



Краткие сообщения / Brief reports  
Оригинальная статья / Original article  
УДК 616.12-002:616.2-02  
DOI: 10.18470/1992-1098-2017-4-211-218

## ИММУНОМАРКЕРЫ ПРИ ОСТРОМ КОРОНАРНОМ СИНДРОМЕ ПРИ ПОСТУПЛЕНИИ И ПРИ ИСХОДЕ В ИНФАРКТ МИОКАРДА

**Маржанат Г. Алиева**

Дагестанский государственный медицинский университет,  
Махачкала, Россия, alieva\_mg@mail.ru

**Резюме. Цель.** Изучение и разработка прогностических критериев клинического исхода острого коронарного синдрома в инфаркт миокарда на основании иммуномаркеров. **Материалы и методы исследования.** Представлены результаты обследования 85 пациентов, поступивших в инфарктное отделение Республиканской клинической больницы Центра специализированной экстренной медицинской помощи (ЦСЭМП) г. Махачкалы. Иммуномаркеры определяли методом ИФА и методом непрямой иммунофлуоресценции. **Результаты.** Из исследованных маркеров кардиоспецифических изменений в системе иммунитета наиболее выраженными являются показатели аутоиммунного ответа на антигенные субстанции некротизированного миокарда. Определяется почти 3-кратное увеличение АТ к КЛ ( $p < 0,01$ ) и в 75% случаев определяются АТ к миокардиальным клеткам, преимущественно фибриллярного типа. Прогноз клинического исхода ОКС в Q-ИМ на госпитальном этапе связан с интервалами концентраций (точки разделения): иммуномаркеров: НП от 20 до 28 нмоль/л, АТ к КЛ от 15 до 20 ЕД/мл и в 75% случаев встречаются АТ к миокардиальным клеткам. Пациенты, имеющие указанные показатели при поступлении в стационар (точка отсчёта), являются группой высокого риска в отношении клинического исхода ОКС в Q-ИМ (конечная точка). Вычислив общие операционные характеристики тестов, мы получили интервалы концентраций - по блоку кардиоспецифических иммуномаркеров: Se=67%, Sp=83%, PVP=57%, PVN=89%, ДЭ=80%, ОР=6,8. Представленные показатели иммуномаркеров попадают в прогностическую блок схему. **Заключение.** Выявление группы высокого риска больных с ОКС позволяет на раннем этапе госпитализации провести лечебные мероприятия в соответствии со стандартами ведения пациентов с окклюзирующими поражениями коронарных сосудов, обуславливающих крупноочаговый инфаркт миокарда.

**Ключевые слова:** острый коронарный синдром, инфаркт миокарда, иммуномаркеры.

**Формат цитирования:** Алиева М.Г. Иммуномаркеры при остром коронарном синдроме при поступлении и при исходе в инфаркт миокарда // Юг России: экология, развитие. 2017. Т.12, N4. С.211-218. DOI: 10.18470/1992-1098-2017-4-211-218

## IMMUNOMARKERS IN ACUTE CORONARY SYNDROME UPON ADMISSION AND ITS TRANSITION TO MYOCARDIAL INFARCTION

**Marzhanat G. Alieva**

Dagestan State Medical University,  
Makhachkala, Russia, alieva\_mg@mail.ru

**Abstract.** The *aim* is to study and develop some prognostic criteria for the clinical outcome of acute coronary syndrome into myocardial infarction based on immunomarkers. **Materials and methods.** Are presented the results of examination of 85 patients admitted to the infarction department of the Republican Clinical Hospital of the Center for Specialized Emergency Medical Care in Makhachkala. Immunomarkers were determined by the methods of enzyme immunoassay and indirect immunofluorescence. **Results.** Of the studied markers of cardiospecific changes in the immunity system, the indices of the autoimmune response to antigenic substances of necrotic myocardium are most pronounced. An almost 3-fold increase in thrombus aspiration to cardioliipin was determined ( $p < 0.01$ ), and in 75% of cases, thrombus aspiration was determined for myocardial cells, mainly of the fibrillar type. The prognosis of clinical outcome of ACS in Q wave myocardial infarction at the hospital stage is associated with concentration intervals (separation points) of the following: immunomarkers: Neopterin from 20 to 28 nmol/L, TA to CL from 15 to 20 U/ml and 75% of cases there are TAs to myocardial cells. Patients who have these indicators at admission to the hospital



(reference point) are a high-risk group for the clinical outcome of ACS in Q wave -MI (endpoint). After calculating the general operating characteristics of the tests, we obtained concentration intervals for a block of cardiospecific immunomarkers: Se = 67%, Sp = 83%, PVP = 57%, PVN = 89%, DE = 80%, RR = 6.8. The presented indices of immunomarkers fall into the prognostic block of the scheme. **Conclusion.** The identification of a high-risk group of patients with ACS allows for early hospitalization to conduct treatment measures in accordance with standards of management of patients with occlusive lesions of coronary vessels causing large-focal myocardial infarction.

**Keywords:** acute coronary syndrome, myocardial infarction, immunomarkers.

**For citation:** Alieva M.G. Immunomarkers in acute coronary syndrome upon admission and its transition to myocardial infarction. *South of Russia: ecology, development.* 2017, vol. 12, no. 4, pp. 211-218. (In Russian) DOI: 10.18470/1992-1098-2017-4-211-218

## ВВЕДЕНИЕ

Иммунная система, являясь временно системой гомеостаза и адаптогенеза, принимает непосредственное и активное участие в патогенезе коронарной болезни сердца. Известно, что иммунный ответ – это воспалительный процесс с обязательным участием лимфоцитов [1], соответственно, сам процесс воспаления обусловлен участием активированных клеток иммунной системы. Более того весь спектр провоспалительных цитокинов, хемокинов, ростовых факторов, молекул адгезии, имеющих прямое отношение к патогенезу ОКС, представляет собой растворимые продукты активированных клеток иммунной системы – Т- и В-лимфоцитов, клеток макрофагально-моноцитарного ряда, дендритных клеток, естественных киллеров и др. Формирование атеросклеротической бляшки с полным правом можно отнести к категории иммунопатогенетически-опосредованных процессов. При ОКС роль иммунной системы двоякая. С одной стороны изменения параметров иммунного статуса при ОКС – это изменения провоспалительные, адаптивные, не имеющие отношения к основной функции иммунной системы – индукции АГ-специфического иммунного ответа. С другой стороны реализация этой основной функции системы иммунитета достигается только в отношении индукции аутоиммунного АГ-специфического иммунного ответа по отношению к АГ-детерминантам ишемизированных и некротизированных кардиомиоцитов. Причём это касается как адаптивной, так и врождённой иммунной системы [2]. Подобная двойственность отражается и на интерпретации параметров иммунного статуса клиницистами-кардиологами. Многочисленными работами доказана патогенетическая значимость и прогностическая ценность при

ОКС таких иммунологических показателей, как про- и противовоспалительные цитокины (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-18, TNF- $\alpha$ , ИФ- $\gamma$ ), хемокины (ИЛ-8, RANTES, RBP, MCP-1), неоптерин, ростовые факторы (ТФР- $\beta$ ), адгезионные молекулы (L-, P- и E-селектины, интергины), уровень CD3+ CD4+ CD20+ CD56+ др. клеток. Не менее значимыми являются показатели аутоиммунного АГ-специфического ответа. Показано, что уровень антител к атерогенным липопротеидам у больных ИБС является одним из показателей выраженности атеросклеротического процесса в коронарных артериях [3; 4]. Уровень анти-миокардиальных антител определяется у 25% пациентов с дилатационной кардиомиопатией, а антитела к кардиолипину (АКА) – у 70% пациентов с коронарной недостаточностью [5]. При ОКС аутоантитела к сульфатированным гликозаминогликанам, коллагену и гиалуроновой кислоте были достоверно выше по сравнению с группой контроля [6]. Большое внимание уделяется значениям неоптерина в сыворотке крови, являющимся маркёром активации клеточного иммунитета. Показано, в частности, что уровень неоптерина (более 10 нг/мл) коррелирует с выраженностью атеросклеротического поражения коронарных артерий и с другими маркёрами воспаления [7; 8]. Иными словами, процитированные и другие работы не оставляют сомнений в том, что иммуномаркёры являются важным компонентом комплексного обследования пациентов с ОКС. Они включают в себя важную информацию о состоянии адаптивного и АГ-специфического иммунитета. Коррекция изменений в иммунной системе при ОКС, несомненно, является важной составной частью лечения и ведения этих больных.



### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Уровень неоптерина (НП) в сыворотке крови определяли методом конкурентного ИФА на наборах “Neopterin ELISA” компании “IBL International GmbH”, Germany, кат. № RE59321. Результат анализа измерялся на многоканальном спектрофотометре Stat Fax 2600, AWRENESS, Technology Inc. USA в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – 620 нм и выражался в нмоль/л. Кросс-реактивность набора составляла <0,05%, коэффициент вариации ~10%.

Уровень сывороточных антител к кардиолипину (КЛ) определялся с помощью набора непрямого твёрдофазного ИФА “Anti-Cardiolipin IgG/IgM Orgentec” Germany, кат. № 416-5150 (ORG515). Результат анализа измерялся на многоканальном спектрофотометре Stat Fax 2600, AWRENESS, Technology Inc. USA в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – 620 нм. Чувствительность набора составляла 0,5-1 ЕД/мл, коэффициент вариации 3,8%.

Антитела к миокардиальным клеткам определяли с помощью набора для полуколичественного определения антител к миокардиоцитам в сыворотке крови методом непрямой иммунофлуоресценции “Anti-Heart Antibody IFA” “IMMCO Diagnostics, Inc.” USA, кат. № 1101H. На 6-луночных слайдах со срезами ткани сердца крыс тестировали наличие антител к миокардиоцитам методом непрямой иммунофлуоресценции. Результат анализировался в люминесцентном микроскопе и выражался в полуколичественном виде. В случае яркого свечения препарата результат обозначался в три +, средней интенсивности в два + и слабое свечение обозначалось в один +.

Статистическая обработка полученных результатов. Обработку данных проводили с помощью статистического пакета Statistica (версия 6,0), а также “Biostat 4.03”. База данных создавалась с использованием редактора электронных таблиц Microsoft Excel 2007.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Кардиоспецифические изменения в системе иммунитета в общей группе больных ОКС при поступлении в стационар отражают повышение уровня НП и индукция

аутоиммунного ответа на АГ-содержащие компоненты кардиомиоцитов – АТ к кардиолипину и АТ к миокардиальным клеткам (табл.1).

Таблица 1

**Кардиоспецифические изменения в системе иммунитета в общей группе больных ОКС при поступлении в стационар**

Table 1

**Cardiospecific changes in the immunity system in the general group of patients with ACS upon admission to hospital**

Иммуномаркёры Immune markers	Группа больных с ОКС A group of patients with ACS	Контрольная группа Control group
НП, нмоль/л / NP, nmol/l	25,4 (19,3; 33,5) *	17 (16; 20)
Ат к кардиолипину, ЕД/мл Antibodies to cardiolipin, U/ml	5,8 (4,5; 7,1)	3 (5; 5)
Ат к миокардиальным клеткам Antibodies to myocardial cells	в 59% случаев In 59% of cases	отр / negative

От 9-12% пациентов при выписке (конечные точки) имели диагноз инфаркт миокарда. Из исследованных маркеров кардиоспецифических изменений в системе иммунитета в данной группе наиболее выраженными являются показатели аутоиммунного ответа на антигенные субстанции некротизированного миокарда. Определяется почти 3-кратное увеличение АТ к КЛ

( $p < 0,01$ ) и в 75% случаев определяются АТ к миокардиальным клеткам, преимущественно фибриллярного типа.

Кардиоспецифические изменения в системе иммунитета при ОКС с исходом в Q-ИМ были представлены достоверными значениями ОР в отношении НП и АТ к КЛ (табл. 2).



Таблица 2

Кардиоспецифические изменения в системе иммунитета  
при ОКС с исходом в Q-ИМ

Table 2

Cardiospecific changes in the immunity system in ACS with the outcome in Q wave-MI

Кардиомаркеры Cardiomarkers	При поступлении в стационар ("до") Me (25; 75 процентили), n = 21 When entering the hospital ("before") Me (25; 75 percentiles) n = 21	Исход ОКС в Q-инфаркт миокарда ("после") Me (25; 75 процентили), n = 21 The outcome of ACS in Q wave myocardial infarction ("after") Me (25; 75 percentile) n = 21	Контрольная группа Me (25; 75 процентили), n = 19 Control group Me (25; 75 percentiles), n = 19
НП, нмоль/л / NP, nmol/l	37 (35,3;39,5) ** <sup>x</sup>	19,5 (19,3;27,2)	17 (16;20)
Ат к кардиолипину, ЕД/мл Antibodies to cardiolipin, U/ml	4,3 (3,8;9,5) <sup>x</sup>	15,2 (10,2;28,5) **	5 (5;5)
Ат к миокардиальным клеткам Antibodies to myocardial cells	в 60% случаев In 60% of cases	в 75% случаев In 75% of cases	отр / negative

**Примечание:** \*  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой (критерии Крускала- Уоллиса и Данна); \*\*  $p < 0,01$  по сравнению с контрольной группой (критерии Крускала- Уоллиса и Данна)  
**Note:** \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  in comparison with the test group (Kruskal-Wallis and Dunn's test)

Наиболее информативный интервал концентраций НП в сыворотке крови – это интервал от 20 до 28 нмоль/мл (рис. 1, 2). При шаге группирования в сводных таблицах для двух групп в 10, ОР исхода ОКС в Q-

инфаркт миокарда по интервалу концентраций НП от 20 до 28 нмоль/мл составил 4,8, ДИ от 1,8 до 12,6,  $p < 0,05$ . Абсолютный риск = 46%. Диагностическая эффективность = 71%.

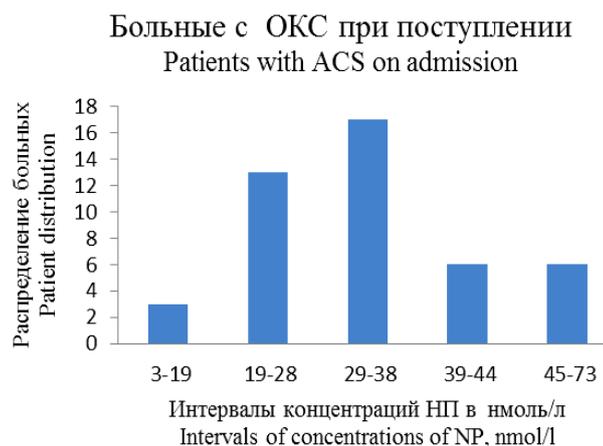
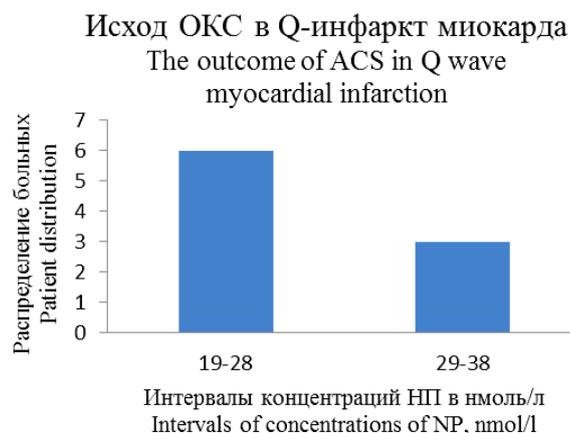


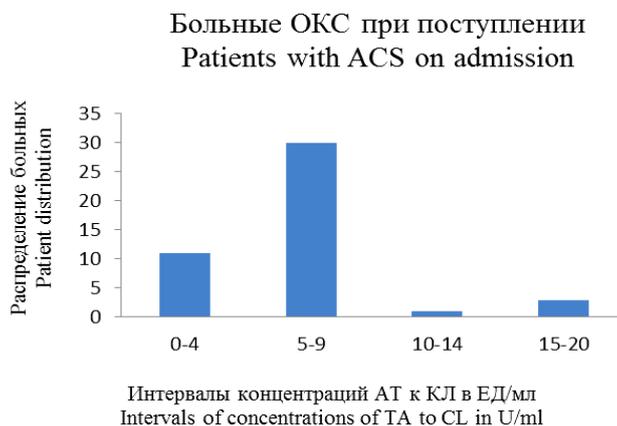
Рис. 1. Интервалы концентраций НП у больных ОКС при поступлении в стационар

Fig. 1. Intervals of NP concentrations in patients with ACS upon admission to hospital

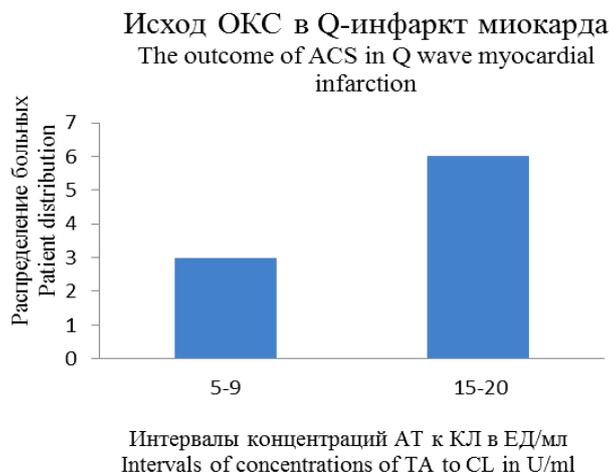


**Рис. 2. Интервалы концентраций НП при ОКС с исходом в Q-инфаркт миокарда**  
**Fig. 2. Intervals of NP concentrations in ACS with outcome in Q wave myocardial infarction**

Частотное распределение интервалов концентраций АТ к КЛ представлено на рисунках 3 и 4.



**Рис. 3. Интервалы концентраций АТ к КЛ у больных ОКС при поступлении в стационар**  
**Fig. 3. Intervals of TA concentrations to CL in patients with ACS upon admission to hospital**



**Рис. 4. Интервалы концентраций АТ к КЛ при ОКС с исходом в Q-инфаркт миокарда**  
**Fig. 4. Intervals of concentrations of TA to CL in ACS with outcome in Q wave myocardial infarction**



Видно, что наиболее часто встречающийся интервал концентраций АТ к КЛ – это интервал от 15 до 20 ЕД/мл. При шаге группирования в сводных таблицах для двух групп в 5, ОР исхода ОКС в Q-инфаркт миокарда по интервалу концентраций АТ к КЛ от 15 до 20 ЕД/мл составил 8,9, ДИ от 2,8 до 16,5,  $p < 0,05$ . Абсолютный риск = 67%. Диагностическая эффективность = 88% (табл. 3).

В целом, анализ частотного распределения наиболее информативных интервалов концентраций показателей иммуномаркеров определил те показатели, которые, обладая соответствующей статистической мощностью, были включены в итоговую прогностическую блок-схему.

Таблица 3

Относительный риск исхода ОКС в Q-инфаркт миокарда по показателям воспаления, эндотелиальной дисфункции, системы иммунитета и кардиомаркёров

Table 3

Relative risk of outcome of ACS in Q wave myocardial infarction by indices of inflammation, endothelial dysfunction, immunity system and cardiomarkers

Интервалы концентраций Concentration range	ОР / RR	95% ДИ / 95% CI	p
НП, от 20 до 28 нмоль/л NP, from 20 to 28 nmol/l	4,7	от 1,7 до 12,8	$p < 0,05$
АТ к КЛ, от 15 до 20 ЕД/мл Antibodies to cardiolipin, from 15 to 20 U/ml	8,9	от 2,8 до 16,5	$p < 0,05$

**Примечание:** ОР – относительный риск; ДИ – доверительный интервал; в таблице представлены диагностически и прогностически наиболее информативные интервалы концентраций показателей воспаления, эндотелиальной дисфункции, системы иммунитета и кардиомаркёров

**Note:** RR – relative risk; CI – confidence interval; the table includes diagnostically and prognostically the most informative intervals of concentrations of inflammatory parameters, endothelial dysfunction, immunity system and cardiomarkers

Все показатели ОР по изученным интервалам концентраций при клиническом исходе ОКС в Q-ИМ были достоверными. Наибольшими значениями ОР отличались АТ к КЛ. Все данные были включены в итоговую блок-схему клинического исхода ОКС в Q-ИМ.

В прогностическую блок-схему вошли наиболее информативные интервалы

концентраций патогенетически важных показателей, имеющих статистически достоверные значения ОР, достаточно высокие значения абсолютного риска, диагностической эффективности приемлемые операционные характеристики использованных тестов и прогностичности полученных результатов, а также имеющие достоверные сильные корреляционные взаимосвязи.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прогноз клинического исхода ОКС в Q-ИМ на госпитальном этапе связан с интервалами концентраций (точки разделения): иммуномаркеров: НП от 20 до 28 нмоль/л, АТ к КЛ от 15 до 20 ЕД/мл и в 75% случаев встречаются АТ к миокардиальным клеткам. Пациенты, имеющие указанные показатели при поступлении в стационар (точка отсчёта), являются группой высокого риска в отношении клинического исхода ОКС в Q-ИМ (конечная точка). Вычислив общие операци-

онные характеристики тестов, мы получили интервалы концентраций - по блоку кардиоспецифических иммуномаркеров: Se=67%, Sp=83%, PVP=57%, PVN=89%, ДЭ=80%, ОР=6,8.

Представленные показатели иммуномаркеров попадают в прогностическую блок схему, а достоверность прогноза, безусловно, усилит учёт клинико-анамнестических данных и данных ЭКГ-исследований.



### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Хаитов Р.М. Иммунология. Москва: ГЭОТАР-Медиа. 2006, 246 с.
2. Laskarin G., Zaputovic L., Persic V., Ruzic A., Tokmadzic Sotosek V. Harmful immune reactions during acute myocardial infarction // *Med Hypotheses*. 2012, vol. 78, iss. 6. P. 703–706. doi: 10.1016/j.mehy.2012.02.013.
3. Покровская Е.В., Ваулин Н.А., Грацианский Н.А., Аверков О.В., Деев А.Д. Острый коронарный синдром без подъёмов сегмента ST на ЭКГ: агрегация тромбоцитов и маркёры воспаления при раннем применении аторвастатина и правастатина // *Кардиология*. 2003, Т. 43, N1. С.7–18.
4. Уразильдеева С.А., Титков А.Ю., Васина Л.В. и др. Степень коронарной недостаточности и уровень антител к атерогенным липопротеидам у больных ишемической болезнью сердца // *Терапевтический архив*. 2011, Т. 83, N9. С.10–13.
5. Зыков К.А., Татенкулова С.Н., Масенко В.П., Кузнецова Т.В., Рвачева А.В., Беленков Ю.Н. Выявление особенностей аутоиммунных реакций при хронической сердечной недостаточности различной этиологии // *Терапевтический архив*. 2009, Т.81, N4. С. 22–27.
6. Давыдов С.И. Тарасов А.А., Емельянова А.Л., Киселева М.А., Бабаева А.Р. Новые возможности иммунологической диагностики ишемической болезни сердца // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2012, Т.11, N1. С.49–53.
7. Палеев Ф.Н., Абудеева И.С., Москалец О.В., Минченко Б.И., Белокопытова И.С. Неспецифические маркёры воспаления в прогнозировании течения ишемической болезни сердца // *Кардиология*. 2009, Т. 49, N9. С. 59–65.
8. Алиева М.Г. Прогностическая блок-схема клинического исхода острого коронарного синдрома в стенокардию напряжения III функционального класса на госпитальном этапе (Часть II) // *Юг России: экология, развитие*. 2017, Т.12, N3. С.75–86. DOI: 10.18470/1992-1098-2017-3-75-86

### REFERENCES

- 1.Khaitov R.M. *Immunologiya* [Immunology]. Moscow, GEOTAR-Media Publ., 2006, 246 p. (In Russian)
- 2.Laskarin G., Zaputovic L., Persic V., Ruzic A., Tokmadzic Sotosek V. Harmful immune reactions during acute myocardial infarction. *Med Hypotheses*. 2012, vol. 78, iss. 6. pp. 703–706. doi: 10.1016/j.mehy.2012.02.013.
- 3.Pokrovskaya E.V., Vaulin N.A., Gratsiansky N.A., Averkov O.V., Deev A.D. Markers of Inflammation and Platelet Aggregation in Patients With Non ST Elevation Acute Coronary Syndrome Treated With Atorvastatin or Pravastatin. Randomized Comparative Study. *Kardiologiya* [Kardiologiya]. 2003, vol. 43, no. 1. pp. 7–18. (In Russian)
- 4.Urazildeeva S.A., Titkov A.Yu., Vasina L.V., Tsaregorodtseva V.V., Gurevich V.S. The extent of coronary stenosis and the level of antibodies to atherogenic lipoproteins in patients with coronary heart disease. *Terapevticheskiy arkhiv* [Therapeutic archive]. 2011, vol. 83, no. 9. pp. 10–13. (In Russian)
- 5.Zykov K.A., Tatenkulova S.N., Masenko V.P., Kuznetsova T.V., Rvacheva A.V., Belenkov Yu.N. Characteristics of autoimmune reactions in chronic cardiac failure of different etiology. *Terapevticheskiy arkhiv* [Therapeutic archive]. 2009, vol. 81, no. 4. pp. 22–27. (In Russian)
- 6.Davydov S.I., Tarasov A.A., Emelyanova A.L., Kiseleva M.A., Babaeva A.R. New perspectives in immunological diagnostics of coronary heart disease. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika* [Cardiovascular Therapy and Prevention]. 2012, vol. 11, no. 1. pp. 49–53. (In Russian)
- 7.Paleev F.N., Abudeeva I.S., Moskalets O.V., Minchenko B.I., Belokopytova I.S. Nonspecific Markers of Inflammation in Prognostication of the Course of Ischemic Heart Disease. *Kardiologiya* [Kardiologiya]. 2009, vol. 49, no. 9. pp. 59–65. (In Russian)
- 8.Alieva M.G. Graphical representation of the clinical outcome of acute coronary syndrome into effort angina of III functional class at the hospital level (Part II). *South of Russia: ecology, development*. 2017, vol. 12, no. 3, pp. 75–86. (In Russian) DOI: 10.18470/1992-1098-2017-3-75-86

### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ

#### Принадлежность к организации

**Маржанат Г. Алиева** – кандидат медицинских наук, доцент, Дагестанская государственная медицинский университет, зав. инфарктным отделением Республиканской клинической больницы Центра специализированной экстренной медицинской помощи (ЦСЭМП). Россия, 367000, г. Махачкала, ул. Пирогова, 3. Тел.: 89634139848. E-mail: alieva\_mg@mail.ru

### AUTHOR INFORMATION

#### Affiliations

**Marzhanat G. Alieva** – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Dagestan State Medical University, lead of the infarction department of the Republican Clinical Hospital of the Center for Specialized Emergency Medical Care. Russia, 367000, Makhachkala, st. Pirogov, 3. Tel.: 89634139848. E-mail: alieva\_mg@mail.ru



**Критерии авторства**

Маржанат Г. Алиева полностью подготовила рукопись и несет ответственность за плагиат и самоплагиат и другие неэтические проблемы.

**Конфликт интересов**

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила в редакцию 11.05.2017**

**Принята в печать 26.06.2017**

**Contribution**

Marzhanat G. Alieva is the sole author of the article and is responsible for avoiding the plagiarism, self-plagiarism or any other unethical issues.

**Conflict of interest**

The author declares no conflict of interest.

**Received 11.05.2017**

**Accepted for publication 26.06.2017**