

## СУБПОПУЛЯЦИИ МОНОЦИТОВ У ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И У ПАЦИЕНТОВ С СЕПСИСОМ

**Калашникова А.А., Ворошилова Т.М., Чиненова Л.В.,  
Давыдова Н.И., Калинина Н.М.**

*ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» Министерства  
РФ по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных  
бедствий, Санкт-Петербург, Россия*

**Резюме.** Моноцитам принадлежит ключевая роль в развитии адекватного иммунного ответа при бактериальной инфекции благодаря выполнению ими фагоцитарной, антигенпрезентирующей и секреторной функции. Выделяют три субпопуляции моноцитов: классические CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>, переходные CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> и неклассические CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, различающиеся фенотипически и функционально. Соотношение субпопуляций изменяется по мере развития противобактериального ответа. Цель исследования: изучить особенности фенотипа субпопуляций моноцитов у пациентов с сепсисом и изменение их соотношения в зависимости от наличия в крови бактерий; оценить вклад субпопуляций моноцитов в продукцию цитокинов.

В динамике обследовано 16 пациентов с сепсисом (10 мужчин и 6 женщин, возраст 58±14 лет, SOFA 9,4±2,1 баллов, проанализировано 44 образца крови). Контрольная группа включала условно здоровых лиц (n = 23, 12 мужчин и 11 женщин, возраст 51±13 лет). Выполняли: бактериологический посев, определение абсолютного и относительного количества субпопуляций классических, переходных и неклассических моноцитов и экспрессию ими HLA-DR и CD64, определение концентрации IL-6, TNFα, IL-1β, IL-10 в сыворотке.

При сепсисе увеличивается абсолютное количество моноцитов, снижается доля классических и увеличивается относительное и абсолютное количество переходных клеток, субпопуляция неклассических моноцитов меняется незначительно. Соотношение субпопуляций зависит от наличия бактерий в крови: увеличение доли переходных клеток наблюдается при положительных результатах бактериологических посевов. При элиминации бактерий соотношение субпопуляций восстанавливается. При сепсисе увеличивается плотность экспрессии LPS-рецептора CD14, IgG-рецепторов CD16 и CD64, особенно выражено – в субпопуляциях переходных и неклассических моноцитов. Во всех субпопуляциях моноцитов снижается экспрессия HLA-DR, наиболее заметно среди классических моноцитов, наименее – на переходных клетках. Отмечается значительное повышение содержания в сыворотке цитокинов IL-6, IL-1β, TNFα и IL-10. Определена прямая взаимосвязь между абсолютным количеством классических моноцитов и концентрацией IL-6, а также выраженностью полиорганной дисфункции. По-видимому, повышение абсолютного количества классических моноцитов и IL-6 может быть косвенным критерием оценки степени активации эндотелия – активного продуцента ростовых факторов миелоидного ростка и IL-6. Прямая взаимосвязь между долей CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клеток и концентрацией IL-10 в сыворотке свидетельствует о роли переходных моноцитов в его про-

### Адрес для переписки:

*Калашникова Анастасия Андреевна  
ФГБУ «Всероссийский центр экстренной  
и радиационной медицины имени А.М. Никифорова»  
Министерства РФ по делам гражданской обороны,  
чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий  
стихийных бедствий  
194044, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика  
Лебедева, 4/2.  
Тел.: 8 (921) 864-23-86.  
E-mail: petkova\_nas@mail.ru*

### Address for correspondence:

*Kalashnikova Anastasia A.  
A. Nikiforov Russian Centre of Emergency  
and Radiation Medicine  
194044, Russian Federation, St. Petersburg,  
Acad. Lebedev str., 4/2.  
Phone: 7 (921) 864-23-86.  
E-mail: petkova\_nas@mail.ru*

### Образец цитирования:

*А.А. Калашникова, Т.М. Ворошилова, Л.В. Чиненова,  
Н.И. Давыдова, Н.М. Калинина «Субпопуляции  
моноцитов у здоровых лиц и у пациентов с сепсисом»  
// Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 6.  
С. 815-824. doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-815-824  
© Калашникова А.А. и соавт., 2018*

### For citation:

*A.A. Kalashnikova, T.M. Voroshilova, L.V. Chinenova,  
N.I. Davydova, N.M. Kalinina "Monocyte subsets in healthy  
adults and sepsis patients", Medical Immunology (Russia)/  
Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 6,  
pp. 815-824. doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-815-824  
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-6-815-824*

дукции. IL-10 подавляет антигенпрезентирующую функцию переходных клеток – экспрессию молекул HLA-DR. О последнем свидетельствует обратная зависимость между концентрацией IL-10 и плотностью экспрессии HLA-DR на CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клетках. Определена обратная корреляция между степенью полиорганной дисфункции и относительным количеством HLA-DR<sup>+</sup> моноцитов. Чем выраженнее преобладание среди моноцитов субпопуляции классических, тем заметнее снижение этого показателя. Изучение соотношения субпопуляций моноцитов, особенностей их фенотипа при сепсисе помогает понять механизмы противобактериальной защиты. Мониторинг количества классических моноцитов и концентрации в сыворотке IL-6 необходим для комплексной оценки воспалительного ответа при сепсисе. Определение экспрессии HLA-DR на моноцитах позволяет оценить выраженность иммуносупрессии у тяжелобольных пациентов.

*Ключевые слова:* субпопуляции моноцитов, сепсис, цитокины, классические моноциты, переходные моноциты, воспаление

## MONOCYTE SUBSETS IN HEALTHY ADULTS AND SEPSIS PATIENTS

**Kalashnikova A.A., Voroshilova T.M., Chinenova L.V., Davydova N.I., Kalinina N.M.**

*A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation*

**Abstract.** Monocytes play a key role in the development of immune response in bacterial infection, because of their phagocytic, antigen-presenting and secretory functions. There are three subpopulations of monocytes: “classical” CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>, “intermediate” CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, and “nonclassical” CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>. These monocyte subtypes have different phenotypes and functions. The ratio of appropriate subpopulations varies with development of the antibacterial response. The aim of the present research was to study phenotypes of the monocyte subpopulations in the patients with sepsis, and changes in the monocyte subpopulation ratio, depending on the presence of bacteria in circulating blood of the patients, as well as to estimate contribution of the monocyte subpopulations to the cytokine production.

We observed 16 patients with sepsis (10 men and 6 women; mean age, 58±14 years, SOFA 9.4±2.1; a total of 44 blood samples) examined in dynamics. The control group included healthy adults (n = 23, 12 men and 11 women; mean age, 51±13 years). Laboratory studies included bacteriological cultures, determination of absolute and relative numbers of subpopulations of classical, intermediate and non-classical monocytes and their expression of HLA-DR and CD64, determination of IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 concentration in blood serum.

Absolute number of monocytes was increased in the sepsis patients, the ratio of classical monocytes was also increased, like as relative and absolute numbers of intermediate cells. Meanwhile, the subpopulation of non-classical monocytes did not change significantly. The monocyte subpopulation ratio depended on the presence of bacteria in blood, i.e., a higher proportion of intermediate cells was observed in the samples positive for bacteria in blood cultures. The ratio of subpopulations was restored after elimination of bacteria from the circulation. The expression density of LPS receptor (CD14), IgG receptors (CD16 and CD64) was found to be increased, especially in the subpopulations of intermediate and nonclassical monocytes. In all subpopulations of monocytes, expression of HLA-DR is reduced, most notably in classical monocytes, least in intermediate cells. There was a significant increase in serum levels of IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and IL-10 cytokines. Direct correlation between the absolute number of classical monocytes and IL-6 concentration was revealed, as well as intensity of multiple organ dysfunction. Increase in absolute amount of classical monocytes and IL-6 concentration might serve as an indirect criterion for evaluation of endothelial activation, an active producer of IL-6 and myeloid cell growth factors. A direct correlation between the percentage of CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> cells and IL-10 concentration in blood serum indicates to an important role of intermediate monocytes in IL-10 production. IL-10 suppresses the antigen-presenting function of intermediate cells, namely, expression of HLA-DR molecules, as suggested by inverse correlation between the IL-10 concentration and HLA-DR expression density on CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> cells. We have also determined an inverse correlation between the degree of multi-organ dysfunction and relative amount of HLA-DR<sup>+</sup> monocytes. The larger was a classical monocyte subpopulation, the more noticeable was a decrease of this index. The studies in ratios of monocyte subpopulations help to understand the mechanisms of antibacterial protection in sepsis. Monitoring of classical monocyte numbers and serum concentrations of IL-6 is necessary for a comprehensive assessment of inflammatory response in sepsis. Determination of HLA-DR expression on monocytes allows us to evaluate the intensity of immune suppression in critically ill patients.

*Keywords:* monocyte subsets, sepsis, cytokines, classical monocytes, intermediate monocytes, inflammation

## Введение

Моноциты – клетки врожденного иммунитета, входящие в состав мононуклеарно-фагоцитарной системы, включающей также макрофаги, дендритные клетки и их костномозговые клетки-предшественники. Популяция циркулирующих в периферической крови моноцитов составляет 5–10% от лейкоцитов. Дальнейшая дифференцировка моноцитов в макрофаги или дендритные клетки осуществляется после миграции во внутренние органы [19]. Основными функциями моноцитов являются фагоцитоз апоптотических телец, распознавание молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением тканей (DAMP) или с патогенами (PAMP), синтез цитокинов и презентация антигенов клеткам адаптивного иммунитета.

В зависимости от экспрессии высокоаффинного рецептора к LPS (CD14) и низкоаффинного рецептора к IgG (CD16) принято выделять три субпопуляции моноцитов: классические CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>, переходные CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> и неклассические CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> [20]. Субпопуляции моноцитов различаются по экспрессии молекул, опосредующих распознавание, фагоцитоз и представление антигенов, что обуславливает их функциональные особенности.

В норме классические моноциты CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> составляют около 80–85% всей популяции моноцитов. Выраженная экспрессия этими клетками скавенджер-рецепторов [12] свидетельствует о том, что их основная функция – фагоцитоз апоптотических телец. Высокая экспрессия классическими моноцитами рецептора CD11b/CD18 (CR3) позволяет им участвовать в фагоцитозе возбудителей, опсонизированных компонентами комплемента [16]. Классические моноциты экспрессируют CD64 – высокоаффинный рецептор IgG. У неактивированных клеток этот рецептор связан с иммуноглобулином. CD64 располагается в липидных рафтах клеточной мембраны [4] и ассоциирован с рецептором к IFN $\gamma$ . Связь CD64-IgG позволяет поддерживать сигнальные пути в преактивированном состоянии и способствует быстрому проведению сигнала при связывании IFN $\gamma$  с рецептором [5, 17, 18]. Участие CD64 в фагоцитозе IgG-опсонизированных антигенов без предварительной активации моноцитов является сомнительным [12, 17]. Среди популяций моноцитов классические моноциты характеризуются наименее выраженной экспрессией HLA-DR и костимуляторных молекул CD80 и CD86 [12], что, возможно, отражает их более скромную роль в антигенпрезентации по сравнению с остальными субпопуляциями моноцитов. Низкая экспрессия этими клетками TLR4 ограничивает их участие в распознавании DAMP и PAMP. В ответ на стимуляцию LPS или *S. aureus* классические моноциты продуцируют цитокины TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 и др. [16].

Переходные моноциты CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> составляют одну из минорных субпопуляций. Принято считать, что эти клетки образуются в результате активации и дифференцировки классических моноцитов [12]. Их основные функции: IgG-опосредованный фагоцитоз, распознавание PAMP и синтез цитокинов, антигенпрезентация. Реализация этих функций возможна благодаря высокой экспрессии CD64 и CD16, CD14 и TLR, HLA-DR и костимуляторных молекул [10, 12, 16]. Переходные моноциты CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> продуцируют как провоспалительные цитокины (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и др.), так и противовоспалительный IL-10. В этой популяции клеток отмечается максимальная экспрессия TNF $\alpha$  и IL-10 после стимуляции LPS или *S. aureus*. Переходные моноциты уступают классическим в плотности экспрессии скавенджер-рецепторов и CR3.

Неклассические моноциты CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> с минимальной плотностью экспрессируют CD14 и скавенджер-рецепторы, что ограничивает их участие в распознавании комплекса липополисахарида + ЛПС-связывающий белок и элиминации апоптотических клеток. Неклассические моноциты с максимальной плотностью экспрессируют HLA-DR и костимуляторные молекулы. Антигенпрезентация – одна из основных их функций. Выраженная экспрессия TLR4 приводит к активации этих клеток при взаимодействии с DAMP и PAMP и синтезу цитокинов. В зарубежных исследованиях отмечается высокий уровень продукции TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$  неклассическими моноцитами в ответ на стимуляцию LPS и *S. aureus*, а также низкий уровень продукции IL-10 [12, 16].

Фагоцитарная, антигенпрезентирующая и секреторная функции моноцитов обуславливают их ключевую роль в иммунном ответе при бактериальной инфекции. Благодаря секреции монокинов и других продуктов моноциты осуществляют иммунорегуляцию, участвуют в кроветворении, гемостазе и фибринолизе.

В нашем исследовании были сопоставлены особенности фенотипа и продукции цитокинов субпопуляциями моноцитов у пациентов с сепсисом и здоровых лиц. Проведены динамические исследования, в результате которых определена взаимосвязь между увеличением содержания переходных моноцитов в периферической крови септических больных и бактериемией.

## Материалы и методы

Исследовали периферическую кровь пациентов с сепсисом отделений реанимации и интенсивной терапии ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России (ВЦЭРМ МЧС России). Диагноз «сепсис» устанавливался в соответствии с клиническими критериями (ACCP/SCCM Consensus Conference committee, 1992). Оценку органной дисфункции проводили в бал-

лах по шкале SOFA. Обследовано 16 пациентов с сепсисом, 10 мужчин и 6 женщин, средний возраст  $58 \pm 14$  лет, SOFA  $9,4 \pm 2,1$  баллов. У 14 пациентов кровь брали 1-4 раза в зависимости от длительности пребывания в отделении (в среднем 1-2 раза в неделю). Проанализировано 23 образца крови, каждый раз выполняли исследования субпопуляций моноцитов и однократно каждому пациенту – бактериологический посев крови и определение содержания цитокинов. У двух человек взятие крови осуществлялось каждые 2-3 дня, проанализирован 21 образец, каждый раз выполняли иммунологические исследования и бактериологические посеvy крови.

Контрольная группа включала условно здоровых лиц ( $n = 23$ ) без острой соматической патологии на момент обследования, проходивших плановое диспансерное обследование во ВЦЭРМ МЧС России. Контрольная группа была сопоставима по полу и возрасту (12 мужчин и 11 женщин, средний возраст  $51 \pm 13$  лет).

Обследования включали: бактериологический посев, определение абсолютного и относительного количества субпопуляций классических, переходных и неклассических моноцитов и экспрессию ими HLA-DR и CD64, определение концентрации цитокинов в сыворотке.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета программ Statistica 10.0. Для расчета взаимосвязей использовали непараметрический корреляционный анализ по Спирмену. Для сравнения групп использовали критерий Манна–Уитни. Результаты представлены в таблицах в виде средних значений  $\pm$  стандартное отклонение.

#### **Клинический анализ крови**

Кровь брали из локтевой вены, в качестве антикоагулянта использовали ЭДТА. Пробы анализировали на гемализаторе LH750 (Beckman Coulter, США).

#### **Бактериологический посев**

Сбор материала проводили стандартными методами: кровь заседали в две пары флаконов Bac/Alert 3D (БиоМерье, Франция), инкубировали. Выделенные микроорганизмы идентифицировали с использованием бактериологического анализатора VITEK2 (БиоМерье, Франция), определение чувствительности к антибактериальным препаратам проводили автоматическим методом, применяя соответствующие карты.

#### **Определение относительного и абсолютного количества субпопуляций моноцитов**

Кровь брали из локтевой вены, в качестве антикоагулянта использовали ЭДТА. Применяли антитела: IgG1FITC, CD64FITC, CD14PE, CD16PC5, HLA-DRPC7, CD45APC-AF750 (Beckman Coulter, США). Инкубировали 15 мин в темноте. Для лизиса эритроцитов использовали VersaLyse. Пробы анализировали на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США). Популяцию моноцитов определяли как CD45<sup>+</sup>SSC<sup>mod</sup>CD14<sup>+</sup> клетки. Накапливали

до 5000 событий в моноцитарном регионе. В зависимости от плотности экспрессии CD16 среди CD14<sup>+</sup> моноцитов выделяли три субпопуляции: CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (классические), CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (переходные), CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> (неклассические) (рис. 1Г). Для каждой из субпопуляций определяли относительное количество клеток, экспрессирующих CD64 или HLA-DR и плотность экспрессии этих молекул (рис. 2А, Б, В).

Абсолютное количество субпопуляций моноцитов рассчитывали с использованием данных клинического анализа крови.

#### **Определение содержания цитокинов**

Методом твердофазного ИФА оценивали содержание в сыворотке крови IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IL-10 (АО «Вектор-Бест», Россия).

## **Результаты**

При сепсисе по сравнению с нормой отмечается увеличение абсолютного количества моноцитов, снижение доли субпопуляции классических моноцитов и увеличение относительного и абсолютного количества переходных клеток, субпопуляция неклассических моноцитов меняется незначительно (табл. 1).

Фенотип субпопуляций моноцитов у пациентов с сепсисом имеет ряд особенностей (табл. 2).

#### **Экспрессия поверхностных антигенов моноцитами условно здоровых лиц**

У здоровых лиц преобладают классические моноциты, на которые приходится более 80%. Переходные и неклассические моноциты составляют минорные субпопуляции (табл. 1).

Плотность экспрессии CD14 классическими и переходными моноцитами сопоставима, тогда как неклассические моноциты экспрессируют CD14 значительно слабее (табл. 2).

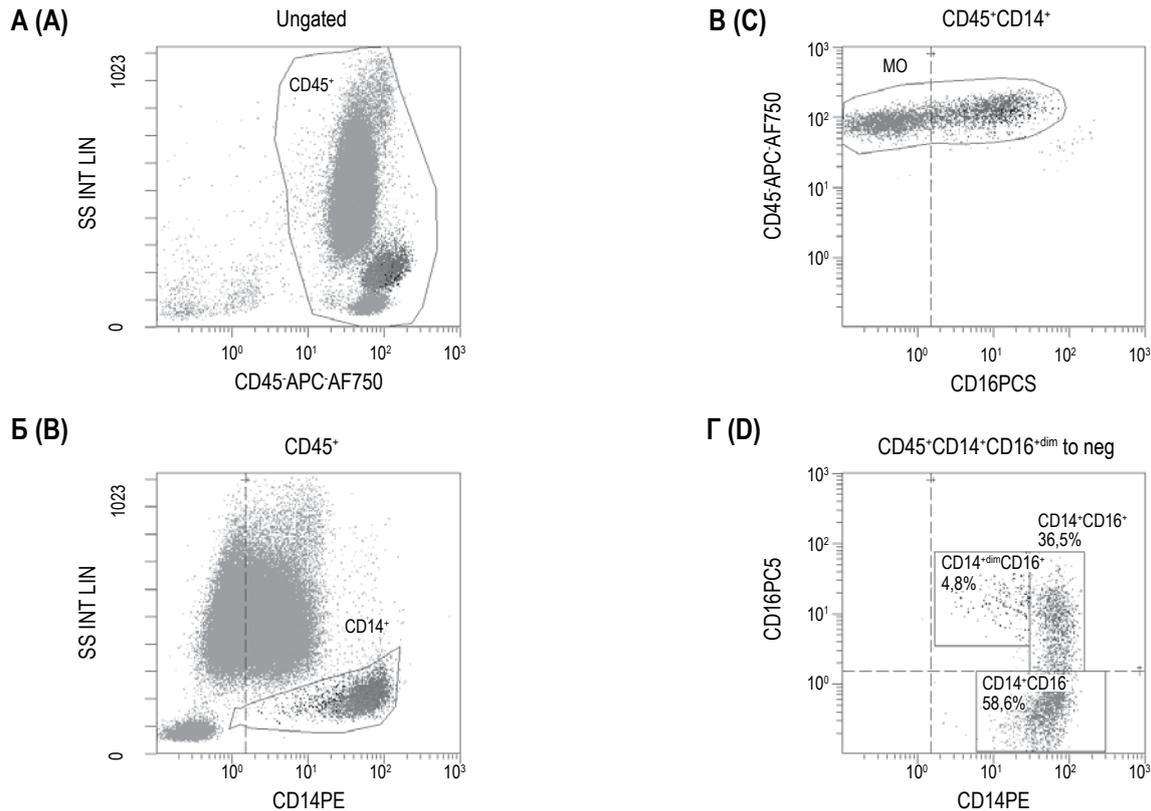
CD64 экспрессируют с высокой плотностью практически все клетки субпопуляций классических и переходных моноцитов. Среди неклассических моноцитов только 40% клеток экспрессируют этот рецептор, причем плотность экспрессии ими CD64 более чем в три раза уступает плотности экспрессии CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> и CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клетками.

Экспрессия низкоаффинного IgG рецептора CD16 неклассическими моноцитами почти в 2 раза превышает этот показатель у переходных моноцитов.

Молекулы HLA-DR экспрессируют моноциты всех популяций, однако плотность экспрессии различна. Плотность экспрессии HLA-DR популяциями CD16<sup>+</sup> моноцитов в два раза и более превышает этот показатель у классических моноцитов. В норме субпопуляции переходных и неклассических моноцитов имеют сходную плотность экспрессии HLA-DR.

#### **Экспрессия поверхностных антигенов моноцитами пациентов с сепсисом**

Выявлена тенденция к увеличению плотности экспрессии CD14-моноцитами пациентов с сеп-



**Рисунок 1. Стратегия гейтирования субпопуляций моноцитов**

**Примечание.** А – выделение лейкоцитов по панлейкоцитарному антигену CD45 (CD45 против бокового светорассеяния); Б – гейтирование CD14-позитивных клеток, включая слабопозитивные (CD14 против бокового светорассеяния); В – исключение из зоны анализа примеси гранулоцитов CD45<sup>dim</sup>CD16<sup>bright</sup> (CD16 vs CD45); Г – определение субпопуляций моноцитов по распределению маркеров CD14 и CD16: CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> классические, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> переходные, CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> неклассические.

Figure 1. Gating strategy fore identification of monocyte subsets

Note. A, identification of leucocyts by leucocyte common antigen CD45 (CD45 vs side scatter); B, gating CD14<sup>+</sup> cells with CD14<sup>dim</sup> (CD14 vs side scatter); C, exclusion of neutrophils CD45<sup>dim</sup>CD16<sup>bright</sup> (CD16 vs CD45); D, identification of monocyte subsets on CD14 and CD16 surface expression: CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> classical, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> intermediate, CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> nonclassical.

сисом, наиболее выраженная в субпопуляциях переходных и неклассических моноцитов.

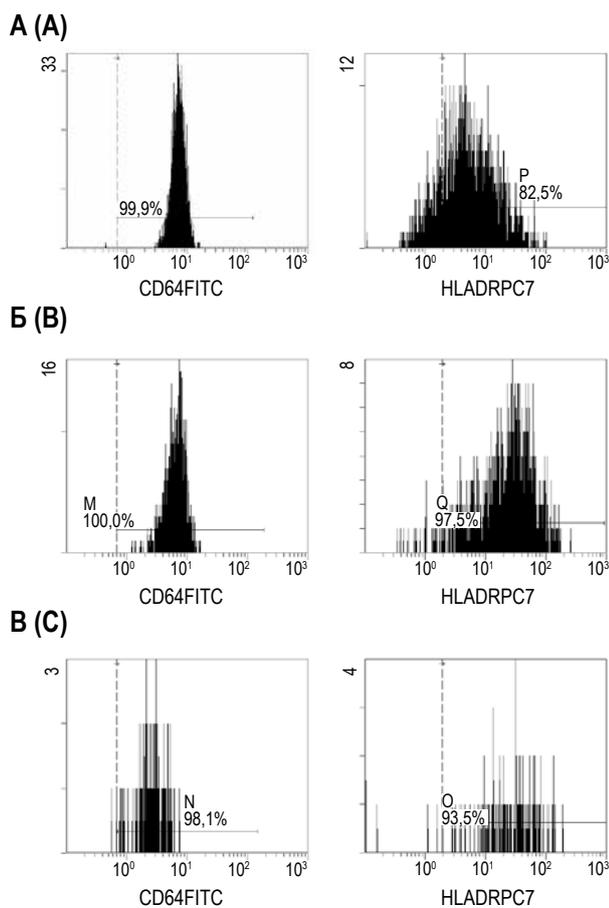
У пациентов с сепсисом отмечается двукратное увеличение плотности экспрессии CD64 всеми субпопуляциями моноцитов, доля CD64<sup>+</sup> неклассических моноцитов возрастает практически до 100%. В отличие от аналогичных показателей моноцитов контрольной группы, плотность экспрессии CD64 переходными моноцитами сопоставима, а в ряде случаев и превышает плотность экспрессии этого рецептора классическими моноцитами. Плотность экспрессии CD16 переходными и неклассическими моноцитами также заметно превышает показатель здоровых лиц.

Относительное количество HLA-DR<sup>+</sup> моноцитов и плотность экспрессии HLA-DR у пациентов с сепсисом ниже нормальных значений, особенно выражены эти изменения в субпопуляции классических моноцитов, в минимальной степени – на переходных моноцитах.

#### Содержание цитокинов в сыворотке здоровых лиц и пациентов с сепсисом

В сыворотке пациентов с сепсисом по сравнению с нормой отмечалось выраженное повышение содержания цитокинов IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  и IL-10 (табл. 3).

Для того чтобы сопоставить изменения концентрации цитокинов в сыворотке в зависимости от соотношения субпопуляций моноцитов, все образцы крови пациентов с сепсисом были разделены на две группы. В первую вошли пробы с относительным количеством классических моноцитов, близким к норме – более 85%, во вторую – со снижением относительного количества классических моноцитов менее 85% за счет увеличения доли переходных клеток (табл. 4). Результаты трех образцов были исключены из анализа, поскольку в этих образцах снижение субпопуляции классических моноцитов сопровождалось увеличением доли как переходных, так и неклассических клеток.



**Рисунок 2. Различная экспрессия CD64 и HLA-DR субпопуляциями моноцитов**

**Примечание.** А – классические моноциты CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>; Б – переходные моноциты CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>; В – неклассические моноциты CD14<sup>+</sup>dimCD16<sup>+</sup>.

Figure 2. Differential expression of CD64, and HLA-DR of monocyte subsets

Note. A, classical monocytes CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>; B, intermediate monocytes CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>; C, nonclassical monocytes CD14<sup>+</sup>dimCD16<sup>+</sup>.

Корреляционный анализ выявил прямую взаимосвязь между содержанием в сыворотке IL-10 и относительным количеством переходных моноцитов, а также между концентрацией IL-10 и TNFα. Выявлена прямая связь между абсолютным количеством субпопуляций классических моноцитов и концентрацией IL-6.

**Сопоставление динамики изменения содержания субпопуляций моноцитов у пациентов с сепсисом и результатов бактериологического исследования крови**

У двух пациентов с сепсисом были проведены динамические наблюдения изменений количества субпопуляций моноцитов в периферической крови. Результаты сопоставлялись с результатами бактериологических посевов крови. Выявлено, что появление микроорганизмов в крови сопровождалось увеличением относительного количества переходных моноцитов. При отрицательных результатах бактериологического исследования крови популяция переходных моноцитов снижалась до значений, близких к норме. Отмечена прямая сильная взаимосвязь между увеличением доли переходных моноцитов и наличием бактерий в крови ( $p < 0,05$ ). Динамика изменений показателей для одного из пациентов представлена на рисунке 3.

## Обсуждение

Определение субпопуляций моноцитов в периферической крови с использованием проточной цитометрии вызывает некоторые затруднения, связанные с вариабельностью плотности экспрессии моноцитарных маркеров CD14, HLA-DR различными субпопуляциями моноцитов. Применяются разнообразные стратегии гейтирования, направленные на выделение моноцитов без примеси NK-клеток ( $SS^{dim}CD14^{+}CD16^{+}HLA-DR^{dim}$  to neg) или нейтрофилов ( $SS^{bright}CD14^{+}CD16^{+}HLA-DR^{-}$ ) [8].

**ТАБЛИЦА 1. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С СЕПСИСОМ И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ**

TABLE 1. SUBPOPULATION PROFILE OF PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES IN THE GROUP OF PATIENTS WITH SEPSIS, AND HEALTHY CONTROL GROUP (DONORS)

	Общее количество моноцитов Monocytes, total		CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> Классические Classical		CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> Переходные Intermediate		CD14 <sup>+</sup> dimCD16 <sup>+</sup> Неклассические Nonclassical	
	%	× 10/л × 10/l	%	× 10/л × 10/l	%	× 10/л × 10/l	%	× 10/л × 10/l
<b>Доноры</b> Donors (n = 23)	8,5 ±1,3	0,5 ±0,1*	84,4 ±4,8	0,4 ±0,1	9,4 ±4,1*	0,04 ±0,02*	5,6 ±1,9	0,03 ±0,01
<b>Сепсис</b> Sepsis (n = 44)	6,6 ±2,9	0,9 ±0,4*	72,5 ±10,8	0,6 ±0,3	21,3 ±11,9*	0,2 ±0,1*	5,7 ±3,4	0,05 ±0,04

**Примечание.** \* –  $p < 0,05$  – статистически достоверные различия показателей между группами пациентов с сепсисом и здоровых лиц.

Note. \*,  $p < 0.05$ , statistical significance of the differences between group of patients with sepsis, and healthy control group (donors).

**ТАБЛИЦА 2. СРАВНЕНИЕ ФЕНОТИПА СУБПОПУЛЯЦИЙ МОНОЦИТОВ ПАЦИЕНТОВ С СЕПСИСОМ И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ**  
TABLE 2. COMPARISON OF MONOCYTE SUBPOPULATIONS PHENOTYPES IN THE GROUP OF PATIENTS WITH SEPSIS, AND HEALTHY CONTROL GROUP (DONORS)

Маркер Parameter	Ед. Unit	Группа Group	CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup>	CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	CD14 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>
CD14	mean	Норма Donors	30,0±6,2*	29,8±8,6**	4,1±0,9* **
		Сепсис Sepsis	30,6±13,1*	36,4±13,3**	6,6±2,8* **
CD64	%	Норма Donors	98,8±0,8*	99,3±0,7**	41,6±11,3# * **
		Сепсис Sepsis	100±0,0	99,9±0,2	94,8±5,4
	mean	Норма Donors	2,9±0,5# *	2,4±0,4# **	0,8±0,1# * **
		Сепсис Sepsis	5,5±1,8# *	5,5±1,8***	2,1±0,7# * **
CD16	mean	Норма Donors	0,5±0,1	5,2±1,2# **	8,7±3,4**
		Сепсис Sepsis	0,5±0,1	9,0±4,4# **	19,5±9,1# **
HLA-DR	%	Норма Donors	99,8±0,1#	99,2±0,5	99,8±0,2#
		Сепсис Sepsis	78,5±14,5#	89,4±8,5#	91,8±6,7#
	mean	Норма Donors	21,3±2,9# * **	53,2±11,1*	54,5±10,9# **
		Сепсис Sepsis	7,8±4,2# * **	41,6±18,1* ***	31,0±14,0# * ** ***

**Примечание.** \* –  $p < 0,05$  – статистически достоверные различия показателей между группами пациентов с сепсисом и здоровых лиц; \* – статистически достоверные отличия значения показателя в субпопуляции классических моноцитов (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>) по сравнению с другими субпопуляциями; \*\* – статистически достоверные отличия значения показателя в субпопуляции неклассических моноцитов (CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>) по сравнению с другими субпопуляциями; \*\*\* – статистически достоверные отличия значения показателя в субпопуляции переходных моноцитов (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) по сравнению с другими субпопуляциями.

Note. \*,  $p < 0.05$ , statistical significance of the differences between groups of patients with sepsis, and donors; \*, statistical significance of the differences between classical monocytes (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>), and other monocyte subpopulations; \*\*, statistical significance of the differences between nonclassical monocytes (CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>), and other monocyte subpopulations; \*\*\*, statistical significance of the differences between intermediate monocytes (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>), and other monocyte subpopulations.

**ТАБЛИЦА 3. СРАВНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ ПАЦИЕНТОВ С СЕПСИСОМ И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ**  
TABLE 3. COMPARISON OF SERUM LEVEL OF CYTOKINES IN THE GROUP OF PATIENTS WITH SEPSIS, AND HEALTHY CONTROL GROUP (DONORS)

	IL-6, пг/мл pg/ml	IL-1β, пг/мл pg/ml	TNFα, пг/мл pg/ml	IL-10, пг/мл pg/ml
Здоровые лица Donors (n = 23)	3,0±3,2*	2,8±2,6*	2,3±2,6*	8,8±8,1*
Сепсис Sepsis (n = 35)	91,3±81,3*	41,7±12,3*	22,0±27,2*	34,0±37,2*

**Примечание.** См. примечание к таблице 1.  
Note. As for Table 1.

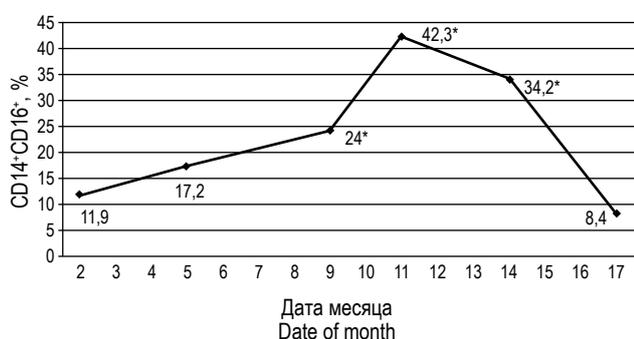
**ТАБЛИЦА 4. СРАВНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКАХ ПАЦИЕНТОВ С СЕПСИСОМ В ГРУППАХ С РАЗЛИЧНЫМ СООТНОШЕНИЕМ КЛАССИЧЕСКИХ И ПЕРЕХОДНЫХ МОНОЦИТОВ**

TABLE 4. COMPARISON OF SERUM LEVEL OF CYTOKINES IN GROUPS OF PATIENTS WITH SEPSIS WITH DIFFERENCE RATIO OF CLASSICAL AND INTERMEDIATE MONOCYTES

	<b>IL-6, пг/мл pg/ml</b>	<b>IL-1β, пг/мл pg/ml</b>	<b>TNFα, пг/мл pg/ml</b>	<b>IL-10, пг/мл pg/ml</b>
<b>Группа 1 Group 1 (n = 17)</b>	106,6±111,1	15,0±14,6	15,5±11,6	17,8±18,5*
<b>Группа 2 Group 2 (n = 15)</b>	77,0±42,2	14,4±10,3	30,4±36,2	52,1±45,0*

**Примечание.** \* –  $p < 0,01$  статистически достоверные различия показателей между группами.

Note. \*,  $p < 0.01$ , statistical significance of the differences between groups.



**Рисунок 3. Изменения относительного количества переходных моноцитов в зависимости от наличия бактерий в крови у пациентки с сепсисом**

**Примечание.** Пациентка Г., 79 лет. Диагноз: сепсис.

\* – значения относительного количества CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов при положительных результатах бактериологических исследований.

Figure 3. Change in the intermediate monocyte rate, depending on the presence of bacteria in the blood of the patient with sepsis

Note. Patient G., 79 years old. Ds: sepsis. \*, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocyte rate (%) in case of positive results of blood culture.

Используемая в нашем исследовании стратегия гейтирования субпопуляций моноцитов как CD14<sup>+</sup>SSC<sup>mod</sup>CD45<sup>+mod</sup> клеток позволила получить значения относительного количества субпопуляций классических, переходных и неклассических моноцитов у здоровых лиц, сопоставимые с данными литературы.

Моноцитам принадлежит ключевая роль в развитии адекватного иммунного ответа при бактериальной инфекции. Эти клетки выполняют множество функций для инициации, поддержания и негативной регуляции воспаления. Абсолютная лимфопения у септических больных с выраженным снижением абсолютного и относительного количества регуляторных популяций лимфоцитов приводит к возрастанию роли моноцитов как регуляторных клеток. У пациентов с бактериальным сепсисом наблюдается абсолютный моноцитоз, при котором увеличи-

вается количество классических и, более выражено, количество переходных моноцитов. Эти субпопуляции различаются фенотипически и функционально, их соотношение изменяется по мере развития противобактериального ответа. В норме классические моноциты составляют более 85%, их основная функция – поддержание гомеостаза путем элиминации апоптотических телец. Классические моноциты выполняют также надзорную функцию – распознавание бактерий и их продуктов. Связывание TLR4 на поверхности классических моноцитов приводит к активации MyD88-зависимого пути проведения сигнала и синтезу провоспалительных цитокинов IL-6, TNFα, IL-1β [15]. Продукция IL-6 регулирует дифференцировку плазматических клеток и синтез антител, тогда как провоспалительные цитокины, в том числе TNFα, стимулируют экспрессию CD64- и CD16-рецепторов к иммуноглобулинам. После встречи с бактериями классические моноциты дифференцируются в CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клетки. В нашем исследовании отмечена корреляция между концентрацией TNFα в сыворотке и плотностью экспрессии высокоаффинного рецептора к IgG CD64 на всех популяциях моноцитов. Образующиеся *de novo* CD64 и CD16 способствуют усилению фагоцитоза IgG-опсонизированных бактерий. Переходные моноциты оптимально приспособлены для выполнения функций распознавания бактериальных фрагментов, фагоцитоза и презентации антигенов клеткам приобретенного иммунитета. При бактериальной инфекции повышение этой популяции необходимо для эффективной элиминации возбудителя. CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клетки, с одной стороны, активно продуцируют провоспалительные цитокины, с другой – стремятся ограничить иммунный ответ, синтезируя IL-10 на стадии поздней активации [12, 14]. Изменение пула цитокинов связано с активацией TRIF-зависимого сигнального пути, который задействуется при одновременном связывании CD16 и TLR4 [15]. Выявленная нами прямая корреляционная зависимость между концентрацией в сыворотке IL-10 и относительным количеством

переходных моноцитов CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> подтверждает данные литературы о том, что среди субпопуляций моноцитов эти клетки являются основными продуцентами IL-10 при сепсисе [16]. IL-10 подавляет LPS-индуцированную активацию моноцитов, снижает продукцию провоспалительных цитокинов и подавляет антигенпрезентирующую функцию переходных клеток. В нашем исследовании выявлена обратная корреляционная зависимость между концентрацией в сыворотке IL-10 и плотностью экспрессии HLA-DR на CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клетках. Существуют сообщения о том, что IL-10 снижает экспрессию HLA-DR на всех субпопуляциях моноцитов [10] вследствие подавления активности регулятора транскрипции гена HLA-DR – СИТА (MHC class II transactivator) [11]. Под воздействием IL-10 изменяется фенотип антигенпрезентирующих клеток – уменьшается относительное количество воспалительных CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> и увеличивается доля CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> моноцитов, выполняющих сканджер-функцию – восстанавливается нормальное соотношение классических и переходных моноцитов. Некоторое время классические моноциты имеют фенотип, отличный от нормы, а именно сниженную экспрессию HLA-DR и ко-стимуляторных молекул, тем более выраженную, чем выше была продукция IL-10. Как правило, такой цикл является оптимальным для элиминации возбудителя из крови и предотвращения повреждения макроорганизма продуктами воспаления.

Длительная персистенция в крови бактерий или эндотоксина, а также продуктов разрушения тканей приводит к гиперпродукции IL-6 классическими моноцитами и эндотелиоцитами сосудов. Активированному васкулярному эндотелию принадлежит центральная роль в инициации и регуляции системного воспалительного ответа при эндотоксемии и бактериальном сепсисе [3,

21]. Активированные эндотелиоциты продуцируют IL-6 и ростовые факторы миелоидного роста, стимулирующие выход из костного мозга моноцитов с «наивным» классическим фенотипом. Повышение абсолютного количества классических моноцитов и содержания в сыворотке IL-6, ассоциированного с плохим прогнозом у септических больных [7], может быть косвенным критерием оценки степени активации эндотелия, что объясняет выявленную нами взаимосвязь между абсолютным количеством классических моноцитов и выраженностью полиорганной дисфункции по шкале SOFA.

IL-6, наряду с IL-10, способен оказывать иммуносупрессорное действие, снижая экспрессию молекул HLA-DR на поверхности антигенпрезентирующих клеток [6, 9]. Возможно, снижение экспрессии HLA-DR при сепсисе, особенно выраженное в субпопуляции классических моноцитов, связано в том числе с продолжительной гиперпродукцией IL-6. В многочисленных исследованиях снижение экспрессии HLA-DR моноцитами крови тяжелобольных пациентов расценивается как предиктор развития нозокомиальных инфекций и фактор неблагоприятного прогноза [1, 2, 11]. В настоящей работе определена обратная зависимость между степенью полиорганной дисфункции и относительным количеством HLA-DR<sup>+</sup> моноцитов. Следует заметить, что чем большую долю от общего количества моноцитов составляют классические CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>, тем более снижено относительное количество клеток, экспрессирующих HLA-DR. Мониторинг изменений абсолютного и относительного количества классических моноцитов и концентрации в сыворотке IL-6 необходим для комплексной оценки воспалительного ответа при сепсисе. Определение экспрессии HLA-DR на моноцитах позволяет оценить выраженность иммуносупрессии у тяжелобольных пациентов.

## Список литературы / References

1. Лазанович В.А., Маркелова Е.В., Смирнов Г.А., Смолина Т.П. Клиническая значимость экспрессии Toll2, Toll4, CD14, HLA-DR на моноцитах у пациентов с сепсисом // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 3. С. 221-228. [Lazanovich V.A., Markelova E.V., Smirnov G.A., Smolina T.P. Clinical significance of Toll2, Toll4, CD14, and HLA-DR expression on the monocytes in patients with sepsis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 3, pp. 221-228. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2015-3-221-228.
2. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Черешнев В.А. Цитометрический анализ в клинической иммунологии. Екатеринбург: УрО РАН, 2011. 220 с. [Khaidukov S.V., Zurochka A.V., Chereshevnev V.A. Cytometric analysis in clinical immunology]. Ekaterinburg: UB RAS, 2011. 220 p.
3. Andonegui G., Zhou H., Bullard D., Kelly M.M., Mullaly S.C., McDonald B., Long E.M., Robbins S.M., Kubers P. Mice that exclusively express TLR4 on endothelial cells can efficiently clear a lethal systemic Gram-negative bacterial infection. *J. Clin. Invest.*, 2009 Vol. 119, no. 7, pp. 1921-1930.
4. Beekman J.M., van der Linden J.A., van der Winkel J.G., Leusen J.H. FcγRI (CD64) resides constitutively in lipid rafts. *Immunol. Lett.*, 2008, Vol. 116, no. 2, pp. 149-155.
5. Bezbradica J.S., Rosenstein R.K., DeMarco R.A., Brodsky I., Medzhitov R. A role for the ITAM signaling module in specifying cytokine-receptor function. *Nat. Immunol.*, 2014, Vol. 15, no. 4, pp. 333-342.
6. Braun D.A., Fribourg M., Sealfon S.C. Cytokine response is determined by duration of receptor and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) activation. *J. Biol. Chem.*, 2013, Vol. 288, no. 5, pp. 2986-2993.
7. Chaudhry H., Zhou J., Zhong Y., Ali M.M., McGuire F., Nagarkatti P.S., Nagarkatti M. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In Vivo*, 2013, Vol. 27, no. 6, pp. 669-684.
8. Italiani P., Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Front. Immunol.*, 2014, no. 5, p. 514.

9. Kitamura H., Ohno Y., Toyoshima Y., Ohtake J., Homma S., Kawamura H., Takahashi N., Taketomi A. Interleukin-6/STAT3 signaling as a promising target to improve the efficacy of cancer immunotherapy. *Cancer Sci.*, 2017, Vol. 108, no. 10, pp. 1947-1952.

10. Lee J., Tam H., Adler L., Iltstad-Minnihan A., Macaubas C., Mellins E.D. The MHC class II antigen presentation pathway in human monocytes differs by subset and is regulated by cytokines. *PLoS ONE*, 2017, Vol. 12, no. 8, e0183594. doi: 10.1371/journal.pone.0183594.

11. Lucaszewicz A.-C., Faivre V., Payen D. Is monocyte HLA-DR expression monitoring a useful tool to predict the risk of secondary infection? *France Minerva Anesthesiol.*, 2010, Vol. 76, no. 9, pp. 737-743.

12. Mukherjee R., Kanti Barman P., Kumar Thatoi P., Tripathy R., Kumar Das B., Ravindran B. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in sepsis and System Lupus Erythematosus. *Sci. Rep.*, 2015, no. 5, 13886. doi: 10.1038/srep13886.

13. Rosales C. Molecular mechanisms of phagocytosis. Medical intelligence unit. New York: Springer science + Business media, 2005. 165 p.

14. Samarasinghe R., Tailor P., Tamura T., Kaisho T., Akira S., Ozato K. Induction of an anti-inflammatory cytokine, IL-10, in dendritic cells after toll-like receptor signaling. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2006, Vol. 26, no. 12, pp. 893-900.

15. Shalova I.N., Kajiji T., Lim J.Y., Gomes-Pina V., Fernandez-Ruiz I., Arnalich F., Iau P.T., Lopez-Collazo E., Wong S.C., Biswas S.K. CD16 regulates TRIF-dependent TLR4 response in human monocytes and their subsets. *J. Immunol.*, 2012, no. 188, pp. 3584-3593.

16. Skrzeczynska-Moncznik J., Brownska M., Loseke S., Grage-Griebenow E., Zembala M., Pryjma J. Peripheral blood CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes are main producers of IL-10. *Scand. J. Immunol.*, 2008, Vol. 67, no. 2, pp. 152-159.

17. Swisher J.F., Feldman G.M. The many faces of FcγRI: implication for therapeutic antibody function. *Immunol. Rev.*, 2015, Vol. 268, no. 1, pp. 160-174.

18. van der Poel C.E., Spaapen R.M., van der Winkel J.G., Leusen J.H.W. Functional characteristics of the high affinity IgG receptor, FcγRI. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, no. 5, pp. 2699-2704.

19. Yang J., Zhang L., Yu C., Yang X.-F., Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker Research.*, 2014, Vol. 2, no. 1, p. 1.

20. Ziegler-Heitbrock L., Hofer T.P. Toward a refined definition of monocyte subsets. *Front Immunol.*, 2013, no. 4, p. 23.

21. Ye X., Ding J., Zhou X., Chen G., Liu S.F. Divergent roles of endothelial NF-κappaB in multiple organ injury and bacterial clearance in mouse models of sepsis. *J. Exp. Med.*, 2008, Vol. 205, no. 6, pp. 1303-1315.

**Авторы:**

**Калашникова А.А.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» Министерства РФ по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных бедствий, Санкт-Петербург, Россия

**Ворошилова Т.М.** — к.м.н., заведующая лабораторией бактериологических исследований ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» Министерства РФ по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных бедствий, Санкт-Петербург, Россия

**Чиненова Л.В.** — к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» Министерства РФ по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных бедствий, Санкт-Петербург, Россия

**Давыдова Н.И.** — к.м.н., старший научный сотрудник, заведующая лабораторией клинической иммунологии ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» Министерства РФ по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных бедствий, Санкт-Петербург, Россия

**Калинина Н.М.** — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» Министерства РФ по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных бедствий, Санкт-Петербург, Россия

**Authors:**

**Kalashnikova A.A.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Voroshilova T.M.**, PhD (Medicine), Head, Laboratory of Bacteriological Studies, A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Chinenova L.V.**, PhD (Medicine), Physician, Laboratory of Clinical Immunology, A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Davydova N.I.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Head, Laboratory of Clinical Immunology, A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Kalinina N.M.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 27.12.2017  
Принята к печати 08.02.2018

Received 27.12.2017  
Accepted 08.02.2018