

© М.Д.Желязкова-Савова, Б.Т.Галунска, Д.И.Герова, Т.Г.Червенков, М.В.Сидерова, Р.Ж.Зорчева, Д.Н.Паскалев, 2011
УДК 616.61-008.64-036.12-085.38-055.2:618.176]:611.018.4

*М.Д. Желязкова-Савова¹, Б.Т. Галунска², Д.И. Герова³, Т.Г. Червенков⁴,
М.В. Сидерова⁵, Р.Ж. Зорчева⁶, Д.Н. Паскалев⁶*

НЕКАРБОКСИЛИРОВАННЫЙ ОСТЕОКАЛЬЦИН У ЖЕНЩИН В ПОСТМЕНОПАУЗЕ, ПОЛУЧАЮЩИХ ЛЕЧЕНИЕ ГЕМОДИАЛИЗОМ

*M.D. Zhelyazkova-Savova, B.Tz. Galunska, D.I. Gerova, T.G. Chervenkov,
M.V. Siderova, R.J. Zorcheva, D.N. Paskalev*

UNDERCARBOXYLATED OSTEOCALCIN IN POSTMENOPAUSAL PATIENTS ON HEMODIALYSIS

¹Кафедра доклинической и клинической фармакологии и токсикологии, ²кафедра биохимии, молекулярной медицины и нутригеномики, ³Центр клинической лабораторной диагностики госпиталя Св. Марина, ⁴лаборатория клинической иммунологии госпиталя Св. Марина, ⁵Клиника эндокринологии госпиталя Св. Марина, ⁶Клиника нефрологии и диализа госпиталя Св. Марина Медицинского университета, г.Варна, Болгария

РЕФЕРАТ

Остеокальцин – витамин К-зависимый белок, секретируемый остеобластами. При дефиците витамина К отмечается повышение концентрации неактивной его фракции – некарбоксилированного остеокальцина (Глю-ОК). Хроническая болезнь почек ассоциируется с остеопорозом, а также субоптимальным статусом витамина К. **ЦЕЛЬЮ** данного исследования было оценить статус витамина К у женщин в периоде постменопаузы, получающих лечение гемодиализом с учетом уровня Глю-ОК, основываясь на идее о необходимости заместительной терапии витамином К. **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** 78 женщин в постменопаузе были распределены на 3 группы: 1-я – женщины, получающие лечение гемодиализом; 2-я – контрольная группа с нормальной минеральной плотностью костей; 3-я группа с остеопорозом. Концентрацию Глю-ОК определяли иммунохимическим методом. Остеопороз верифицировали по результатам двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии лучевой кости. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Концентрация сывороточного Глю-ОК у гемодиализных пациенток была значимо повышена по сравнению с группой контроля и группой остеопороза при отсутствии значимых различий между двумя последними. У гемодиализных больных была выявлена достоверная положительная взаимосвязь между Глю-ОК и концентрацией паратгормона, а также между Глю-ОК и длительностью гемодиализа. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Повышение концентрации Глю-ОК у женщин в постменопаузе, получающих лечение гемодиализом, может свидетельствовать о тяжелом дефиците витамина К, однако возможно влияние и других факторов. Следовательно, необходимы дополнительные исследования для подтверждения необходимости заместительной терапии витамином К у данной категории больных.

Ключевые слова: остеокальцин, женщины в постменопаузе, гемодиализ.

ABSTRACT

Osteocalcin is a vitamin K-dependent protein secreted by osteoblasts. In vitamin K deficiency the fraction of the inactive, undercarboxylated osteocalcin (ucOC) is increased. Chronic kidney disease is associated with bone loss and there is evidence for a sub-optimal status of vitamin K in renal patients. **THE AIM** of the present study was to assess the vitamin K status in postmenopausal hemodialysis patients based on their ucOC level with the background idea to substantiate the need of vitamin K supplementation. **PATIENTS AND METHODS.** 78 postmenopausal women were divided into 3 groups: 1) women on hemodialysis; 2) a control group with normal bone mineral density; 3) osteoporosis group. Serum ucOC was measured immunochemically. Osteoporosis was verified by DEXA scan of the radius. **RESULTS.** Serum ucOC in hemodialysis women was significantly increased in comparison with control and osteoporosis group, which did not differ significantly between each other. In hemodialysis patients, a strong positive correlation was found between ucOC and parathormone and between ucOC and hemodialysis duration. **CONCLUSION.** The increase of ucOC in hemodialysis postmenopausal patients may indicate a severe vitamin K deficit, but other factors may also contribute. Therefore, additional investigation is needed to justify supplementation with vitamin K in these patients.

Key words: osteocalcin, postmenopausal women, hemodialysis.

ВВЕДЕНИЕ

Остеокальцин (ОК) является основным неколла-
гаеновым матриксным белком, секретируемым

зрелыми остеобластами. Это витамин К-зависи-
мый белок. При активации остеокальцина под дей-
ствием витамина К карбоксилируются 3 молеку-
лы гамма-глутамата. Считается, что способность
активного ОК связывать кальций через отрица-
тельно заряженные карбоксилированные гамма

Bistra Tz. Galunska. Department of Biochemistry, Molecular Medicine
and Nutrigenomics, Varna Medical University; 55 Marin Drinov St, 9002
Varna, Bulgaria; +359 52 677076; E-mail: bistra.galunska@gmail.com

остатки карбокси-глутамата, отражает процесс минерализации кости. Точный механизм действия ОК, однако, остается предметом обсуждения [1].

Часть ОК, произведенного остеобластами и не депонированная в костном матриксе, попадает в системный кровоток [2]. Вследствие этого его концентрация в крови может быть измерена и считается маркером функции остеобластов, т.е. формирования кости [3, 4]. С другой стороны – ОК может попадать в кровь при резорбции кости, а следовательно, рассматриваться как маркер остеопороза [5].

Интерпретации уровней общего ОК в оценке обмена костной ткани часто спорны. При субклиническом дефиците витамина К ОК в сыворотке остается некарбоксилированным (Глю-ОК), а следовательно, не участвующим в метаболизме кости [6, 7]. Глю-ОК считают более надежным маркером нарушенного обмена костной ткани, так как его концентрация увеличивается в некоторых случаях при остеопорозе [8, 9]. В клинических исследованиях было показано увеличение уровня Глю-ОК при возрастных изменениях плотности костной ткани [8, 10, 11]. В частности, Глю-ОК является хорошим предиктором переломов шейки бедра у женщин в постменопаузе [12, 13].

Клинические исследования показывают, что пищевой дефицит витамина К распространен в Западной Европе, особенно у детей и пожилых [14, 15, 16]. Субклинический дефицит витамина К был найден также у гемодиализных больных [17, 18], но это подтверждается не всеми исследователями [19]. М. Kohlmeier и соавт. [17] считают, что имеется взаимосвязь субоптимального уровня витамина К у гемодиализных больных с увеличением риска переломов и с высокой распространенностью гиперпаратиреоидизма.

Цель данного исследования состояла в том, чтобы оценить статус витамина К в постменопаузе у женщин, получающих лечение гемодиализом (ГД), и сравнить его со статусом витамина К у амбулаторных пациенток с остеопорозом и без него, для того, чтобы определить потребность в заместительной терапии витамином К у ГД-больных.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Мы обследовали 78 женщин, которых распределили на 3 группы по 26 человек в каждой:

1-я – женщины, получающие лечение ГД.

2-я – контрольная амбулаторная группа с нормальной минеральной плотностью костей.

3-я – амбулаторная группа женщин с остеопорозом.

Средний возраст пациенток составил $59,0 \pm 0,9$ года в контрольной группе, $65 \pm 1,4$ года в группе с остеопорозом и $61,0 \pm 1,3$ года в группе ГД. Средний индекс массы тела составил $27,9 \pm 0,9$ кг/м² в контрольной группе, $15,8 \pm 1,8$ кг/м² в в группе с остеопорозом и $24,5 \pm 0,9$ в группе ГД. Средняя длительность диализной терапии составила $37,6 \pm 6,5$ мес. Первичным заболеванием, обусловившим потребность в ГД, был хронический пиелонефрит (включая калькулезный) у 12, аутосомно-доминантный поликистоз почек у 7, хронический гломерулонефрит – у 2, гипертоническая болезнь – у 2 и другие заболевания – у 3 пациенток. Все участницы исследования подписали информированное согласие. Исследование было одобрено местным Комитетом по Этике Медицинского университета Варны.

Натощак 8 мл крови собирали в вакутейнеры, содержащие активирующий тромбоциты фактор (Greiner Bio-One, Kremsmuenster, Austria); у пациенток, получающих лечение ГД, кровь забирали до начала процедуры. Все пробы немедленно центрифугировали в течение 10 мин при 1500 g, затем замораживали при температуре -70°C . Сывороточный уровень Глю-ОК (нг/мл) определяли с использованием наборов EIA kit, TAKARA Bio. Inc. (Japan). Только у больных на ГД сразу же определяли концентрацию общего кальция и фосфатов (ммоль/л) при помощи цветового фотометрического теста и фотометрического ультрафиолетового теста на анализаторе Olympus Beckman-Coulter.

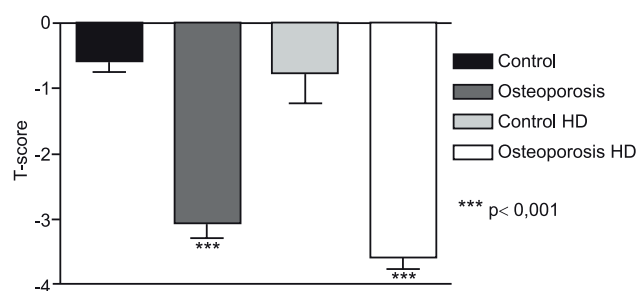


Рис. 1. Минеральная плотность костей (Т-показатель) у амбулаторных и ГД-больных.

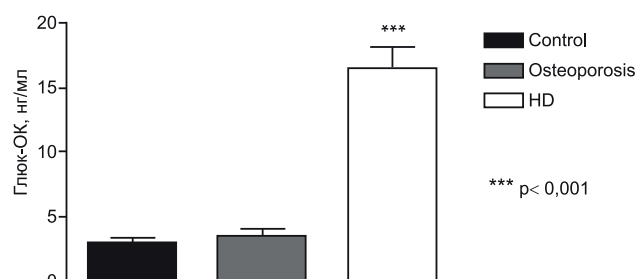


Рис. 2. Концентрация Глю-ОК в сыворотке крови амбулаторных и ГД-больных.

Корреляции между концентрацией Глю-ОК и различными показателями в группах пациенток

Таблица 1

Показатель	Диализные больные (группа 1)		Амбулаторные больные (группы 2 и 3)	
	Pearson r	p	Pearson r	p
Возраст	-0,49	0,01	0,05	NS
10-летняя вероятность значимых переломов	0,23	NS	0,24	0,09
10-летняя значимость переломов шейки бедра	0,19	NS	0,26	0,06

теопорозом на ГД (Т-показатель - $3,58 \pm 0,018$). Была выявлена тенденция, не достигающая статистической достоверности ($p=0,09$) более низкой минеральной плотности костей у

Остальные пробы венозной крови по 5 мл собирали в вакутейнеры с ЭДТА (Greiner Bio-One, Kremsmuenster, Austria) для определения паратгормона (iPTH). Пробы крови транспортировали на льду в лабораторию, немедленно центрифугировали при температуре 4°C в течение 210 мин при 1500 g, и концентрацию паратгормона (нг/л) определяли с использованием хемилюминесцентного набора (CLIA) kit on Immulite 2000.

Наличие остеопороза оценивали при помощи двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии лучевой кости. Т-показатель ниже -2,5 стандартного отклонения расценивали как доказательство остеопороза. 10-летний риск развития перелома шейки бедра и значимых остеопоретических переломов оценивали с использованием опросника FRAX. Все пациентки отвечали на опросник, состоящий из 34 шкал. Его результаты оценивали полуквалиметрично в отношении стиля жизни, включая потребление пищи, физическую активность, использование лекарственных препаратов и другие факторы риска остеопороза. При статистической обработке использовали t-критерий Стюдента и коэффициент корреляции Пирсона. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Различия между амбулаторными группами (контрольной и с остеопорозом) базировались на результатах костной денситометрии, представленных Т-показателем, который составил соответственно $-0,58 \pm 0,17$ и $-3,06 \pm 0,22$. Группу диализных больных также распределили на 2 части в зависимости от минеральной плотности костей: группу контроля на ГД (Т-показатель $-0,77 \pm 0,45$) и группу с ос-

больных с остеопорозом на ГД по сравнению с группой амбулаторных больных с остеопорозом (рис. 1).

Сывороточный уровень Глю-ОК у ГД-пациентов ($16,45 \pm 1,62$ нг/мл) был достоверно выше по сравнению с контрольной группой ($3,01 \pm 0,36$ нг/мл), $p < 0,0001$. Не было выявлено различий между контрольной группой и амбулаторной группой с остеопорозом ($3,49 \pm 0,53$ нг/мл) (рис. 2).

Значимая обратная коррелятивная взаимосвязь была выявлена между Глю-ОК и возрастом только в группе ГД-больных. Корреляционная взаимосвязь между уровнем Глю-ОК и 10-летней вероятностью остеопоретических переломов шейки бедра и значимых остеопоретических переломов у амбулаторных больных, в отличие от группы ГД-больных, была на уровне пограничного значения (табл. 1). Не выявлено корреляций между Глю-ОК с индексом массы тела, длительностью менопаузы и Т-показателем.

У диализных больных была выявлена значимая позитивная корреляция между Глю-ОК и iPTH, а также между Глю-ОК и длительностью ГД (табл. 2). Корреляций между Глю-ОК и сывороточным кальцием, фосфатом и производением кальций-фосфат выявлено не было.

В отношении стиля жизни, по данным опросника, не было выявлено различий в потреблении зеленых листовых овощей и других продуктов, в степени физической активности и наличия факторов риска остеопороза.

ОБСУЖДЕНИЕ

Некарбоксилированный остеокальцин признан в качестве маркера статуса витамина К. Дефицит витамина К ассоциируется с повышением сывороточного Глю-ОК. С другой стороны – часто находят взаимосвязь между Глю-ОК и минеральной плотностью костей, а так же с риском переломов у женщин в постменопаузе, также как и других состояний вторичного остеопороза, как, например, глюкокортикостероид-индуцированный остеопороз [20], остеопороз при воспалительных заболеваниях кишечника [21] и т.п.

Таблица 2
Корреляции между концентрацией Глю-ОК и различными показателями у пациенток на диализе

Показатель	Пациенты на диализе	
	Пирсон	p
Паратгормон	0,52	0,008
Длительность терапии диализом	0,77	0,0001

Отсеопороз у больных с терминальной почечной недостаточностью является лишь частью широкого спектра метаболических костных проблем, объединяемых термином уремическая остеодистрофия [22]. Частота переломов костей возрастает при хронической болезни почек. Более того, переломы у пациентов с терминальной почечной недостаточностью ассоциируются с увеличением риска смерти [23]. Имеются свидетельства субоптимального статуса витамина К при хронической болезни почек [17, 18, 24], однако этот дефицит не всегда взаимосвязан с ОК и другими показателями костного метаболизма [18, 19].

У наших гемодиализных больных высокий уровень Глю-ОК отражал дефицит витамина К. Однако это не единственный фактор, который может объяснять такой уровень изучаемого показателя. Значимая корреляция между Глю-ОК и длительностью гемодиализа свидетельствует о взаимосвязи с основным заболеванием. Так, есть данные, свидетельствующие об аккумуляции ОК и его фрагментов при почечной недостаточности [25, 26, 27], хотя W. Farrugia, R. Melick [28] объясняют это больше почечным и печеночным метаболизмом ОК, чем его мочевой экскрецией. Значительное повышение уровня ОК у больных с почечной недостаточностью расценивается как комбинация снижения клиренса и повышения скелетной продукции [26]. Кроме того, повышение уровня ОК значительно отличается у пациентов с высокообменной и низкообменной почечной остеодистрофией [25, 27], что подразумевает лишь частичное участие почечной недостаточности в этом процессе.

Наши результаты подтверждают найденную другими исследователями положительную коррелятивную взаимосвязь между общим ОК [25, 26, 29], Глю-ОК или процентом Глю-ОК с iPTH. Возможно, что высокие уровни Глю-ОК отражают высокие уровни общего ОК и могут повторять его поведение. Однако может также быть различие между взаимоотношением ОК и Глю-ОК с iPTH, учитывая возможную разницу в происхождении этих двух фракций. Активный ОК вообще, как полагают, выделяется из костной ткани во время ее резорбции (этим можно объяснить корреляцию с iPTH, который стимулирует высокий обмен костной ткани), тогда как Глю-ОК не связывают с гидроксипатитом, и его увеличение должно, главным образом, отразить ухудшение гамма-карбоксилирования. Кроме того, было показано, что iPTH вовлечен в индукцию экспрессии гена ОК в остеобластах [30], что может объяснить, по крайней мере частично, увеличение концентрации ОК (включая

и Глю-ОК) у пациентов со вторичным гиперпаратиреозом.

Мы обнаружили обратную корреляцию Глю-ОК с возрастом у ГД-больных в отличие от амбулаторных пациенток. Аналогичные данные о здоровых женщинах опубликовали S.M. Kim и соавт. [10], когда сравнили у них уровень Глю-ОК в 10-летних возрастных интервалах. Наиболее высокие уровни показателя отмечались в группе 20–29 лет и вслед за ней в группе 50–59 лет. Авторы объясняют это более высоким обменом костной ткани в данных группах.

Средний возраст наших ГД-пациенток составил $64,6 \pm 1,2$ года (95% ДИ 62,1–67,2), а во 2-й и 3-й группах (без гемодиализа) $61,3 \pm 0,9$ года (95% ДИ 59,4–63,2). При относительно небольшой разнице в возрасте двух групп отмечалось увеличение Глю-ОК больше чем в 4 раза у ГД-пациенток, что связано с ведущим вкладом факторов, обусловленных основной почечной патологией.

Многие исследователи [11, 13, 31, 32] сообщают о непосредственной связи Глю-ОК с увеличенным риском остеопоротических переломов. Наши результаты показывают пограничную корреляцию с 10-летней вероятностью переломов шейки бедра и значимых переломов в соответствии с опросником FRAX только у амбулаторных пациенток. Недостоверность таких взаимоотношений у ГД-пациенток, видимо, обусловлена вмешательством многих факторов, связанных с хронической болезнью почек.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из представленных данных ясно, что информационная ценность Глю-ОК недостаточна для того, чтобы оценить статус витамина К у ГД-больных. Это происходит возможно из-за ряда факторов, которые затрудняют однозначную интерпретацию данного параметра. Дополнительная оценка доли Глю-ОК, основанная на измерении общего ОК, может дать лучшую возможность проникновения в суть роли этого витамин К-зависимого белка для метаболизма кости у почечных пациентов по сравнению с сопоставимыми по возрасту лицами без почечной патологии. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы объяснить проблему и уточнить рекомендации для заместительной терапии витамином К у больных на ГД, чтобы предотвратить развитие осложнений, связанных с потерей костной массы.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Oldenburg J, Marinova M, Muller-Reible C, Watzka M. In: Litwack G, ed. *Vitamin K*. Academic Press, Elsevier, 2008; 46

2. Price PA, Parthamore JG and Deftos LJ. New biochemical marker for bone metabolism. Measurement by radioimmunoassay of bone GLA protein in the plasma of normal subjects and patients with bone disease. *J Clin Invest* 1980; 66, 878-83
3. Urena P, de Vernejoul M. Circulating biochemical markers of bone remodeling in uremic patients. *Kidney Int* 1999; 55:2141-2156
4. Brown JP, Delmas PD, Malaval L, Edouard C et al. Serum bone Gla-protein: a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 1984; 1(8386):1091-1093
5. Ivaska K. *Osteocalcin. Novel insights into the use of osteocalcin as a determinant of bone metabolism*. PhD thesis, 2005:26
6. Adams J, Pepping J. Vitamin K in the treatment and prevention of osteoporosis and arterial calcification. *Am J Health-Syst Pharm* 2005; 62(15):1574-1581
7. Feskanich D, Weber P, Willett WC, Rockett H et al. Vitamin K intake and hip fractures in women: a prospective study. *Am J Clin Nutr* 1999; 69(1):74-79
8. Plantalech L, Guillaumont M, Vergnaud P, Leclercq M et al. Impairment of gamma carboxylation of circulating osteocalcin (bone gla protein) in elderly women. *J Bone Miner Res* 1991; 6(11):1211-1216
9. Vermeer C, Hamulyak K. Pathophysiology of vitamin K-deficiency and oral anticoagulants. *Thromb Haemost* 1991; 66:153-159
10. Kim SM, Kim KM, Kim BT, Joo NS et al. Correlation of undercarboxylated osteocalcin (ucOC) concentration and bone density with age in healthy Korean women. *J Korean Med Sci* 2010; 25(8):1171-1175
11. Szulc P, Arlot M, Chapuy MC, Duboeuf F et al. Serum undercarboxylated osteocalcin correlates with hip bone mineral density in elderly women. *J Bone Miner Res* 1994; 9:1591-1595
12. Arunakul M, Niempoog S, Arunakul P, Bunyaratavej N. Level of undercarboxylated osteocalcin in hip fracture Thai female patients. *J Med Assoc Thai* 2009; 92 [suppl 5]:S7-11
13. Vergnaud P, Garnero P, Meunier PJ, Breart G et al. Undercarboxylated osteocalcin measured with a specific immunoassay predicts hip fracture in elderly women: the EPIDOS Study. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; (3):719-724
14. Vermeer C, Shearer MJ, Zittermann A, Bolton-Smith C et al. Beyond deficiency: potential benefits of increased intakes of vitamin K for bone and vascular health. *Eur J Nutr* 2004; 43(6):325-335
15. Bugel S. Vitamin K and bone health in adult humans. *Vitam Horm* 2008; 78:393-416
16. McCann JC, Ames BN. Vitamin K, an example of triage theory: is micronutrient inadequacy linked to diseases of aging? *Am J Clin Nutr* 2009; 90: 889-907
17. Kohlmeyer M, Saupe J, Shearer M, Schaefer K et al. Bone health of adult hemodialysis patients is related to vitamin K status. *Kidney Int* 1997; 51:1218-1221
18. Pilkey M, Morton R, Boffa B et al. Subclinical vitamin K deficiency in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2007; 49(3):432-439
19. Maiyszko J, Woiczyski S, Skrzydlewska E, Maiyszko JS et al. Vitamin K Status in Relation to Bone Metabolism in Patients with Renal Failure. *Am J Nephrol* 2002; 22:504-508
20. Eastell R, Chen P, Saag G, Burshell AL et al. Bone formation markers in patients with glucocorticoid-induced osteoporosis treated with teriparatide or alendronate. *Bone* 2010; 46(4):929-934
21. Gilman J, Shanahan F, Cashman KD. Altered levels of biochemical indices of bone turnover and bone-related vitamins in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23:1007-1016
22. Ersoy F. Osteoporosis in the elderly with chronic kidney disease. *Int Urol Nephrol* 2007; 39(1):321-331
23. Nickolas TL, Leonard MB, Shane E. Chronic kidney disease and bone fracture: a growing concern. *Kidney Int* 2008; 74(6):721-731
24. Holden RM, Iliescu E, Morton AR, Booth SL. Vitamin K status of canadian peritoneal dialysis patients. *Periton Dial Internat* 2008; 28(4):415-417
25. Malluche HH, Faugere MC, Fanti P, Price PA. Plasma levels of bone Gla-protein reflect bone formation in patients on chronic maintenance dialysis. *Kidney Int* 1984; 26(6):869-874
26. Epstein S, Traberg H, Raja R, Poser J. Serum and dialysate osteocalcin levels in hemodialysis and peritoneal dialysis patients and after renal transplantation. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60(6): 1253-1256
27. Charhon SA, Delmas PD, Malaval L, Chavassieux PM et al. Serum bone Gla-protein in renal osteodystrophy: comparison with bone histomorphometry. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63(4): 892-897
28. Farrugia W, Melick R. Metabolism of osteocalcin. *Calcified Tis Intern* 1986; 39(4):234-238
29. Joffe P, Heaf G, Hyldstrup L. Osteocalcin: A non-invasive index of metabolic bone disease in patients treated by CAPD. *Kidney Int* 1994; 46: 838-846
30. Yu S, Franceschi RT, Luo M, Zhang X et al. Parathyroid hormone increases activating transcription factor 4 expression and activity in osteoblasts: requirement for osteocalcin gene expression. *Endocrinology* 2008; 149(4): 1960-1968
31. Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP. Serum undercarboxylated osteocalcin and the risk of hip fracture. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(3):717-718
32. Binkley N, Harke J, Krueger D, Engelke J et al. Vitamin K treatment reduces undercarboxylated osteocalcin but does not alter bone turnover, density, or geometry in healthy postmenopausal north american women. *J Bone Min Res* 2009; 24(6):983-991

Поступила в редакцию 09.06.2011 г.

Принята в печать 30.06.2011 г.