

Современное представление о ренальных стволовых клетках

С.С. Тодоров¹, М.М. Батюшин²

¹ Морфологический отдел, отдел молекулярно-биологических и оптических методов исследования, 344000, Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29, Ростовский государственный медицинский университет, Россия

² Отделение нефрологии, 344000, Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29, Ростовский государственный медицинский университет, Россия

The current understanding of the renal stem cells

S.S. Todorov¹, M.M. Batiushin²

¹ The department of morphology, molecular biological and optical methods of research, 344000, Rostov-on-don, Nakhichevansky str., 29, Rostov state medical University, Russia

² The department of Nephrology, 344000, Rostov-on-don, Nakhichevansky str., 29, Rostov state medical University, Russia

Ключевые слова: почка, ренальные стволовые клетки, подоциты, эпителий канальцев, иммуногистохимия, молекулярная биология, дифференцировка клеток, дедифференцировка клеток, эпителиально-мезенхимальный переход, фиброз почечной ткани, почечная недостаточность

Резюме

Обсуждаются функциональные особенности, локализация ренальных стволовых клеток (РСК), их роль в механизмах репарации почки. Предполагается, что в качестве РСК могут выступать париетальные эпителиальные клетки капсулы Боумена клубочков. При этом важное значение для определения РСК имеет выявление иммунофенотипа CD24, CD133, PDX (подокаликсин). Есть указания о наличии РСК с PDX-позитивным и PDX-негативным статусом, который определяет дифференцировку их в подоциты. В канальцевом эпителии почки РСК могут трансформироваться в зрелые эпителиальные клетки путем дедифференцировки или локализоваться отдельными группами. До настоящего времени окончательно не решен вопрос о наличии РСК среди клеток эпителия извитых канальцев (КЭИК). Известно, что КЭИК являются высокоспециализированными, дифференцированными клетками, они имеют кубическую или цилиндрическую форму, полярное апикально-базальное расположение. Фенотипически КЭИК, как и подоциты, обладают низкой митотической активностью, однако в случае их повреждения в них может экспрессироваться белок cyclin D1, являющийся индикатором G1-фазы митотического цикла. Обсуждается несколько источников клеток, способных к дифференцировке в КЭИК: участие самих КЭИК в процессах регенерации, наличие единичных РСК среди КЭИК, роль экстраренальных стволовых клеток (пул пролиферации клеток). Наиболее популярной является модель развития дифференцированных КЭИК, которые проходят этап дедифференцировки. Дедифференцировка КЭИК включает переход из эпителиального в мезенхимальное состояние (эпителиально-мезенхимальный переход, ЭМП) и возврат к клеточному циклу с развитием КЭИК (мезенхимально-эпителиальный переход, МЭП). Однако остается непонятным, может ли среди образующихся КЭИК при МЭП появляться только зрелые формы клеток или отдельные из них могут сохранять свойства стволовых. Выявление различных типов РСК открывает новый этап изучения биологических закономерностей регенерации различных клеточных компонентов нефрона, что определит создание новых лекарственных препаратов, предотвратит развитие фиброза почки и почечной недостаточности.

Адрес для переписки: Сергей Сергеевич Тодоров
Тел.: +79185083789 e-mail: setodorov@yandex.ru

Corresponding author: Sergey S Todorov
Tel.: +79185083789 e-mail: setodorov@yandex.ru

Abstract

The role, significance, the localization of renal stem cells (RSC) are discussed. It is expected that the role of RSC can act parietal epithelial cells of Bowman's capsule of glomeruli. At the same time important to determine the RSC is the identification of immunophenotype CD24, CD133, PDX. There are indications of the presence of RSC with PDX positive and negative status, which determines their differentiation in podocytes. In renal tubular epithelium RSC can be transformed into mature epithelial cells by dedifferentiation of localized or specific groups. So far, not fully resolved the issue of the presence of RSC among epithelial cells of the convoluted tubules. It is known that epithelial cells (EC) of tubules are highly specialized, differentiated epithelial cells, cubic or cylindrical, are polar apical-basal location. Phenotypically as podocytes possess low mitotic activity, but in case of damage they can express protein cyclin D1, which is an indicator of G1-phase of the mitotic cycle. We discuss several sources of cells capable of differentiating into EC. EC themselves participate in the regeneration process, among the presence of single RSC EC, extrarenal role of stem cells (a pool of cell proliferation). The most popular model is the development of differentiated EC, they pass stage of dedifferentiation. EC dedifferentiation involves a transition from an epithelial to mesenchymal state (epithelial-mesenchymal transition, EMT) and return to the cell cycle with the development EC (mesenchymal-epithelial transition MET). However, it remains unclear whether among EC produced at MET appear only mature form of cells or some of them can retain the properties of stem. Identify different types of RSC opens a new stage in the study of biological phenomena of regeneration of various cellular components of the nephron, which will determine the development of new medicines, prevent the development of renal fibrosis and renal failure.

Key words: kidney, renal stem cells, podocytes, tubular epithelium, immunohistochemistry, molecular biology, cell differentiation, dedifferentiation of cells, epithelial-mesenchymal transition, renal tissue fibrosis, kidney failure

Почка представляет собой уникальный парный орган, способный регулировать водно-электролитный обмен, уровень артериального давления, кислотно-щелочной баланс, что влияет на поддержание гомеостаза. В ряде случаев острое или хроническое повреждение почечной ткани может приводить к необратимым расстройствам гомеостаза, а значит, требует длительного проведения экстракорпоральных методов лечения [13, 16].

В тех случаях, когда использованы все возможности консервативного лечения, и уже развилась терминальная почечная недостаточность, больному рекомендуется трансплантация почки, при которой, однако, также возможны осложнения. К ним относятся иммунные реакции отторжения трансплантата, осложнения, связанные с длительным применением цитостатиков, сосудистых расстройств донорской почки и т.д. [13, 16].

Современное представление о патогенетическом лечении заболеваний почек невозможно без понимания механизмов их повреждения, ремоделирования, нефросклероза. В этом может помочь молекулярно-биологическое изучение клеток почечной ткани, в том числе принимающих участие в репаративной регенерации клубочков, канальцев, сосудов.

Такими свойствами обладают ренальные стволовые клетки (РСК), участие которых в процессах регенерации может препятствовать возникновению плотной соединительной ткани, заместительной репарации (субституции), приводящей к развитию нефросклероза.

Пристальное внимание к изучению РСК обусловлено еще и трудностями оценки их функциональной активности, а в ряде случаев, отсутствием научных

исследований, посвященных идентификации таких клеточных элементов в почке [2, 4, 30].

Стволовые клетки (СК) представляют собой пластические клеточные элементы, имеющие специфический фенотип и функциональные особенности. Фенотипическими признаками СК является их способность к делению, самовоспроизведению, формированию различных дифференцированных клеточных популяций (клонов). На ранней стадии развития СК являются тотипотентными, обладают способностью к воспроизведению всех типов клеток [10, 12].

В дальнейшем, по мере дифференцировки СК становятся плюрипотентными, участвуют в формировании всех трех зародышевых листков. Созревание СК рассматривается как динамичный процесс, обусловленный регенерацией клеток после их повреждения. К функциональным особенностям СК следует отнести: 1) клеточную незрелость; 2) мультилинейное развитие; 3) способность к самовосстановлению. Как следует из приведенных данных об особенностях строения СК, ряд фенотипических и функциональных признаков тесно связаны друг с другом [18, 25].

До сих пор в нефрологии остаются малоизученными вопросы о наличии СК в ткани почки, о том, какие клеточные элементы могут выполнять данную роль, какие эндогенные или экзогенные сигналы (в том числе лекарственные препараты) могут способствовать полноценной регенерации ткани почки.

Данные отдельных исследователей, посвященные изучению молекулярно-биологических особенностей РСК, основаны на результатах эксперимента. Полагают, что иммунофенотип РСК обладает коэкспрессией белков CD24, CD133, PDX (подокаликсин),

однако, как меняются биологические свойства РСК по мере их созревания остается до конца не изученным [5, 6, 17].

Известно, что почечное тельце состоит из нескольких клеточных элементов: эндотелиоцитов фенестрированного типа, образующих капиллярные сети, мезангиоцитов, расположенных между петлями капилляров, гломерулярных подоцитов (висцеральные эпителиальные клетки), париетальных эпителиальных клеток (ПЭК) капсулы Боумена-Шумлянского. В эмбриогенезе источником образования мезангиоцитов, гломерулярных подоцитов, ПЭК служит мезодермальный листок, в то время как эндотелиоциты происходят из ангиобластов [26]. Эндотелиоциты, подоциты, базальная мембрана формируют сложный биологический гликопротеиновый комплекс, образующий гломерулярный фильтр.

Регенерация подоцитов, ренальные стволовые клетки и подоциты

Из указанных компонентов гломерулярного фильтра наибольший интерес представляют подоциты. Эти клетки являются высокоспециализированными, дифференцированными, со слабой митотической активностью, имеют форму "осьминога" с длинными вытянутыми отростками цитоплазмы, контактирующими друг с другом (ножки подоцитов). Такая сложная биологическая архитектура позволяет сохранить прочность и низкую проницаемость гломерулярного фильтра для высокомолекулярных белков и клеточных элементов [21].

Очевидно, что правильное и своевременное развитие подоцитов является необходимым условием сохранения функции почки. Повреждение в виде слияния ножек подоцитов, отслоения подоцитов от гломерулярной базальной мембраны приводит к развитию протеинурии, фиброзу, утрате функции нефрона [24, 29]. Описано, что единичные подоциты или их фрагменты могут встречаться в моче у практически здоровых людей [27]. *In vitro* установлено, что под воздействием гипергликемии, механического стресса и других повреждающих факторов подоциты могут подвергаться гипертрофии, которая сначала носит адаптивный характер, препятствуя тем самым увеличению участков повреждения гломерулярной базальной мембраны. Впоследствии гипертрофия подоцитов становится неполноценной, декомпенсированной, развивается их атрофия и апоптоз, что приводит к тяжелому повреждению базальной мембраны и возникновению протеинурии. Регенерация, гипертрофия подоцитов могут возникать при длительном использовании ингибиторов АПФ, однако тонкие механизмы возникновения данных изменений до конца не расшифрованы [3, 8].

Использование знаний иммуногистохимии, молекулярной биологии позволяет по-новому оценить биологические свойства клеточных компонентов

гломерулярного фильтра. Отдельные авторы отмечают, что некоторые ПЭК могут экспрессировать белки CD24, CD133, которые указывают на наличие зрелых форм РСК [23].

В этой связи интересен тот факт, что ПЭК гетерогенны и могут быть представлены двумя клеточными подтипами. Первый подтип ПЭК локализуется ближе к мочевому полюсу клубочка, где представлен эпителиальными уплощенными клетками. Второй подтип ПЭК, так называемые периполярные (переходные) клетки, расположен ближе к васкулярному полюсу клубочка и напоминает подоциты, содержащие цитоплазматические гранулы [1, 7].

Первый подтип ПЭК представлен гломерулярными стволовыми клетками, имеющими иммунофенотип CD24, CD133, они способны дифференцироваться в подоциты без возможности самовоспроизведения. Второй подтип ПЭК (переходные клетки) является источником образования так называемых неоподоцитов и обладает возможностями клеточного роста (пролиферации). Способность миграции, пролиферации и дифференцировки ПЭК в подоциты из мочевое в сосудистые полюсы клубочка может иметь благоприятные и неблагоприятные последствия для функциональной активности почки [13]. В одних случаях может происходить полноценная репарация подоцитов клубочков, что ведет к восстановлению целостности гломерулярного фильтра. В других, напротив, наблюдается избыточная пролиферация подоцитов, ПЭК с образованием "полулуний", сращений с капсулой Боумена-Шумлянского, что приводит к развитию фокального или диффузного гломерулосклероза.

При серьезных гломерулярных повреждениях, характеризующихся смертью подоцитов и их отслоением от гломерулярной базальной мембраны, эпителиальные стволовые клетки формируют клеточные мостики между капсулой и сосудистым пучком, которые обеспечивают быструю замену утраченных подоцитов. Клеточные мостики облегчают перемещение, пролиферацию и дифференцировку клеток предшественников, обеспечивая быструю замену утраченных подоцитов. Через образующие мостики париетальные клетки могут также приобретать подоцитарные маркеры после повреждения и непосредственно восстанавливать пул утраченных подоцитов [13, 20]. Установление контроля над способностью РСК дифференцироваться в подоциты является важной задачей современной нефрологии, регуляция процессов пролиферации и дифференцировки подоцитов позволяет, в одном случае, "залатать" участки повреждения гломерулярного фильтра, в другом, предупредить развитие фокального или диффузного нефросклероза. Однако это положение требует дополнительного генетического исследования различных клеточных популяций почки [20].

Молекулярное исследование популяций РСК выявило наличие CD24+, CD133+, нестин+, PDX+

(подокаликсин+) и PDX- (подокаликсин-) клеточные линии. Полагают, что иммунофенотип PCK с PDX+ представляет собой группу клеток переходного типа с ограниченной пролиферативной способностью, которые не могут заменить поврежденные подоциты [23]. Вероятнее всего, PCK, способные к дифференцировке в подоциты локализуются среди ПЭК. Однако механизмы миграции клеток-предшественников подоцитов до сих пор не решен. Есть предположение, что переключение сигнала b-катенина ПЭК может приводить к дифференцировке в подоциты [9].

Регенерация канальцевых эпителиальных клеток

До настоящего времени окончательно не решен вопрос о наличии PCK среди клеток эпителия извитых канальцев (КЭ чечской или цилиндрической формы, имеют полярное апикально-базальное расположение).

Фенотипически КЭИК, как и подоциты, обладают низкой митотической активностью, однако в случае их повреждения в них может экспрессироваться белок *cyclin D1*, являющийся индикатором G1-фазы митотического цикла. Обсуждается несколько источников клеток, способных к дифференцировке в КЭИК: участие самих КЭИК в процессах регенерации, наличие единичных PCK среди КЭИК, роль экстраренальных стволовых клеток (пул пролиферации клеток) [29].

Наиболее популярной является модель развития дифференцированных КЭИК, которые проходят этап дедифференцировки клеток. Дедифференцировка КЭИК включает переход из эпителиального в мезенхимальное состояние (эпителиально-мезенхимальный переход, ЭМП) и возврат к клеточному циклу с развитием КЭИК (мезенхимально-эпителиальный переход, МЭП). В основе ЭМП лежит подавление гена E-кадгерина, ответственного за формирование эпителиальных межклеточных контактов и активация генов виментина, фибронектина, гладкомышечного актина, что позволяет клетке приобрести мультипотентные свойства. МЭП, напротив, происходит в условиях активации экспрессии гена E-кадгерина, с образованием дифференцированного пула эпителиальных клеток, в том числе подоцитов. Таким образом, PCK проходят этапы мультипотентности и унипотентности, что позволяет ремоделировать нормальные компоненты почечной ткани при ее повреждении (эндотелий сосудов, эпителиоциты канальцев, подоциты, клетки Боумена-Шумлянского).

Однако остается непонятным, может ли среди образующихся КЭИК при МЭП появляться только зрелые формы клеток или отдельные из них могут сохранять свойства стволовых [11].

Теория наличия стволовых клеток среди КЭИК также не лишена смысла. В отдельных работах показано, что клетки эпителия с иммунофенотипом CD24+, CD133+, ALDH+ (альдегиддегидрогеназа)

могут указывать на наличие PCK среди КЭИК. Однако это требует дополнительного морфоиммуногистохимического исследования [15, 16].

Репарация интерстиция почки (адаптивная и дезадаптивная)

Известно, что тубуло-интерстициальное пространство представлено канальцами, клетками и волокнами стромы. Интерстициальная ткань состоит из большого количества интерстициальных клеток (фибробластов, клеток воспаления), перитубулярных капилляров, коллагеновых волокон (коллаген I, III, VII), фибронектина, тенасцина. Ведущую роль в продукции и деградации различных компонентов межклеточного матрикса играют фибробласты, обеспечивая тем самым гомеостаз ткани.

Кроме того, перициты соединительной ткани участвуют в ангиогенезе мелких сосудов капиллярного типа. В развитии фиброза почечной ткани особую роль играют миофибробласты, которые экспрессируют гладкомышечный актин и секретируют компоненты экстрацеллюлярного матрикса. Однако до настоящего времени происхождение миофибробластов остается предметом дискуссий. Есть точка зрения, что они могут появляться из мигрирующих или тканевых фибробластов, перицитов, путем эпителиально-мезенхимального или эндотелиально-мезенхимального перехода.

Предполагается, что данные клеточные популяции участвуют в синтезе трансформирующего фактора роста β (TGF- β), фактора некроза опухоли α (TNF- α), что может приводить к развитию фиброза почечной стромы. Известно, что TGF- β и его семейство контролирует пролиферацию, клеточную дифференцировку, может участвовать в иммунном ответе. В нормальных клетках эпителия данный фактор выполняет антипролиферативную функцию, инициирует апоптоз, действуя аутокринно, т.е. на соседние клетки эпителия. Избыточная секреция TGF- β миофибробластами способствует активации секреторной активности фибробластов, подавлению функциональной активности лимфоцитов, макрофагов, образованию коллагеновых волокон с последующим фиброзом стромы.

В этой связи привлекательной становится таргетное лечение прогрессии фиброза стромы почечной ткани путем блокирования активации миофибробластов и TGF- β 1 [22].

Заключение

В настоящее время в современной нефрологии актуальным является оценка репаративных возможностей почки при гломерулярных заболеваниях с целью предупреждения нефросклероза. Обсуждаемая проблема ренальных стволовых клеток (PCK) по-новому позволяет взглянуть на репаративный потенциал почки.

По результатам экспериментальных исследований, обнаружение различных пулов РСК в клубочках, интерстиции почки позволяет формировать дифференцированные формы клеток – подоцитов, эпителиоцитов канальцев, однако данные изменения не являются стабильными. В одних случаях РСК способны полностью заменить поврежденные части гломерулярного фильтра за счет их дифференцировки и пролиферации подоцитов, в других – усиленное деление РСК может приводить к формированию полулуний, клубочковых сращений, нарушая нормальную фильтрацию.

Регенерация компонентов почки – многоступенчатый процесс ремоделирования клеточных элементов почки, включающий в себя этапы дедифференцировки (эпителиально-мезенхимальный переход) и дифференцировки (мезенхимально-эпителиальный переход). Регуляция этих этапов осуществляется генами E-кадгерина с одной стороны, виментина, фибронектина, гладкомышечного актина – с другой. Реализуемые в ходе регенерации изменения могут приводить частично к полному восстановлению поврежденных компонентов клубочков и канальцев с развитием в той или иной степени соединительной ткани (фиброза). Одним из факторов активаторов развития фиброза почки является трансформирующий фактор бета (TGF- β), подавление которого может явиться ключом к предупреждению нефросклероза. Разработка и применение новых целевых препаратов, регулирующих РСК, блокирующих TGF- β , наряду с применением ингибиторов АПФ, позволит предупредить развитие почечной недостаточности.

Авторы не имеют конфликта интересов

The authors declare no conflict of interests

Список литературы

1. *Bariety J., Mandet C., Hill G.S. et al.* Parietal podocytes in normal human glomeruli. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2006. 17: 2770-2780.
2. *Benigni A., Morigi M., Remuzzi G.* Kidney regeneration. *Lancet.* 2010. 375: 1310-1317.
3. *Bhathena D.B.* Glomerular basement membrane length to podocyte ratio in human nephropenia: implications for local segmental glomerulosclerosis. *Am.J.Kidney Dis.* 2003. 41: 1179-1188.
4. *Davidson A.J.* Uncharted waters: nephrogenesis and renal regeneration in fish and mammals. *Pediatr.Nephrol.* 2011. 26: 1435-1443.
5. *Eckfeldt C.E., Mendenhall E.M., Verfaillie C.M.* The molecular repertoire of the almighty stem cell. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2005. 6: 726-737.
6. *Graf T., Stadtfeld M.* Heterogeneity of embryonic and adult stem cells. *Cell Stem Cell.* 2008. 3: 480-483.
7. *Gibson I.W., Downie I., Downie T.T. et al.* The parietal podocyte: a study of the vascular pole of the human glomerulus. *Kidney Int.* 1992. 41: 2770-2780.
8. *Gross M.L., Ritz E., Schoof A. et al.* ACE-inhibition is superior to endothelin A receptor blockade in preventing abnormal capillary supply and fibrosis of the heart in experimental diabetes. *Diabetologia.* 2004. 47: 316-324.
9. *Grouls S., Iglesias D.M., Wentzensen N. et al.* Lineage specification of parietal epithelial cells requires b-catenin/Wnt signalling. *J.Am. Soc. Nephrol.* 2012. 23: 2593-2603.
10. *Hanna J.H., Saba K., Jaenisch R.* Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypothesis, unresolved issues. *Cell.* 2010. 143: 508-525.
11. *Humphreys B.D., Valerius M.T., Kobayashi A. et al.* Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. *Cell Stem Cell.* 2008. 2: 284-291.
12. *Jaenisch R., Young R.* Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell.* 2008. 132: 567-582.
13. *Lasagni L., Romagnani P.* Glomerular epithelial stem cells: the good, the bad, and the ugly. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2010. 21(10): 1612-19.
14. *Levey A.S., Alkins R., Coresh J. et al.* Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives – a position statement from kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney Int.* 2007. 72: 247-259.
15. *Ma L., Allan A.L.* The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. *Stem Cell Rev.* 2011. 7: 292-306.
16. *McCampbell K., Wingert R.A.* Renal stem cells: fact or science fiction? *Biochem. J.* 2012. 444: 153-168.
17. *Meguid El Nabas, Bello A.K.* Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet.* 2005. 365: 331-340.
18. *Mikkers H., Frisen J.* Deconstructing stemness. *EMBO J.* 2005. 24: 2715-2719.
19. *Morrison S.J., Spradling A.C.* Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell.* 2008. 139: 598-611.
20. *Poulsom R., Little M.H.* Parietal epithelial cells regenerate podocytes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009. 20: 231-233.
21. *Prunotto M., Budd D.C., Meier M. et al.* From acute injury to chronic disease: pathophysiological hypothesis of an epithelial / mesenchymal crosstalk alteration in CKD. *Nephrol Dial Transplant.* 2012. 27: iii43-iii50.
22. *Quaggin S.E., Kreidberg J.A.* Development of the renal glomerulus: good neighbors and good fences. *Development.* 2008. 135: 609-620.
23. *Ronconi E., Sagrinati C., Angelotti M.L. et al.* Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009. 20: 322-332.
24. *Sagrinati C., Netti G.S., Mazzinghi B. et al.* Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidney. *J.Am. Soc.Nephrol.* 2006. 17: 2443-2456.
25. *Shankland S.J.* The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2006. 69: 2131-2147.
26. *Simons B.D., Clevers H.* Strategies for homeostatic stem cell-renewal in adult tissues. *Cell.* 2011. 145: 851-862.

27. *Vaughan M.R., Quaggin S.E.* How do mesangial and endothelial cells form the glomerular tuft? *J.Am.Soc.Nephrol.*2008. 19:24-33

28. *Vogelmann S.U., Nelson W.J., Myers B.D. et al.* Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2003. 285: F40-F48.

29. *Vogelseder A., Picard N., Gaspert A. et al.* Proliferation capacity of the renal proximal tubule involves the bulk of differentiated epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2008. 294: C22-C28.

30. *Wiggins R.C.* The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases. *Kidney Int.* 2007. 71: 1205-1214.

31. *Zubko R., Fishman W.* Stem cell therapy for the kidney? *Am. J. Ther.* 2009. 16: 247-256.

Дата получения статьи: 24.02.2017

Дата принятия к печати: 10.11.2017

Submitted 24.02.2017

Accepted 10.11.2017