

УДК: 618.14–006.6+616–002.18–091.818

ИНСУЛИНОПОДОБНЫЕ ФАКТОРЫ РОСТА И АКТИВНОСТЬ ПРОТЕАСОМ В ОПУХОЛЯХ ЭНДОМЕТРИЯ

**Н.В. Бочкарева, И.В. Кондакова, Л.А. Коломиец, А.Л. Чернышова,
Л.В. Спирина, С.Л. Стуканов, Т.В. Тропина, О.Н. Асадчикова**

ГУ «НИИ онкологии Томского научного центра СО РАМН»

Получены новые данные о высокой экспрессии инсулиноподобного фактора роста первого типа (ИФР-I) и белка, связывающего ИФР (IGFBP-3) в опухолях эндометрия, по сравнению с гиперплазированным эндометрием. В опухолях эндометрия наблюдается значительная вариация экспрессии специфической протеиназы IGFBPs – PAPP-A, в частности, уровень PAPP-A снижался при высоком содержании IGFBP-3 в низкодифференцированных карциномах. Уровень ИФР-I в неинвазивном раке эндометрия значительно ниже, чем в инвазивном. Показана взаимосвязь протеасомной активности в нетрансформированной ткани с уровнем ИФР-I в опухоли эндометрия. Выявлена связь IGFBP-3 и протеасомной активности в нетрансформированной ткани с возрастом и менопаузальным статусом у больных раком эндометрия, IGFBP-3 – с наличием гипертонической болезни.

Ключевые слова: инсулиноподобный фактор роста I типа и связывающий его белок, активность протеасом, рак эндометрия.

INSULIN-LIKE GROWTH FACTORS AND PROTEASOME ACTIVITY IN ENDOMETRIAL TUMORS

N.V. Bochkareva, I.V. Kondakova, L.A. Kolomiets, A.L. Chernyshova,

L.V. Spirina, S.L. Stukanov, T.V. Tropina

Tomsk Cancer Research Institute of Russian Academy of Medical Science

New data on a high expression of insulin-like growth factor –I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 (IGFBP-3) in endometrial tumors as compared to endometrial hyperplasia samples have been presented. A significant variability in the expression of specific IGFBPs proteinase (PAPP-A) in endometrial tumors was found. The reduction in the PAPP-A level with high level of IGFBP-3 in low-differentiated carcinomas was observed. The level of IGF-I in non-invasive endometrial cancer was significantly lower than that in invasive cancer. The relationship between proteasome activity in non-transformed tissue and IGF-I level in the endometrial tumors was revealed. The levels of IGFBP-3 and proteasome activity were related with the age and menopausal status and the level of IGFBP-3 was related with hypertension in endometrial cancer patients.

Key words: insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factors binding protein, proteasome activity, endometrial cancer.

В настоящее время сформировано понятие о системе инсулиноподобных факторов роста, в которую входят сами инсулиноподобные факторы роста (ИФР) – ИФР-I и ИФР-II, рецептор ИФР I типа, а также 6 белков, связывающих инсулиноподобные факторы роста (IGFBPs). С этой системой функционально связаны протеиназы, расщепляющие IGFBPs, среди которых важное значение отводят белку, ассоциированному с беременностью – PAPP-A (pregnancy-associated plasma protein) [5]. Роль ИФР, их рецептора и IGFBPs в патогенезе рака эндометрия представляется многоплановой. Автономная или индуцированная эстрадиолом и тамоксифеном продукция ИФР гиперплазированным эндоме-

трием или опухолью при наличии рецепторов к ИФР в тканях может приводить к избыточной пролиферации клеток, их пониженной чувствительности к проапоптотическим стимулам и повышенной клеточной подвижности. При наличии опухолевых клеток это может привести к значительной инвазии в нормальные ткани и метастазированию. Существенную роль в регуляции биодоступности ИФР отводят IGFBPs, экспрессия которых регулируется эстрогенами, прогестероном, специфическими протеазами и самими ИФР [5, 10, 12, 13, 15].

Необходимо отметить, что внутриклеточная деградация белков в протеасомах является конечным этапом во многих физиологических

и патологических процессах. В убиквитин-протеасомной системе расщепляются аномальные или короткоживущие регуляторные белки, в том числе молекулы путей передачи сигналов от ростовых факторов и, частично, сами рецепторы ростовых факторов [6]. Убиквитин-протеасомная система деградации представлена олигопептидом убиквитином и протеасомой – полиферментным комплексом, который обладает трипсиноподобной, химо трипсиноподобной, каспазной и АТФ-азной активностью. Имеется определенная взаимосвязь между компонентами ИФР-системы и активностью протеасом в клетках. Выявлено, что внутриклеточная деградация основного белка, связывающего ИФР во внеклеточной жидкости и индуцирующего апоптоз в клетке при его накоплении в ядре – IGFBP-3, зависит от активности убиквитин E1-лигазы – компонента убиквитин-протеасомной системы деградации белков [14].

Большинство моментов, касающихся роли ИФР-опосредованного сигнального пути в патогенезе предрака и рака эндометрия, остаются неисследованными, а результаты, полученные преимущественно на клеточных опухолевых линиях, нельзя прямо экстраполировать на реальные опухоли. По-видимому, в реализации эффектов ИФР в опухолях эндометрия большое значение имеет строма опухолей. Мало изучены клинические ассоциации компонентов ИФР-опосредованного сигнального пути при раке эндометрия. Нет данных о взаимосвязи системы внутриклеточной деградации белков и состояния ИФР-системы в опухолях эндометрия. Исследования в этом направлении представляются достаточно актуальными как в плане разработки фундаментальных аспектов патогенеза рака эндометрия, так и улучшения прогнозирования заболевания. Поэтому целью исследования явилось изучение уровня компонентов ИФР-системы в опухолях эндометрия во взаимосвязи с активностью протеасом и анализ данных с основными клинко-морфологическими параметрами у больных раком эндометрия.

Материал и методы

Основную группу составили 33 больных раком эндометрия I–II стадии (средний возраст $56,4 \pm 1,9$ года), проходивших хирургическое

или комбинированное лечение в клиниках ГУ «НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН». При гистологическом исследовании эндометриоидный рак верифицирован в 32 образцах, неэндометриоидный (мезодермоидного происхождения) – в 1 случае. Больные были распределены следующим образом: по стадии заболевания – у 2 пациенток выявлен рак *in situ*, у 22 – I стадия, у 9 – II стадия процесса. По степени дифференцировки: у 11 больных выявлены высокодифференцированные аденокарциномы, у 17 – умереннодифференцированные, у 4 – опухоли с низкой степенью дифференцировки. По менопаузальному статусу: 6 больных репродуктивного возраста, 8 пациенток находились в перименопаузе, 19 – в постменопаузе.

Для сравнения была сформирована группа из 8 больных с гиперпластическими процессами эндометрия (6 женщин с типичной и 2 – с атипичной гиперплазией эндометрия, средний возраст – $48,9 \pm 2,8$ года). У всех больных, кроме вышеуказанных клинических параметров были проанализированы возраст, состояние менструальной и репродуктивной функции, менопаузальный статус в соответствии с критериями ВОЗ (1990) и Международного общества по изучению менопаузы (1999), наличие ожирения с подсчетом индекса массы тела, наличие гипертонической болезни и сахарного диабета.

В опухолевой ткани оценивали содержание ИФР-I; PAPP-A; IGFBP-3 методом твердофазного иммуноферментного анализа на ИФА-анализаторе «Anthos 2020». Предварительно около 100 мг опухолевой ткани гомогенизировали в жидком азоте до порошкообразного состояния, порошок ресуспендировали в 600 мкл 50 мМ трис-HCl буфера (pH=7,8) с 1 мМ ЭДТА и 1 мМ дитиотрейтолом. Гомогенат центрифугировали 30 мин при 10000g и 4°C. В каждую лунку планшета для твердофазного иммуноферментного анализа добавляли количество супернатанта, соответствующее методическим указаниям к набору. Использовали наборы Human IGF-I Quantikine ELISA Kit, Human IGFBP-3 Quantikine ELISA Kit, Human Pappalysin-1/PAPPA-A Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, США). Содержание белка в супернатантах определяли по методу Лоури и выражали в мг/мл.

Активность протеасом определяли у 7 больных раком эндометрия в соответствующих образцах опухолевой и неизменной ткани по гидролизу флуорогенного олигопептида Suc-LLVY-AMC [2]. Визуально не измененную ткань эндометрия брали на расстоянии не менее 1 см от границы опухоли. Реакционная смесь содержала 20 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 1 мМ дитиотрейтола, 30 мкМ Suc-LLVY-AMC, 5 мМ $MgCl_2$ и 1 мМ АТФ. Реакцию проводили при 37°C в течение 20 мин. Образовавшийся продукт регистрировали на флуориметре Hitachi-850 (Япония) при значениях возбуждающей длины волны 380 нм и эмиссии 440 нм. За единицу удельной активности протеасом принимали количество фермента, при котором гидролизуеться 1 нмоль Suc-LLVY-AMC в течение 1 мин на 1 мг белка.

В таблицах все результаты представлены как $m \pm M$, где m – среднее выборочное, M – ошибка среднего. Значимость различий показателей в исследуемых группах определяли при помощи непараметрического критерия Манна–Уитни. Степень и значимость корреляционной связи между показателями оценивали с помощью коэффициента Спирмена. Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета статистических программ Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

При анализе показателей ИФР-I, IGFBP-3 и RAPP-A в опухолевой ткани установлено, что уровень ИФР-I и основного белка, связывающего ИФР, IGFBP-3, в опухолях эндометрия был значительно выше, чем в гиперплазированном эндометрии. Аналогичная тенденция выявлена и для RAPP-A (табл. 1). Необходимо отметить, что, в отличие от других изученных параметров, в группе больных раком эндометрия в 12,1 % встречались RAPP-A-отрицательные опухоли,

в то же время в части опухолей уровень экспрессии этого белка был очень высок (более 10 нг/мг белка – в 27,3 %) при среднем значении $8,58 \pm 1,27$ нг/мг белка (табл. 1). Активность протеасом была достоверно выше в опухолевой ткани по сравнению с аутологичной неизменной тканью – $58,5 \pm 18,4 \times 10^3$ Ед/мг белка и $28,4 \pm 2,60 \times 10^3$ Ед/мг белка соответственно.

При оценке состояния ИФР-системы во взаимосвязи с основными клиническими параметрами было выявлено, что уровень IGFBP-3 у больных раком эндометрия в постменопаузе был существенно выше по сравнению с больными репродуктивного возраста и в перименопаузе (табл. 2), что подтверждается и данными, полученными при проведении корреляционного анализа (табл. 3). Аналогичная тенденция выявлена и для RAPP-A. Кроме того, уровень ИФР-I в неинвазивных карциномах был значительно ниже по сравнению с инвазивными. При анализе изученных параметров со степенью дифференцировки опухолей выявлено, что в низкодифференцированных опухолях высокий уровень IGFBP-3 сочетался с низким уровнем RAPP-A.

При проведении корреляционного анализа выявлено, что со стадией заболевания достоверно коррелировал уровень IGFBP-3 в опухоли (табл. 3). Наличие гипертонической болезни также коррелировало с уровнем IGFBP-3. Необходимо отметить, что протеасомная активность в нетрансформированной ткани значительно растет с возрастом больных раком эндометрия, что подтверждается наличием сильной корреляционной связи ($r=0,941$, $p=0,005$). Была выявлена закономерная взаимосвязь между ИФР-I и IGFBP-3 в опухолевой ткани. Кроме того, уровень ИФР-I в опухоли коррелировал с активностью протеасом в нетрансформированной ткани.

Таблица 1

Уровень ИФР-I, IGFBP-3 и RAPP-A в гиперплазированном эндометрии и опухолях эндометрия ($M \pm m$)

Группы больных	ИФР-I, нг/мг белка	IGFBP-3, нг/мг белка	RAPP-A, нг/мг белка
Рак эндометрия	$0,52 \pm 0,06^*$	$4494 \pm 639^*$	$8,58 \pm 1,27$
ГПЭ	$0,34 \pm 0,03$	1488 ± 380	$4,94 \pm 3,29$

Примечание: ГПЭ – гиперпластические процессы эндометрия, * – различия статистически значимы по сравнению с ГПЭ, $p < 0,05$.

Таблица 2

Уровень ИФР-I, IGFBP-3 и PAPP-A в опухолях эндометрия во взаимосвязи с основными клинико-морфологическими параметрами (M±m)

Критерии сравнения	ИФР-I, нг/мг белка	IGFBP-3, нг/мг белка	PAPP-A, нг/мг белка
Менопаузальный статус:			
репродуктивный возраст	0,625 ± 0,210	2455 ± 317	5,79 ± 1,55
перименопауза	0,410 ± 0,130	1912 ± 239	7,02 ± 1,56
постменопауза	0,51 ± 0,070	6333 ± 953**	10,3 ± 2,1
Стадия опухолевого процесса:			
Рак in situ	0,221 ± 0,069*	1848 ± 216*	8,40 ± 0,80
I стадия	0,540 ± 0,080	4028 ± 596	8,48 ± 1,60
II стадия	0,530 ± 0,110	6655 ± 597	9,58 ± 3,10
Степень дифференцировки опухоли:			
высокая	0,635 ± 0,130	2527 ± 358	7,30 ± 1,60
умеренная	0,440 ± 0,070	4800 ± 659	9,94 ± 2,00
низкая	0,491 ± 0,160	10193 ± 4009***	2,14 ± 1,50****

Примечание: * – значимость различий по сравнению с I и II стадией заболевания, $p < 0,05$; ** – значимость различий по сравнению с высокодифференцированными опухолями, $p < 0,05$; *** – значимость различий по сравнению с высоко- и умереннодифференцированными опухолями, $p < 0,05$; **** – значимость различий по сравнению с высоко- и умереннодифференцированными опухолями, $p < 0,05$.

Таблица 3

Спектр корреляционных связей и коэффициент корреляции Спирмена между изученными параметрами в группе больных раком эндометрия

Корреляционные связи	R	p
Возраст – IGFBP-3	0,580	0,0005
Возраст – протеасомная активность в нетрансформированной ткани	0,941	0,005
Гипертоническая болезнь – IGFBP-3	0,482	0,005
Стадия – IGFBP-3	0,560	0,040
ИФР-I – протеасомная активность в нетрансформированной ткани	0,886	0,019
ИФР-I - IGFBP-3	0,432	0,011

Примечание: R – коэффициент корреляции Спирмена.

Полученные данные об уровне компонентов ИФР-системы в опухолях эндометрия свидетельствуют о значительном образовании ИФР-I в опухолях эндометрия. Для сопоставления собственных результатов с данными литературы содержание ИФР-I в ткани эндометрия было рассчитано на 1 мл супернатанта, в результате чего было выявлено, что в супернатанте ткани рака эндометрия содержится достаточно высокое количество ИФР-I – $1,28 \pm 0,17$ нг/мл. Для сравнения, уровень ИФР-I в супернатанте мононуклеаров периферической крови на 5-й день инкубации (в логарифмическую фазу роста) составил в среднем 1,59 нг/мл, в супернатанте клеток человеческой остеосаркомы (U2-OS) – в среднем 2,192 нг/мл [11]. Также нами было показано, что уровень этого белка в карциномах

был значительно выше, чем в гиперплазированной эндометрии.

Достаточно высокие уровни ИФР-I, IGFBP-3 и PAPP-A в опухолевой ткани, по-видимому, свидетельствуют об активации ИФР-системы у больных раком эндометрия. Анализируя данные литературы, можно отметить исследование С.С. Camacho-Hubner et al. (2005), в котором было показано, что клеточная линия карциномы эндометрия HEC-1B секретирует 3 типа IGFBPs: IGFBP-1, IGFBP-2 и IGFBP-3, причем выявлена ИФР-I-зависимая активация синтеза IGFBP-3 [3], что согласуется с полученными нами данными о сочетанном высоком уровне экспрессии ИФР-I и IGFBP-3 в опухолях эндометрия. Необходимо отметить, что оценка уровня как ИФР-I, так и ИФР-II в опухолевой ткани при

раке эндометрия была бы более целесообразна, так как, по данным L.C. Murphy (1994), в аденокарциномах эндометрия экспрессируются значительные количества ИФР-II [5].

В отношении RAPP-A можно отметить, что этот гликопротеин обладает иммуносупрессивными свойствами, и ранее считалось, что он продуцируется исключительно клетками трофобласта. Поэтому основная область использования данного маркера – диагностика и оценка эффективности лечения трофобластической болезни, выявление аномалий течения беременности; вместе с определением свободной b-субъединицы хорионического гонадотропина оценка RAPP-A в сыворотке крови используется в пренатальном скрининге на синдром Дауна [17]. Однако дальнейшие исследования показали, что данный белок обладает свойствами специфической протеиназы IGFBP-4 и -5, секретируется не только клетками трофобласта, но и обнаруживается в фолликулярной, семенной и простатической жидкостях, продуцируется стромальными клетками нормального, гиперплазированного и малигнизированного эндометрия, а также рядом опухолей эпителиального происхождения [7–9, 16]. Причем в малигнизированном эндометрии уровень экспрессии RAPP-A был значительно выше по сравнению с гиперплазированным (иммуногистохимическое исследование) [8], что созвучно полученным нами данным. В то же время в нашем исследовании показано, что в части опухолей RAPP-A не продуцируется.

Полученные взаимосвязи между компонентами ИФР-системы, в частности между уровнем ИФР-I и протеасомной активностью, в нетрансформированной ткани позволяют предположить возможный контроль содержания ИФР-I в опухоли его выработкой в неизменной ткани при участии внутриклеточной протеолитической системы. Такой вариант паракринной регуляции достаточно распространен среди опухолей, в том числе есть примеры и в отношении рака эндометрия [18].

Интересны данные, полученные в отношении взаимосвязи состояния ИФР-системы с основными клинко-морфологическими параметрами у больных раком эндометрия. Связь IGFBP-3 и протеасомной активности в нетрансформированной ткани с возрастом и менопаузальным

статусом у больных раком эндометрия отражает определенные особенности в функционировании ИФР-системы и системы внутриклеточной деградации белков у этих больных, поскольку у здоровых взрослых людей уровень обоих ИФР и IGFBP-3, по крайней мере в сыворотке крови, не зависел от возраста [1]. В отношении протеасомной активности в литературе представлены достаточно разнородные данные, однако для большинства клеточных линий (фибробласты человека, кератиноциты мыши) и тканей (в основном печень, селезенка и мозг крыс и мышей) показано зависимое от возраста снижение протеасомной активности [4]. Также нами было показано, что уровень IGFBP-3 коррелирует с наличием гипертонической болезни, которая у больных раком эндометрия наблюдается не изолированно, а чаще всего является проявлением метаболического синдрома. Кроме того, в последующем будет представлять определенный интерес изучение взаимосвязи компонентов ИФР-системы с уровнем инсулинемии. Уровень ИФР-I в неинвазивном раке эндометрия был значительно ниже, чем в инвазивном. Причем уровень этого белка был практически одинаков при I и II стадии заболевания, в то время как уровень IGFBP-3 прогрессивно возрастал. Важно отметить, что в низкодифференцированных карциномах при высоком уровне IGFBP-3 уровень RAPP-A значительно снижался.

Таким образом, получены новые данные о достаточно высокой экспрессии ИФР-I и IGFBP-3 в опухолях эндометрия по сравнению с гиперплазированным эндометрием, о значительной вариации экспрессии RAPP-A в опухолях эндометрия, в том числе о снижении уровня RAPP-A при высоком уровне IGFBP-3 в низкодифференцированных карциномах. Уровень ИФР-I в неинвазивном раке эндометрия был значительно ниже, чем в инвазивном. Выявлена связь IGFBP-3 и протеасомной активности в нетрансформированной ткани с возрастом и менопаузальным статусом у больных раком эндометрия, а также IGFBP-3 с наличием гипертонической болезни. Полученные результаты о взаимосвязи уровня ИФР-I, IGFBP-3, RAPP-A в опухолевой ткани, активности протеасом в опухолевой и нетрансформированной ткани с основными клинко-морфологическими

параметрами у больных раком эндометрия представляют значительный интерес, однако необходимо продолжение исследований как в плане расширения спектра исследуемых показателей (ИФР-II, IGFBP-4 и IGFBP-5, более широкий спектр клинических показателей), так и в плане увеличения количества обследованных больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлеев В.А., Гаспаров А.С., Аванесян Н.С. Факторы роста и их роль в регуляции репродуктивной функции у больных с синдромом поликистозных яичников // Проблемы репродукции. 1998. № 3. С. 17–25.
2. Ben-Shahar S., Komlosch A., Nadav E. et al. 26S proteasome-mediated production of an authentic major histocompatibility class I-restricted epitope from an intact protein substrate // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274, № 31. P. 21963–21972.
3. Camacho-Hubner C., McCusker R.H., Clemmons D.R. Secretion and biological actions of insulin-like growth factor binding proteins in two human tumor-derived cell lines in vitro // J. Cell. Phys. 2005. Vol. 148, № 2. P. 281–289.
4. Dahlmann B. Role of proteasomes in disease // BMC Biochemistry. 2007. Vol. 8, № 1. S. 3.
5. Firth S.M., Baxter R.C. Cellular action of the insulin-like growth factor binding proteins // Endocrine reviews. 2002. Vol. 23, № 6. P. 824–854.
6. Girnita L., Girnita A., Larson O. Mdm-2-dependent ubiquitination and degradation of the insulin-like growth factor 1 receptor // PNAS. 2003. Vol. 100, № 14. P. 8247–8252.
7. Giudice L.C., Conover C.A., Bale L. et al. Identification and regulation of the IGFBP-4 protease and its physiological inhibitor in human trophoblast and endometrial stroma: evidence for paracrine regulation of IGF-II bioavailability in the placental bed during human implantation // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2002. Vol. 87. P. 2359–2366.
8. Ikarashi T., Takeuchi S. Immunohistochemical localization of placental proteins and tumor-associated antigens in endometrial cancer and endometrial hyperplasia // Nippon Sanka. 1987. Vol. 39, № 9. P. 1634–1640.
9. Kalli K.R., Chen B.K., Bale L.K. et al. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) expression and insulin-like growth factor binding protein-4 protease activity in normal and malignant ovarian surface epithelial cells // Int. J. Cancer. 2004. Vol. 110, № 5. P. 633–640.
10. Maiorano E., Loverro G., Viale G. et al. Insulin-like growth factor-I expression in normal and diseased endometrium // Int. J. Cancer. 1999. Vol. 80, № 2. P. 188–193.
11. Quantikine. Human IGF-I immunoassay: catalog number DG100. 15 с.
12. Rocha R.L., Hilsenbeck S.G., Jackson J.G. et al. IGFBP-3 and insulin receptor substrate-1 in breast cancer: correlation with clinical parameters and disease-free survival // Clin. Cancer Res. 1997. Vol. 3. P. 103–109.
13. Sakai K., Busby W.H., Clarke J.B. et al. Tissue transglutaminase facilitates the polymerization of insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) and leads to loss of IGFBP-1's ability to inhibit insulin-like growth factor-I-stimulated protein synthesis // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276, № 12. P. 8740–8745.
14. Santer F.R., Bacher N., Moser B. et al. Nuclear insulin-like growth factor binding protein-3 induces apoptosis and is targeted to ubiquitin /proteasome-dependent proteolysis // Cancer Res. 2006. Vol. 66, № 6. P. 3024–3033.
15. Shang Y., Brown M. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs // Science. 2002. Vol. 295. P. 2465–2468.
16. Sinosich M.J., Davey M., Sloss P. et al. Pregnancy associated plasma protein-A (PAPP-A) in human ovarian follicular fluid // J. Clin. Endocrinol. Metab. 1984. Vol. 5, № 8. P. 500–505.
17. Wald N., Stone R., Cuckle H.S. et al. First trimester concentrations of pregnancy associated plasma protein A and placental protein 14 in Down's syndrome // BMJ. 1992. Vol. 305. P. 28–33.
18. Yang S., Fang Z., Gurates B. et al. Stromal PRs mediate induction of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in human endometrial epithelium: a paracrine mechanism for inactivation of E2 // Molecular Endocrinol. 2001. Vol. 15, № 12. P. 2093–2105.

Поступила 20.06.08