

РОЛЬ Treg-КЛЕТОК В АДЕНОЗИН-ОПОСРЕДОВАННОЙ ИММУННОЙ СУПРЕССИИ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

Жулай Г.А.¹, Олейник Е.К.¹, Чуров А.В.¹, Романов А.А.²,
Кравченко (Семакова) П.Н.¹, Олейник В.М.¹

¹ ФГБУН «Институт биологии Карельского научного центра» РАН, г. Петрозаводск, Россия

² ГБУЗ «Республиканский онкологический диспансер», г. Петрозаводск, Россия

Резюме. В настоящее время активно исследуется иммуносупрессорная роль внеклеточного аденозина при канцерогенезе. Колоректальный рак является одним из наиболее распространенных типов злокачественных новообразований в России и в мире, однако роль участников (CD39, CD73, A2AR) аденозин-опосредованной иммуносупрессии у больных колоректальным раком пока не ясна. В работе исследовали уровень мРНК генов A2AR, эктонуклеотидаз CD39 и CD73 (гидролизующих АТФ до аденозина) в лейкоцитах больных колоректальным раком. Показано, что у больных содержание мРНК CD39 увеличивается в процессе развития заболевания, тогда как для CD73 значительных различий по сравнению со здоровыми донорами не было. У больных с поздними стадиями колоректального рака отмечено повышение экспрессии мРНК A2AR, что может свидетельствовать об активации аденозин-A2AR иммуносупрессорного механизма. Кроме того, при развитии колоректального рака усиливается экспрессия молекулы CD39 на Т-клетках. Наиболее значительное изменение экспрессии CD39 как на Т-хелперах, так и на Тreg-клетках отмечено на поздних стадиях колоректального рака. Также обнаружена прямая корреляция между экспрессией эктонуклеотидазы CD39 на CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} Treg-клетках и изменением уровня мРНК A2AR лейкоцитов онкологических больных.

Ключевые слова: Treg-клетки, эктонуклеотидаза CD39, A2AR, колоректальный рак

SIGNIFICANCE OF Treg CELLS FOR ADENOSINE-MEDIATED IMMUNE SUPPRESSION IN COLORECTAL CANCER

Zhulai G.A.^a, Oleinik E.K.^a, Churov A.V.^a, Romanov A.A.^b,
Kravchenko (Semakova) P.N.^a, Oleinik V.M.^a

^a Institute of Biology of Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

^b Republican Cancer Dispensary, Petrozavodsk, Russian Federation

Abstract. At the present time, immunosuppressive role of extracellular adenosine in carcinogenesis is actively investigated. Colorectal cancer is one of the most common types of malignant neoplasms in Russia

Адрес для переписки:

Жулай Галина Анатольевна
ФГБУН «Институт биологии Карельского научного
центра» РАН
185014, Россия, Республика Карелия, г. Петрозаводск,
ул. Пушкинская, 11.
Тел.: 8 (953) 525-26-36.
Факс: 8 (8142) 76-98-10.
E-mail: zhgali-111@yandex.ru

Address for correspondence:

Zhulai Galina A.
Institute of Biology of Karelian Research Centre, Russian
Academy of Sciences
185910, Russian Federation, Karelia, Petrozavodsk,
Pushkinskaya str., 11.
Phone: 7 (953) 525-26-36.
Fax: 7 (8142) 76-98-10.
E-mail: zhgali-111@yandex.ru

Образец цитирования:

Г.А. Жулай, Е.К. Олейник, А.В. Чуров, А.А. Романов,
П.Н. Кравченко (Семакова), В.М. Олейник «Роль Treg-
клеток в аденозин-опосредованной иммунной супрессии при
колоректальном раке» // Медицинская иммунология, 2017.
Т. 19, № 1. С. 89-94.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-89-94

© Жулай Г.А. и соавт., 2017

For citation:

G.A. Zhulai, E.K. Oleinik, A.V. Churov, A.A. Romanov,
P.N. Kravchenko (Semakova), V.M. Oleinik "Significance
of Treg cells for adenosine-mediated immune suppression in
colorectal cancer", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2017, Vol. 19, no. 1, pp. 89-94.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-89-94

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2017-1-89-94>

and worldwide, but the role of mediators of adenosine-dependent immunosuppression, such as CD39 (that hydrolyze ATP to adenosine), CD73, A2AR, is not yet clear in patients with colorectal cancer. The levels of specific mRNAs for A2AR, ectonucleotidase CD39, and CD73 genes were assayed in white blood cells of the patients with colorectal cancer. The results have shown that the CD39 mRNA content is increased in the patients with colorectal cancer in the course of the disease progression. Meanwhile, no significant difference for CD73 gene expression was found between the patients and healthy donors. Moreover, an increase in A2AR mRNA expression was noted for the patients with advanced colorectal cancer, thus presuming potential activation of adenosine-A2AR-mediated immunosuppressive mechanism. Furthermore, the CD39 expression on T cells was elevated in parallel to the cancer progression. The most significant changes in CD39 expression were observed for both T helper and Treg cell populations at the late stages of colorectal cancer. Similarly, a direct correlation was revealed between CD39 expression on CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-}Treg cells, and changes of A2AR mRNA levels in leukocytes from the cancer patients.

Keywords: Treg cells, CD39 ectonucleotidase, A2AR, colorectal cancer

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект № 16-34-00970, и бюджетной темы № 0221-2014-0011.

Введение

Колоректальный рак (КРР) является одним из наиболее распространенных типов злокачественных новообразований в России и в мире [2]. Известно, что при КРР особую важность составляет инфильтрация опухоли клетками иммунной системы [8]. Однако в процессе развития опухолевые клетки, используя различные механизмы, могут вызывать супрессию противоопухолевого иммунного ответа. Относительно недавно была показана важная роль внеклеточного аденозина при канцерогенезе [9]. Аденозин может усиливать неоангиогенез, стимулируя пролиферацию эндотелиальных клеток и экспрессию фактора роста эндотелия сосудов. Кроме того, он обладает иммуносупрессорным действием. Накопление аденозина приводит к ингибированию эффекторных функций Т-клеток, включая пролиферацию, экспансию и секрецию важных противоопухолевых цитокинов, таких как IFN γ и TNF α [9]. Образование внеклеточного аденозина происходит путем гидролиза нуклеотидов АТФ и АДФ до АМФ эктонуклеозид трифосфат дифосфогидролазой-1 (ENTPD1, CD39), и далее до самого нуклеотида экто-5'-нуклеотидазой (NT5E, CD73). CD39 и CD73 экспрессируются многими лейкоцитами, а именно Т- и В-лимфоцитами, нейтрофилами, натуральными киллерами, моноцитами и макрофагами [3]. Противовоспалительное действие внеклеточного аденозина на Т-клетки реализуется при активации аденозинового рецептора A2A (A2AR), что в свою очередь вызывает накопление в клетке иммуносупрессорного цАМФ [4, 9]. В связи с этим блокирование сигнального пути внеклеточный аденозин-A2AR в настоящее время

рассматривается в качестве терапевтического подхода для усиления эффективности опухолевых специфических CD8⁺ и CD4⁺Т-клеток [4].

Среди лимфоцитов есть популяция регуляторных Т-клеток (Treg), в культуре которых было продемонстрировано непосредственное накопление аденозина [6]. Показано, что у человека Treg-клетки экспрессируют только CD39, в отличие от мышинных, способных экспрессировать обе эктонуклеотидазы CD39 и CD73. Treg-клетки отличаются экспрессией транскрипционного фактора FoxP3, высокой конститутивной экспрессией α -цепи рецептора к IL-2 (CD25), а также низкой экспрессией молекулы CD127 (IL-7R α). Эти лимфоциты присутствуют в большом количестве в опухолевой ткани и крови онкологических больных и препятствуют эффективному противоопухолевому иммунному ответу благодаря широкому набору ингибиторных механизмов, к одному из которых относят участие в генерации внеклеточного аденозина.

В настоящее время участники аденозин-опосредованной иммуносупрессии (CD39, CD73, A2AR) изучаются на различных моделях опухолей, однако их роль у больных КРР пока не ясна. Целью исследования было изучение влияния развития КРР на изменение уровня экспрессии лейкоцитами мРНК генов *CD39*, *CD73*, *A2AR* и на экспрессию эктонуклеотидазы CD39 Treg-клетками.

Материалы и методы

В работе исследовано 42 образца периферической крови больных КРР, средний возраст которых составил 65,0 \pm 12,4 лет и 30 образцов крови здоровых доноров (контроль) в возрасте 54,4 \pm 20,6 лет. Экспрессию мРНК *CD39*, *CD73*, *A2AR* определяли методом ПЦР в реальном времени. Выделение и очистку нуклеиновых кис-

лот проводили с помощью набора «AxyPrep Blood Total RNA Miniprep Kit» (Axygen, США). Для синтеза кДНК использовали случайные гексапраймеры и MMLV-обратную транскриптазу (ООО «Силекс», Россия). Амплификацию кДНК, а также анализ продуктов амплификации в режиме реального времени выполняли с использованием реакционной смеси с интеркалирующим красителем SYBR Green I (ЗАО «Евроген», Россия) на приборе iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Экспрессию молекул клетками оценивали методом многоцветной проточной цитометрии на приборе Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США) с использованием моноклональных антител CD4-FITC, CD25-PC5, CD127-PC7 (Beckman Coulter, Франция), CD39-PE (R&D Systems, США), FoxP3-PE (eBioscience, США) и соответствующих изотипических контролей. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ Statistica 6.0, достоверность различий между группами рассчитывали по критерию Манна–Уитни при уровне значимости $p < 0,05$. Для выявления и оценки характера связи между признаками использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Данные представлены в виде $M \pm SD$. Исследо-

вание выполнено с использованием приборной базы Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН (ЦКП НО ИБ КарНЦ РАН).

Результаты и обсуждение

Обследованные больные KPP были разделены на две группы: ранние стадии заболевания – больные на I–II стадиях развития KPP и поздние стадии заболевания – больные на III–IV стадиях. Определение уровня генов эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в периферических лейкоцитах больных KPP показало, что наиболее значительные изменения происходят в экспрессии CD39, причем содержание мРНК CD39 увеличивается в процессе развития заболевания (рис. 1). Для CD73 достоверных различий с контролем не наблюдалось.

У больных с поздними стадиями KPP отмечено также значительное повышение экспрессии мРНК A2AR (рис. 1), что, вероятно, свидетельствует об активации аденозин-A2AR иммуносупрессорного сигнального пути.

Для оценки роли Treg-клеток в этом механизме исследовали экспрессию молекулы CD39 CD4⁺CD25^{hi} и CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-}Treg-

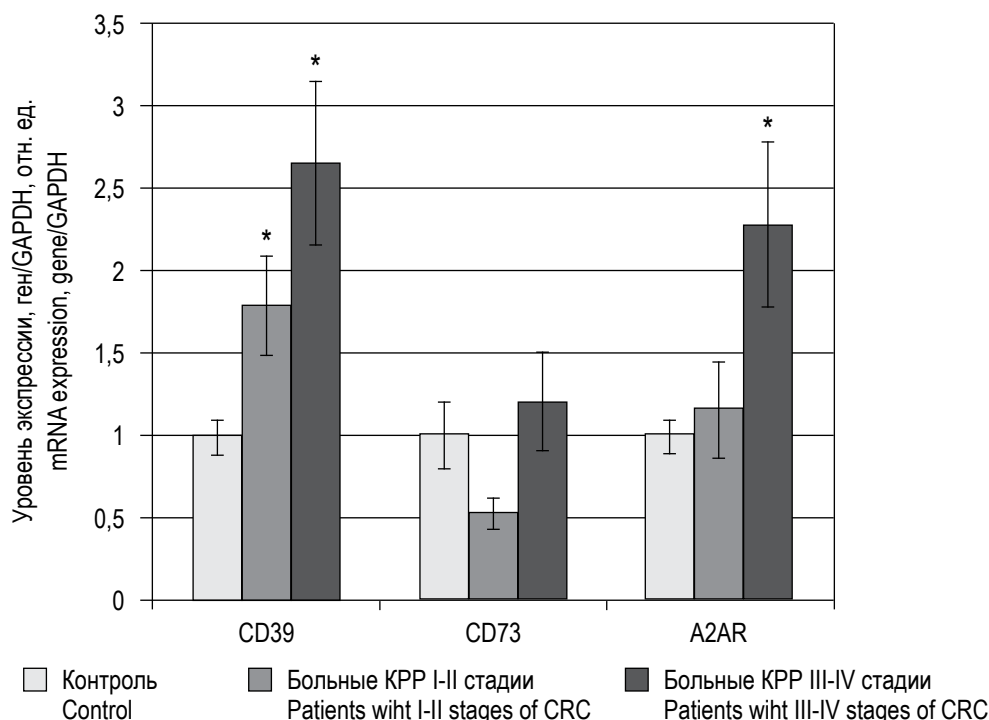


Рисунок 1. Относительный уровень мРНК CD39, CD73 и A2AR в лейкоцитах периферической крови больных на разных стадиях KPP, нормализованный по мРНК GAPDH

Примечание. * – различия достоверны по сравнению с контролем, данные представлены как $M \pm SE$.

Figure 1. Relative mRNA levels of CD39, CD73 and A2AR in peripheral blood leukocytes of patients at different stages of CRC normalized for GAPDH mRNA

Note. * – difference from the controls is statistically significant; the data are presented as $M \pm SE$.

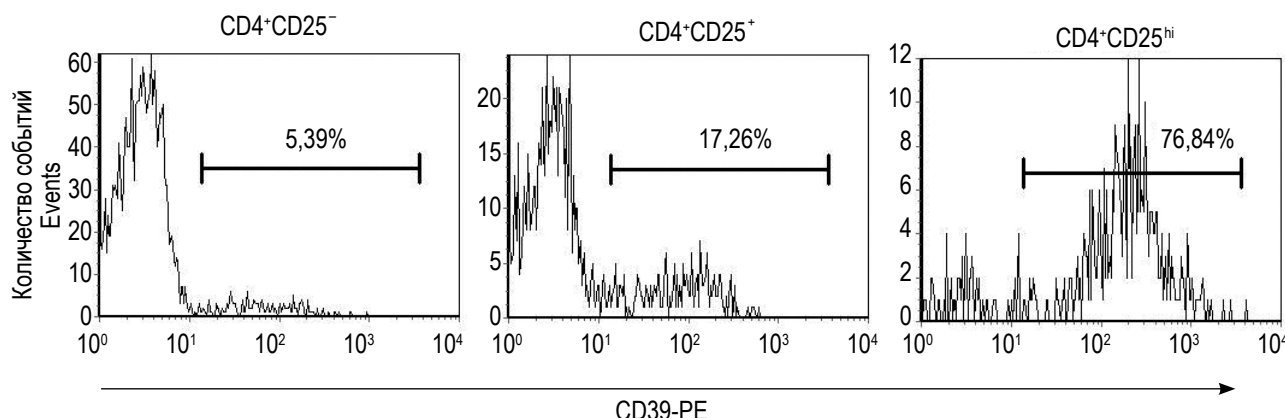


Рисунок 2. Распределение экспрессии CD39 в зависимости от экспрессии CD25 на поверхности CD4⁺Т-клеток у больного КРР

Примечание. Справа под горизонтальной линией отмечены клетки, экспрессирующие CD39, слева находятся клетки, негативные по экспрессии CD39.

Figure 2. Distribution of CD39 expression for CD4⁺CD25⁻, CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25^{hi} T cells in CRC patients

Note. CD39-expressing cells are noted below the horizontal line (right), whereas CD39neg cells are located on the left.

ТАБЛИЦА 1. ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛЫ CD39 CD4⁺Т-КЛЕТКАМИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ КРР

TABLE 1. CD39 EXPRESSION BY CD4⁺T CELLS IN HEALTHY DONORS AND CRC PATIENTS, M±SD

	CD39/CD4 ⁺ CD25 ⁺	CD39/CD4 ⁺ CD25 ^{hi}	CD39/CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{lo/-}
Контроль, n = 30 Healthy donors (controls)	9,66±0,8%	39,66±2,5%	41,16±3,1%
больные КРР I-II стадии, n = 20 Patients with I-II stage CRC	13,17±1,9%	53,97±4,0%*	55,24±4,2%*
больные КРР III-IV стадии, n = 22 Patients with III-IV stage CRC	16,15±1,7%*	66,04±3,5%**	67,95±3,1%**

Примечание. * – различия достоверны по сравнению с контролем; * – различия достоверны по сравнению с группой больных на I-II стадиях развития КРР.

Note. * – difference from the control is statistically significant; * – difference from the group with I-II stage CRC is statistically significant.

клетками. Оказалось, что Treg-клетки экспрессируют эту эктонуклеотидазу сильнее, чем клетки с фенотипом, не характерным для регуляторных лимфоцитов CD4⁺CD25⁻ и CD4⁺CD25⁺ (рис. 2, табл. 1). Так, у здоровых доноров для клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁻ уровень экспрессии CD39 составил 5,58±3,9% от CD4⁺Т-клеток, что значительно отличается от уровня экспрессии этой молекулы CD4⁺CD25^{hi} (p < 0,001) и CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-}Treg-клетками (p < 0,001; табл. 1). В литературе отмечается, что экспрессия CD39 может увеличиваться после активации Т-лимфоцитов [3], но этот уровень экспрессии все равно был выше для Treg-клеток по сравнению с активированными CD4⁺CD25⁺Т-клетками (p < 0,001; табл. 1). У больных лиц наблюдалась такая же закономерность.

Имеются сведения [10], что молекулу CD39 могут секретировать как FoxP3⁺, так и FoxP3⁻

CD4⁺Т-клетки. Но только FoxP3⁺CD39⁺Treg-клетки могут подавлять иммунный ответ, в то время как FoxP3⁻CD39⁺Т-клетки схожи по характеристикам с клетками памяти и не проявляют супрессии [10]. В наших опытах, как у здоровых, так и у больных CD4⁺CD25⁺Т-клетки слабо экспрессировали транскрипционный фактор FoxP3. Так, у больных КРР уровень экспрессии FoxP3 для CD4⁺CD25⁺ клеток составил 15,20±8,5%, тогда как у CD4⁺CD25^{hi}Treg-клеток уровень экспрессии FoxP3 был 67,49±14,7% (p < 0,001). Кроме того, нами обнаружена положительная корреляция между экспрессией CD39 и экспрессией транскрипционного фактора FoxP3 на CD4⁺Т-клетках: у больных КРР коэффициент корреляции был равен 0,47 при p = 0,006. Эти результаты, а также данные других авторов [6, 7] свидетельствуют о том, что экспрессия CD39 в большей

степени характерна для Treg-клеток по сравнению с другими популяциями Т-лимфоцитов.

Содержание CD4⁺T-клеток, экспрессирующих эктонуклеотидазу CD39, в крови обследованных лиц сильно колеблется. Так, у здоровых доноров количество этих клеток составляло в среднем 7,29±3,5% от CD4⁺T-клеток и варьировало от 1,46 до 13,61%, а у больных КРР — 10,7±4,9% (от 2,16 до 21,53%); различия между этими группами были достоверны ($p < 0,05$). При анализе количества CD4⁺CD39⁺T-клеток у больных КРР в зависимости от развития заболевания обнаружилось, что накопление этих клеток происходит на более поздних стадиях КРР (группа больных с III-IV стадиями) по сравнению контролем ($p < 0,01$).

Усиление уровня экспрессии молекулы CD39 наблюдали у CD4⁺CD25^{hi} и CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-}Treg-клеток больных КРР (табл. 1). Экспрессия эктонуклеотидазы Treg-клетками увеличивается уже на начальных стадиях развития опухоли и достигает максимальных значений у больных с III-IV стадиями КРР.

Кроме того, отмечена повышенная экспрессия молекулы CD39 активированными CD4⁺CD25⁺T-хелперами у больных с III-IV стадиями развития опухоли (табл. 1) по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Таким образом, накопление CD4⁺CD39⁺T-клеток у больных на поздних стадиях КРР происходит не только за счет экспрессии этой эктонуклеотидазы Treg-клетками, но и активированными Т-хелперами.

Мы оценили роль Treg-клеток в активации аденозин-опосредованной супрессии иммунного

ответа у больных КРР. Для этого была проанализирована связь экспрессии CD39 этой популяцией клеток с изменением относительного содержания мРНК клеточного рецептора A2A. Оказалось, что существует положительная корреляция между уровнем экспрессии этого гена и уровнем экспрессией молекулы CD39 на CD4⁺CD25^{hi} и CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-}Treg-клетках. Так, для CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-}Treg-клеток r был 0,45 ($p = 0,039$). В то же время существенной корреляции экспрессии CD39 на CD4⁺CD25⁺ активированных Т-клетках с содержанием мРНК A2AR не обнаружено.

Таким образом, согласно полученным данным по изучению уровня мРНК CD39 и экспрессии этой нуклеотидазы CD4⁺T-клетками, периферические лимфоциты больных КРР активно участвуют в расщеплении АТФ до АМФ и тем самым способствуют генерации аденозина и активации аденозин-опосредованной супрессии. Можно предположить, что ослабление клеточного иммунитета у больных КРР [1] связано с этим механизмом развития иммунной супрессии. Положительная корреляция между уровнем экспрессии CD39 CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-}Treg-клетками и изменением относительного содержания мРНК рецептора A2A в лейкоцитах, возможно, свидетельствует о значительном вкладе Treg в активацию аденозин-A2AR супрессии. Изменения в содержании мРНК A2AR могут представлять интерес как один из важных критериев оценки уровня иммунной супрессии при КРР.

Список литературы / References

1. Жулай Г.А., Олейник Е.К., Романов А.А., Олейник В.М., Чуров А.В., Кравченко П.Н. Циркулирующие регуляторные Т-клетки и изменения в субпопуляционном составе лимфоцитов у больных колоректальным раком // Вопросы онкологии, 2016. Т. 62, № 1. С. 96-100. [Zhulai G.A., Oleinik E.K., Romanov A.A., Oleinik V.M., Churov A.V., Kravchenko P.N. Circulating regulatory T-cells and changes in the subpopulation composition of lymphocytes in colorectal cancer patients. *Voprosy onkologii = Problems in Oncology*, 2016, Vol. 62, no. 1, pp. 96-100. (In Russ.)]
2. Циммерман Я.С. Колоректальный рак: современное состояние проблемы // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии, 2012. Т. 22, № 4. С. 5-17. [Tsimmerman Ya.S. Colorectal cancer: state-of-the-art. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, kolopraktologii = Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*, 2012, Vol. 22, no. 4, pp. 5-17. (In Russ.)]
3. Antonioli L., Pacher P., Vizi S.E., Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol. Med.*, 2013, Vol. 19, pp. 355-367.
4. Haskó G., Linden J., Cronstein B., Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2008, Vol. 7, no. 9, pp. 759-770.
5. Longhi M.S., Robson S.C., Bernstein S.H., Serra S., Deaglio S. Biological functions of ecto-enzymes in regulating extracellular adenosine levels in neoplastic and inflammatory disease states. *J. Mol. Med. (Berl)*, 2013, Vol. 91, pp. 165-172.
6. Mandapathil M., Hildorfer B., Szczepanski M.J., Czystowska M., Szajnik M., Ren J., Lang S., Jackson E.K., Gorelik E., Whiteside T.L. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, Vol. 285, pp. 7176-7186.

7. Mandapathil M., Szczepanski M.J., Szajnik M., Ren J., Lenzner D.E., Jackson E.K., Gorelik E., Lang S., Johnson J.T., Whiteside T.L. Increased ectonucleotidase expression and activity in regulatory T cells of patients with head and neck cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2009, Vol. 15, pp. 6348-6357.
8. Nosh K., Baba Y., Tanaka N., Shima K., Hayashi M., Meyerhardt J.A., Giovannucci E., Dranoff G., Fuchs C.S., Ogino S. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *J. Pathol.*, 2010, Vol. 222, pp. 4350-4366.
9. Ohta A., Gorelik E., Prasad S.J., Ronchese F., Lukashev D., Wong M.K., Huang X., Caldwell S., Liu K., Smith P., Chen J.F., Jackson E.K., Apasov S., Abrams S., Sitkovsky M. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, Vol. 103, pp. 13132-13137.
10. Zhou Q., Yan J., Putheti P., Wu Y., Sun X., Toxavidis V., Tigges J., Kassam N., Enjyoji K., Robson S.C., Strom T.B., Gao W. Isolated CD39 expression on CD4⁺ T cells denotes both regulatory and memory populations. *Am. J. Transplant.*, 2009, Vol. 9, pp. 2303-2311.

Авторы:

Жулай Г.А. — младший научный сотрудник группы иммунологии ФГБУН «Институт биологии Карельского научного центра» РАН, г. Петрозаводск, Россия

Олейник Е.К. — д.б.н., главный научный сотрудник, заведующая группой иммунологии ФГБУН «Институт биологии Карельского научного центра» РАН, г. Петрозаводск, Россия

Чуров А.В. — к.б.н., научный сотрудник группы иммунологии ФГБУН «Институт биологии Карельского научного центра» РАН, г. Петрозаводск, Россия

Романов А.А. — врач хирург-онколог ГБУЗ «Республиканский онкологический диспансер», г. Петрозаводск, Россия

Кравченко (Семакова) П.Н. — младший научный сотрудник группы иммунологии ФГБУН «Институт биологии Карельского научного центра» РАН, г. Петрозаводск, Россия

Олейник В.М. — д.б.н., ведущий научный сотрудник группы иммунологии ФГБУН «Институт биологии Карельского научного центра» РАН, г. Петрозаводск, Россия

Authors:

Zhulai G.A., Junior Research Associate, Immunology Group, Institute of Biology of Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

Oleinik E.K., PhD, MD (Biology), Chief Research Associate, Head, Immunology Group, Institute of Biology of Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

Churov A.V., PhD (Biology), Research Associate, Immunology Group, Institute of Biology of Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

Romanov A.A., Oncology Surgeon, Republican Cancer Dispensary, Petrozavodsk, Russian Federation

Kravchenko (Semakova) P.N., Junior Research Associate, Immunology Group, Institute of Biology of Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

Oleinik V.M., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Immunology Group, Institute of Biology of Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

Поступила 20.10.2016
Принята к печати 31.10.2016

Received 20.10.2016
Accepted 31.10.2016