

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ-АЛЬФА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ

Зотина Е.Н.¹, Загоскина Т.П.², Шардаков В.И.¹, Йовдий А.В.¹,
Зайцева Г.А.¹

¹ ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

² ГБОУ ВПО «Кировская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Киров, Россия

Резюме. Изучено прогностическое значение провоспалительного цитокина – фактора некроза опухоли-альфа (TNF α) у 140 больных с впервые выявленным хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ). Содержание TNF α в сыворотке крови определяли твердофазным иммуноферментным методом. Установлено, что у пациентов с впервые выявленным ХЛЛ наблюдается достоверное увеличение содержания TNF α в сыворотке крови по сравнению со здоровыми лицами. Выявлена зависимость концентраций данного цитокина от стадии и варианта течения заболевания: наиболее высокие уровни TNF α в сыворотке крови отмечались у больных с продвинутыми стадиями заболевания и с прогрессирующим течением ХЛЛ. Установлены корреляционные связи между изучаемым цитокином и клинико-лабораторными параметрами, отражающими пролиферативную активность и размер опухолевого клона. Проведение иммунохимиотерапии сопровождалось достоверным снижением уровня TNF α . По данным многофакторного регрессионного анализа, уровень TNF α в момент постановки диагноза является независимым предиктором общей выживаемости. Следовательно, TNF α играет важную роль в механизмах патогенеза ХЛЛ и может использоваться в качестве дополнительного фактора прогноза ХЛЛ.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, цитокины, фактор некроза опухоли-альфа, прогноз, общая выживаемость

PROGNOSTIC VALUE OF TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA IN PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

Zotina E.N.^a, Zagoskina T.P.^b, Shardakov V.I.^a, Yovdy A.V.^a,
Zaitseva G.A.^a

^a Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Kirov, Russian Federation

^b Kirov State Medical Academy, Kirov, Russian Federation

Abstract. The prognostic value of tumor necrosis factor- α (TNF α), a pro-inflammatory cytokine was studied in 140 patients with a newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia (CLL). TNF α contents in blood

Адрес для переписки:

Зотина Екатерина Николаевна
ФГБУН «Кировский научно-исследовательский
институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства»
610027, Россия, г. Киров, ул. Красноармейская, 72.
Тел.: 8 (8332) 37-11-97.
Факс: 8 (8332) 54-97-31.
E-mail: enzotina@mail.ru

Address for correspondence:

Zotina Ekaterina N.
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion
610027, Russian Federation, Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 72.
Phone: 7 (8332) 37-11-97.
Fax.: 7 (8332) 54-97-31.
E-mail: enzotina@mail.ru

Образец цитирования:

Е.Н. Зотина, Т.П. Загоскина, В.И. Шардаков,
А.В. Йовдий, Г.А. Зайцева «Прогностическое значение
фактора некроза опухоли-альфа у больных хроническим
лимфолейкозом» // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18,
№ 5. С. 489-494. doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-495-497

© Зотина Е.Н. и соавт., 2016

For citation:

E.N. Zotina, T.P. Zagoskina, V.I. Shardakov, A.V. Yovdy,
G.A. Zaitseva "Prognostic value of tumor necrosis factor- α in
patients with chronic lymphocytic leukemia", *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2016, Vol. 18, no. 5,
pp. 489-494. doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-495-497

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-5-495-497>

serum was determined using ELISA method. A significant increase of serum TNF α was shown in patients with newly diagnosed CLL, as compared to healthy individuals. Dependence of the cytokine concentration on clinical stage and course of disease was revealed: the highest levels of serum TNF α were registered in patients with advanced disease and/or CLL progression. Distinct correlations were revealed between the studied cytokine amounts and clinical laboratory parameters reflecting the cell proliferative activity and tumor clone size. Immunochemotherapy was accompanied by a significant reduction of TNF α levels. According to the data from multivariate regression analysis. TNF α level of at the time of the diagnosis was an independent predictor of overall survival. Hence, TNF α plays an important role in CLL pathogenesis and may be used as an additional predictive factor for CLL outcomes.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, cytokines, tumor necrosis factor-alpha, prognosis, overall survival

Введение

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) – наиболее распространенное лимфопролиферативное заболевание, характеризующееся повышенной пролиферацией и накоплением клональных лимфоцитов, имеющих морфологию зрелых лимфоидных элементов и иммунофенотип, соответствующий В-клеткам поздних стадий дифференцировки. Характерным признаком ХЛЛ является накопление трансформированных В-лимфоцитов в костном мозге, периферической крови и других органах [3, 8]. При этом опухолевые лимфоциты функционально малоактивны и не способны к полноценному иммунному ответу. Поэтому ХЛЛ относят к опухолям иммунной системы.

Согласно современным представлениям, в основе развития ХЛЛ лежит нарушение взаимодействия опухолевых клеток и иммунной системы, которое сопровождается дисбалансом продукции цитокинов и их регуляции, что оказывает влияние на течение неопластического процесса [1, 8]. Цитокины – это большая группа биологически активных веществ белковой, пептидной или гликопротеиновой природы, которые продуцируются клетками кровяной системы и являются сигнальными молекулами, взаимодействующими с мембранными рецепторами и модулирующими выживаемость, рост, дифференцировку, миграцию, функциональную активность и апоптоз клеток [2].

В настоящее время большое внимание в расшифровке патогенеза ХЛЛ уделяется изучению роли провоспалительного цитокина – фактора некроза опухоли-альфа (TNF α), который характеризуется антиканцерогенными свойствами. Основными продуцентами TNF α являются моноциты, макрофаги и лимфоциты [2, 4]. Установлено, что TNF α обладает избирательной цитотоксичностью в отношении злокачественных клеток за счет индукции образования и освобождения свободных радикалов, а также ухудшения трофики, васкуляризации и оксигенации опухоли в связи с нарушением коагуляционно-

го гемостаза и реологических свойств крови [1, 2, 6]. Наряду с этим было показано, что TNF α участвует практически во всех стадиях канцерогенеза и способствует прогрессии опухолевого клона. В соответствии с данными литературы, не исключают роль TNF α в механизмах развития аутокринной и паракринной стимуляции клеток ХЛЛ [4]. Помимо прямого влияния на формирование опухолевой ткани через активацию факторов транскрипции, TNF α также влияет на рост сосудов и экспрессию адгезионных молекул, вовлеченных в метастазирование трансформированных клеток [1, 5, 8].

К сожалению, в настоящее время имеются лишь единичные работы, посвященные исследованию данного цитокина при ХЛЛ [1, 5, 6, 9]. Исследования носят фрагментарный характер и охватывают небольшую выборку пациентов. Недостаточно освещенными остаются вопросы, касающиеся определения взаимосвязей TNF α с другими факторами неблагоприятного прогноза течения ХЛЛ, не описана динамика данного цитокина в ходе опухолевой прогрессии. В связи с этим определение характера и механизмов нарушения продукции TNF α у больных ХЛЛ в развитии опухолевого процесса представляется актуальным.

Целью настоящего исследования явились оценка уровня TNF α в сыворотке крови больных ХЛЛ и установление связи данного показателя с вариантом течения заболевания и прогнозом.

Материалы и методы

В исследование включено 140 больных с впервые выявленным ХЛЛ в возрасте от 38 до 75 лет. Медиана возраста составила 58 лет. Среди обследованных было 81 (58%) мужчин и 59 (42%) женщин. У 52 (37%) больных зарегистрирована стадия А, у 69 (49%) – стадия В и у 19 (14%) – стадия С по классификации J. Binet. Соматический статус пациентов по шкале ECOG на момент постановки диагноза варьировал от 0 до 2 баллов: 0 баллов имели 43 (31%), 1 балл – 80 (57%) и

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ ХЛЛ

Параметр	Количество больных, абс. (%)
Общее количество больных	140 (100)
Медиана возраста, лет (диапазон)	58 (38-75)
Пол: мужской женский	81 (58) 59 (42)
Стадия по J. Binet: А В С	52 (37) 69 (49) 19 (14)
Соматический статус по шкале ECOG: 0 баллов 1 балл 2 балла	88 (63) 43 (31) 9 (6)
Вариант течения: прогрессирующий индолентный	78 (56) 62 (44)

2 балла – 17 (12%) больных. Характеристика пациентов представлена в таблице 1.

Диагноз ХЛЛ верифицировали согласно общепринятым критериям [7], включавшим данные клинического анализа крови, иммунофенотипирования лимфоидных элементов периферической крови и/или костного мозга с помощью проточной цитофлуориметрии, а также исследование пунктата костного мозга с подсчетом миелограммы и/или гистологическое исследование трепанобиоптата.

В ходе наблюдения за пациентами отмечались различные темпы прогрессирования заболевания. В зависимости от варианта течения ХЛЛ все обследованные были распределены на 2 группы. В первую группу вошли 78 (56%) больных, у которых выявлено индолентное течение опухолевого процесса, вторую группу составили 62 (44%) пациента с прогрессирующим течением ХЛЛ. Вялотекущее, медленно развивающееся течение заболевания констатировали спустя 2 года с момента постановки диагноза. У этих больных на протяжении 24 месяцев и более не наблюдалось нарастания лейкоцитоза, абсолютного лимфоцитоза. Лимфатические узлы, печень и селезенка оставались нормальных размеров. При прогрессирующем течении ХЛЛ удвоение числа лимфоцитов, увеличение размеров лимфатических узлов, селезенки и печени, развитие анемии и тромбоцитопении отмечалось в ближайшие 24 месяца от момента постановки диагноза.

Пациентам назначалась иммунохимиотерапия по программе «R-FC», которая включала: ритуксимаб 375 мг/м² внутривенно в первый курс химиотерапии и 500 мг/м² в последующие курсы

в первый день, циклофосфамид 250 мг/м² внутривенно во 2-4 дни курса, флударабин 25 мг/м² внутривенно или 40 мг/м² внутрь во 2-4 дни курса). Курсы RFC проводились каждые 4 недели до максимального эффекта, но не более 6.

Содержание TNF α в сыворотке крови определяли твердофазным иммуноферментным методом с использованием наборов ProCon, выпускаемых ООО «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург), согласно прилагаемым инструкциям. Анализ проводился с образцами сыворотки крови больных, хранившихся при температуре -20 °С. Непосредственно перед анализом образцы размораживали посредством тепловой обработки в водяной бане при температуре 37 °С, чтобы предотвратить осаждение фибриногена. Количественный учет результатов реакции проводили с помощью автоматического фотометра для микропланшетов при длине волны 450 нм. Концентрацию TNF α рассчитывали путем построения калибровочных кривых зависимости оптической плотности от концентрации для стандартного антигена и по построенным графикам определяли концентрацию цитокинов в пикограммах на миллилитр (пг/мл) в исследуемых образцах. У всех пациентов концентрацию TNF α определяли в момент постановки диагноза до начала противоопухолевого лечения и после его завершения. В качестве контрольной группы обследовано 50 первичных доноров крови без соматической и инфекционной патологии.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью статистической прикладной программы STATISTICA 8. Количественные признаки с нормальным распределени-

ем представлены как $M \pm \delta$ (среднее \pm стандартное отклонение). Для выявления существенных различий по количественным признакам использовали критерий Стьюдента. Для оценки корреляционных связей использовали ранговый коэффициент корреляции R Спирмена для количественных значений. Оценку прогностической ценности признаков в отношении общей выживаемости больных ХЛЛ проводили с помощью регрессионной модели пропорционального риска Кокса. Различия показателей считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При анализе уровня TNF α в сыворотке крови больных ХЛЛ в момент постановки диагноза выявлено достоверное увеличение данного показателя в 2,5 раза ($12,2 \pm 5,41$ пг/мл) по сравнению со здоровыми лицами – $4,6 \pm 1,37$ пг/мл ($p < 0,001$), что, по-видимому, связано с высокой пролиферативной активностью клеток и быстрым увеличением опухолевого субстрата.

Установлено, что содержание TNF α в сыворотке крови зависело от стадии ХЛЛ. Так, у пациентов со стадиями В и С по классификации J. Vinet наблюдался более высокий уровень TNF α в сыворотке крови по сравнению с больными, имевшими стадию А, и равнялся $20,7 \pm 7,84$ пг/мл и $8,4 \pm 3,71$ пг/мл соответственно ($p < 0,001$). Высокий уровень TNF α в сыворотке крови у пациентов с продвинутыми стадиями, вероятнее всего, можно объяснить усилением процессов опухолевой пролиферации, так как, по мнению ряда исследователей, изучаемый цитокин может стимулировать рост и продолжительность выживаемости опухолевых клеток [4, 9]. Следует также отметить способность самих опухолевых клеток при лимфопролиферативных заболеваниях вырабатывать широкий спектр цитокинов, являющихся для них факторами роста и метастазирования [1, 4, 6].

По мере прогрессирования опухолевого процесса отмечалось увеличение содержания TNF α в сыворотке крови больных ХЛЛ. Так, у больных с индолентным течением заболевания концентрация изучаемого цитокина была достоверно ниже, чем у лиц с прогрессирующим течением ХЛЛ ($25,8 \pm 8,67$ пг/мл и $9,6 \pm 1,45$ пг/мл соответственно; $p < 0,001$), что косвенным образом может указывать на связь уровня TNF α с размером опухолевой массы. Прогрессирующее течение ХЛЛ характеризовалось наличием большой опухолевой массы и высоким содержанием TNF α . В то же время индолентному течению заболевания было свойственно менее выраженное по-

вышение уровня TNF α и были менее выражены такие признаки заболевания, как абсолютный лимфоцитоз, органомегалия и лимфаденопатия.

При проведении корреляционного анализа установлены сильные положительные корреляционные связи между концентрацией TNF α и такими показателями, как абсолютное число лимфоцитов в периферической крови ($r = 0,85$; $p < 0,001$), уровень тимидинкиназы (ТК) в сыворотке крови ($r = 0,93$; $p < 0,001$). Корреляция между содержанием TNF α и количеством CD95⁺ лимфоцитов, несущих основной маркер апоптоза, была менее выражена, являлась средней положительной ($r = 0,56$; $p = 0,007$). Выявлена сильная отрицательная корреляционная связь между уровнем TNF α и содержанием гемоглобина ($r = -0,81$; $p < 0,001$), тромбоцитов ($r = -0,80$; $p < 0,001$). В то же время содержание TNF α не коррелировало с возрастом ($r = 0,23$; $p > 0,05$) и полом пациентов ($r = 0,20$; $p > 0,05$).

Проведение химиотерапии у больных ХЛЛ сопровождалось достоверным снижением уровня TNF α в 1,8 раза по сравнению с пациентами до начала лечения ($12,2 \pm 5,41$ пг/мл и $6,7 \pm 1,14$ пг/мл, $p = 0,013$), что указывает на уменьшение размеров опухоли и выраженности интоксикационного синдрома. Следует отметить, что после завершения химиотерапии у большинства пациентов полной нормализации изучаемого цитокина не произошло, что, вероятнее всего, связано с токсическим воздействием применяемых противоопухолевых препаратов на различные органы и ткани [3].

Для оценки влияния TNF α на продолжительность общей выживаемости (ОВ) больных ХЛЛ были проведены однофакторный и многофакторный анализы. С помощью однофакторного регрессионного анализа были определены факторы, имеющие неблагоприятное прогностическое значение. Результаты однофакторного анализа показали, что у пациентов с ХЛЛ факторами, статистически достоверно влияющими на ОВ, являются возраст ($p = 0,033$), пол ($p = 0,021$), стадия заболевания ($p = 0,007$), соматический статус по шкале ECOG ($p = 0,019$), время удвоения лимфоцитов ($p = 0,023$), активность сывороточной ТК ($p = 0,009$), содержание в сыворотке крови TNF α ($p = 0,012$).

Наряду с этим, для исключения факторов, действующих односторонне и равнозначно, проведен многофакторный анализ. В многофакторном анализе на основе модели пропорциональных рисков Кокса использовали параметры, которые при проведении однофакторного анализа показали значимое влияние

ТАБЛИЦА 2. НЕБЛАГОПРИЯТНЫЕ ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ОБЩУЮ ВЫЖИВАЕМОСТЬ БОЛЬНЫХ ХЛЛ ПО ДАННЫМ МНОГОФАКТОРНОГО АНАЛИЗА

Параметры	Пороговое значение	Отношение рисков (95% ДИ)	р
Пол	мужской	1,47 (1,26-1,83)	0,027
Возраст	> 60 лет	0,83 (0,61-1,27)	> 0,05
Стадия	В и С	2,28 (2,13-3,10)	< 0,001
Соматический статус по ECOG	> 2 баллов	0,81 (0,62-1,13)	> 0,05
Время удвоения лимфоцитов	< 12 мес	1,76 (1,28-1,92)	0,014
Активность ТК	> 10 Ед/л	2,56 (2,23-2,91)	< 0,001
Содержание TNF α	> 13 пг/мл	1,63 (1,27-1,89)	0,013

Примечание. ДИ – доверительный интервал.

на ОВ. Полученные результаты представлены в таблице 2, из которых видно, что среди исследованных показателей независимое прогностическое значение в отношении ОВ больных ХЛЛ имеют пол, стадия заболевания, активность сывороточной ТК, а также содержание TNF α в сыворотке крови.

Наблюдаемые закономерности изменения уровня TNF α в сыворотке крови больных ХЛЛ на разных стадиях заболевания и в процессе иммунохимиотерапии расширяют представления о молекулярно-клеточных механизмах развития патогенеза данной опухоли.

Выводы

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о повышении сывороточного уровня TNF α у больных с впервые

выявленным ХЛЛ по сравнению со здоровыми лицами. Обнаружена зависимость концентраций TNF α от стадии и варианта течения заболевания. Наиболее высокие уровни TNF α в сыворотке крови отмечались у пациентов с продвинутыми стадиями и с прогрессирующим течением ХЛЛ. Проведение иммунохимиотерапии у больных ХЛЛ сопровождалось достоверным снижением содержания TNF α . По данным многофакторного регрессионного анализа, уровень TNF α в момент постановки диагноза является независимым предиктором общей выживаемости, наряду с возрастом, стадией заболевания, временем удвоения лимфоцитов, активностью ТК. Следовательно, TNF α играет важную роль в механизмах патогенеза ХЛЛ и может использоваться в качестве дополнительного фактора прогноза течения ХЛЛ и эффективности лечения.

Список литературы / References

1. Жевак Т.Н., Чеснокова Н.П., Шелехова Т.В. Закономерности изменений цитокинового статуса при хроническом лимфолейкозе и их роль в патогенезе прогрессирующих форм заболевания // Саратовский научно-медицинский журнал, 2012. Т. 8, № 2. С. 203-209. [Zhevak T.N., Chesnokova N.P., Schelekhova T.V. [Regularities of cytokine status changes in chronic lymphocytic leukaemia and their role in pathogenesis forms of disease. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Saratov Journal of Medical Scientific Research*, 2012, Vol. 8, no 2, pp. 203-209. (In Russ.)]
2. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008. 552 с. [Ketlinsky S.A., Simbirtsev A.S. *Cytokines*. St. Petersburg: Foliant, 2008. 552 p.
3. Волкова М.А. Клиническая онкогематология. М.: Медицина, 2007. 1120 с. [Volkova M.A. *Clinical Oncohematology*. Moscow: Medicine, 2007. 1120 p.
4. Balkwill F., Joffroy C. TNF: a tumor-suppressing factor or tumor-promoting factor? *Future Oncology*, 2010, Vol. 6, no. 12, pp. 1833-1836.
5. Bojarska-Junak A., Hus I., Szczepanek E.W., Dmoszynska A., Rolinski J. Peripheral blood and bone marrow TNF and TNF receptors in early and advanced stages of B-CLL in correlation with ZAP-70 protein and CD38 antigen. *Leukemia Research*, 2008, Vol. 32, no 2, pp. 225-233.
6. Ferrajoli A., Keating M.J., Manshouri T., Giles F.J., Dey A., Estrov Z., Koller C.A., Kurzrock R., Thomas D.A., Faderl S., Lerner S., O'Brien S., Albitar M. The clinical significance of tumor necrosis factor- α plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2002, Vol. 100, no. 4, pp. 1215-1219.

7. Hallek M., Cheson B.D., Catovsky D., Caligaris F., Dighiero G., Dohner H., Hillmen P., Keating M.J., Montserrat E., Rai K.R., Kipps T.J., International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*, 2008, Vol. 111, no 12, pp. 5446-5456.

8. Klein U., Dalla-Favera R. New insights into the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in Cancer Biology*, 2010, Vol. 20, no. 6, pp. 377-338.

9. Singer M.K., Assem M., Abdel Ghaffar A.B., Morcos N.Y. Role of TNF-alpha as a survival prognostic marker in chronic lymphocytic leukemia patients. *The Egyptian Journal of Immunology*, 2011, Vol. 18, no. 2, pp. 51-60.

Авторы:

Зотина Е.Н. — к.м.н., младший научный сотрудник научно-клинического отдела ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

Загоскина Т.П. — к.м.н., доцент кафедры госпитальной терапии ГБОУ ВПО «Кировская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Киров, Россия

Шардаков В.И. — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории иммунологии лейкозов ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

Йовдий А.В. — к.м.н., младший научный сотрудник лаборатории иммуногематологии ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

Зайцева Г.А. — д.м.н., профессор, руководитель научного направления ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

Authors:

Zotina E.N., PhD (Medicine), Junior Research Associate, Clinical Research Department, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Kirov, Russian Federation

Zagoskina T.P., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Hospital Therapy, Kirov State Medical Academy, Kirov, Russian Federation

Shardakov V.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Leukemia Immunology, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Kirov, Russian Federation

Yovdy A.V., PhD (Medicine), Junior Researcher Associate, Laboratory of Immunohematology, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Kirov, Russian Federation

Zaitseva G.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Research Direction, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Kirov, Russian Federation

Поступила 13.05.2016
Принята к печати 31.05.2016

Received 13.05.2016
Accepted 31.05.2016