

© Н.А.Броновицкая, М.М.Батюшин, И.В.Сарвилина, Д.Г.Пасечник, 2014
УДК [616.61-002+616.153.962]-073.584

Н.А. Броновицкая², М.М. Батюшин^{1,2}, И.В. Сарвилина⁴, Д.Г. Пасечник³

БЕЛКИ-МАРКЕРЫ IGA-НЕФРОПАТИИ И ФОКАЛЬНО-СЕГМЕНТАРНОГО ГЛОМЕРУЛОСКЛЕРОЗА ПО ДАННЫМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

N.A. Bronovitskaya, M.M. Batyushin, I.V. Sarvilina, D.G. Pasechnik

PROTEIN MARKERS IGA-NEPHROPATHY, AND FOCAL SEGMENTAL GLOMERULOSCLEROSIS BY MASS SPECTROMETRY

¹Кафедра внутренних болезней с курсом физиотерапии, ²нефрологическое отделение №2, ³Центральная научно-исследовательская лаборатория Ростовского государственного медицинского университета, ⁴Медицинский центр «НОВОМЕДИЦИНА», г. Ростов-на-Дону, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Поиск неинвазивных методов диагностики IgA-нефропатии и фокально-сегментарного гломерулосклероза (ФСГС) на основе протеомного исследования мочи. **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** В исследование включен 61 пациент: первая группа – 31 больной с ФСГС, вторая группа – 30 больных с IgA-нефропатией. Всем пациентам были выполнены общеклинические методы исследования (общий анализ крови, общий анализ мочи, концентрация креатинина крови с определением скорости клубочковой фильтрации) и масс-спектрометрия мочи. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Выявлены клинико-лабораторные признаки гломерулонефрита: артериальная гипертензия, азотемия, протеинурия, микро- или макрогематурия, снижение скорости клубочковой фильтрации. Определены патогенетические особенности IgA-нефропатии и ФСГС, позволившие выделить функциональные группы белков-маркеров, отражающих возможные пути возникновения и прогрессирования гломерулонефрита. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Анализ протеомного спектра мочи пациентов с IgA-нефропатией и ФСГС позволяет использовать полученные белки в качестве потенциальных маркеров возникновения и прогрессирования гломерулонефрита.

Ключевые слова: хронический гломерулонефрит, протеомика, молекулярные маркеры.

ABSTRACT

THE AIM: to search noninvasive diagnostic IgA-nephropathy and focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) based at proteomic studies of urine. **PATIENTS AND METHODS.** The study included 61 patients, who were divided into two groups. The first group included 31 patients with FSGS and 30 patients with IgA-nephropathy. All patients underwent general clinical research methods (complete blood count, urinalysis, blood creatinine concentration with the definition of the glomerular filtration rate) and mass spectrometry of urine. **RESULTS.** It was identified clinical and laboratory signs of glomerulonephritis: hypertension, azotemia, proteinuria, hematuria, decreased glomerular filtration rate. It was identified pathogenetic features of IgA-nephropathy and FSGS, with highlighting the functional groups of protein markers that reflect the way the progression of glomerulonephritis. **CONCLUSION.** Proteomic analysis of the spectrum of urine of patients with IgA-nephropathy and FSGS allows to use the proteins as potential markers of the progression of glomerulonephritis.

Key words: chronic glomerulonephritis, proteomics, molecular markers.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на большое количество исследований по модернизации диагностических и лечебных технологий, накопленных на протяжении последних десятилетий, диагностика и лечение хронического гломерулонефрита остается актуальной задачей современной нефрологии. Согласно регистру ERA-EDTA, хронический гломерулонефрит в 14% случаев становится причиной терминальной

хронической почечной недостаточности (ТХПН) в странах Европы [1]. По данным Всемирной организации здравоохранения – из 30–35 млн лиц, ежегодно умирающих от всех хронических заболеваний, 1 млн погибают от патологии почек и мочевых путей [2]. Причем в 80% случаев, наблюдается малосимптомное начало заболевания, случайно диагностируемое в ходе исследования мочевого осадка [3].

Исследования молекулярных механизмов развития хронического гломерулонефрита связаны с

Батюшин М.М. 344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, д. 29.
Тел.: 8-918-501-88-01, 8(863)201-44-23, E-mail: batyushin-m@rambler.ru

открытиями в области генома и протеома человека, изучением ультраструктурных клеточных изменений, тканевого и органного ремоделирования при хроническом гломерулонефрите, освоением новых технологий, позволяющих выявлять биомаркеры патогенеза болезни [4].

Одним из наиболее важных факторов риска развития ТХПН при нефропатиях, в частности, является тубулоинтерстициальный фиброз (ТИФ), развитие которого во многом определяет процесс ремоделирования почечной паренхимы [5]. Для диагностики ТИФ при гломерулопатиях единственным методом является пункционная нефробиопсия с последующим гистологическим исследованием. Вместе с тем, в последние годы в нефрологии начинают применяться методы пост-геномных исследований, направленные на поиск взаимосвязей между белками-маркерами и патологическими изменениями, обнаруживаемыми при гистологическом исследовании нефробиоптата [6]. Целью этих исследований является поиск неинвазивных методов оценки состояния почечной паренхимы. Определение таких маркёров в дальнейшем позволит стать альтернативой нефробиопсии в случае невозможности ее проведения, а также при мониторинге риска развития почечных повреждений в процессе лечения пациента [7]. В настоящее время масс-спектрометрия считается наиболее востребованным и чувствительным методом анализа органических молекул [8], который позволяет выявлять белки, участвующие в процессах воспаления, фиброза, ремоделирования, межклеточного взаимодействия. Применение масс-спектрометрии при изучении протеомного паттерна разных форм хронических гломерулонефритов и патологических изменений в нефробиоптате поможет сформировать представление о маркёрах-кандидатах, определение которых в дальнейшем позволит верифицировать не только форму нефрита, но и особенности гломерулярного и тубулоинтерстициального повреждения, расширив возможности неинвазивной диагностики [9, 10].

Цель исследования: поиск неинвазивных методов диагностики IgA-нефропатии и фокально-сегментарного гломерулосклероза (ФСГС) на основе протеомного исследования мочи.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование одномоментное, скрининговое, когортное, открытое, состояло из двух этапов. На первом этапе из числа больных с хроническим гломерулонефритом (n=85), прошедших

процедуру пункционной нефробиопсии, был отобран 31 пациент с ФСГС и 30 пациентов с IgA-нефропатией, проводился детальный сбор клинико-анамнестических данных, а также стандартное физикальное и лабораторно-инструментальное обследование. На втором этапе всем пациентам с ФСГС и IgA-нефропатией проводилась масс-спектрометрия мочи.

Критериями исключения были пациенты с хронической болезнью почек (ХБП) 5 стадии, сахарным диабетом, ишемической болезнью сердца, хронической сердечной недостаточностью (ФК 2–4). Контрольную группу составили добровольцы при отсутствии признаков соматической патологии, в том числе – изменений в анализе мочи (n=30). В контрольной группе проводилась масс-спектрометрия мочи.

В группу пациентов с хроническим гломерулонефритом был отобран 61 пациент: 29 мужчин (47%) и 32 женщины (53%). Средний возраст обследованных составил $34,4 \pm 0,9$ года. В целом продолжительность гломерулонефрита составила $0,64 \pm 0,31$ года и колебалась от 1,2 мес до 2 лет. Подробно собирали анамнез заболевания, оценивали длительность течения и клинические проявления нефрита, наличие сопутствующей патологии, проводимые диагностические исследования и особенности лечения. Оценивали следующие параметры:

а) клинические данные – наличие отечного синдрома и артериальной гипертензии (АГ);

б) показатели инструментальных методов исследования – УЗИ почек, ЭКГ;

в) показатели лабораторных методов исследования – общий анализ крови, общий анализ мочи, суточную протеинурию, биохимический анализ крови (мочевая кислота, общий белок, общий холестерин, мочевины, креатинин, калий и натрий);

г) показатели иммуноморфологического исследования на материале пункционных биоптатов почек: морфологическое исследование гистологических препаратов, которые были окрашены гематоксилином и эозином по Ван-Гизону и Шифф-реактивом и исследованы в цифровом микроскопе; ультраструктурное исследование почек с использованием трансмиссионного электронного микроскопа JEM-1000; иммуноморфологическое исследование почечных биоптатов с использованием меченных FITC антител кролика к IgG, М, А, С3 и фибрину на люминесцентном микроскопе «Laborlux S»; оценка степени фиксации иммуноглобулинов и комплемента в срезах осуществлялась полуколичественным методом по

Таблица 1

Сравнение показателей лабораторных исследований у пациентов с IgA-нефропатией и ФСГС

Показатель	Группа пациентов с IgA-нефропатией (n=30)	Группа пациентов с ФСГС (n=31)
Общий анализ крови		
Эритроциты, 10^{12} /л	4,19±0,7	4,17±0,7
Гемоглобин, г/л	126±7	125±8
Лейкоциты, 10^9 /л	6,5±0,6	6,6±0,7
Скорость оседания эритроцитов, мм/ч	12±1,5	14±1,5
Биохимия крови		
Креатинин, мкмоль/л	101±20	119±226
Мочевина, ммоль/л	5,18±1,3	6±1,5
Мочевая кислота, ммоль/л	233,6±7,5	280±17
СКФ, мл/мин/1,73 м ²	77±17*	66±18
Моча		
Протеинурия, г/л	0,8±1,1	2±2,5*
Эритроцитурия, в п/зр	24,5±28*	5±1,6
Суточная протеинурия, г/сут	1,06±1,7	3,4±2*

Примечание. * $p < 0,05$, СКФ – скорость клубочковой фильтрации.

градации интенсивности свечения и распространения в тканях [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ

У обследованных пациентов артериальная гипертензия встречалась в группе ФСГС в 54%, а при IgA-нефропатии в 45% случаев. Результаты лабораторных исследований представлены в табл. 1. Существенных различий между группами не отмечалось, за исключением протеинурии, степень которой была достоверно выше при ФСГС.

У пациентов в группе ФСГС снижение СКФ наблюдалось на 14,3% чаще, чем у пациентов в группе с IgA-нефропатией ($p < 0,05$).

При анализе масс-спектрограмм использовались соответствующие базы данных белков. Пример молекулярного спектра пептидных фрагментов белков мочи пациентов с ФСГС и IgA-нефропатией представлен на рис. 1 и 2. Молекулярный спектр отражает различия по показателю m/z пептидных фрагментов белков мочи в диапазоне M_r – от 800 Да до 10 кДа, которые позволили уже на этапе графической регистрации диагностических молекулярных паттернов выявить отличия в качественном составе молекул белков мочи у пациентов с ФСГС, IgA-нефропатией и здоровых лиц.

В ходе анализа встречаемости белков протеомного паттерна при нефротическом синдроме были установлены следующие факты. С нефротическим синдромом были ассоциированы такие белки, как рецептор-переносчик потенциального катионного канала, α -цепь коллагена, тропомиозин 1. Это может быть обусловлено как универсальным механизмом развития нарушения процессов

почечной фильтрации посредством усиления работы актинового комплекса в клетке, обеспечивающего транспорт везикул с активными компонентами и сокращение гладкомышечных волокон, так и нарушением процесса селективной по молекулярной массе и размерам ультрафильтрации субстанций крови на уровне почек.

Артериальная гипертензия встречалась в 64% случаев у пациентов с ФСГС и в 56% у пациентов с IgA-нефропатией. Белками-маркерами развития ТИФ при наличии артериальной гипертензии являлись: β_2 -микроглобулин, белок рецептор-переносчик потенциального катионного канала, тканевой фактор роста β (ТФР β), белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста 3, МАК белок и тимозин β_4 .

В группе пациентов с ФСГС отмечалось более быстрое прогрессирование хронической болезни почек (ХБП). При равной продолжительности нефрита (в среднем около 6 мес) в группе пациентов с ФСГС в 19% встречалась ХБП 3А ст., в группе с IgA-нефропатией – в 7% случаев. По мере прогрессирования хронического повреждения почек в моче появляются белки-маркеры ТИФ, определение которых может иметь диагностическое значение: при ХБП 3 ст. – аннексин А3, ЗБ (α -цепь фибриногена), при ХБП 4 стадии – α -цепь фибриногена, α_1 -антитрипсин, сосудистый белок клеточной адгезии, молекула повреждения почечной ткани-1. Раннее выявление в моче данных субстанций, обладающих профибротической активностью, может быть сигналом для проведения более активной нефропротективной терапии.

В ходе протеомного анализа были выделены

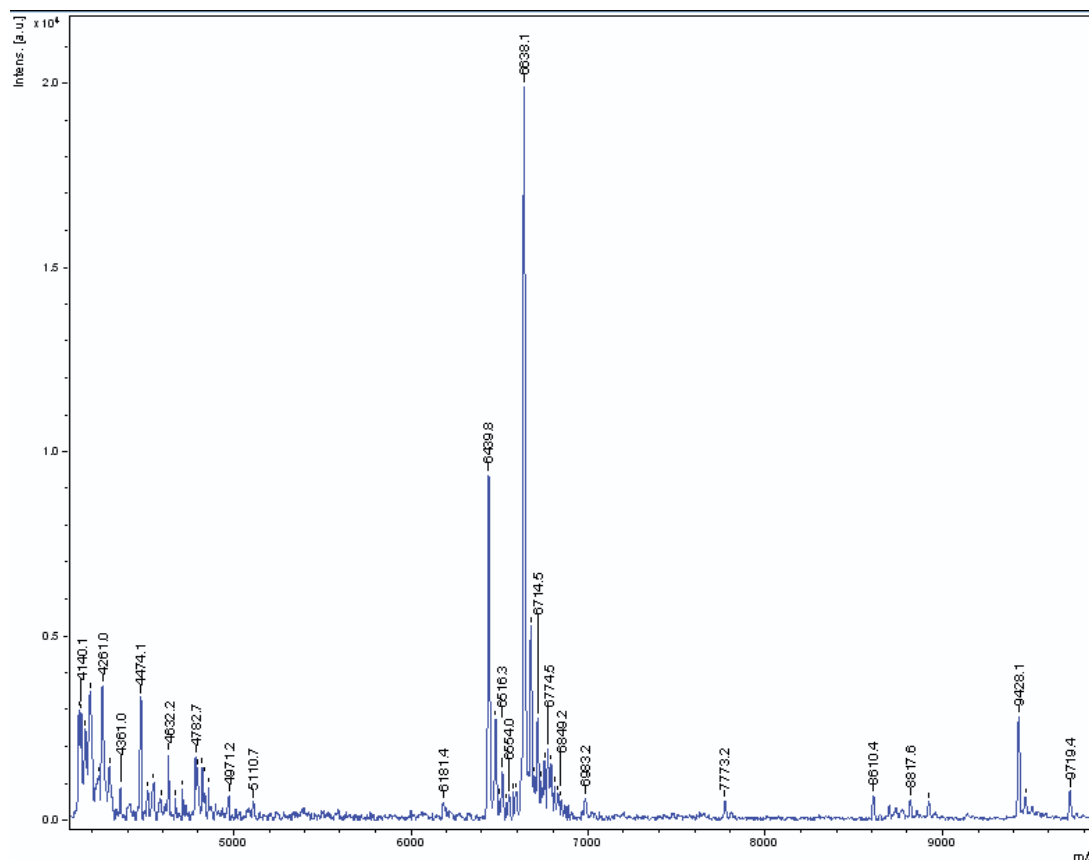


Рис. 1. Пример масс-спектрограммы пептидных фрагментов и белков мочи у пациента Г., 52 года, с ФСГС (диапазон M_r = 4 кДа–10 кДа).

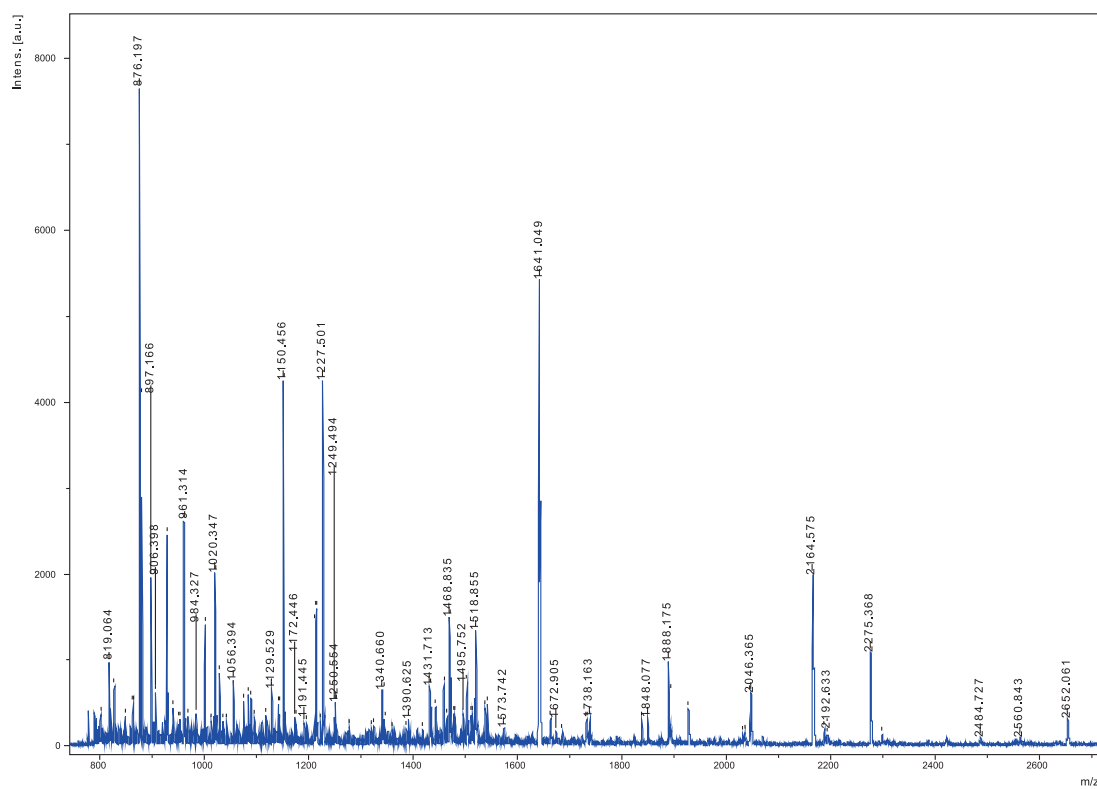


Рис. 2. Пример масс-спектрограммы пептидных фрагментов и белков мочи у пациента К., 39 лет, с IgA-нефропатией (диапазон M_r = 800 Да–3 кДа).

Таблица 2

**Протеомный спектр мочи у пациентов
с IgA-нефропатией и ФСГС**

№	Название белка	Встречаемость белков, %		p
		IgA	ФСГС	
1	β_2 -микроглобулин	53,33	80,65	<0,005
2	РППКК	10,0	58,06	<0,005
3	ТФР- β	10,0	61,29	<0,005
4	БСИФР-1	26,67	19,35	н.д.
5	Глутатион - S - трансфераза	23,33	19,35	н.д.
6	Ингибитор активатора плазминогена	60,0	48,39	н.д.
7	МАК-белок	0,00	12,90	<0,005
8	α -цепь фибриногена	46,67	45,16	н.д.
9	α -цепь коллагена	51,61	23,33	<0,005
10	α_2 -антитрипсин	46,67	45,16	н.д.
11	Цистатин В	36,67	54,84	н.д.
12	БСИФР-3	43,79	41,94	н.д.
13	Тимозин β -4	0,00	32,26	<0,005
14	Тропомозин 1	10,0	32,26	<0,005
15	ЯАПК	3,33	25,81	<0,005
16	Аннексин A_2	53,33	25,81	<0,005
17	β актин 1	16,67	22,58	н.д.
18	МСР-1	16,67	9,68	н.д.
19	Эпидермальный фактор роста	30,0	3,23	<0,005
20	Аминопептидаза Н	33,33	16,13	<0,005
21	Сосудистый белок клеточной адгезии	12,90	43,33	<0,005
22	МППТ-1	43,33	12,90	<0,005
23	ИЛ-6	46,67	0,00	<0,005
24	Гепарансульфат 2	43,33	0,00	<0,005
25	Индуктор апоптоза, идентичный ТФР- β	13,33	0,00	<0,005
26	Гепцидин	23,33	0,00	<0,005

Примечание. н.д. – различия между группами недостоверны; РППКК – рецептор-переносчик потенциального катионного канала; БСИФР – белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста; ЯАПК – ядерный антиген пролиферации клеток; МСР-1 – моноцитарный хемотаксический фактор-1; МППТ-1 – молекула-1 повреждения почечной ткани; ИЛ-6 – интерлейкин 6.

функциональные группы белков, составивших молекулярные профили мочи у пациентов с IgA-нефропатией и ФСГС, которые отражают универсальные пути ее возникновения и прогрессирования: белки, регулирующие тонус сосудов почек и активность свертывающей и противосвертывающей систем крови; участники систем детоксикации; сократительные белки нефротелия, эндотелия почечных сосудов; белки-участники метаболизма в нефроцитах; белки, регулирующие клеточный рост, реакции протеолиза в клетке, процессинг нейрогормональных факторов, процессы ангиогенеза и адгезии клеток; структурные белки почечной ткани; белки, регулирующие активность ядра клетки; белки-участники

иммуновоспалительных процессов и тубулоинтерстициального повреждения почечной ткани; транспортные белки.

Нами обнаружены различия в протеомном профиле мочи у пациентов с ФСГС и IgA-нефропатией, что позволило выделить белковый спектр мочи, характерный для определенной группы нефрита (табл. 2).

Необходимо отметить, что молекулы пептидов и белков, экспрессия которых была обнаружена в моче у пациентов с ФСГС и IgA-нефропатией, не регистрировались в протеомном профиле мочи у здоровых лиц.

ОБСУЖДЕНИЕ

В нашем исследовании были обнаружены белки, которые, с учетом их молекулярных связей, удалось классифицировать на функциональные группы:

- белки, регулирующие тонус сосудов;
- белки, регулирующие активность свертывающей и противосвертывающей систем крови;
- белки, регулирующие СРО-АОС на уровне почечной ткани,
- белки-участники систем детоксикации и элиминации;
- сократительные белки нефротелия и эндотелия почечных сосудов;
- белки-участники метаболизма в нефроцитах;
- регуляторные белки, контролирующие клеточный рост; активность реакций протеолиза; процессинг нейрогормональных факторов; процессы ангиогенеза и адгезии клеток;
- структурные белки почечной ткани;
- белки-транскрипционные факторы, регулирующие активность ядра клетки;
- белки-участники иммуновоспалительных процессов;
- транспортные белки.

В настоящее время обсуждается возможная патогенетическая роль молекул, ответственных за нарушение сосудистой проницаемости и «подцитоз» при ФСГС и IgA-нефропатии [11]. При идентификации белковых молекул в моче у пациентов с IgA-нефропатией выявлены α -цепь коллагена, МСР-1, эпидермальный фактор роста, молекула повреждения почечной ткани-1, интерлейкин-6, гепарансульфат 2, индуктор апоптоза, идентичный ТФР- β , гепцидин, аминопептидаза Н, аннексин А3. Некоторые из выявленных белков были ранее описаны при гломерулонефритах. Так, МСР-1 был впервые идентифицирован как продукт секреции моноцитарных лейкоцитарных клеток, стимулированных липополисахаридом, а

также мононуклеарных клеток периферической крови [12]. У пациентов с IgA-нефропатией уровень MCP-1 с мочой коррелирует с выраженностью мезангиальной пролиферации, количеством полулуний и макрофагов в клубочках, степенью интерстициального повреждения (инфильтрацией CD68+-макрофагами, тубулярной атрофией, интерстициальным фиброзом) [13]. Эпидермальный фактор роста, молекула повреждения почечной ткани-1, интерлейкин-6, гепарансульфат 2, индуктор апоптоза, идентичный TFR- β , обладающие протеолитической и сигнальной активностью, в основном изучались при диабетической нефропатии [14]. Нами было отмечено, что α -цепь коллагена, гепарансульфат 2 при IgA-нефропатии также ассоциированы с процессами фиброза интерстиция.

В группе пациентов с ФСГС с высокой вероятностью выявляются такие белки, как рецептор-переносчик потенциального катионного канала, МАК-белок, цистатин В, тимозин- β_4 , тропомиозин-1, ядерный антиген пролиферирующих клеток, сосудистый белок клеточной адгезии, TFR β . Цистатин В является новым потенциальным маркером активности склеротических процессов в почечной ткани при гломерулонефрите, наиболее выраженных при ФСГС. Увеличение синтеза цистатина В сопровождается увеличением экспрессии цистатина С, который секретируется в клетках проксимальных канальцев нефрона и определяет интенсивность скорости клубочковой фильтрации [15]. Нарушение функционирования катионного канала подсемейства С при гломерулонефрите сопровождается прекращением работы и внутриклеточного контроля со стороны вторичной системы мессенджеров, связанной с фосфатидил-инозитолом, который взаимодействует с подоцином в подоцитах, нарушая процесс селективной по молекулярной массе и размерам ультрафильтрации крови [16].

В нашем исследовании высокая экспрессия рецептора-переносчика потенциального катионного канала свидетельствовала, вероятно, о прогрессировании процессов склероза в гломерулярном аппарате почек. Увеличение экспрессии тропомиозина 1 в моче, выявленное нами в первую очередь при ФСГС, может свидетельствовать об усилении работы актинового комплекса в клетке, обеспечивающего транспорт везикул с активными компонентами и сокращение гладкомышечных волокон [17]. TFR- β секретируется многими типами клеток, включающих макрофаги, на поверхности которых обнаруживается латентный комплекс TFR- β . Посредством связывания через CD36 с

лигандом тромбоспондином-1 воспалительные стимулы активируют макрофаги, увеличивают высвобождение активного TFR- β , что стимулирует образование плазмينا [18]. В нашем исследовании выявлена высокая экспрессия данного белка наиболее характерна для ФСГС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявленная нами экспрессия белков в моче при ФСГС и IgA-нефропатии позволила сформировать молекулярный «портрет» этих гистохимических типов гломерулонефрита. Обнаруженные нами молекулярные паттерны мочи при ФСГС и IgA-нефропатии могут быть использованы в процессе дифференциальной диагностики данных типов гломерулонефрита. Каждая молекула белка в функциональной группе взаимодействует с множеством других молекул белков, реализуя межмолекулярные взаимодействия. В перспективе целесообразным является изучение биологической активности и функциональной роли каждой молекулы в межмолекулярных взаимодействиях (интерактомика) при развитии поражения ткани почек у пациентов с различными морфологическими формами нефропатий.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease, 2012
2. Батюшин ММ, Повилайтите ПЕ. Клиническая нефрология 2009; 682
3. Галишон П, Гертг А. Эпителиально-мезенхимальная трансформация как биомаркер почечного фиброза: готовы ли мы применить теоретические знания на практике? Нефрология 2013; (4): 9-16
4. Мухин НА, Тареева ИЕ, Шилов ЕМ, Козловская ЛВ. Диагностика и лечение болезней почек 2011; 383
5. Kassianos AJ, Wang X, Sampangi S, Muczynski K et al. Increased tubulointerstitial recruitment of human CD141(hi) CLEC9A(+) and CD1c(+) myeloid dendritic cell subsets in renal fibrosis and chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; 1391-1401
6. Yang J, Lin SC, Chen G et al. Adiponectin promotes monocyte-to-fibroblast transition in renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2013; 23-32
7. Norman JT, Fine LG. Intrarenal oxygenation in chronic renal failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2013; 989-996
8. Писарев ДИ. Масс-спектрометрия: история и перспективы использования. *Молодой ученый* 2012; (10): 99-104
9. Небыльцова ОВ, Климова ЖА, Носенко ГА. Лабораторный справочник СИНЭВО 2011; 420
10. Bowling CB, Muntner P. Epidemiology of Chronic Kidney Disease. Among Older Adults: A Focus on the Oldest Old. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2012; 72-87
11. Donderski R, Szczepanek J, Domagalski K et al. Analysis of Relative Expression Level of VEGF, HIF-1 α and CTGF Genes in Chronic Glomerulonephritis Patients. *Kidney Blood Press Res* 2013; 22-38
12. Baggioli M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 1994; (55): 97-179
13. Wada T, Furuichi K, Segawa C et al. MIP-1 α and MCP-1

contribute crescents and interstitial lesions in human crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 1999; (56): 995-1003

14. Лебедева НО, Викулова ОК. Маркеры доклинической диагностики диабетической нефропатии у пациентов с сахарным диабетом 1 типа. *Сахарный диабет* 2012; (2):38–45

15. Järvinen M, Rinne A, Hopsu-Havu VK. Human cystatins in normal and diseased tissues – a review. *Acta Histochem* 2008; 5-18

16. Islam MS. Transient Receptor Potential Channels. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2011;700

17. Zare M, Jazii F, Soheili Z, Moghanibashi M. Downregula-

tion of tropomyosin-1 in squamous cell carcinoma of esophagus, the role of Ras signaling and methylation. *Mol Carcinog* 2012; (10): 796-806

18. Taylor AW. Review of the activation of TGF-beta in immunity. *Leukoc Biol* 2009; 29-33

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию: 17.04.2014 г.

Принята в печать: 26.06.2014 г.