

Фенотип и функции дендритных клеток человека, генерированных из субпопуляций моноцитов CD14⁺, оппозитных по экспрессии CD16

Черных Е.Р., Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А.,
Курочкина Ю.Д., Олейник Е.А., Сахно Л.В., Останин А.А.

Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ)
Россия, 630099, Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Анализ взаимосвязи между субпопуляционной принадлежностью моноцитов и фенотипом и (или) функциями генерируемых дендритных клеток (dendrite cells, DC), а также их чувствительностью к толерогенному действию дексаметазона.

Материалы и методы. В исследование включены 15 здоровых доноров. DC генерировали с интерфероном альфа (IFN α) и колониестимулирующим фактором гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF) из обогащенной популяции CD14⁺ моноцитов периферической крови с деплецией (CD16⁻Mo-DC) и без деплеции (CD16⁺Mo-DC) CD16⁺ клеток. Субпопуляции моноцитов получали методом магнитной сепарации.

Результаты. CD16⁺Mo-DC характеризовались большим содержанием зрелых DC (CD83⁺CD14⁻) и меньшим количеством клеток промежуточной степени зрелости (CD14⁺CD83⁺), но были сопоставимы с CD16⁻Mo-DC по экспрессии HLA-DR и CD86, участвующих в презентации антигенов и активации наивных Т-клеток, а также ингибиторных (толерогенных) молекул B7-H1 и TLR-2. При этом CD16⁻Mo-DC проявляли более высокую аллостимуляторную активность, которая прямо коррелировала с экспрессией CD86 ($r_s = 0,69$) и обратно – с экспрессией TLR-2 ($r_s = -0,72$). Аллостимуляторная активность CD16⁻Mo-DC находилась в прямой взаимосвязи с количеством зрелых CD14⁺CD83⁺DC и CD14⁺CD83⁺DC промежуточной степени зрелости. Добавление дексаметазона (10^{-6} М) в культуры CD16⁻Mo-DC и CD16⁺Mo-DC сопровождалось задержкой созревания DC, снижением экспрессии CD86 и повышением TLR-2, а также увеличением количества клеток с ингибиторным фенотипом CD86⁻B7-H1⁺, что, в свою очередь, ассоциировалось со снижением аллостимуляторной активности DC. Снижение индекса соотношения CD86⁺/TLR-2⁺ клеток в популяции CD16⁺Mo-DC в большей степени обусловлено уменьшением количества CD86⁺DC, а в популяции CD16⁻Mo-DC – возрастанием числа клеток TLR-2⁺. При этом ингибирующий эффект дексаметазона на созревание DC был более выраженным в популяции CD16⁺Mo-DC.

Заключение. CD14⁺ моноциты, как содержащие, так и истощенные по CD16⁺клеткам, дифференцируются в присутствии IFN α в DC, однако наличие в общем пуле моноцитарных предшественников CD16⁺ клеток ассоциируется с генерацией DC с более зрелым фенотипом и высокой аллостимуляторной активностью. DC, генерированные из субпопуляций моноцитов, оппозитных по экспрессии CD16, характеризуются чувствительностью к супрессорному эффекту дексаметазона. При этом толерогенная активность дексаметазона в субпопуляциях CD16⁻Mo-DC и CD16⁺Mo-DC опосредуется с вовлечением различных механизмов.

Ключевые слова: дендритные клетки, интерферон альфа, аллостимуляторная активность, дексаметазон.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

✉ Черных Елена Рэмовна, e-mail: ct_lab@mail.ru.

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-015-00215-А.

Соответствие принципам этики. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института фундаментальной и клинической иммунологии (протокол № 104 от 12.01.2018).

Для цитирования: Черных Е.Р., Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Курочкина Ю.Д., Олейник Е.А., Сахно Л.В., Останин А.А. Фенотип и функции дендритных клеток человека, генерированных из субпопуляций моноцитов CD14⁺, оппозитных по экспрессии CD16. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 266–276. [https://doi.org: 10.20538/1682-0363-2019-1-266-276](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-266-276).

УДК 612.017:611.018.83:577.27

[https://doi.org: 10.20538/1682-0363-2019-1-266-276](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-266-276)

Phenotype and functions of human dendritic cells derived from CD14⁺ monocyte subsets opposed to CD16 expression

Chernykh E.R., Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Kurochkina Yu. D., Oleynik E.A., Sakhno L.V., Ostanin A.A.

Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (RIFCI) 14, Yadrintsevskaya Str., Novosibirsk, 630099, Russian Federation

ABSTRACT

The aim of the study was to analyze the relationship between monocyte subpopulations and phenotype/functions of monocyte-derived dendritic cells (DCs), as well as DC sensitivity to the tolerogenic effect of dexamethasone.

Materials and methods. The study included 15 healthy donors. DCs were generated by cultivating enriched fractions of CD14⁺ monocytes with or without CD16⁺ cell depletion (CD16⁻Mo-DCs or CD16⁺Mo-DCs, respectively) in the presence of interferon alpha (IFN α) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). Monocyte subpopulations were obtained by immunomagnetic negative selection.

Results. CD16⁺Mo-DCs were characterized by higher percentage of mature (CD83⁺CD14⁻) and lower number of semi-mature (CD14⁺CD83⁺) cells, but were similar to CD16⁻Mo-DCs by HLA-DR and CD86 expression, involved in the presentation of antigens and activation of naive T-cells. and also to co-inhibitory/tolerogenic molecules B7-H1 and TLR-2. CD16⁺Mo-DCs displayed higher allostimulatory activity, which was positively correlated with CD86 expression ($r_s = 0.69$; $p = 0.027$) and negatively – with TLR-2 expression ($r_s = -0.72$; $p = 0.1$). Allostimulatory activity of CD16⁻Mo-DCs was positively correlated with the number of mature CD14⁺CD83⁺DCs and semi-mature CD14⁺CD83⁺DCs. Addition of dexamethasone (10⁻⁶ M) into CD16⁻Mo-DCs and CD16⁺Mo-DCs cultures led to the delay of DC maturation, the decrease of CD86 and the increase of TLR-2 expression, as well as the increase of cells with co-inhibitory CD86⁻B7-H1⁺ phenotype that was positively correlated with the reduction of DC allostimulatory activity. The decrease of CD86⁺/TLR-2⁺ index in CD16⁺Mo-DC population was due to the reduction of CD86⁺DCs and in CD16⁻Mo-DC population – to the increase of TLR-2⁺ cells. Dexamethasone possessed higher inhibitory effect on DC maturation in the CD16⁺Mo-DC cultures.

Conclusion. CD14⁺ monocytes, both contained and depleted by CD16⁺ cells, can differentiate into DCs when cultured with IFN α . The presence of CD16⁺ cells in whole blood monocyte pool is associated with generation of DCs showed a more mature phenotype and higher allostimulatory activity. Both CD16⁻ and CD16⁺ monocyte-derived DCs are sensitive to suppressive effect of dexamethasone. However, dexamethasone tolerogenic effect involves different mechanisms in CD16⁻Mo-DCs and CD16⁺Mo-DCs.

Key words: dendritic cells, interferon- α , allostimulatory activity, dexamethasone.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research as part of the research project No. 18-015-00215-A.

Conformity with the principles of ethics. The study approved by the local ethics committee under Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Protocol No. 104 of 12.01.2018).

For citation: Chernykh E.R., Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Kurochkina Yu. D., Oley-nik E.A., Sakhno L.V., Ostanin A.A. Phenotype and functions of human dendritic cells derived from CD14⁺ monocyte subsets opposed to CD16 expression. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 266–276. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-266-276>.

ВВЕДЕНИЕ

Циркулирующие моноциты человека представлены гетерогенной популяцией, которая включает классические (CD14⁺CD16⁻), промежуточные (CD14⁺⁺CD16⁺) и неклассические (CD14⁺CD16⁺⁺) моноциты, различающиеся не только фенотипически, но и функционально [1]. Классические моноциты являются доминирующей субпопуляцией, тогда как количество CD16-позитивных клеток не превышает 10–20% [1–4]. Однако при различных патологических состояниях это соотношение может существенно меняться. Поскольку моноциты являются предшественниками дендритных клеток (dendritic cell, DC), нельзя исключить, что изменения в структуре пула циркулирующих моноцитов могут сказываться на процессах дифференцировки, созревания и функциях генерируемых DC.

Дендритные клетки, являясь специализированными антигенпрезентирующими клетками, способны как стимулировать иммунный ответ, так и индуцировать толерантность [5]. Роль различных субпопуляций моноцитов в детерминировании функциональной активности генерируемых из них DC в последние годы активно обсуждается. Тем не менее имеющиеся данные противоречивы [6, 7] и не позволяют однозначно ответить на вопрос, в какой степени функции DC связаны с фенотипом моноцитов-предшественников. Следует также отметить, что исследования такого рода проводятся с использованием DC, генерированных из моноцитов в присутствии интерлейкина (IL) 4 (IL-4-DC) [8]. Между тем альтернативным индуктором дифференцировки моноцитов в DC является интерферон альфа (IFN α) [9]. Замена IL-4 на IFN α позволяет получить IFN-DC с промежуточным типом зрелости, которые отличаются большей стабильностью, более выраженной миграционной, Th1- или провоспалительной и противоопухолевой цитотоксической активно-

стью [10, 11]. Участие клеток отдельных субпопуляций моноцитов в генерации IFN-DC совсем не исследовано. Неясным также остается вопрос, могут ли различные субпопуляции моноцитов детерминировать чувствительность генерируемых DC к толерогенным сигналам.

Одним из ключевых эндогенных медиаторов толерогенной активности DC являются глюкокортикоиды, уровень которых возрастает при любых стресс-реакциях, сопровождающих воспалительный процесс. Проведенные нами ранее исследования показали, что дексаметазон *in vitro* подавляет созревание IFN-DC, усиливает экспрессию толерогенных молекул (TLR-2), снижает цитокин-секреторную и аллостимуляторную активность DC [12]. При этом выраженность толерогенного фенотипа дексаметазон-модифицированных IFN-DC прямо коррелировала с содержанием неклассических клеток CD14⁺CD16⁺⁺ среди моноцитов-предшественников (данные не опубликованы).

Целью настоящей работы явилось изучение взаимосвязи между субпопуляционной принадлежностью моноцитов и фенотипом и (или) функциями генерируемых IFN-DC, а также их чувствительностью к толерогенному действию дексаметазона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 15 здоровых доноров обоего пола в возрасте 20–54 лет. Забор крови и все исследования проводили после получения письменного информированного согласия. Мононуклеарные клетки (MNC) выделяли центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фикола-верографина. Для выделения моноцитов из полученной взвеси MNC использовали наборы магнитных бус (Easy SepTM, STEMCELL Technologies Inc., Кана-

да), позволяющие получить популяции моноцитов CD14⁺ с деплецией (CD14⁺CD16⁻) и без деплеции клеток CD16⁺ (CD14⁺CD16⁺). Магнитную сепарацию осуществляли согласно инструкциям производителя. Контроль чистоты выделенных субпопуляций моноцитов проводили методом проточной цитофлуориметрии с использованием

FITC-конъюгированных анти-CD14- и Ре-конъюгированных анти-CD16-антител (BD PharMingen, США). Содержание моноцитов CD14⁺ и CD16⁺ во фракции CD14⁺ с деплецией CD16⁺ составляло (80,6 ± 4,5) и (3,4 ± 0,5)%, а во фракции моноцитов CD14⁺ без деплеции CD16⁺ – (64,8 ± 3,5) и (27,2 ± 3,4)% соответственно (рис. 1).

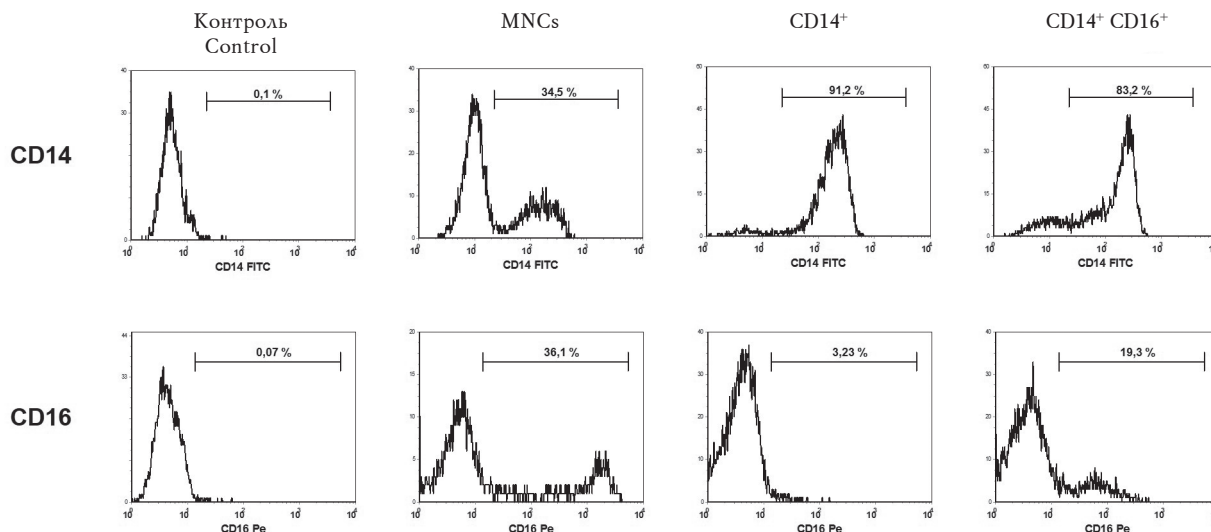


Рис. 1. Экспрессия антигенов CD14 и CD16 до и после магнитной сепарации: репрезентативные гистограммы флуоресценции антигенов CD14 и CD16, экспрессируемых мононуклеарными клетками (MNCs) до магнитной сепарации, а также выделенные субпопуляциями CD14⁺ моноцитов с деплецией (моноциты CD14⁺CD16⁻) и без деплеции клеток CD16⁺ (моноциты CD14⁺CD16⁺)

Fig. 1. CD14 and CD16 molecule expression before and after immunomagnetic selection: the flow cytometric histograms represent CD14 and CD16 antigens expressed by the start MNCs and final enriched fractions of CD14⁺ monocytes with CD16⁺ cell depletion (CD14⁺CD16⁻ monocytes) and without CD16⁺ cell depletion (CD14⁺CD16⁺ monocytes) using immunomagnetic negative selection

Дендритные клетки генерировали путем культивирования выделенных моноцитов CD14⁺CD16⁻ и CD14⁺CD16⁺ в 6-луночных планшетах (Nunc, Дания) в течение 3–4 сут в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 2,5% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS, БиолоТ, г. Санкт-Петербург), в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) и IFN α (1000 Ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария). Для индукции созревания DC на 4-е сут вносили липополисахарид (ЛПС, 10 мкг/мл, LPS E. coli 0114:B4, Sigma-Aldrich) и продолжали культивировать в течение 24 ч. В отдельной серии экспериментов на этапе дифференцировки за 1 сут до внесения ЛПС в культуры DC добавляли дексаметазон (10⁻⁶ М).

Оценку фенотипа IFN-DC проводили методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, Becton Dickinson, США) с использованием FITC-

или Ре-меченных моноклональных анти-CD14, -CD83, -HLA-DR, -CD123, -CD86, -TLR-2 и B7-H1/CD274 антител (BD PharMingen, США). В качестве негативного контроля использовали изотипические антитела, конъюгированные с аналогичными флуорохромами (BD PharMingen, США).

Стимуляторную активность IFN-DC оценивали в аллогенной смешанной культуре лимфоцитов (алло-СКЛ), используя в качестве отвечающих клеток аллогенные MNC доноров (0,1×10⁶/лунку), которые культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах в среде RPMI-1640 в присутствии 10% инактивированной сыворотки крови АВ (IV) группы при 37 °С в CO₂-инкубаторе. Стимуляторами служили IFN-DC в соотношении MNC : DC = 10 : 1. Пролиферативный ответ оценивали на 5-е сут радиометрически по включению ³H-тимидина (1 мкКю на лунку), вносимого за 18 ч до окончания культивирования.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ

Statistica 6.0. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический W -критерий Вилкоксона (для связанных, парных выборок). Для анализа взаимосвязей между исследуемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (r_s). Результаты представлены в виде $M \pm SE$, где M – среднее значение, SE – ошибка среднего. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Учитывая малочисленность в общем пуле моноцитов крови клеток $CD16^+$, получение достаточного количества промежуточных и неклассических моноцитов для дальнейшего исследования и генерации из них DC представлялось технически сложным. Поэтому был использован метод магнитной сепарации для выделения из MNC обогащенной популяции моноцитов $CD14^+$ с деплецией и без деплеции клеток $CD16^+$ ($CD14^+CD16^-$ и $CD14^+CD16^+$ субпопуляции соответственно). Такой подход позволял выяснить, каким образом присутствие или отсутствие промежуточных и неклассических моноцитов $CD16^+$ влияет на фе-

нотип и функции IFN-DC. Моноциты $CD14^+CD16^-$ и $CD14^+CD16^+$ получали от одних и тех же доноров, что давало возможность сравнить два типа генерируемых DC ($CD16^-Mo-DC$ и $CD16^+Mo-DC$), полученных от одного индивида.

Фенотипический анализ DC, генерированных из моноцитов $CD14^+CD16^-$ и $CD14^+CD16^+$, показал, что присутствие клеток $CD16^+$ в общей популяции моноцитов ассоциировалось с почти двукратным уменьшением количества DC промежуточной степени зрелости ($CD14^+CD83^+$) по сравнению с культурами $CD16^-Mo-DC$ (рис. 2, *a*). При этом содержание зрелых $CD14^+CD83^+$ DC и клеток с незрелым фенотипом ($CD14^+CD83^-$) среди $CD16^-Mo-DC$ и $CD16^+Mo-DC$ значимо не различалось. Тем не менее среди DC, экспрессирующих $CD83$, относительное содержание (%) зрелых клеток $CD83^+CD14^-$ в популяции $CD16^+Mo-DC$ было в среднем в 1,7 раза выше ($p = 0,076$), чем в популяции $CD16^-Mo-DC$ (рис. 2, *b*). Таким образом, отсутствие клеток $CD16^+$ в общей популяции моноцитарных предшественников ведет к их дифференцировке в IFN-DC с менее зрелым фенотипом и преобладанием DC промежуточной степени зрелости.

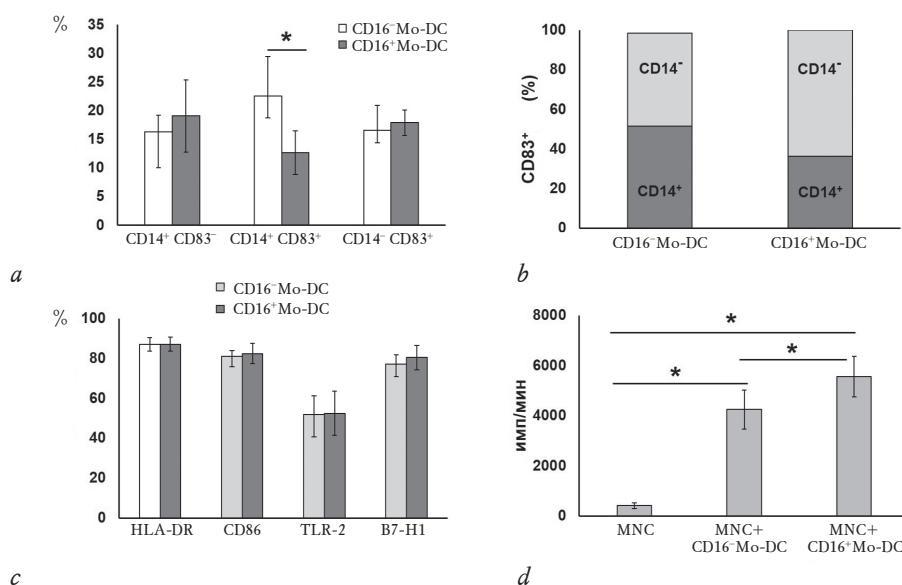


Рис. 2. Фенотип и аллостимуляторная активность IFN-DC, генерированных из $CD16^-$ и $CD16^+$ моноцитов: *a* – DC, экспрессирующие $CD14$ и $CD83$, $n = 7$, %; *b* – $CD14^-$ и $CD14^+$ среди $CD83^+$ DC ($n = 7$), %; *c* – $HLA-DR^+$ ($n = 8$), $CD86^+$ ($n = 7$), $B7-H1^+$ ($n = 7$) и $TLR-2^+$ ($n = 6$) в популяциях $CD16^-Mo-DC$ и $CD16^+Mo-DC$, %; *d* – пролиферативный ответ MNC в алло-СКЛ в отсутствие IFN-DC (MNC) и присутствии указанных типов IFN-DC, имп/мин, $M \pm SE$. Здесь и на рис. 3, 4: * $p < 0,05$ (непараметрический W -критерий Вилкоксона)

Fig. 2. Phenotype and allostimulatory activity of $CD16^-$ and $CD16^+$ monocyte-derived IFN-DCs: *a* – the relative number of DCs expressing $CD14$ and $CD83$, $n = 7$; *b* – the proportion of $CD14^-$ and $CD14^+$ cells among $CD83^+$ DCs, $n = 7$; *c* – the relative number of $HLA-DR^+$ ($n = 8$), $CD86^+$ ($n = 7$), $B7-H1^+$ ($n = 7$) and $TLR-2^+$ ($n = 6$) cells in $CD16^-Mo-DC$ and $CD16^+Mo-DC$ cultures; *d* – and proliferative response of MNCs in allo-MLC test (cpm) in the absence of IFN-DCs (MNCs), as well as in presence of signed subtypes of IFN-DCs in allo-MLC test, $M \pm SE$. * Here and at Fig. 3, 4: $p < 0.05$ (nonparametric Wilcoxon Test)

Популяции CD16⁻Мо-DC и CD16⁺Мо-DC были сопоставимы по относительному содержанию клеток, экспрессирующих HLA-DR и CD86, участвующих в презентации антигенов и активации наивных Т-клеток. При этом оба типа DC не различались по количеству клеток, экспрессирующих ингибиторные (толерогенные) молекулы B7-H1 и TLR-2 (см. рис. 2, *c*).

Оценка стимуляторной активности IFN-DC в алло-СКЛ показала (рис. 2, *d*), что способность CD16⁺Мо-DC индуцировать пролиферативный ответ Т-клеток на аллоантигены была в среднем на 63% (IQR 18–76%) выше, чем у CD16⁻Мо-DC ($p = 0,028$). При этом аллостимуляторная активность CD16⁺Мо-DC находилась в прямой корреляционной связи с долей CD86⁺ DC ($r_s = 0,69; p = 0,027$) и отрицательно коррелировала с количеством TLR-2⁺ DC ($r_s = -0,72; p = 0,1$). В свою очередь, аллостимуляторная активность CD16⁻Мо-DC прямо коррелировала с содержанием CD14⁺CD83⁺DC и CD14⁻CD83⁺DC ($r_s = 0,84; p = 0,038$). Таким образом, более низкая аллостимуляторная активность CD16⁻Мо-DC, по-видимому, обусловлена меньшей степенью зрелости этой популяции IFN-DC, тогда как для CD16⁺Мо-DC эта функция детерминируется балансом костимуляторных (CD86) и ингибиторных (TLR2) молекул.

Поскольку одним из ключевых медиаторов толерогенной активности DC являются глюкокортикоиды, на следующем этапе было изучено влияние деплеции моноцитов CD16⁺ на чувствительность генерируемых IFN-DC к дексаметазону. Добавление дексаметазона на этапах генерации CD16⁻Мо-DC и CD16⁺Мо-DC сопровождалось практически двукратным возрастанием количества незрелых CD14⁺CD83⁻ и снижением доли зрелых CD14⁻CD83⁺DC (рис. 3). Эти изменения были более выражены и статистически значимы в популяции CD16⁺Мо-DC (рис. 3, *a*), тогда как в культурах CD16⁻Мо-DC проявлялись в виде отчетливого тренда ($p = 0,07-0,11$). Таким образом, CD16⁺Мо-DC более чувствительны к действию дексаметазона, что подтверждалось при анализе изменений под действием дексаметазона соотношения клеток CD14⁻ и CD14⁺ среди DC, экспрессирующих CD83 (рис. 3, *b*). Обработка дексаметазоном CD16⁺Мо-DC приводила к более выраженному сдвигу баланса в сторону клеток промежуточной степени зрелости, коэкспрессирующих CD14 и CD83 ($p = 0,028$). В то же время в культурах CD16⁻Мо-DC изменение соотношения менее зрелых CD14⁺CD83⁻ и зрелых CD14⁻CD83⁺DC не было статистически достоверным ($p > 0,05$).

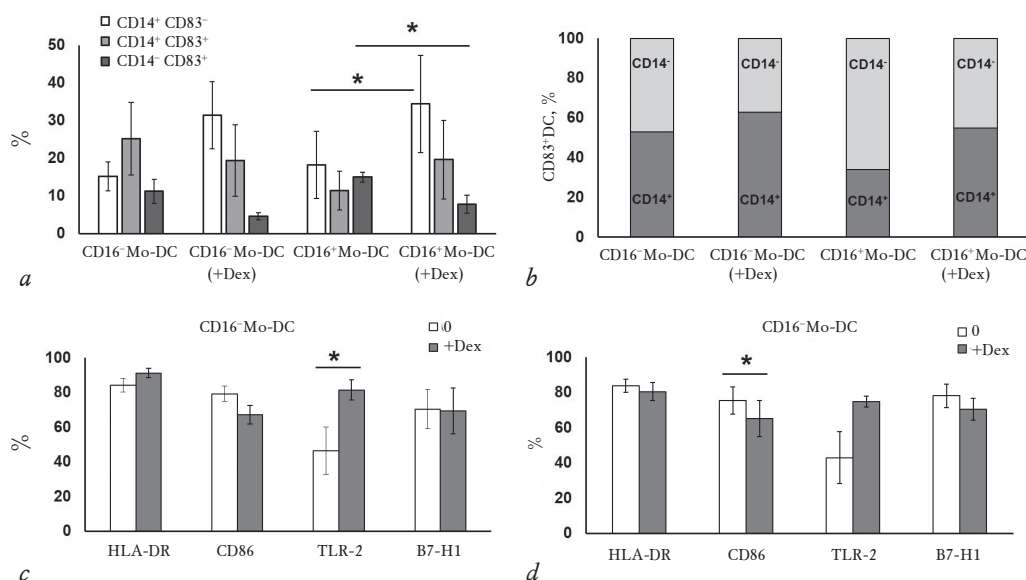


Рис. 3. Влияние дексаметазона на фенотип IFN-DC, генерированных из моноцитов CD16⁻ и CD16⁺: *a* – DC, экспрессирующие CD14 и CD83 ($n = 6$); *b* – CD14⁻ и CD14⁺ среди CD83⁺DC ($n = 6$); *c*, *d* – HLA-DR⁺ ($n = 6$), CD86⁺ ($n = 6$), B7-H1⁺ ($n = 6$) и TLR-2⁺ ($n = 4$) в популяциях CD16⁻Мо-DC и CD16⁺Мо-DC, генерированных в стандартных условиях и в присутствии дексаметазона (+Dex), %, $M \pm SE$

Fig. 3. The effect of dexamethasone on the phenotype of CD16⁻ and CD16⁺ monocyte-derived IFN-DCs: *a* – DC expressing CD14 and CD83 ($n = 6$); *b* – the proportion of CD14⁻ and CD14⁺ cells among CD83⁺DCs ($n = 6$); *c*, *d* – the relative number of HLA-DR⁺ ($n = 6$), CD86⁺ ($n = 6$), B7-H1⁺ ($n = 6$) and TLR-2⁺ ($n = 4$) cells in CD16⁻Mo-DCs and CD16⁺Mo-DCs generated under standard conditions and in the presence of dexamethasone (+Dex), %, $M \pm SE$

Добавление дексаметазона на этапе дифференцировки моноцитов CD14⁺CD16⁻ и CD14⁺CD16⁺ в DC по-разному влияло на экспрессию костимуляторных и толерогенных молекул (CD86 и TLR-2 соответственно). Из данных рисунка следует (рис. 3, *c* и *d*), что под действием дексаметазона отмечалось снижение относительного содержания клеток CD86⁺: статистически значимое в популяции CD16⁺Mo-DC ($p = 0,04$), а в культурах CD16⁻Mo-DC в виде отчетливой тенденции ($p = 0,12$). При этом дексаметазон индуцировал достоверное возрастание клеток TLR-2⁺ среди CD16⁻Mo-DC и в культурах CD16⁺Mo-DC – в виде тренда. Как следствие, в популяциях CD16⁻Mo-DC и CD16⁺Mo-DC после контакта с дексаметазоном наблюдалась инверсия индекса соотношения клеток CD86⁺/TLR-2⁺ и его снижение в среднем с $(2,3 \pm 0,9)$ до $(0,75 \pm 0,05)$ расч. ед. ($p = 0,06$), что свидетельствовало о сдвиге балан-

са от стимуляторных CD86⁺DC в сторону толерогенных клеток TLR-2⁺.

Обработка дексаметазоном не оказывала влияния на экспрессию HLA-DR антигенов и ингибиторной молекулы B7-H1. Тем не менее анализ коэкспрессии CD86 и B7-H1 показал (рис. 4), что дексаметазон более чем в два раза увеличивал относительное содержание клеток CD86⁻B7-H1⁺ как в популяции CD16⁻Mo-DC, так и среди CD16⁺Mo-DC ($p = 0,04$). Количество клеток, коэкспрессирующих CD86 и B7-H1, при этом снижалось, достигая статистически значимого уровня в культурах CD16⁺Mo-DC ($p = 0,04$).

Сравнительный анализ аллостимуляторной активности IFN-DC показал (рис. 5), что дексаметазон подавлял способность как CD16⁻Mo-DC, так и CD16⁺Mo-DC индуцировать пролиферативный ответ MNC на аллоантигены ($p = 0,008$ и $p = 0,005$ соответственно).

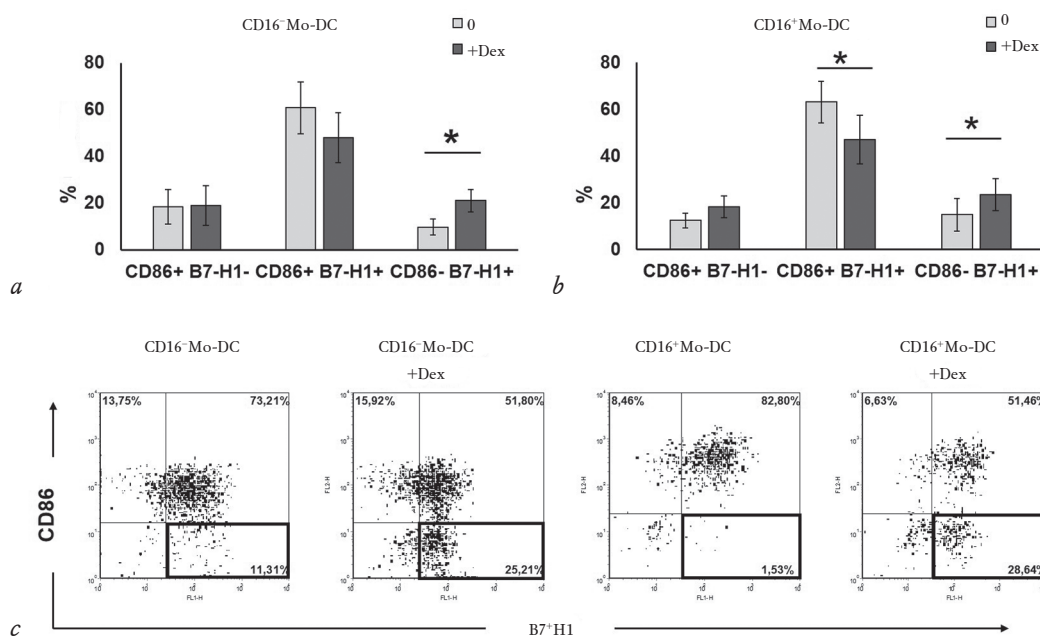


Рис. 4. Влияние дексаметазона на экспрессию CD86 и B7-H1 на IFN-DC, генерированных из CD16⁻ и CD16⁺ моноцитов: DC, экспрессирующие CD86 и B7-H1, в популяциях CD16⁻Mo-DC (*a*) и CD16⁺Mo-DC (*b*), генерированных в стандартных условиях и с дексаметазоном (+Dex), %, $M \pm SE$. Представлены индивидуальные DotPlot гистограммы распределения CD16⁻Mo-DC и CD16⁺Mo-DC, генерированных стандартно и в присутствии дексаметазона по флуоресценции FITC-меченных анти-B7-H1- и PE-меченных анти-CD86-антител (*c*). Левый верхний квадрант – CD86⁺B7-H1⁻ клетки, правый верхний квадрант – CD86⁺B7-H1⁺ клетки, правый нижний квадрант – CD86⁻B7-H1⁺клетки

Fig. 4. The effect of dexamethasone on CD86 and B7-H1 expression on CD16⁻ and CD16⁺ monocyte-derived IFN-DC. The data are presented in the form of $M \pm SE$ of the relative number of DC expressing CD86 and B7-H1 in CD16⁻Mo-DC (*a*) and CD16⁺Mo-DC cultures (*b*) generated under standard conditions and in the presence of dexamethasone (+Dex). Representative flow cytometric dot plots of co-staining of FITC-conjugated anti-B7-H1 and PE-conjugated anti-CD86 monoclonal antibodies on CD16⁻Mo-DC and CD16⁺Mo-DC generated under standard conditions and in the presence of dexamethasone (+Dex) are illustrated at (*c*). Upper left quadrant – CD86⁺B7-H1⁻ cells, upper right quadrant – CD86⁺B7-H1⁺ cells, lower right quadrant – CD86⁻B7-H1⁺ cells

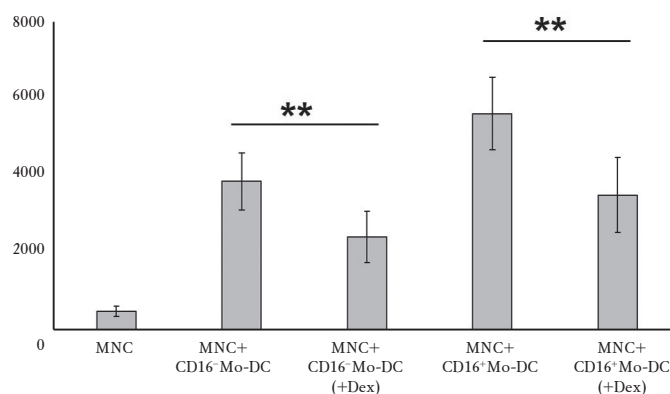


Рис. 5. Влияние дексаметазона на аллостимуляторную активность IFN-DC, генерированных из CD16⁻ и CD16⁺ моноцитов: пролиферативный ответ MNC в алло-СКЛ в отсутствии IFN-DC (MNC) и присутствии CD16⁻ Мо-DC и CD16⁺ Мо-DC, генерированных в стандартных условиях и с дексаметазоном (+Dex), имп/мин, $M \pm SE$. ** $p < 0,01$ (непараметрический W-критерий Вилкоксона).

Fig. 5. The effect of dexamethasone on allostimulatory activity of CD16⁻ and CD16⁺ monocyte-derived IFN-DC: proliferative response of MNC in allo-MLC test in the absence of IFN-DC (MNC), as well as in presence of CD16⁻ Mo-DC and CD16⁺ Mo-DC cultures generated under standard conditions and in the presence of dexamethasone (+Dex), cpm, $M \pm SE$. ** $p < 0.01$ (nonparametric Wilcoxon test)

Одной из причин снижения функциональной активности DC после обработки дексаметазоном является гормон-индуцированное повышение количества DC, экспрессирующих ко-ингибиторные (толерогенные) молекулы (B7-H1, TLR-2). Действительно, проведенный корреляционный анализ показал, что аллостимуляторная активность обеих исследуемых популяций, обработанных дексаметазоном, находится в обратной взаимосвязи с содержанием среди них клеток CD86⁻B7-H1⁺ ($rS = -0,72$; $p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В работе показано, что популяции моноцитов CD14⁺, содержащие и истощенные по клеткам CD16⁺, дифференцируются в DC, различающиеся по фенотипу и функциям. Промежуточные и неклассические моноциты CD16⁺ дифференцируются в IFN-DC с большей степенью зрелости по сравнению с DC, полученными из популяции классических клеток CD14⁺CD16⁻. Так, в отличие от CD16⁻ Мо-DC для CD16⁺ Мо-DC характерно меньшее количество клеток CD14⁺CD83⁺ промежуточной степени зрелости, преобладание CD14-негативных клеток в структуре CD83⁺DC, а также более выраженная способность индуцировать пролиферативный ответ в алло-СКЛ. Несмотря на отсутствие различий в экспрессии стимуляторных (HLA-DR, CD86) и ингибиторных молекул (B7-H1, TLR-2) на CD16⁺ Мо-DC и CD16⁻ Мо-DC, более низкая аллостимуляторная активность DC, генерированных из классических

моноцитов CD14⁺CD16⁻, по-видимому, обусловлена меньшей степенью зрелости этой популяции IFN-DC, тогда как для CD16⁺ Мо-DC эта функция детерминирована балансом костимуляторных (CD86) и ингибиторных (TLR-2) молекул.

Полученные данные согласуются с результатами других авторов. Показано, например, что повышение количества клеток CD16⁺ среди общего пула циркулирующих моноцитов ассоциируется с более зрелым статусом генерированных DC *in vitro* [13]. Очевидно, неклассические клетки CD14⁺CD16⁺⁺ являются более зрелой формой моноцитов. Об этом свидетельствует более выраженная (по сравнению с классическими и промежуточными моноцитами) экспрессия проапоптотических и антипролиферативных генов, ассоциированных с высоко дифференцированным статусом клеток; более высокая экспрессия антигенов MHC II класса и костимуляторных молекул; низкая фагоцитарная и повышенная аллостимуляторная активность, а также меньшая длина теломер [6, 14, 15]. Кроме того, именно в неклассических моноцитах экспрессируется определенный набор генов (*SIGLEC10*, *CD43*, *RARA*, *IRF8*), имеющих критическое значение для генерации DC [6, 16]. Соответственно, можно предположить, что моноциты CD14⁺CD16⁺⁺ в наибольшей степени детерминированы к дифференцировке в DC с иммуностимуляторными свойствами. Однако этим данным противоречит работа L.B. Voyette с соавт., которые показали, что только популяция классических моноцитов

CD14⁺CD16⁻ может быть предшественниками DC [7]. По-видимому, в данном случае важную роль играют способы выделения моноцитов, а также условия культивирования моноцитов, в частности применение GM-CSF и IL-4 для индукции дифференцировки DC. Нами впервые показано, что деплеция CD16⁺ из общего пула моноцитов не влияет на их способность дифференцироваться в DC при использовании IFN α вместо IL-4. При этом присутствие моноцитов CD16⁺, как клеток-прекурсоров с большей степенью зрелости, позволяет получить INF-DC с фенотипом и аллостимуляторной активностью, характерной для более зрелых DC.

Известно, что при различных стресс-реакциях, сопряженных с повышением уровня катехоламинов и глюкокортикоидов в крови, происходят активация моноцитов и изменение их субпопуляционного состава [4], что, в свою очередь, может отражаться на процессах дифференцировки и созревания DC. В настоящем исследовании впервые охарактеризовано влияние дексаметазона на созревание и функции IFN-DC, генерированных из субпопуляций моноцитов CD14⁺, оппозиционных по экспрессии CD16. Показано, что как CD16⁺Mo-DC, так и CD16⁻Mo-DC подвержены супрессорному эффекту дексаметазона, который проявляется задержкой созревания DC, сдвигом баланса соотношения CD86⁺/TLR-2⁺ в сторону толерогенных клеток TLR-2⁺, а также ингибированием стимуляторной активности IFN-DC в алло-СКЛ.

Интересно отметить, что доля клеток TLR-2⁺, ассоциированных с толерогенным фенотипом DC, в ответ на добавление дексаметазона значимо возрастала только в популяции CD16⁻Mo-DC, тогда как для CD16⁺Mo-DC эти изменения проявлялись в виде тенденции. Характерно, что классические моноциты CD14⁺CD16⁻ отличаются от моноцитов, экспрессирующих CD16⁺, более выраженной экспрессией TLR-2 в ответ на бактериальные антигены (ЛПС, пептидогликаны, энтеротоксин В *St. aureus*) [17]. По-видимому, присутствие дексаметазона в культурах IFN-DC на этапе конечного созревания усиливает эффект ЛПС на экспрессию TLR-2 на CD16⁻Mo-DC, поскольку интактные ЛПС-стимулированные CD16⁻Mo-DC и CD16⁺Mo-DC не различались по этому показателю.

В отличие от TLR-2 уровень экспрессии ко-ингибиторной молекулы B7-H1 при добавлении дексаметазона значимо не менялся в популяциях CD16⁻Mo-DC и CD16⁺Mo-DC. Следует отметить, что роль B7-H1 в биологии DC до конца не ясна. Показано, в частности, что молекула B7-

H1, экспрессируемая на DC, участвует не только в индукции апоптоза и анергии Т-клеток [18], но обладает также протективной функцией, обеспечивая устойчивость DC к лизису со стороны цитотоксических Т-клеток [19]. В настоящем исследовании подавляющая часть интактных CD16⁻Mo-DC и CD16⁺Mo-DC коэкспрессировали B7-H1 и CD86 (см. рис. 4), обладая при этом выраженной аллостимуляторной активностью. Добавление дексаметазона приводило к двукратному увеличению количества CD86⁻B7-H1⁺DC, одновременно снижая число клеток CD86⁺B7-H1⁺. Схожие результаты были получены J.-H. Le с соавт., которые в экспериментальных моделях показали, что различные толерогенные стимулы, в том числе и дексаметазон, приводят к увеличению количества CD86⁻B7-H1⁺ среди DC, индуцированных IL-4 [20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом полученные данные свидетельствуют о том, что IFN α -индуцированные DC эффективно генерируются из циркулирующих моноцитов CD14⁺, как обогащенных, так и истощенных по клеткам CD16⁺. Тем не менее наличие в общем пуле моноцитарных предшественников CD16⁺ ассоциируется с дифференцировкой IFN-DC с более зрелым фенотипом и высокой аллостимуляторной активностью. DC, генерированные из субпопуляций моноцитов, оппозиционных по экспрессии CD16, характеризуются чувствительностью к супрессорному эффекту дексаметазона. При этом толерогенное действие дексаметазона в субпопуляциях CD16⁻Mo-DC и CD16⁺Mo-DC может реализовываться с вовлечением различных механизмов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D.N., Leenen P.J.M., Liu Y.-J., MacPherson G., Randolph G.J., Scherberich J., Schmitz J., Shortman K., Sozzani S., Strobl H., Zembala M., Austyn J.M., Lutz M.B. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010; 116: e74–80. DOI: 10.1182/blood-2010-02-258558.
2. Feng A.-L., Zhu J.-K., Sun J.-T., Yang M.-X., Neckenig M.R., Wang X.-W., Shao Q.-Q., Song B.-F., Yang Q.-F., Kong B.-H., Qu X. CD16⁺ monocytes in breast cancer patients: expanded by monocyte chemoattractant protein-1 and may be useful for early diagnosis. *Clin. Exp. Immunol.* 2011; 164 (1): 57–65. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2011.04321.x.
3. Chara L., Sánchez-Atrio A., Pírez A., Cuende E., Albarrón F., Turrián A., Chevarría J., del Barco A.A., Sánchez M.A.,

- Monserrat J., Prieto A., de la Hera A., Sanz I., Diaz D., Alvarez-Mon M. The number of circulating monocytes as biomarkers of the clinical response to methotrexate in untreated patients with rheumatoid arthritis. *J. Transl. Med.* 2015; 13: 2. DOI: 10.1186/s12967-014-0375-y.
4. Wong K.L., Yeap W.H., Tai J.J.-Y., Ong S.M., Dang T.M., Wong S.C. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol. Res.* 2012; 53 (1–3): 41–57. DOI: 10.1007/s12026-012-8297-3.
 5. Bakdash G., Sittig S.P., Dijk T. van, Figdor C.G., Vries I.J.M. de. The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II. *Front. Immunol.* 2013; 4: 53 DOI: 10.3389/FIMMU.2013.00053.
 6. Ancuta P., Liu K.-Y., Misra V., Wacleche V., Gosselin A., Zhou X., Gabuzda D. Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16⁺ and CD16⁻ monocyte subsets. *BMC Genomics.* 2009; 10: 403. DOI: 10.1186/1471-2164-10-403.
 7. Boyette L.B., Macedo C., Hadi K., Elinoff B.D., Walters J.T., Ramaswami B., Chalasani G., Taboas J.M., Lakkis F.G., Metes D.M. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS One.* 2017; 12 (4): e0176460. DOI: 10.1371/journal.pone.0176460.
 8. Thurner B., Ruder C., Dieckmann D., Heuer M., Kruse M., Glaser A., Keikavoussi P., Kdmpgen E., Bender A., Schuler G. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J. Immunol. Methods.* 1999; 223: 1–15. DOI: 10.1016/S0022-1759(98)00208-7.
 9. Papewalis C., Jacobs B., Wuttke M., Ullrich E., Baehring T., Fenk R., Willenberg H.S., Schinner S., Cohnen M., Seissler J., Zacharowski K., Scherbaum W.A., Schott M. IFN- γ skews monocytes into CD56⁺-expressing dendritic cells with potent functional activities in vitro and in vivo. *J. Immunol.* 2008; 180 (3): 1462–1470. DOI: 10.4049/jimmunol.180.3.1462.
 10. Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Мишинов С.В., Ступак В.В., Останин А.А., Черных Е.Р. CCL19/CCL21-зависимый хеммотаксис дендритных клеток в норме и при злокачественных опухолях головного мозга. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2014; 158 (12): 752–756. [Tyrinova T.V., Leplina O.Y., Tikhonova M.A., Mishinov S.V., Stupak V.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R. CCL19/CCL21-dependent chemotaxis of dendritic cells in healthy individuals and patients with brain tumors. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2014; 158 (12): 752–756 (in Russ.)]. DOI: 10.1007/s10517-015-2862-4.
 11. Leplina O. Yu., Tyrinova T.V., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Interferon alpha induces generation of semi-mature dendritic cells with high pro-inflammatory and cytotoxic potential. *Cytokine.* 2015; 71: 1–7. DOI: 10.1016/j.cyto.2014.07.258.
 12. Курочкина Ю.Д., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Баторов Е.В., Сизиков А.Э., Останин А.А., Черных Е.Р. Влияние дексаметазона на интерферон- α -индуцированную дифференцировку моноцитов в дендритные клетки. *Медицинская иммунология.* 2016; 18 (4): 347–356. [Kurochkina Y.D., Leplina O.Y., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Batorov E.V., Sizikov A.E., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Effect of dexamethasone on interferon- α -induced differentiation of monocytes to dendritic cells. *Med. Immunol.* 2016; 18 (4): 347–356. (in Russ.)]. DOI: 10.15789/1563-0625-2016-4-347-356.
 13. Dopheide J.F., Zeller G.C., Kuhlmann M., Girndt M., Sester M., Sester U. Differentiation of monocyte derived dendritic cells in end stage renal disease is skewed towards accelerated maturation. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2015; 24 (2): 257–266. DOI: 10.17219/acem/40463.
 14. Wong K.L., Tai J.J.-Y., Wong W.-C., Han H., Sem X., Yeap W.-H., Kourilsky P., Wong S.-C. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood.* 2011; 118 (5): e1631. DOI: 10.1182/blood-2010-12-326355.
 15. Merino A., Buendia P., Martin-Malo A., Aljama P., Ramirez R., Carracedo J. Senescent CD14⁺CD16⁺ Monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity. *J. Immunol.* 2011; 186 (3): 1809–1815. DOI: 10.4049/jimmunol.1001866.
 16. Gren S.T., Rasmussen T.B., Janciauskiene S., Hekansson K., Gerwien J.G., Grip O. A single-cell gene-expression profile reveals inter-cellular heterogeneity within human monocyte subsets. *PLoS One.* 2015; 10 (12): e0144351. DOI: 10.1371/journal.pone.0144351.
 17. Skinner N.A., MacIsaac C.M., Hamilton J.A., Visvanathan K. Regulation of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 on CD14^{dim}CD16⁺ monocytes in response to sepsis-related antigens. *Clin. Exp. Immunol.* 2005; 141 (2): 270–278. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2005.02839.x.
 18. Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Leplina O.Y., Shevela E.Y., Nikonov S.D., Zhdanov O.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Cytotoxic activity of dendritic cells as a possible mechanism of negative regulation of T lymphocytes in pulmonary tuberculosis. *Clin. Dev. Immunol.* 2012; 2012: 1–9. DOI: 10.1155/2012/628635.
 19. Chen L., Azuma T., Yu W., Zheng X., Luo L., Chen L. B7-H1 maintains the polyclonal T cell response by protecting dendritic cells from cytotoxic T lymphocyte destruction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2018; 115 (12): 3126–3131. DOI: 10.1073/pnas.1722043115.
 20. Lee J.-H., Park C.-S., Jang S., Kim J.-W., Kim S.-H., Song S., Kim K., Lee C.-K. Tolerogenic dendritic cells are efficiently generated using minocycline and dexamethasone. *Scientific Reports.* 2017; 7: 15087. DOI: 10.1038/s41598-017-15569-1.

Вклад авторов

Черных Е.Р., Останин А.А. – разработка концепции и дизайна. Тыринова Т.В., Курочкина Ю.Д., Олейник Е.А., Сахно Л.В. – культуральные работы. Тихонова М.А. – пробоподготовка для цитометрического анализа, цитометрический анализ проб. Курочкина Ю.Д., Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Черных Е.Р. – анализ и интерпретация данных. Тыринова Т.В., Черных Е.Р., Останин А.А. – подготовка текста статьи. Останин А.А., Черных Е.Р. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

Сведения об авторах

Черных Елена Рэмовна, д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, зав. лабораторией клеточной иммуноterapiи, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0003-2346-6279.

Тыринова Тамара Викторовна, канд. биол. наук, науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммуноterapiи, НИИФКИ, г. Новосибирск.

Леплина Ольга Юрьевна, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммуноterapiи, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0003-3169-8643.

Тихонова Марина Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммуноterapiи, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0002-2366-1667.

Курочкина Юлия Дмитриевна, аспирант, лаборатория клеточной иммуноterapiи НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0002-7080-777X.

Олейник Екатерина Александровна, аспирант, лаборатория клеточной иммуноterapiи НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0002-1044-3564.

Сахно Людмила Васильевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммуноterapiи, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0003-3290-7910.

Останин Александр Анатольевич, д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммуноterapiи, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0001-6895-938X.

(✉) Черных Елена Рэмовна, e-mail: ct_lab@mail.ru.

Поступила в редакцию 03.09.2018
Подписана в печать 17.12.2018

Authors contribution

Chernykh E.R., Ostanin A.A. – conception and design; Tyrinova T.V., Kurochkina Yu. D., Oleynik E.A., Sakhno L.V. – works with cultures. Tikhonova M.A. – preparation of samples for cytometry, cytometry of the samples. Kurochkina Yu. D., Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Chernykh E.R., – analysis and interpretation of data. Tyrinova T.V., Chernykh E.R., Ostanin A.A. – drafting of the manuscript. Ostanin A.A., Chernykh E.R. – final approval of the manuscript for publication.

Authors information

Chernykh Elena R., DM, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-2346-6279.

Tyrinova Tamara V., PhD, Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Leplina Olga Yu., DM, Leading Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-3169-8643.

Tikhonova Marina A., PhD, Superior Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-2366-1667.

Kurochkina Yuliya D., Postgraduate Student, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-7080-777X.

Oleynik Ekaterina A., Postgraduate Student, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-1044-3564.

Sakhno Ludmila V., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation

Ostanin Alexander A., DM, Professor, Main Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-6895-938X.

(✉) Chernykh Elena R., e-mail: ct_lab@mail.ru.

Received 03.09.2018
Accepted 17.12.2018