

••• МІКРОБІОЛОГІЯ І ВІРУСОЛОГІЯ ••• MICROBIOLOGY AND VIROLOGY •••

УДК: 577.826+578.832:615.281.8+477

Адаптивні властивості виділених в Україні вірусів грипу в умовах обмеженого використання протівірусних препаратів **С.Бабій¹, Л.Радченко², А.Фесенко², О.Смутько¹, Д.Степанський³, А.Міроненко²**

¹ННЦ «Інститут біології» Київський національний університет імені Тараса Шевченка (Київ, Україна)

²ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В.Громашевського» НАМН України (Київ, Україна)

³ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» (Дніпропетровськ, Україна)
cbiitjlaha@ukr.net

Важливою проблемою залишається адаптація вірусів грипу до протівірусних препаратів, а саме до інгібіторів нейрамінідази. В роботі було досліджено наявність точкових мутацій у гені нейрамінідази вірусів грипу, виділених в Україні в епідемічні сезони 2011–2012 рр. та 2012–2013 рр. Для цього секвенували гени вірусів грипу та провели генотиповий аналіз. При дослідженні амінокислотних послідовностей нейрамінідази вірусів грипу типу А(Н3N2) та А(Н1N1)pdm не виявили замін у відповідних позиціях, що свідчить, що українські ізоляти є чутливими до озелтамівіру, занамівіру та перамівіру. У вірусів грипу типу В не виявлено замін у позиціях, асоційованих із резистентністю до NAI.

Ключові слова: вірус грипу, нейрамінідаза, штам, резистентність, мутація, протівірусні препарати, озелтамівір, занамівір, перамівір.

Адаптивные свойства выделенных в Украине вирусом гриппа в условиях ограниченного использования противовирусных препаратов **С.Бабий, Л.Радченко, А.Фесенко, О.Смутько, Д.Степанський, А.Міроненко**

Важной проблемой остается адаптация вирусом гриппа к противовирусным препаратам, а именно к ингибиторам нейраминидазы. В работе было исследовано наличие точечных мутаций в гене нейраминидазы вирусом гриппа, выделенных в Украине в эпидемические сезоны 2011–2012 гг. и 2012–2013 гг. Для этого секвенировали гены вирусом гриппа и провели генотипический анализ. При исследовании аминокислотных последовательностей нейраминидазы вирусом гриппа типа А(Н3N2) и А(Н1N1)pdm не обнаружили замен в соответствующих положениях, что свидетельствует, что украинские изоляты чувствительны к оселтамивиру, занамивиру и перамивиру. У вирусом гриппа типа В не обнаружено замен в положениях, ассоциированных с резистентностью к NAI.

Ключевые слова: вирус гриппа, нейраминидаза, штам, резистентность, мутация, противовирусные препараты, оселтамивир, занамивир, перамивир.

Adaptive properties of influenza viruses isolated in Ukraine, at the limited use of antiviral drugs **S.Babii, L.Radchenko, A.Fesenko, O.Smutko, D.Stepanskyu, A.Mironenko**

Today the important problem is an adaptation of influenza viruses to antiviral drugs, especially the neuraminidase inhibitors. In this study the presence of point mutations was investigated in the neuraminidase of influenza viruses isolated in the Ukraine in the epidemic season of 2011–2012 years and 2012–2013 years. For these influenza viruses, genes were sequenced and their genotypes were analysed. No replacements were found in the comparable positions of the amino acid sequences of influenza virus neuraminidase type А(Н3N2) and А(Н1N1)pdm, indicating that the Ukrainian isolates are sensitive to oseltamivir, zanamivir and peramivir. There were not detected the substitutions in the positions associated with the resistance to NAI in influenza viruses type В.

Key words: influenza virus, neuraminidase, strain, resistance, mutation, antiviral drugs, oseltamivir, zanamivir, peramivir.

Вступ

Вчені різних країн світу вже багато років займаються вивченням проблеми мінливості збудника грипу, причинами та дослідженням появи нових резистентних до противірусних препаратів штамів вірусу грипу (Fauquet et al., 2005). Існує два механізми антигенної мінливості вірусів грипу: відносно невеликі зміни, які відбуваються шляхом точкових мутацій (антигенний дрейф), та виражені зміни внаслідок обміну генетичними сегментами (антигенний шифт). Це еволюційний механізм пристосування вірусу для забезпечення виживання. Особливості будови вірусу грипу (сегментованість геному) полегшує обмін окремими генетичними фрагментами за рахунок реасортацій (Ахматуллина, Саятов, 1991). Високі темпи зміни поколінь вірусів, одночасна циркуляція вірусів грипу людини і тварин визначають швидкість еволюційних процесів. Все це уможливорює формування вірусу з новими антигенними і біологічними властивостями, тобто полегшує адаптацію вірусу до змін у навколишньому середовищі. Мінливість антигенних і біологічних властивостей є фундаментальною особливістю вірусів грипу типу А (Дзюблик, Широбоков, 2005).

Поліпептидний ланцюг нейрамінідази (NA) вірусу грипу типу А складається з 470 амінокислотних залишків. Амінокислотна послідовність NA кодується шостим сегментом РНК. У вірусів грипу типу А описано 9 субтипів NA, в той час як для вірусів грипу типу В та С описаний лише один субтип нейрамінідази (Ахматуллина, Саятов, 1991). Гени NA вірусу грипу поділяють на дві групи: група I (вірус грипу типу А) та група II (вірус грипу типу В). Субтипи нейрамінідази вірусу грипу типу А розділяють на дві філогенетичні групи: до першої групи нейрамінідаз входять N1, N4, N5 та N8 субтипи, до другої групи – N2, N3, N6, N7 та N9 субтипів. Віруси грипу типу А обох субгруп незалежно адаптувались до своїх господарів (людини, свині, птахів та коней) та мають подібні патерни складу господар-специфічних кластерів (Jianpeng et al., 2012).

Для визначення адаптації вірусів до противірусних препаратів проводять аналіз нуклеотидної послідовності, включаючи піросеквенування (Deyde, Gubareva, 2009) та деякі модифікації ЗТ-ПЛР у реальному часі (Chidlow et al., 2010). Ці методи мають переваги для швидкої детекції вірусів, які містять асоційовані з резистентністю заміни у порівнянні з фенотиповим/функціональним аналізом та стандартним секвенуванням за методом Сенгера. Також за допомогою цих підходів можливе дослідження первинних клінічних зразків (таких як носоглоткові змиви), при цьому виключається ймовірність будь-яких змін, які могли б виникнути внаслідок культивування вірусу у культурі клітин. Однак за допомогою генотипового аналізу детектуються лише вже існуючі заміни, які пов'язані із резистентністю, такі як H274Y у нейрамінідазі 1-го типу. Варто зазначити, що ці методи технічно не визначають ізолят як чутливий чи резистентний. При відсутності мутацій можна говорити лише про те, що вірус ймовірно чутливий до препарату (Дзюблик, Широбоков, 2005).

Оскільки на сьогоднішній день абсолютно доведена резистентність вірусів грипу типу А до препаратів адамантанового ряду (ремантадин та амантадин), яка зумовлена декількома мутаціями, закріпленими на генетичному рівні, використання амантадину чи ремантадину є не доцільним (Deyde et al., 2007). Проблема адаптації вірусів грипу до противірусних препаратів, а саме набуття резистентності до інгібіторів нейрамінідази (neuraminidase inhibitors, NAIs), на сьогодні залишається важливою, а в світлі нещодавньої пандемії набуває ще більшого значення.

Останніми роками (з 2008 року) відзначається виникнення резистентних до препарату озелтамівір («Таміфлю»™) вірусів сезонного грипу підтипу А(H1N1) (до 60%). Оскільки цей препарат є найбільш ефективним на даний час для лікування грипу, дослідженню даного явища на сьогодні приділяється велика увага. Раніше було виявлено специфічну мутацію (за якої гістидин замінювався на тирозин – H275Y) в гені NA, з присутністю якої асоціюють виникнення резистентності до препарату (Lackenby et al., 2010). Така мутація детектована і серед українських ізолятів минулих років (до 35%). Під час пандемії 2009–2010 років озелтамівір був препаратом вибору №1 у специфічній терапії грипу. В Україні віруси грипу А(H1N1)pdm у епідемічному сезоні 2010–2011 рр. були чутливими до озелтамівіру, а в епідемічному сезоні 2011–2012 рр. – не циркулювали на території нашої країни (European Centre for Disease Prevention and Control, 2012). Тому особливо важливий моніторинг наявності замін, пов'язаних із резистентністю, особливо мутації H275Y, у вірусів, які циркулювали в Україні в 2012–2013 рр., що дасть змогу говорити про появу резистентних до озелтамівіру українських ізолятів пандемічних вірусів грипу А(H1N1)pdm чи навпаки – їх чутливості.

Отже, метою нашої роботи було дослідження наявності точкових мутацій (антигенного дрейфу), асоційованих із резистентністю до інгібіторів нейрамінідази у гені нейрамінідази вірусів грипу, виділених в Україні в епідемічні сезони 2011–2012 рр. та 2012–2013 рр.

Об'єкти і методи дослідження

В роботі були використанні українські ізоляти вірусів грипу епідемічних сезонів 2011–2012 рр. та 2012–2013 рр.

Штамову ідентифікацію вірусів проводили в реакції гальмування гемаглютинації за стандартною методикою (<http://uapatents.com/4-67896-sposib-tekhniki-postanovki-reakci-gemaglyutinaci-ta-reakci-galmuvannya-gemaglyutinaci.html>). Перед дослідженням проводили виділення та накопичення вірусів у культурі клітин MDCK. Клітини отримані для дослідження з Санкт-Петербурзького Інституту грипу РАНH у 2006 році.

Для визначення штамової приналежності вірусів грипу було використано референс-штами та штамоспецифічні сироватки до цих штамів, надані Центром контролю за інфекціями (CDC Атланта, США): A/Perth/16/2009, A/Victoria/361/2011 та B/Malaysia/2506/04.

Виділення РНК вірусів грипу здійснювали з використанням комерційного набору QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) за схемою, зазначеною в інструкції виробника (WHO, 2009).

Для постановки полімеразно-ланцюгової реакції готували реакційну суміш, відповідно до рекомендованої методики «Протокол полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в реальному часі (real-time RT-PCR) Центру контролю за інфекціями (CDC) для виявлення та дослідження свинячого та сезонних вірусів грипу (версія 2009)» (WHO, 2009). Для постановки ПЛР-аналізу використовували: набір для приготування реакційної суміші (Ambion AgPath-IDTM One-Step RT-PCR Kit); набір праймерів і зондів з двома мітками (Taqman), надані Центром контролю за інфекціями (CDC, Атланта, США); прилад 96-луночкового формату ПЛР в реальному часі Applied Biosystems™ real-time PCR 7500.

Секвенування генів виділених нами вірусів A(H3N2), пандемічних A(H1N1) та грипу В було здійснене у Світовому центрі грипу в Лондоні з використанням технології RNA-SEQ, що дає можливість секвенувати кодуєчі та некодуєчі мРНК (The Francis Crick institute). Для проведення генотипового аналізу застосовували програмне забезпечення пакету програм MEGA 5.1 (Tamura et al., 2007). На рис. 1 подані фрагменти амінокислотних послідовностей українських ізолятів вірусів грипу A(H3N2) в програмі MEGA 5.1.

Рис. 1. Фрагменти амінокислотних послідовностей українських ізолятів вірусів грипу A(H3N2) в програмі MEGA 5.1

Послідовності пандемічних вірусів грипу, виділених в різних країнах, отримані з бази даних веб-ресурсу GISAID (<http://platform.gisaid.org/>) та ресурсу, який містить інформацію про послідовності пандемічного вірусу грипу (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/SwineFlu.html>).

Визначення наявності у вірусів грипу заміни амінокислот, які призводять до резистентності до інгібіторів нейрамінідази, включало наступні кроки:

1. Пошук аналогічних сегментів (NA) до українських ізолятів з використанням веб-ресурсу GISAID (<http://platform.gisaid.org/>). Ідентифікацію та порівняння отриманих послідовностей проводили за допомогою системи BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) – аналізу (Бутвиловский и др., 2006) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2. Вирівнювання послідовностей проводили, застосовуючи алгоритм ClustalW (Бутвиловский и др., 2006).

3. Переведення нуклеотидних сиквенсів в амінокислотні послідовності здійснювали за допомогою програми MEGA 5.1 (Tamura et al., 2007).

4. Порівняння амінокислотних послідовностей поверхневого антигену NA вірусів грипу проводили з метою виявлення певних замін у послідовностях, пов'язаних зі зниженням чутливості до NA інгібіторів (NAI), та оцінки їх якості.

Результати та обговорення

З протестованих в real-time RT-PCR 401 клінічного зразка, які отримали від хворих на грипозоподібні захворювання (ГПЗ) та тяжкі гострі респіраторні захворювання (ТГРЗ), 209 зразків у ПЛР виявились позитивними на грип, що становило 49,4% досліджених зразків. Переважну більшість позитивних зразків (207 із 209) становили віруси грипу A(H3N2). Два ізоляти виявились позитивними на грип В. Серед досліджених зразків сезону 2011–2012 рр. не виявлено жодного пандемічного ізоляту A(H1N1)pdm, який входив до складу вакцини на даний епідемічний сезон (рис. 2).

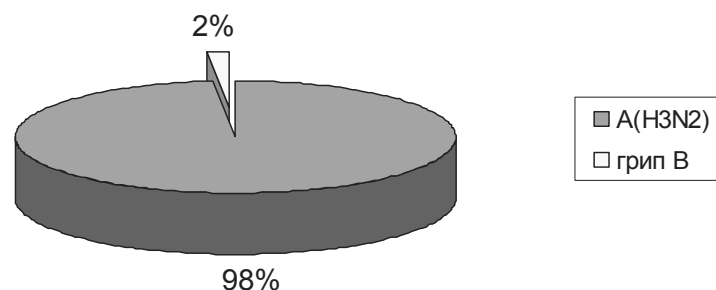


Рис. 2. Структура популяції виділених вірусів грипу сезону 2011–2012 років в Україні

Схожа закономірність спостерігалась у всьому Європейському регіоні. За даними Європейського центру контролю за інфекціями, в період з 1 вересня 2011 р. до 1 березня 2012 р. були протестовані 355 клінічних зразків з Національних центрів грипу. Більшість проаналізованих зразків – 83% виявились вірусами грипу A(H3N2), 6% – вірусами грипу В лінії V/Yamagata, 3% – вірусами грипу A(H1N1)pdm і 4% – вірусами грипу В лінії V/Victoria (European Centre for Disease Prevention and Control, 2012).

15 ізолятів вірусу грипу A(H3N2), виділених в Україні в епідемічний сезон 2011–2012 рр., за результатами визначення штамової приналежності за допомогою штамоспецифічних імунних сироваток в реакції гальмування гемаглютинації (РГГА), мали спорідненість до двох референс-штамів A/Perth/16/2009 та A/Victoria/361/2011, про що свідчать високі титри реагування (1:160 та 1:160 відповідно) з сироватками до цих штамів. Віруси, які циркулювали на початку 2012 року в січні та лютому, мали спорідненість до референс-штаму A/Perth/16/2009, а віруси, які ізолювали в березні та квітні, були більш близькими антигенно до штаму A/Victoria/361/2011. Слід зазначити, що за останні декілька років (з 2008 року) віруси грипу A(H3N2) мали характерну особливість – відсутність здатності аглютинувати пташині еритроцити та еритроцити людини I(0) групи крові (European Centre for Disease Prevention and Control, 2012). У них збереглася здатність аглютинувати лише еритроцити гвінейської свинки, що було враховано при проведенні реакції гальмування гемаглютинації.

Результати визначення штамової приналежності ізолятів грипу В в реакції гальмування гемаглютинації (РГГА) показали, що досліджуваний ізолят прореагував у титрі 1:320 із сироваткою до штаму V/Malaysia/2506/04, який належить до генетичної лінії V/Victoria.

Визначити штамову приналежність у РГГА трьох ізолятів пандемічного вірусу A(H1N1) епідемічного сезону 2012–2013 рр. не вдалося, можливо, внаслідок відсутності у них здатності аглютинувати еритроцити доступних тварин.

При дослідженні амінокислотних послідовностей NA вірусів грипу типу A(H3N2) епідемічних сезонів 2011–2012 рр. (32 послідовності) та 2012–2013 рр. (1 послідовність) не виявили замін у

відповідних позиціях E119I/V/D, Q136K, D151E/V, I222L, R224K, E276D, R292K, N294S, R371K, які асоціюються із резистентністю до NA1. Це свідчить про те, що, ймовірно, українські ізоляти є чутливими до озелтамівіру, занамівіру та перамівіру.

Так, після дослідження трьох послідовностей нейрамінідази пандемічних вірусів грипу A(H1N1)pdm, виділених в Україні у епідемічний сезон 2012–2013 рр., було встановлено, що всі ізоляти в позиції 275 мали амінокислоту гістидин, а це свідчить про чутливість їх до препарату озелтамівіру. Також спостерігалась відсутність замін E119G/V, Q136K, Y155H, D198G, I222K/R/V, S246N/G, H274Y, N294S (нумерація по N2), асоційованих зі зниженням чутливості до NA1. Це свідчить про те, що, ймовірно, українські ізоляти є чутливими до озелтамівіру, занамівіру та перамівіру.

При дослідженні амінокислотних послідовностей нейрамінідази вірусів грипу типу В епідемічних сезонів 2011–2012 рр. (3 послідовності) не виявили заміни у позиціях, асоційованих із резистентністю до NA1 (табл. 1).

Таблиця 1.

Аналіз замін амінокислот у нейрамінідазі, асоційованих зі зниженням чутливості до інгібіторів нейрамінідази

Послідовність	Заміщення амінокислоти, нумерація по N2									
	E119A (G,V,A/D)	R152K	D198E (N, Y)	I222T (V/I)	H274Y	R292K	N294S	T365R	R371K	G402S
B/Ukraine/104/ 2012	E	K	D	I	H	R	N	R	R	G
B/Ukraine/5374/2012	E	K	D	I	H	R	N	R	R	G
B/Ukraine/5376/2012	E	K	D	I	H	R	N	R	R	G

Слід відмітити, що у вірусів грипу типу В було виявлено заміну у 365 позиції треоніну на аргінін (T365R, нумерація по N2). З даною мутацією не асоціює зниження чутливості до препаратів, але амінокислота в цій позиції бере участь у формуванні ферментативно активного центру NA і, ймовірно, відіграє важливу роль у виході віріону з клітини.

Схожа ситуація спостерігалася й у європейському регіоні (табл. 2).

Таблиця 2.

Резистентність до NA1 вірусів грипу, які циркулювали в Європейському регіоні, за типом та субтипом вірусів грипу у епідемічному сезоні 2011–2012 рр.

Тип/субтип вірусів грипу	Резистентність до NA1			
	Озелтамівір		Занамівір	
	Кількість зразків	Резистентні n (%)	Кількість зразків	Резистентні n (%)
A(H3N2)	715	0	707	0
A(H1N1)pdm	54	0	54	0
B	56	0	55	0

У епідемічному сезоні 2011–2012 рр. на чутливість до антивірусних препаратів (на наявність мутації H275Y в амінокислотній послідовності нейрамінідази) було проаналізовано 855 зразків вірусів грипу, виділених у Данії, Німеччині, Італії, Нідерландах, Норвегії, Португалії, Румунії, Швеції та Великій Британії. Всі досліджувані віруси грипу A(H3N2), A(H1N1)pdm та віруси грипу типу В були чутливими до озелтамівіру та занамівіру (European Centre for Disease Prevention and Control, 2012).

Оскільки у генотиповому аналізі можна виявити лише вже відомі мутації, асоційовані із резистентністю, то відсутність замін не свідчить про чутливість до препарату. Тому сьогодні оцінка чутливості до NA1 має ґрунтуватись не тільки на генотиповому, а й на функціональному (фенотиповому) аналізах.

В сезоні 2012–2013 років в популяції вірусів грипу в Україні були відсутні заміни, пов'язані із резистентністю до інгібіторів нейрамінідази, що свідчить про ймовірну чутливість виділених штамів до цих препаратів. Дані фенотипового аналізу (аналіз чутливості вірусів грипу за методом MUNANA),

який було проведено John McCauley (Лондон) у Світовому центрі грипу, підтвердили чутливість усіх українських штамів до озелтамівіру та занамівіру (WHO Influenza Centre, 2013).

Отже, всі досліджені ізоляти вірусів грипу епідемічного сезону 2012–2013 були чутливими до озелтамівіру та занамівіру. Це свідчить про те, що віруси грипу даних сезонів ще не пристосувалися до інгібіторів нейрамінідази, а ці препарати є перспективними для етіотропного лікування тяжких форм грипу.

Висновки

За результатами генотипового аналізу всі досліджувані віруси епідемічних сезонів 2011–2012 рр. та 2012–2013 рр., ймовірно, були чутливими до інгібіторів нейрамінідази у зв'язку з відсутністю асоційованих із резистентністю замін у гені нейрамінідази.

Віруси грипу типу В епідемічного сезону 2011–2012 рр. містили мутацію Т365R в активному центрі NA, яка не пов'язана із зниженням чутливості до препаратів.

Встановлено, що за результатами фенотипового та генотипового аналізів всі досліджені ізоляти вірусів грипу, виділені у епідемічному сезоні 2012–2013 рр., були чутливими до інгібіторів нейрамінідази (озелтамівір та занамівір).

Список літератури

- Ахматуллина Н.Б., Саятов М.Х. Биология вируса гриппа человека и животных. – Алма-Ата: Гылым, 1991. – 192с. /Akhmatullina N.B., Sayatov M.X. Biologiya virusa gripa cheloveka i zhivotnykh. – Alma-Ata: Gilim, 1991. – 192s./
- Бутвиловский А.В., Барковский Е.В., Бутвиловский В.Э. Базисные методы молекулярной эволюции: учеб.-метод. пособие. – Минск: БГМУ, 2006. – 36с. /Butvilovskiy A.V., Barkovskiy Ye.V., Butvilovskiy V.Ye. Bazisnyye metody moleculyarnoy evolyutsii. – Minsk: BGMU, 2006. – 36s./
- Дзюблик І.В., Ширококов В.П. Грип та його профілактика. – К., 2005. – 194с. /Dzyublik I.V., Shyrobokov V.P. Gryp ta yogo profilaktyka. – K., 2005. – 194s./
- Chidlow G.R., Harnett G.B., Williams S.H. et al. The detection of oseltamivir-resistant pandemic influenza A/H1N1 2009 viruses using a real-time RT-PCR assay // J. Virol. Methods. – 2010. – Vol.169. – P. 47–51.
- Deyde V.M., Gubareva L.V. Influenza genome analysis using pyrosequencing method: current applications for a moving target // Expert Rev. Mol. Diagn. – 2009. – Vol.9. – P. 493–509.
- Deyde V.M., Xu X., Bright R.A. et al. Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A(H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide // J. Infect. Dis. – 2007. – Vol.196. – P. 249–257.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Influenza virus characterisation Summary Europe, March 2012 <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1204-TED-CNRL-report.pdf>
- European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance report. Influenza overview week 22/2012. http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Forms/ECDC_DispForm.aspx?ID=899
- Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J. et al. Virus Taxonomy VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses // Elsevier Academic Press. – 2005. – P.1162.
- Jianpeng Xu, Davis C.T., Christman M.C. et al. Evolutionary history and phylodynamics of influenza A and B neuraminidase (NA) genes inferred from large-scale sequence analyses // PLoS One. – 2012. – Vol.7. – Issue 7:e38665. – P. 1–15. <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0038665>
- Lackenby A., Hungnes O., Dudman S.G. et al. Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A(H1N1) viruses in Europe // EuroSurveill. – 2010. – Vol.15. – P. 1–3.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // Mol Biol Evol. – 2007. – Vol.24. – P. 1596–1599.
- The Francis Crick institute. Advanced Sequencing. <http://www.crick.ac.uk/research/science-technology-platforms/advanced-sequencing/>
- WHO. CDC protocol of real-time RT-PCR for swine influenza A(H1N1) revision 1. April 2009. <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimertpcr/en/index.html>.
- WHO influenza centre, London. Summary of NIMR results, 23–25 September 2013. <http://www.crick.ac.uk/media/221859/nimr-report-sep2013final.pdf>

Представлено: Н.О.Виноград / Presented by: N.O.Vinograd

Рецензент: А.М.Самойлов / Reviewer: A.M.Samoylov

Подано до редакції / Received: 14.04.2015