250® у самцов крыс, нами были продемонстрированы антиканцерогенные эффекты длительного перорального применения полипренолов в виде снижения частоты и множественности простатической интраэпителиальной неоплазии (ПИИ) и РПЖ [26]. Витамин E содержится в ХПК в минимальных количествах. Это важно с точки зрения возможного повышения риска РПЖ на фоне длительного приема α -токоферола ацетата. К сожалению, обескураживающими были результаты SELECT (the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial) – самого крупного рандомизированного клинического исследования по химиопрофилактике РПЖ из когда-либо проведенных. Оно включало более 35000 мужчин. При медиане периода наблюдения 7 лет в группе мужчин, получавших α -токоферола ацетат (400 мг/сут), было установлено достоверное повышение риска развития РПЖ на 17% (HR=1.17; 99% CI 1,004-1,36, p=0,008) [27]. ■

ВЫВОДЫ

В нашем исследовании фармакологические эффекты ХПК в отношении тестостерон-индуцированной ДГПЖ были сопоставимы с экстрактом *S. repens*. Кроме того, имелась тенденция к более выраженной фармакологической активности у ХПК, вводимого в лечебно-профилактическом режиме. Полученные результаты

вместе с ранее полученными экспериментальными данными могут служить обоснованием для дальнейшего клинического изучения ХПК в качестве лечебного растительного средства в комплексной терапии ДГПЖ или лечебно-профилактического средства в качестве альтернативы при выжидательной тактике у мужчин со слабыми или умеренными СНМП. ■

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Launer BM, McVary KT, Ricke WA, Lloyd GL. The rising worldwide impact of benign prostatic hyperplasia. *BJU Int* 2021;127(6):722-728. <https://doi.org/10.1111/bju.15286>.
2. Patel ND, Parsons JK. Epidemiology and etiology of benign prostatic hyperplasia and bladder outlet obstruction. *Indian J Urol* 2014;30(2):170-6. <https://doi.org/10.4103/0970-1591.126900>.
3. Аполихин О.И., Сивков А.В., Золотухин О.В., Шадеркин И.А., Войтко Д.А., Просянников М.Ю. и др. Распространенность симптомов нарушения функции нижних мочевых путей у мужчин по результатам популяционного исследования. *Экспериментальная и клиническая урология* 2018(2):4-12. [Apolikhin O.I., Sivkov A.V., Zolotuhin O.V., Shaderkin I.A., Voytko D.A., Prosyannikov M.Yu., et al. Prevalence of lower urinary tract symptoms in men according to the results of population research. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya urologiya = Experimental and Clinical Urology* 2018(2):4-12. (In Russian)]. <https://doi.org/10.29188/2222-8543-2018-9-1-4-12>.
4. Chughtai B, Forde JC, Thomas DD, Laor L, Hossack T, Woo HH, Te AE, Kaplan SA. Benign prostatic hyperplasia. *Nat Rev Dis Primers* 2016(2):16031. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.31>.
5. Yu ZJ, Yan HL, Xu FH, Chao HC, Deng LH, Xu XD, et al. Efficacy and side effects of drugs commonly used for the treatment of lower urinary tract symptoms associated with benign prostatic hyperplasia. *Front Pharmacol* 2020(11):658. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00658>.
6. EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Milan 2021. URL: <https://uroweb.org/guidelines/how-to-cite-the-eau-guidelines/>
7. Lerner LB, McVary KT, Barry MJ, Bixler BR, Dahm P, Das AK, et al. Management of lower urinary tract symptoms attributed to benign prostatic hyperplasia: AUA Guideline part I, initial work-up and medical management. *J Urol* 2021;206(4):806-817.
8. Jiwrajka M, Yaxley W, Ranasinghe S, Perera M, Roberts MJ, Yaxley J. Drugs for benign prostatic hypertrophy. *Aust Prescr* 2018;41(5):150-153. <https://doi.org/10.18773/austprescr.2018.045>.
9. Bortnick E, Brown C, Simma-Chiang V, Kaplan SA. Modern best practice in the management of benign prostatic hyperplasia in the elderly. *Ther Adv Urol* 2020(12):1756287220929486. <https://doi.org/10.1177/1756287220929486>.
10. Keehn A, Lowe FC. Complementary and alternative medications for benign prostatic hyperplasia. *Can J Urol* 2015;22 Suppl 1:18-23.
11. Fornara P, Madersbacher S, Vahlensieck W, Bracher F, Romics I, Kil P. Phytotherapy adds to the therapeutic armamentarium for the treatment of mild-to-moderate lower urinary tract symptoms in men. *Urol Int* 2020;104(5-6):333-342. <https://doi.org/10.1159/000504611>.
12. Cai T, Cui Y, Yu S, Li Q, Zhou Z, Gao Z. Comparison of Serenoa repens with tamsulosin in the treatment of benign prostatic hyperplasia: a systematic review and meta-analysis. *Am J Mens Health* 2020;14(2):1557988320905407. <https://doi.org/10.1177/1557988320905407>.
13. Tacklind J, Macdonald R, Rutks I, Stanke JU, Wilt TJ. Serenoa repens for benign prostatic hyperplasia. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;12(12):CD001423. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001423.pub3>.
14. Беспалов В.Г., Муразов Я.Г., Кужанов А.А., Семенов А.Л. Сравнительное изучение простатотропных эффектов хвойного провитаминного концентрата и экстракта *Serenoa repens* на модели доброкачественной гиперплазии предстательной железы у крыс. *Экспериментальная и клиническая урология* 2013(2):0-34. [Bespalov V.G., Murazov Ya.G., Kuzhanov A.A., Semenov A.L. Comparative study of prostatotropic effects of coniferous provitamin concentrate and extract of *Serenoa repens* based on the model of benign prostatic hyperplasia in rats. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya urologiya = Experimental and Clinical Urology* 2013(2):30-34. (In Russian)].
15. Strum SB. Serenoa repens (Saw palmetto) for lower urinary tract symptoms (LUTS): the evidence for efficacy and safety of lipidosterolic extracts. *Part I. Uro* 2021(1):118-138. <https://doi.org/10.3390/uro1030015>.
16. Zhang J, Zhang M, Tang J, Yin G, Long Z, He L, et al. Animal models of benign prostatic hyperplasia. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2021;24(1):49-57. <https://doi.org/10.1038/s41391-020-00277-1>.
17. Choi YJ, Kim EK, Fan M, Tang Y, Hwang YJ, Sung SH. Effect of Paecilomyces tenuipes extract on testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in sprague-dawley rats. *Int J Environ Res Public Health* 2019;16(19):3764. <https://doi.org/10.3390/ijerph16193764>.
18. Heywood LH. Testosterone levels in the male laboratory rat: variation under experimental conditions. *Int J Androl* 1980;3(5):519-29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1980.tb00140.x>.
19. Šimková M, Heráček J, Drašar P, Hampel R. Determination of intraprostatic and intratesticular androgens. *Int J Mol Sci* 2021;22(1):466. <https://doi.org/10.3390/ijms22010466>.
20. Islam MT, Ali ES, Uddin SJ, Shaw S, Islam MA, Ahmed MI, et al. Phytol: A review of biomedical activities. *Food Chem Toxicol* 2018(121):82-94. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.032>.
21. Bobe G, Zhang Z, Kopp R, Garzotto M, Shannon J, Takata Y. Phytol and its metabolites phytanic and pristanic acids for risk of cancer: current evidence and future directions. *Eur J Cancer Prev* 2020;29(2):191-200.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000534.

22. Salehi B, Quispe C, Sharifi-Rad J, Cruz-Martins N, Nigam M, Mishra AP et al. Phytosterols: from preclinical evidence to potential clinical applications. *Front Pharmacol* 2021;(11):599959. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.599959>.

23. Wilt T, Ishani A, MacDonald R, Stark G, Mulrow C, Lau J. Beta-sitosterols for benign prostatic hyperplasia. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;1999(2):CD001043. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001043>.

24. Milani A, Basirnejad M, Shahbazi S, Bolhassani A. Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. *Br J Pharmacol* 2017;174(11):1290-1324. <https://doi.org/10.1111/bph.13625>.

25. Cantagrel V, Lefeber DJ. From glycosylation disorders to dolichol biosynthesis defects: a new class of metabolic diseases. *J Inherit Metab Dis* 2011;34(4):859-67. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9301-0>.

26. Муразов Я.Г., Нюганен А.О., Артемьева А.С. Оценка химиопрофилактического потенциала полипренолов из хвои *Picea abies* L. и *Pinus sylvestris* L. на модели канцерогенеза предстательной железы у самцов крыс Wistar. *Вопросы питания* 2021;90(3):104-115. <https://doi.org/10.33029/0042-8833-2021-90-3-104-115> [Murazov I.G., Nyuganen A.O., Artemyeva A.S. [Evaluation of the chemopreventive potential of polyphenols from the needles of *Picea abies* L. and *Pinus sylvestris* L. using the model of prostate carcinogenesis in male Wistar rats. *Voprosy Pitaniia = Problems of Nutrition* 2021;90(3):104-115. (In Russian)]. <https://doi.org/10.33029/0042-8833-2021-90-3-104-115>.

27. Klein EA, Thompson IM Jr, Tangen CM, Crowley JJ, Lucia MS, Goodman PJ et al. Vitamin E and the risk of prostate cancer: the selenium and Vitamin E cancer prevention trial (SELECT). *JAMA* 2011;306(14):1549-56. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.1437>.

Сведения об авторах:

Кужанов А.А. – лаборант-исследователь научной лаборатории химиопрофилактики рака и онкофармакологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; Санкт-Петербург, Россия; kuzhanov@mail.ru; РИНЦ Author ID 910829

Муразов Я.Г. – к.б.н., научный сотрудник научной лаборатории химиопрофилактики рака и онкофармакологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; Санкт-Петербург, Россия; yaroslav84@yandex.ru; РИНЦ Author ID 899740

Нюганен А.О. – врач-патологоанатом патологоанатомического отделения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; Санкт-Петербург, Россия; antonyuganen@gmail.com; РИНЦ Author ID 1088145

Александров В.А. – д.м.н., в.н.с. научной лаборатории химиопрофилактики рака и онкофармакологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; Санкт-Петербург, Россия; alexandrov.valeri@yandex.ru; РИНЦ Author ID 80753

Артемьева А.С. – к.м.н., врач-патологоанатом, заведующий патологоанатомическим отделением, руководитель научной лаборатории морфологии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; Санкт-Петербург, Россия; oinochoya@gmail.com; РИНЦ Author ID 927324

Стуков А.Н. – д.м.н., старший научный сотрудник научного отдела инновационных методов терапевтической онкологии и реабилитации ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; Санкт-Петербург, Россия; stukov2008@yandex.ru; РИНЦ Author ID 611058

Вклад авторов:

Кужанов А.А. – концепция исследования, сбор и систематизация данных, написание и редактирование текста статьи, 30%
 Муразов Я.Г. – сбор и анализ данных, написание и редактирование текста статьи, 20%
 Нюганен А.О. – сбор и анализ данных, редактирование текста статьи, 20%
 Александров В.А. – написание и редактирование текста статьи, 10%
 Артемьева А.С. – критические замечания, редактирование текста статьи, 10%
 Стуков А.Н. – критические замечания, редактирование текста статьи, 10%

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: Статья опубликована без финансовой поддержки.

Статья поступила: 08.11.21

Результаты рецензирования: 18.11.21

Исправления получены: 29.11.21

Принята к публикации: 2.12.21

Information about authors:

Kuzhanov A.A. – Laboratory Research Assistant, Scientific Laboratory of Cancer Chemoprevention and Oncopharmacology, FSBI «N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation; Saint-Petersburg, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-8983-3679>

Murazov Ia.G. – PhD, Researcher, Scientific Laboratory of Cancer Chemoprevention and Oncopharmacology, FSBI «N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation; Saint-Petersburg, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-6573-3112>

Nyuganen A.O. – pathologist, Department of Pathology, FSBI «N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation; Saint-Petersburg, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-2685-5093>

Alexandrov V.A. – Dr. Sc., Leading Researcher, Scientific Laboratory of Cancer Chemoprevention and Oncopharmacology, FSBI «N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation; Saint-Petersburg, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-0019-2685>

Artemyeva A.S. – PhD, Head of the Department of Pathology, Head of the Scientific Laboratory of Morphology of Tumors, FSBI «N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation; Saint-Petersburg, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-2948-397X>

Stukov A.N. – Dr. Sc., Senior Researcher, Department of innovative methods of therapeutic oncology and rehabilitation, FSBI «N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation; Saint-Petersburg, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-1741-6630>

Authors' contributions:

Kuzhanov A.A. – conception of the work, data collection and systematization, writing and editing of the manuscript, 30%
 Murazov Ia.G. – data collection and analysis, writing and editing of the manuscript, 20%
 Nyuganen A.O. – data collection and analysis, editing of the manuscript, 20%
 Alexandrov V.A. – writing and editing of the manuscript, 10%
 Artemyeva A.S. – critical revision of the article, editing of the manuscript, 10%
 Stukov A.N. – critical revision of the article, editing of the manuscript, 10%

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

Financing. The article was published without financial support.

Received: 08.11.21

Peer review: 18.11.21

Corrections received: 29.11.21

Accepted for publication: 2.12.21