

УДК 616.5-006:81-091.8

АНАЛИЗ ВЗАИМОСВЯЗИ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛ КЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ Е-КАДГЕРИН И β -КАТЕНИН С МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ И ПРОГНОЗОМ ЗАБОЛЕВАНИЯ ПРИ МЕЛАНОМЕ КОЖИ

Алексинский В. С. (*aleksinski.w.s@gmail.com*), Басинский В. А. (*basinsk@gmail.com*)
 УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

Введение: считается, что Е-кадгерин и β -катенин вовлечены в злокачественную трансформацию меланоцитов и прогрессию меланоцитарной опухоли, но механизм данного эффекта и роль этих молекул в прогрессии опухолевого процесса остаются не до конца ясными.

Цель: проанализировать взаимосвязь экспрессии маркеров клеточной адгезии Е-кадгерин и β -катенин с морфологическими параметрами и прогнозом заболевания при меланоме кожи.

Материал и методы: 65 меланом кожи с ретроспективно известными исходами подвергнуты макроскопическому, гистологическому и иммуногистохимическому исследованию.

Результаты исследования: показана тесная корреляция данных маркёров и снижение их экспрессии в беспигментных и узловых меланомах, а также в меланомах с выраженной проминенцией, высокими показателями толщины по Breslow и объема. Установлено, что в меланомах 3-й и 4-й стадий инвазивного роста по Кларку снижение уровня экспрессии β -катенина ассоциировано со снижением безрецидивной выживаемости пациентов.

Выводы: полученные результаты позволяют рекомендовать β -катенин в качестве прогностически ценного маркера при меланоме кожи.

Ключевые слова: меланома кожи, межклеточная адгезия, Е-кадгерин, β -катенин, иммуногистохимия, прогноз

Е-кадгерин и β -катенин являются молекулами клеточной адгезии: β -катенин связан с цитоплазматическим доменом Е-кадгерина и играет важную роль не только в межклеточной адгезии, но в Wnt/wg-сигнализации, участвуя в прогрессии многих новообразований, в том числе и меланомы кожи [1, 2], а Е-кадгерин в свою очередь также принимает участие в правильном расположении клеток и целостности тканей и экспрессируется в первичной меланоме в виде короткой формы, которая может нарушать межклеточную сцепку и влиять на рост и поведение меланоцитов [3, 4, 5].

Хотя считается, что Е-кадгерин и β -катенин, несомненно, вовлечены в злокачественную трансформацию меланоцитов и прогрессию меланоцитарной опухоли, однако как механизм проявления данного эффекта, так и причинная роль этих молекул в прогрессии опухолевого процесса остаются не до конца ясными [6, 7, 8, 9].

Цель исследования: проанализировать взаимосвязь экспрессии молекул клеточной адгезии Е-кадгерин и β -катенин с морфологическими параметрами и прогнозом заболевания при меланоме кожи.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили 65 меланом кожи, полученных при хирургическом лечении пациентов Гродненской области, не подвергавшихся лучевой и химиотерапии, с ретроспективно известными исходами течения опухолевого процесса. Медиана возраста пациентов составила 62 (51; 70) года, а медиана безрецидивной продолжительности жизни пациентов в послеоперационном периоде равнялась 38 (15; 90) месяцам (в скобках приведены нижний и верхний квартили).

Оценивались макроскопические параметры меланомы: большой и малый размеры, высота (Н) и степень пигментации (показатель «Color» оценивался полуколичественно, от 0 до 3 баллов), исходя из линейных размеров, определялись площадь основания опухоли в плоскости кожи и ее объем (учитывалась группа меланом, не имеющих проминенции – показатель V_{tum} , и группа только выступающих над поверхностью кожи опухолей – V_{tum} пр.).

Для гистологического исследования с парафиновых блоков получали срезы толщиной 5 мкм, которые окрашивались гематоксилином и эозином по стандартной методике. Оценивались такие морфологические параметры меланомы, как стадия инвазивного роста по Кларку, толщина по Breslow (в мм), на основании которой определялась стадия pT согласно требованиям ВОЗ к TNM-классификации меланомы кожи [10], гистологический тип, отмечалось наличие вторичных изменений в опухоли (изъязвлений и некрозов), выраженность перитуморозной лимфогистиоцитарной инфильтрации (ПТИ).

Имуногистохимическое (ИГХ) исследование выполнено с использованием моноклональных мышиных антител к Е-кадгерину и β -катенину фирмы «ДАКО» по следующей методике [11]: из парафиновых блоков готовились срезы толщиной 5 мкм, переносились на предметные стекла ultrafrost+; срезы в вертикальном положении высушивали 18 ч при комнатной температуре, далее помещали в термостат на 30 мин. при температуре 60°C. После этого проводилась депарафинизация в ксилоле (в батарее из 3-х ёмкостей по 3 мин. в каждой) и дегидратация в этиловом спирте (в батарее из 3-х ёмкостей в спиртах восходящей крепости по 3 мин. в каждой). Предметные стекла со срезами переносились в цитратный буфер pH 6.0 и помещались в водяную баню при температуре 98°C на 30 минут. Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы обрабатывались 3% перекисью водорода. Первичные антитела наносились в стандартном разведении. Срезы инкубировались в течение 30 мин. при комнатной температуре. В качестве визуализирующей системы использовали комплекс вторичных антител EnVision фирмы «ДАКО» с диаминбензидином. Затем срезы промывали проточной водой, докрашивали гематоксилином и заключали в канадский бальзам. Проводились положительные и отрицательные контрольные реакции.

Для количественной оценки результатов ИГХ-реакции микропрепараты были сфотографированы при помощи микроскопа AxioStar с цифровой камерой Canon (объектив $\times 40$, разрешение 1600 \times 1200 пикселей).

Общая (вне зависимости от паттерна окрашива-

ния) экспрессия маркёров оценивалась количественно при помощи компьютерной программы Argeo ImageScore в максимально возможном количестве полей зрения по стандартному алгоритму подсчёта позитивных пикселей “Positive Pixel Count v9”, исходя из показателя “позитивность”, или “positivity”, поэтому показатели обозначались как Cad_p и Cat_p для E-кадгерина, и β-катенина, соответственно. Стромальные прослойки и просветы сосудов, а также гистологические артефакты, исключались из анализа. Помимо того, были оценены полуколичественно по шкале от 0 до 3 интенсивность мембранного и цитоплазматического окрашивания E-кадгерина и β-катенина (Cad_{инт.мем.} и Cat_{инт.мем.}), а также Cad_{инт.цит.} и Cat_{инт.цит.}, соответственно).

Для статистической обработки полученных результатов использовался пакет прикладных программ STATISTICA 10.0 согласно руководству О. Ю. Ребровой по работе с данным программным обеспечением [12]: описательная статистика (Me (LQ; UQ) – медиана (верхний квартиль; нижний квартиль)), непараметрический корреляционный анализ Спирмена, сравнения 2-х независимых групп Манна-Уитни, а также множественных независимых групп Краскела-Уоллиса и медианный тест. Применялись ROC-анализ и оценка выживаемости (регрессионная модель Каплана-Мейера, тест сравнения выживаемости в двух и множественных группах). Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Экспрессия маркёров клеточной адгезии β-катенин и E-кадгерин в меланоме кожи прямо коррелировала между собой (табл. 1).

Таблица 1. – Характер взаимосвязи показателей экспрессии маркёров β-катенин и E-кадгерин в меланоме кожи

ИГХ-показатели	r_s	p
Cat _p & Cad _p	0,44	0,003
Cat _p & Cad _{инт.мем.}	0,44	0,003
Cat _p & Cad _{инт.цит.}	0,39	0,01
Cat _{инт.мем.} & Cad _p	0,49	<0,001
Cat _{инт.цит.} & Cad _p	0,28	0,07
Cat _{инт.мем.} & Cad _{инт.мем.}	0,47	0,001
Cat _{инт.мем.} & Cad _{инт.цит.}	0,53	<0,001
Cat _{инт.цит.} & Cad _{инт.мем.}	0,46	0,002

Характерно то, что при наличии корреляции всех параметров друг с другом не выявлено взаимосвязи между интенсивностью цитоплазматического окрашивания β-катенина и E-кадгерина ($p > 0,05$).

Позитивность маркера клеточной адгезии β-катенин, а также интенсивность его цитоплазматической и мембранной экспрессии не продемонстрировали корреляционных связей с макроскопическими параметрами меланомы, за исключением степени пигментации опухоли: позитивность β-катенина прямо коррелировала с данным показателем, интенсивность цитоплазматического окрашивания вела себя аналогично, а мембранного – показала тенденцию к наличию подобной взаимосвязи. В то же время позитивность такого маркера клеточной адгезии, как E-кадгерин, обратно коррелировала с высотой опухоли. При этом

аналогичную связь с высотой опухоли продемонстрировала интенсивность как мембранного, так и цитоплазматического окрашивания. Также перечисленные показатели, характеризующие экспрессию маркера E-кадгерин, имели прямую корреляцию со степенью пигментации меланомы, были связаны с объёмом опухоли, в частности, обратно коррелировали с показателем V_{tum}, а интенсивность цитоплазматической экспрессии с высокой статистической значимостью коррелировала также и с показателем V_{tum pr.} Указанные взаимосвязи отражены в табл. 2.

Таблица 2. – Характер корреляционных связей изучаемых компонентов клеточного адгезивного комплекса с макроскопическими параметрами меланомы

Показатели опухоли	r_s	p
Cat _p & Color	0,35	0,02
Cat _{инт.мем.} & Color	0,27	0,078
Cat _{инт.цит.} & Color	0,36	0,016
Cad _p & Color	0,34	0,02
Cad _{инт.мем.} & Color	0,3	0,04
Cad _{инт.цит.} & Color	0,39	0,007
Cad _p & H	-0,4	0,006
Cad _{инт.мем.} & H	-0,31	0,035
Cad _{инт.цит.} & H	-0,42	0,004
Cad _p & V _{tum}	-0,34	0,02
Cad _{инт.мем.} & V _{tum}	-0,29	0,047
Cad _{инт.цит.} & V _{tum}	-0,38	0,01
Cad _{инт.цит.} & V _{tum pr.}	-0,4	0,008

Несмотря на некоторые различия в отношении взаимосвязей с макроскопическими параметрами, в отношении гистологических параметров маркёры β-катенин и E-кадгерин проявляли себя весьма сходным образом: имела место взаимосвязь их экспрессии с толщиной опухоли по Breslow (табл. 3) при отсутствии статистически значимых связей с остальными параметрами ($p > 0,05$).

Таблица 3. – Характер корреляционных связей показателей экспрессии исследуемых компонентов клеточного адгезивного комплекса с толщиной по Breslow

Показатели опухоли	r_s	p
Cat _p & Breslow	-0,33	0,026
Cad _p & Breslow	-0,29	0,046
Cat _{инт.мем.} & Breslow	-0,39	0,008
Cad _{инт.мем.} & Breslow	-0,28	0,05
Cat _{инт.цит.} & Breslow	-0,16	0,29
Cad _{инт.цит.} & Breslow	-0,53	<0,001

Причём в случае с толщиной опухоли по Breslow основные различия определялись на уровне паттерна экспрессии: для β-катенина была характерна статистически значимая связь с толщиной по Breslow интенсивности мембранного окрашивания, для E-кадгерина – цитоплазматического.

Тест Манна-Уитни не выявил статистически значимых различий по средним значениям обоих иммуногистохимических показателей между опухолями округлой и вытянутой форм (во всех случаях $p > 0,05$).

Группы пигментных и беспигментных меланом различались между собой по интенсивности цитоплазматического окрашивания исследуемых маркеров клеточной адгезии и по позитивности Е-кадгерина: в первой группе данные показатели были статистически значимо более высокими. По некоторым остальным показателям экспрессии данных маркёров подобное различие также имело характер статистической тенденции (табл. 4).

Таблица 4. – Результаты сравнения пигментных и беспигментных меланом по показателям экспрессии маркёров β -катенин и Е-кадгерин

ИГХ-показатели	Me(LQ;HQ)		U	p
	беспигментные меланомы	пигментные меланомы		
Cat _p	0,24 (0,17; 0,3)	0,28 (0,22; 0,43)	152	0,08
Cat _{инт.цит.}	0 (0; 1)	1 (0; 2)	133	0,03
Cad _p	0,28 (0,2; 0,38)	0,35 (0,28; 0,54)	173	0,037
Cad _{инт.мем.}	2 (1; 3)	3 (2; 3)	186	0,056
Cad _{инт.цит.}	0 (0; 1)	1 (0,5; 2)	164	0,014

Тест Краскела-Уоллиса и медианный тест не показали взаимосвязи между выраженностью ПТИ, а также гистологическим типом меланомы и всеми полученными иммуногистохимическими параметрами ($p > 0,05$ во всех случаях). Однако тест Манна-Уитни показал статистически значимые различия между узловыми меланомами и объединенной группой поверхностно распространяющихся и злокачественных лентигинозных меланом (группа “ПРМ/ЗЛМ”) в значениях некоторых показателей экспрессии маркёров клеточной адгезии (табл. 5). В частности, в группе ПРМ/ЗЛМ позитивность β -катенина была незначительно выше, на уровне статистической тенденции, а интенсивность мембранного окрашивания β -катенина и цитоплазматического окрашивания Е-кадгерина – достаточно заметной и статистически значимой.

Таблица 5. – Результаты сравнения узловых меланом с группой поверхностно распространяющихся и злокачественных лентигинозных меланом (ПРМ/ЗЛМ) по показателям экспрессии маркёров β -катенин и Е-кадгерин

ИГХ-показатели	Me (LQ; HQ)		U	p
	узловые меланомы	ПРМ/ЗЛМ		
Cat _p	0,23 (0,15; 0,3)	0,27 (0,22; 0,4)	100,5	0,07
Cat _{инт. мем.}	2(1;3)	3 (2; 3)	96	0,045
Cad _{инт. цит.}	0(0;1)	1,5 (1; 2)	77	0,002

Меланомы с наличием вторичных изменений и без них не различались по экспрессии маркёров β -катенин и Е-кадгерин, а множественные сравнения меланом разных цитологических типов также показали отсутствие различий их по исследуемым иммуногистохимическим показателям (тест Краскела-

Уоллиса и медианный тест, $p > 0,05$ во всех случаях).

При сравнении двух групп (тест Манна-Уитни) не становлено различий между меланомами, содержащими и не содержащими невусные клетки, по иммуногистохимическим показателям ($p > 0,05$ во всех случаях). То же самое можно сказать и про меланомы, сгруппированные по содержанию/отсутствию эпителиоидно-клеточного компонента. Но меланомы с веретенноклеточным компонентом характеризовались статистически значимо более высокой интенсивностью цитоплазматического окрашивания β -катенина: 0 (0; 1) баллов для меланом с указанным компонентом и 1 (0; 1) – для опухолей без него ($U=148$, $p=0,045$).

Сравнение безрецидивной выживаемости пациентов, сгруппированных по интенсивности разных паттернов экспрессии иммуногистохимических маркеров Е-кадгерин и β -катенин, не показало статистически значимых различий во всех полученных группах (тест Краскела-Уоллиса и медианный тест, а также тест сравнения выживаемости в множественных группах: $p > 0,05$ во всех случаях). При сравнении ИГХ-параметров меланом у пациентов, сгруппированных по 5-летней безрецидивной выживаемости, методом Манна-Уитни не найдено статистически значимых различий между полученными группами.

При использовании корреляционного анализа не обнаружено взаимосвязей между безрецидивной выживаемостью пациентов и значениями исследуемых ИГХ-показателей. При перегруппировке, однако, найдена прямая корреляционная связь между безрецидивной выживаемостью пациентов с меланомой 3/4 стадий по Кларку и всеми показателями экспрессии β -катенина (при отсутствии подобных связей в остальных полученных группах): позитивностью ($r_s=0,46$, $p=0,035$), интенсивностью мембранного ($r_s=0,44$, $p=0,045$) и цитоплазматического ($r_s=0,49$, $p=0,029$) окрашивания. По-видимому, на начальных уровнях инвазии в меланомах сохраняется стабильно высокий уровень β -катенина, не влияющий на продолжительность жизни пациентов, а при достижении опухолью жировой клетчатки на 5-й стадии инвазивного роста микроокружение может «вмешиваться» в экспрессию данной молекулы, изменяя ее уровень как в сторону его понижения, так и в направлении его повышения.

ROC-анализ не выявил пороговых значений показателей исследуемых ИГХ-маркеров клеточной адгезии, при которых пациенты могли бы “переходить” в неблагоприятную для исхода группу (рецидив либо смерть от меланомы в течение пяти лет после постановки диагноза).

Выводы

1. Экспрессия маркеров клеточной адгезии β -катенин и Е-кадгерин тесно взаимосвязана, имеет чаще сонаправленный характер.

2. Беспигментные меланомы демонстрируют более низкие уровни экспрессии маркеров клеточной адгезии β -катенин и Е-кадгерин. Снижение экспрессии данных маркеров сопутствует также увеличению высоты опухоли, ее толщины по Breslow и объема.

3. Узловые меланомы характеризуются снижением интенсивности цитоплазматической экспрессии Е-кадгерина и мембранной экспрессии β -катенина.

4. В меланомах 3-й и 4-й стадий инвазивного роста по Кларку снижение уровня экспрессии β -катенина ассоциировано со снижением безрецидивной выживаемости пациентов, что позволяет рекомендовать его в качестве прогностически ценного маркера при меланоме кожи.

Литература

1. Morin, P. J. beta-catenin signaling and cancer / P.J. Morin // *Bioessays*. – 1999. – Vol. 21(12). – P. 30-1021.
2. Activated Wnt/beta-catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model / A. J. Chien [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2009. – Vol. 106(4). – P. 1193-8.
3. Bauer, R. A secreted form of P-cadherin is expressed in malignant melanoma / R. Bauer, R. Hein, A. K. Bosserhoff // *Exp. Cell. Res.* – 2005 – Vol. 305(2) – P. 418-26.
4. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma / N.K. Haass [et al.] // *Pigment Cell. Res.* – 2005 – Vol. 18(3) – P. 9-150.
5. McGary, E.C. Cellular adhesion pathways and metastatic potential of human melanoma / E. C. McGary, D. C. Lev, M. Bar-Eli // *Cancer Biol. Ther.* – 2002 Vol. 1(5) – P. 65-459.
6. Cadherin expression pattern in melanocytic tumors more likely depends on the melanocyte environment than on tumor cell progression / S. Krenkel [et al.] // *J. Cutan. Pathol.* – 2004 – Vol. 31(1) – P. 1-7.
7. Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development / G. Li [et al.] // *Oncogene* – 2001 – Vol. 20(56) – P. 35-8125.
8. Bypassing melanocyte senescence by beta-catenin: A novel way to promote melanoma / L. Larue [et al.] // *Pathol. Biol. (Paris)*. – 2009 [Epub. ahead of print]
9. Activated Wnt/beta-catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model / A.J. Chien [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2009. – Vol. 106(4). – P. 1193-8.
10. Classification of Tumours. Pathology and Genetics Skin Tumours [Electronic resource] / WHO ; eds.: P. E. LeBoit [et al.]. – Lyon : IARC press, 2006. – P. 51. – Mode of access: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb6/>. – Date of access: 25.01.2016.
11. Использование в иммуногистохимических исследованиях метода восстановления антигенной специфичности, воздействием на ткани, фиксированные формалином. Л. Е. Гуревич, В.А. Исаков // *Архив патологии*. – 999. – № 2. – С. 48–50.
12. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.

Literatura

1. Morin, P. J. beta-catenin signaling and cancer / P.J. Morin // *Bioessays*. – 1999. – Vol. 21(12). – P. 30-1021.
2. Activated Wnt/beta-catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model / A. J. Chien [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2009. – Vol. 106(4). – P. 1193-8.
3. Bauer, R. A secreted form of P-cadherin is expressed in malignant melanoma / R. Bauer, R. Hein, A. K. Bosserhoff // *Exp. Cell. Res.* – 2005 – Vol. 305(2) – P. 418-26.
4. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma / N. K. Haass [et al.] // *Pigment Cell. Res.* – 2005 – Vol. 18(3) – P. 9-150.
5. McGary, E.C. Cellular adhesion pathways and metastatic potential of human melanoma / E. C. McGary, D. C. Lev, M. Bar-Eli // *Cancer Biol. Ther.* – 2002 Vol. 1(5) – P. 65-459.
6. Cadherin expression pattern in melanocytic tumors more likely depends on the melanocyte environment than on tumor cell progression / S. Krenkel [et al.] // *J. Cutan. Pathol.* – 2004 – Vol. 31(1) – P. 1-7.
7. Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development / G. Li [et al.] // *Oncogene* – 2001 – Vol. 20(56) – P. 35-8125.
8. Bypassing melanocyte senescence by beta-catenin: A novel way to promote melanoma / L. Larue [et al.] // *Pathol. Biol. (Paris)*. – 2009 [Epub. ahead of print]
9. Activated Wnt/beta-catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model / A.J. Chien [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2009. – Vol. 106(4). – P. 1193-8.
10. Classification of Tumours. Pathology and Genetics Skin Tumours [Electronic resource] / WHO ; eds.: P. E. LeBoit [et al.]. – Lyon : IARC press, 2006. – P. 51. – Mode of access: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb6/>. – Date of access: 25.01.2016.
11. Ispol'zovanie v immunogistoximicheskix issledovaniyax metoda vosstanovleniya antigennoj specifichnosti, vozdeystviem na tkani, fiksirovanny'e formalinom. L.E. Gurevich, V.A. Isakov // *Arxiv patologii*. – 999. – № 2. – S. 48–50.
12. Rebrova, O.Yu. Statisticheskij analiz medicinskih danny'x. Primenenie paketa prikladny'x programm Statistica / O.Yu. Rebrova. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.

ANALYSIS OF THE CORRELATION BETWEEN EXPRESSION OF THE CELL ADHESION MOLECULES E-CADHERIN AND β -CATENIN AND MORPHOLOGICAL PARAMETERS AND PROGNOSIS OF SKIN MELANOMA

Aliaksinski V. S., Basinski V. A.

Educational Establishment "Grodno State Medical University", Grodno, Belarus

Background: E-cadherin and β -catenin are believed to be involved in the malignant transformation of melanocytes and progression of a melanocytic tumor. However, the mechanism of this effect and the role of these molecules in progression of a tumor are not clear.

Aim: To analyze the relationship between the expression of the cell adhesion markers E-cadherin and β -catenin and morphological parameters and prognosis of cutaneous melanoma.

Material and Methods: Sixty-five cutaneous melanomas with retrospectively assessed outcomes were subjected to macroscopic, histological and immunohistochemical studies.

Results: We revealed a strong cross-correlation of the above markers and decrease of their expression in nodular and amelanotic melanomas, as well as in melanomas with expressed prominence, high indices of Breslow thickness and volume. We found that in melanomas of stages III and IV of invasive growth by Clark reduction of β -catenin expression was associated with the decrease of disease-free survival in patients.

Conclusions: The obtained results allow us to recommend β -catenin as a valuable prognostic marker for cutaneous melanomas.

Keywords: skin melanoma, intercellular adhesion, β -catenin, E-cadherin, β -catenin, immunohistochemistry, prognosis.

Поступила: 15.05.2016

Отрецензирована: 20.06.2016