

К ВОПРОСУ О ВЛИЯНИИ БИОТИЧЕСКОГО ФАКТОРА — ИНВАЗИИ ТРЕМАТОДЫ *OPISTHORCHIS FELINEUS* — НА СОСТОЯНИЕ ИММУННОГО СТАТУСА ОРГАНИЗМА И ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

А.Г. Рыбка

ФГБОУ ВО Тюменский государственный университет, г. Тюмень, Россия

Резюме. В статье подтверждается факт перестройки иммунной системы организма на фоне длительной описторхозной инвазии и ее роль как фактора риска в канцерогенезе холангиокарцином. Исследования показали, что первые этапы описторхозной инвазии опосредуют изменения в иммунной системе организма: антигены метацеркариев активируют В-систему иммунитета, антигены описторхов ингибируют активность клеточного иммунитета, метаболиты описторхов на фоне низкой функциональной активности лимфоцитов стимулируют пролиферативную активность митоген-индуцированных Т-лимфоцитов. Хроническая описторхозная инвазия детерминирует значительный дисбаланс в системе иммунитета, который характеризуется: снижением активности неспецифических и специфических киллеров, а также количества Т-лимфоцитов на фоне их высокой пролиферативной активности; изменением соотношения количества субпопуляций регуляторных Т-лимфоцитов в сторону превалирования супрессоров. Однако функциональная их активность — как неспецифических, так и специфических Т-супрессоров — низкая. Отмечается хелперно-амплификационная активация Т-лимфоцитов. При снижении циркулирующего пула В-лимфоцитов регистрируется активная генерация антителообразующих клеток в селезенке и накопление циркулирующих иммунных комплексов в организме. В отдаленные сроки после дегельминтизации (3–6 месяцев) состояние иммунореактивности организма существенно изменяется в положительную сторону, но дисбаланс в системе иммунитета остается. Кроме того, хроническая описторхозная инвазия приводит к активации пролиферативных процессов в протоковом эпителии, печени, лимфоузлах и в тканях других органов. На ее фоне существенно возрастает скорость роста сингенных опухолей и модифицируются свойства L-IFN. Полученные результаты диктуют необходимость разработки технологии иммунокоррекции как при подготовке пациентов к дегельминтизации, так и в постгельминтный период и использовать ее в качестве профилактики холангиокарциногенеза.

Ключевые слова: иммунный статус, иммунореактивность, иммунокомпетентные клетки, аллергические реакции, антигены, антитела, иммунные комплексы, описторхоз, хроническая/длительная описторхозная инвазия, пролиферативная активность, канцерогенез, холангиокарцинома.

Адрес для переписки:

Рыбка Ангелина Григорьевна
625003, Россия, г. Тюмень, ул. Володарского, д. 6,
ФГБОУ ВО Тюменский государственный университет.
Тел.: 8 (3452) 33-70-39; 8 (912) 382-32-59 (моб.).
E-mail: fond.quality.life@rambler.ru

Contacts:

Angelina G. Rybka
625003, Russian Federation, Tyumen, Volodarskogo str., 6,
Tyumen State University.
Phone: +7 (3452) 33-70-39; +7 (9123) 82-32-59 (mobile).
E-mail: fond.quality.life@rambler.ru

Библиографическое описание:

Рыбка А.Г. К вопросу о влиянии биотического фактора — инвазии трематоды *Opisthorchis felineus* — на состояние иммунного статуса организма и пролиферативную активность соматических клеток // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 3. С. 232–236.
doi: 10.15789/2220-7619-2016-3-232-236

Citation:

Rybka A.G. The biotic factor of trematod *Opisthorchis felineus* invasion influence on host immune status and somatic cells proliferative activity // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2016, vol. 6, no. 3, pp. 232–236. doi: 10.15789/2220-7619-2016-3-232-236

THE BIOTIC FACTOR OF TREMATOD *OPISTHORCHIS FELINEUS* INVASION INFLUENCE ON HOST IMMUNE STATUS AND SOMATIC CELLS PROLIFERATIVE ACTIVITY

Rybka A.G.

Tyumen State University, Tyumen, Russian Federation

Abstract. The paper confirms long-time opisthorchis invasion role as a risk factor of host immune system reconstitution as well as an important factor in holangiocarcinomas development. It was shown that opisthorchosis invasion primal stage induce host immune system reconstitution. Host immune B-cells system is activated by metacercaria antigens, while the same antigens inhibits T-cells activity. Opisthorchis metabolites stimulate proliferative mithogen-induced T-cells activity. Chronic opisthorchis invasion leads to immune system disbalance. It means: decrease of specific and non-specific natural killers activity, number of high proliferative activity T-lymphocytes and the shift of regulatory T-cells subset to suppressors prevalence. At the same time specific as well as non-specific T-suppressors functional ability is very low. It was shown T-cells helper-amplifier activation. Despite of circulating B-cells decrease the antibody produced cells number is spleen increases significantly at the same time with circulating immune complexes accumulation. Even 3–6 month after dehelmintisation the immune system disbalance decreases but lefts. In addition, chronic opisthorchis invasion leads to the proliferative processes activation in ductal epithelium, liver, lymph nodes and in other organs which leads to cancer proliferation. According to the results obtained the opisthorchis infected patients needs to be immunocorrected before as well as after dehelmintisation for holangiocarcinogenesis profylaxis.

Key words: *immune status, immune response, immunocompetent cells, allergic reactions, antigens, antibodies, immune complexes, opisthorchiasis, chronic/long opisthorchosis invasion, proliferative activity, carcinogenesis, cholangiocarcinoma.*

Введение

В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что нарушение механизмов иммунного ответа организма способствует развитию злокачественных опухолей. По мнению некоторых авторов [11] в основе морфологических изменений печени при описторхозе лежит аллергическая реакция на описторхи как на антиген. Иммунную перестройку организма при описторхозной инвазии отражают паразитарные гранулемы [2]. Они представляют собой локальные участки экссудативно-продуктивного воспаления, формирующегося вокруг скопления яиц сибирской двуустки. Яйца паразита в толщу стенки протоков проникают в результате деструкции эпителиальной выстилки последних мигрирующими сибирскими двуустками, а также лимфогенного заноса в толщу стенки и перипортальную соединительную ткань. Считают, что иммунологические реакции играют роль в поражении желчных ходов. Зубов Н.А. и Муканов В.Н. [8] установили, что сужение и облитерация желчных протоков с развитием ретенциональных холангиоэктазов является результатом образующихся в ранней фазе болезни паразитарных гранулем. Повреждающее действие аллергических реакций может быть также связано с образованием иммунных комплексов (ИК), которые оказывают действие в различных тканях [1]. Накопление ИК на базальной мембране эндотелия сосудов при описторхозе было отмечено В.Я. Глумовым с соавт. [5].

В значительной степени роль аллергического фактора в патогенезе описторхоза подтверждается и данными иммуноморфологических и цитохимических исследований, проведенных А.Г. Гиновкером [4].

В работе Н.А. Жукова [7], посвященной изучению иммунных механизмов развития хронического панкреатита при описторхозе, получены свидетельства сенсibilизации Т-лимфоцитов к тканям собственной поджелудочной железы. Сенсibilизация Т-лимфоцитов возникает на общем аллергическом фоне, вызванном реакцией гиперчувствительности на присутствующих в организме гельминтов.

При описторхозной инвазии, кроме местных иммунопатологических реакций, наблюдается дисбаланс иммунореактивности организма по показателям периферической крови. Нами у больных хроническим описторхозом в конце 70-х гг. прошлого века было выявлено снижение количества Т-лимфоцитов. Позднее установлено, что их уровень падает, в основном, за счет CD4. Иммунорегуляторный индекс (соотношение CD4/CD8) составил $1,2 \pm 0,2$ ($< 25,0\%$), тогда как в контрольной группе — $1,6 \pm 0,3$. Зарегистрировано и снижение CD22, в среднем, на 10,5%. Наряду с этим выявлено повышенное содержание тяжелых циркулирующих иммунных комплексов (на 145%, $p < 0,001$), а также суммы легких и тяжелых (на 59,8%, $p < 0,001$).

Дисбаланс иммунореактивности у человека при хроническом описторхозе отмечают многие авторы [2].

При заболевании описторхозом наступает перестройка иммунологической системы организма, на фоне которой у человека легко формируется предрасположенность к другим заболеваниям [11].

В начале 70-х гг. прошлого века профессором А.А. Шайном [13] на основании эпидемиологических исследований, проведенных в Обь-Иртышском бассейне, установлено, что в зоне

распространения описторхозной инвазии заболеваемость холангиоцеллюлярным раком печени повышена в 10–13 раз, чем среди неинвазированного населения других регионов страны. В связи с этим описторхоз рассматривают как факультативный предрак печени. В патогенезе холангиокарцином на фоне описторхозной инвазии играет роль комплекс факторов риска, среди которых определенное значение имеет нарушение иммунного ответа организма.

Учитывая тот факт, что нарушение механизмов иммунного ответа способствует развитию злокачественных новообразований [3] пришли к выводу, что одним из ведущих промоторных факторов в патогенезе первичного холангиоцеллюлярного рака печени на фоне хронического описторхоза являются нарушения функционирования иммунной системы.

Цель исследования — изучить закономерности влияния биотического фактора — инвазии трематоды *Opisthorchis felinus* на иммунологическую реактивность организма и разработать подходы к повышению противоопухолевой/иммунной защиты организма.

Материалы и методы

В качестве объектов для изучения влияния описторхозной инвазии на различные системы регуляции гомеостаза организма использовали мышей линий СВА/Лас, А/сн, F1 [СВА/Лас × С57В1/6], С57В1/6, Balb/c (Y).

Выделенные из рыбы стандартным методом метацеркарии с помощью глазной пипетки вводили в ротовую полость мышам (40 шт. в 0,9% NaCl). Инвазия животных описторхами подтверждалась следующими признаками: увеличение холедоха в размерах, изменение цвета печени и наличие гельминтов (взрослых особей) в гепатобилиарном тракте.

Все исследования на основе пролиферативной активности (ПА) соматических клеток (процесса синтеза ДНК) осуществляли с использованием меченого тритием тимидина (³H-тимидин) стандартным методом автордиографии и радиометрии.

Функцию натуральных киллеров (NK) тестировали с помощью микротеста *in vitro* (клетки-мишени: EL-4, K-562, MOLT и аллогенные клетки костного мозга, меченных хромом-51 (⁵¹Cr) по высвобождению ⁵¹Cr в супернатант (радиометрия) или по способности цитостазировать клетки-мишени, меченные ³H-тимидном.

Функциональную активность специфических Т-киллеров определяли по способности сенсibilизированных аллогенными клетками костного мозга лимфоцитов из лимфоузлов инактивировать клетки-мишени в летально облуженном реципиенте (подсчет количества

колониеобразующих единиц/КОЕ в селезенке) или в микротесте *in vitro* по способности цитостазировать клетки-мишени, меченные ³H-тимидином.

Неспецифическую супрессорную активность митоген-индуцированных Т-лимфоцитов (КонА) определяли по их способности тормозить пролиферацию аллогенных лимфоцитов.

Специфическую супрессорную активность лимфоцитов мышей, иммунизированных аллогенными клетками, определяли по их способности тормозить пролиферацию сингенных лимфоцитов, в присутствии стимуляторов, в сравнении с лимфоцитами неиммунизированных мышей (MLC-тест).

Количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке определяли методом локального гемолиза в геле.

Для чистоты эксперимента по изучению влияния метаболитов метацеркарий и описторхов на ткани органов и системы регуляции гомеостаза организма, метацеркарии и описторхи культивировались *in vivo* (внутрибрюшинно) в диффузионных камерах, созданных из 2-х тефлоновых колец с диаметром 14 и 18 мм и миллипорового фильтра.

Статистические расчеты средних показателей, стандартного отклонения, стандартной ошибки выполняли с использованием общепринятых статистических методов.

Результаты и обсуждение

Нами изучена иммунореактивность (ИР) организма у мышей линий СВА/Лас, А/сн, F1 [СВА/Лас × С57В1/6], С57В1/6, Balb/c (Y), инвазированных описторхами, со сроками инвазии 4–6 месяцев.

Количество АОК у мышей линий ♀ СВА/Лас и ♀ А/сн со сроком описторхозной инвазии 6 месяцев было выше контроля на 126,0% ($p < 0,05$) соответственно.

Пролиферативная активность митоген-индуцированных лимфоцитов из лимфоузлов у вышеуказанных животных была значительно выше (на 43,1%, $p < 0,05$), чем в контроле. Это свидетельствует об активации функции хелперов.

Активность NK-клеток у описторхозных мышей падает, индекс цитотоксичности (ИЦТ, ⁵¹Cr) при одномесечной и двухмесечной инвазии ниже контроля на 66,2% ($p < 0,05$) и на 18,9% ($p < 0,05$) соответственно. При шестимесечной инвазии у животных индекс цитостаза (ИЦ, ³H-тимидин) значительно выше (на 175%) по сравнению с контролем. Данные показывают, что эффекторная активность NK снижена на 175%. Отмечается также понижение уровня функциональной активности специфических Т-киллеров (КОЕ, ИЦ).

Эндогенная супрессорная неспецифическая активность митоген-индуцированных лимфоцитов (Кона) у инвазированных мышей выявлена в 33,3% случаев (индекс супрессии (ИС) = $8,0 \pm 1,3$ против контроля $24,9 \pm 4,9$), тогда как хелперно-амплификационная активность наблюдалась в 67,0% случаев (ИТх-а = $99,5 \pm 15,3$).

Специфическая супрессия Т-лимфоцитов у описторхозных мышей выявлена в 100% случаев, но ИС значительно ниже контроля (на 53,2%, $p < 0,05$). Это говорит о снижении функциональной активности Т-супрессоров (Т-s).

Таким образом, при длительной описторхозной инвазии в организме на фоне сниженной супрессорной активности лимфоцитов наблюдается возрастание их хелперно-амплификационной активности. Это обуславливает высокую генерацию АОК в селезенке и высокую пролиферацию митоген-индуцированных лимфоцитов в лимфоузлах на фоне снижения их количества в периферической крови [14, 15]. Необходимо отметить, что наряду с активной генерацией АОК в селезенке отмечается также снижение пула В-лимфоцитов (В-л) и накопление циркулирующих иммунных комплексов в периферической крови. Дисбаланс иммунореактивности организма дополняется угнетением NK и функциональной активности специфических Т-киллеров.

Кроме того, нами в эксперименте на мышях ♀ линии А/Sn весом 14–16 г установлено, что изменение состояния иммунной системы опосредуется уже на первых этапах описторхозной инвазии: антигены метацеркариев (при попадании в организм) активируют В-систему иммунитета (АОК) и ингибируют активность клеточного иммунитета (РБТЛ на ФГА/Кона). Метаболиты описторхов (культивирование в диффузионных камерах *in vivo*) на фоне низкой функциональной активности лимфоцитов (NK) стимулируют ПА митоген-индуцированных Т-лимфоцитов. Львовой М.Н. с соавт. определено 37 многофункциональных белков — компонентов экскреторно-секреторного продукта *O. felineus* [9].

Наряду с этим, хроническая описторхозная инвазия приводит к активации пролиферативных процессов (^3H -тимидин) не только в протоковом эпителии и печени, но и в тканях других органов: почки, поджелудочная железа, селезенка, лимфоузлы и др. Особенности ПА тканей органов: ПА клеток костного мозга всегда угнетена, лимфоузлы и селезенка в разные сроки инвазии в отношении ПА всегда в оппозиционном состоянии. Проллиферация тканей активируется метаболитами метацеркариев и поддерживается метаболитами взрослых описторхов.

Скорость роста сингенных опухолей (РШМ-5, АКАТОЛ, КСМЛ) у инвазированных инбредных мышей также значительно возрастает (на 50–650%).

Значительный интерес для понимания процессов холангиокаncerогенеза представляют данные о том, что при длительной описторхозной инвазии ингибирующий в отношении злокачественного роста эффект лейкоцитарного интерферона (L-IFN) модифицируется в активационный.

Приведенные результаты исследования дают основание полагать, что дисбаланс иммунореактивности организма, длительно инвазированного кошачьей двуусткой, на фоне постоянного поддержания пролиферативной активности соматических клеток метаболитами описторхов (особенно в месте их обитания — в желчных протоках) опосредует снижение антитуморогенных его свойств [10] и является одним из ведущих промоторных факторов холангиокаncerогенеза.

В связи с тем, что иммунный статус у больных с хронической описторхозной инвазией после дегельминтизации, наряду с тенденцией некоторых показателей к положительной динамике, не восстанавливается даже в отдаленные сроки (3–12 месяцев), целесообразно сформировать методологические подходы к коррекции состояния иммунной системы как при подготовке к дегельминтизации, так и в постгельминтный период как одной из важных систем регуляции гомеостаза организма [7, 12]. По нашему мнению, иммунокоррекция должна быть направлена на: повышение количества и функциональной активности макрофагов, восстановление соотношения иммунорегуляторных клеток, повышение активности супрессоров, снижение концентрации IgG, нормализацию антителогенеза, стимуляцию бактерицидной активности организма.

В связи с тем, что неспецифические модификаторы иммунитета действуют на разные фазы иммунного ответа (индуктивную, пролиферативную, эффекторную) и различные звенья иммунной системы (Т-, В-, макрофаги и др.), для неспецифической иммунотерапии наиболее целесообразно использование комплекса иммуномодуляторов, которые следует подбирать с учетом индивидуальных показателей иммунного статуса и патологического состояния организма (основное и сопутствующие заболевания). При этом необходима коррекция разовой и курсовой доз иммуностропных препаратов. Возможно, что наиболее результативной окажется иммунокоррекция с использованием невысоких доз лекарственных препаратов при пролонгировании курса лечения.

Список литературы/References

1. Адо А.Д. Общая аллергология: руководство для врачей. М.: Медицина, 1978. 464 с. [Ado A.D. Obshchaya allergologiya: rukovodstvo dlya vrachei [General allergology: a guide for physicians]. Moscow: Medicine, 1978, 464 p.]
2. Белозеров Е.С., Шувалова Е.П. Описторхоз. М.: Медицина, 1981. 128 с. [Belozеров E.S., Shuvalova E.P. Opistorkhoz [Opisthorchiasis]. Moscow: Medicine, 1981, 128 p.]
3. Бернет Ф. Клеточная иммунология. М.: Мир, 1971. 542 с. [Burnet F. Kletochnaya immunologiya [Cellular immunology]. Moscow: Mir, 1971, 542 p.]
4. Гиновкер И.А. Иммуноморфологические и цитохимические изменения лимфоидных органов при экспериментальном описторхозе // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 1971. № 6. С. 657–663. [Ginovker I.A. Immunomorphological and cytochemical changes of lymphoid organs in experimental opisthorchiasis. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni = Medical Parasitology and Parasitic Diseases*, 1971, no. 6, pp. 657–663. (In Russ.)]
5. Глумов В.Я., Урошников А.С., Чураков А.Н. Морфогенез и патогенез поражений внутрипеченочных сосудов в острой и хронической стадиях экспериментального описторхоза // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 1986. № 5. С. 24–29. [Glumov V.Ya., Uroshnikov A.S., Churakov A.N. The morphogenesis and pathogenesis of the intrahepatic vascular lesions in acute and chronic stages of experimental opisthorchiasis. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni = Medical Parasitology and Parasitic Diseases*, 1986, no. 5, pp. 24–29. (In Russ.)]
6. Жуков Н.А., Климова С.К. Аллергический дегельминтизационный синдром при описторхозе // Терапевтический архив. 1993. № 11. С. 49–53. [Zhukov N.A., Klimova S.K. Allergic degelmintization syndrome in opisthorchiasis. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic archive*, 1993, no. 11, pp. 49–53 (In Russ.)]
7. Жулай Г.А., Олейник Е.К. Регуляторные Т-клетки и канцерогенез // Иммунология. 2013. Т. 34, № 1. С. 61–64. [July G.A., Oleinik E.K. Regulatory T-cells and carcinogenesis. *Immunologiya = Immunology*, 2013, vol. 34, no. 1, pp. 61–64. (In Russ.)]
8. Зубов Н.А., Муканов В.Н. Паразитарные гранулемы в стенке желчных протоков при экспериментальном описторхозе // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 1976. Т. 45, № 3. С. 352–355. [Zubov N.A. Mukanov V.N. Parasitic granulomas in the wall of bile ducts in experimental opisthorchiasis. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni = Medical Parasitology and Parasitic Diseases*, 1976, vol. 45, no. 3, pp. 352–355. (In Russ.)]
9. Львова М.Н., Дужак Т.Г., Центалович Ю.П., Катохин А.В., Мордвинов В.А. Секретом мариты печеночного сосальщика *Opisthorchis felinus* // Паразитология. 2014. Т. 48, вып. 3. С. 169–184. [Lvova M.N., Duzhak T.G., Centalovich Y.P., Katohin A.V., Mordvinov V.A. Secretome of the adult liver fluke *Opisthorchis felinus*. *Parazitologiya = Parasitology*, 2014, vol. 48, no. 3, pp. 169–184. (In Russ.)]
10. Малайцев В.В., Богданова И.М. Индуцируемая опухолевыми клетками активация системы врожденного иммунитета в популяции клеток селезенки интактных мышей *in vitro* // Иммунология. 2014. Т. 35, № 5. С. 247–250. [Malaycev V.V., Bogdanova I.M. Induced by tumor cells activation of the innate immune system in the population of spleen cells of intact mice *in vitro*. *Immunologiya = Immunology*, 2014, vol. 35, no. 5, pp. 247–250. (In Russ.)]
11. Озерецковская Н.Н. Органная патология в острой стадии тканевых гельминтозов // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2000. № 3. С. 3–7. [Ozeretskovskaya N.N. Organ pathology in the acute stage of tissue helminths. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni = Medical Parasitology and Parasitic Diseases*, 2000, no. 3, pp. 3–7 (In Russ.)]
12. Харченко Е.П. Канцерогенез: иммунная система и иммунотерапия // Иммунология. 2011. Т. 32, № 1. С. 50–56. [Kharchenko E.P. Carcinogenesis: immune system and immunotherapy. *Immunologiya = Immunology*, 2011, vol. 32, no. 1, pp. 50–56. (In Russ.)]
13. Шайн А.А., Шаназаров Н.А., Бабинов Б.Н., Федоров Н.М., Левина Е.С., Сабиров А.Х., Синяков А.Г., Шунько Е.Л., Кондратьев Н.П. Кафедра онкологии Тюменского ГМА. Сорок лет научно-исследовательской и педагогической работы // Тюменский медицинский журнал. 2010. № 2. С. 8–14. [Shayn A.A., Shanazarov N.A., Babinov B.N., Fedorov N.M., Levina E.S., Sabirov A.H., Sinyakov A.G., Shun'ko E.L., Kondratyev N.P. Department of Oncology in Tyumen State Medical Academy. Forty years of research and educational experience. *Tyumenskii meditsinskii zhurnal = Tyumen Medical Journal*, 2010, no. 2, pp. 8–14. (In Russ.)]
14. Maruyama T., Kono K., Mizukami Y. Distribution of Th17 cells and FoxP3(+) regulatory T-cells in tumor-infiltrating lymphocytes, tumor-draining lymph nodes and peripheral blood lymphocytes in patients with gastric cancer. *Cancer Sci.*, 2010, vol. 101, pp. 1947–1954. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01624.x
15. Yang Z.Z., Ansell S.M. The role of Treg cells in the cancer immunological response. *Am. J. Immunol.*, 2009, vol. 5, no. 1, pp. 17–28. doi: 10.4110/in.2009.9.6.209

Автор:

Рыбка А.Г., к.б.н., старший научный сотрудник, доцент кафедры физической географии и экологии Института наук о Земле ФГБОУ ВО Тюменский государственный университет, г. Тюмень, Россия.

Author:

Rybka A.G., PhD (Biology), Senior Researcher, Associate Professor, Department of Physical Geography and Ecology, Institute of Earth Sciences, Tyumen State University, Tyumen, Russian Federation.

Поступила в редакцию 12.06.2016
Принята к печати 23.06.2016

Received 12.06.2016
Accepted 23.06.2016