

ОСТАТОЧНОЕ СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКА В БИООБРАЗЦАХ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ (КРОЛИКОВ) ПОСЛЕ ПОДГОТОВКИ ПРОБ К АНАЛИЗУ МЕТОДОМ ВЭЖХ-УФ

В.М. Косман

к.фарм.н.,

ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации» (г.п. Кузьмолловский, Всеволожский р-н, Ленинградская обл.)

E-mail: kosmanvm@doclinika.ru

М.В. Карлина

к.б.н.,

ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации» (г.п. Кузьмолловский, Всеволожский р-н, Ленинградская обл.)

Актуальность. Основное ограничение чувствительности ВЭЖХ-УФ-методик, широко используемых для анализа лекарственных веществ в биологических образцах (плазме крови, тканях и органах), связано со значимым фоновым влиянием матриц биообразцов. Осаждение белков считают наиболее простым, универсальным и результативным способом подготовки биообразцов к ВЭЖХ-анализу. Однако сведения об эффективности применяемых способов осаждения белков и уровне их остаточного содержания в анализируемых биопробах в доступной литературе ограничены.

Цель работы. Оценка остаточного содержания белка в биообразцах плазмы крови лабораторных животных (кроликов) после подготовки проб к анализу методом ВЭЖХ-УФ.

Материал и методы. На примере плазмы крови кроликов после подготовки образцов к дальнейшему анализу, включающей осаждение кислыми растворами, ацетонитрилом и метанолом, оценено остаточное содержание белка спектрофотометрическими методами.

Результаты. Показано, что метод Бредфорд позволяет получить более низкие по абсолютному значению результаты по сравнению с методом прямой спектрофотометрии. При использовании различных осадителей и их соотношений и двух режимов центрифугирования остаточное содержание белка, определенное по методу Бредфорд, составило примерно 0,02–0,4 мг/мл, что свидетельствует о практически полном осаждении белков (более 99,5%) и подтверждает корректность использования осадительной пробоподготовки для дальнейшего анализа проб методом ВЭЖХ-УФ. Наиболее предпочтительным с точки зрения минимального остаточного содержания белка является применение в качестве осадителя ацетонитрила; наибольший уровень белка обнаружен в пробах после обработки 15%-ным раствором хлорной кислоты, то есть применение этого осадителя наименее желательно для дальнейшего ВЭЖХ-анализа.

Выводы. Осаждение является эффективным способом очистки биообразцов от белков, выявленные особенности применения различных осадителей могут быть использованы при создании биоаналитических методик, основанных на ВЭЖХ-анализе.

Ключевые слова: плазма крови, пробоподготовка, белок, остаточное содержание.

Для цитирования: Косман В.М., Карлина М.В. Остаточное содержание белка в биообразцах плазмы крови лабораторных животных (кроликов) после подготовки проб к анализу методом ВЭЖХ-УФ. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020;23(10):53–58. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-10-08>

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым (УФ) детектированием имеет широкое применение для анализа лекарственных веществ в биологических образцах (плазме крови, тканях и органах). Основное ограничение чувствительности ВЭЖХ-УФ методик связано со значимым фоновым влиянием матриц биообразцов [1].

Ключевым этапом при разработке методики анализа является выбор оптимальной процедуры обработки проб, позволяющей максимально удалить компоненты, мешающие определению, и выделить целевой анализ. Белки являются основной

группой соединений в составе биообразцов, от которых необходимо избавиться перед хроматографическим анализом. Осаждение белков считают наиболее простым, универсальным и достаточно эффективным способом подготовки биообразцов к ВЭЖХ-анализу [2–4]. Однако сведения об эффективности применяемых способов осаждения белков и уровне их остаточного содержания в анализируемых биопробах в доступной литературе ограничены.

В результате проведенного авторами ранее исследования [1] рассмотрено влияние природы осадителя, режима центрифугирования, включения

стадии твердофазной экстракции в процедуру подготовки проб трех типов плазмы крови (крысы, кролика, человека) на уровень фонового сигнала при анализе методом ВЭЖХ-УФ. Установлено, что наибольшее значение на уровень фонового сигнала оказывают выбор осадителя при пробоподготовке (ацетонитрил предпочтительнее, чем метанол) и выбор длины волны детектирования (следует по возможности избегать ближневолновой области).

Цель работы – оценка остаточного содержания белка в биообразцах плазмы крови лабораторных животных (кроликов) после подготовки проб к анализу методом ВЭЖХ-УФ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использована гепаринизированная плазма крови интактных животных (половозрелых самцов кроликов), хранившаяся в замороженном виде при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Образцы были получены в рамках различных экспериментальных исследований, проводимых в Санкт-Петербургском институте фармации (г.п. Кузьмоловский, Ленинградская обл.) согласно нормативным документам, регулирующим проведение доклинических исследований с использованием лабораторных животных, и одобренных на заседаниях биоэтической комиссии.

Особенности пробоподготовки представлены в табл. 1, общая схема была следующей: в пластиковую центрифужную пробирку вместимостью 2 мл (типа «Эппендорф») помещали 0,2 мл плазмы кро-

ви, прибавляли осадитель (ацетонитрил, метанол, 50%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ) или 15%-ный раствор хлорной кислоты), встряхивали в течение 30 с на шейкере Vortex-2 (ИКА, Германия). Затем пробы центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин (центрифуга лабораторная медицинская LMC-3000, ООО «BioSan», Латвия) или 15 мин при 10000 об/мин (микроцентрифуга Z 216 V-2, Hermle Labortechnik GmbH, Германия). Надосадочную жидкость отделяли, проводили определение содержания белков методом прямой спектрофотометрии [5] и методом Бредфорд [6]. При оценке методом прямой спектрофотометрии оптическую плотность (A) измерили при длинах волн 260 нм (A_{260}) и 280 нм (A_{280}), расчет содержания белка в пробе (X, мг/мл) выполняли методом Варбурга–Кристиана ($X=1,55\cdot A_{260}-0,76\cdot A_{280}$) [5] и методом Калькара ($X=1,45\cdot A_{260}-0,74\cdot A_{280}$) [7]; полученные значения усредняли и пересчитывали содержание белка в миллиграммах на миллилитр с учетом разбавления исходной пробы (в 1,1–5 раз). При оценке методом Бредфорд оптическую плотность испытуемых проб после реакции с реагентом Бредфорд («Sigma-Aldrich», США) измеряли при длине волны 595 нм; для расчетов использовали уравнение регрессии, полученное по результатам анализа серии калибровочных растворов бычьего сывороточного альбумина (БСА, «Sigma-Aldrich», США).

Для статистической обработки данных использовали программное обеспечение Microsoft Office Excel 2007.

Таблица 1. Условия подготовки проб плазмы крови

№ пробы	Осадитель	Соотношение плазма крови:осадитель (об:об)	Обороты при центрифугировании, об/мин
1	Ацетонитрил	1:2	3000
2		1:2	10000
3		1:3	3000
4		1:3	10000
5	Метанол	1:2	3000
6		1:2	10000
7		1:4	3000
8		1:4	10000
9	50%-ный раствор ТХУ	1:0,1	3000
10		1:0,1	10000
11	15%-ный раствор хлорной кислоты	1:0,2	3000
12		1:0,2	10000

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При выполнении экспериментальной части работы рассмотрены несколько вариантов осадителей, соотношений плазма крови:осадитель и два режима центрифугирования, выбранные на основании литературных данных [2, 8, 9] и собственного экспериментального опыта [4].

Для оценки содержания белков и эффективности их осаждения использовали метод прямой спектрофотометрии, как и в работе [2]. По данным [2] при применении ацетонитрила, трихлоруксусной кислоты и сульфата цинка при соотношениях плазма крови:осадитель в диапазоне 1:2–4 для плазмы крови собак, крыс и мышей эффективность осаждения составила более 90–95%, что согласуется с полученными данными, представленными в табл. 2 (спектрофотометрический метод).

При использовании более чувствительных методов оценки содержания белка, например метода Лоури, эффективность осаждения составила более 99% по данным [10], что также согласуется

с полученными результатами (табл. 2, метод Бредфорд).

Методы Бредфорд и Лоури в настоящее время являются основными для определения содержания белков в растворах [11]. Метод Лоури отличается меньшей устойчивостью результатов; определению мешают некоторые соли, тиоловые соединения, углеводы, липиды, и другие соединения [6], присутствие которых в плазме крови вполне вероятно. Метод Бредфорд также относят к более чувствительным и избирательным методам определения белка, чем метод прямой спектрофотометрии. Основной его недостаток связан с тем, что в реакцию с окрашенным реагентом наиболее активно вступают аргинин и лизин в составе белков [6], что может приводить к занижению результатов [11]. Однако, по мнению этих же авторов [11], он является доминирующим, поскольку менее «капризен», чем метод Лоури. Поэтому в качестве еще одного аналитического метода оценки содержания белка в данной работе выбран метод Бредфорд.

Таблица 2. Остаточное содержание белка в пробах (среднее \pm SD) и оценка эффективности осаждения*

№ пробы	Прямая спектрофотометрия		Метод Бредфорд	
	Содержание белка, мг/мл	Эффективность осаждения, %	Содержание белка, мг/мл	Эффективность осаждения, %
1	3,37 \pm 0,21	95,19	0,02 \pm 0,01	99,97
2	3,66 \pm 0,24	94,77	0,03 \pm 0,01	99,96
3	3,08 \pm 0,20	95,60	0,03 \pm 0,01	99,95
4	2,39 \pm 0,16	96,58	0,07 \pm 0,01	99,91
5	4,83 \pm 0,30	93,11	0,11 \pm 0,02	99,84
6	4,51 \pm 0,27	93,56	0,08 \pm 0,01	99,88
7	4,20 \pm 0,20	94,01	0,08 \pm 0,01	99,88
8	4,29 \pm 0,20	93,87	0,09 \pm 0,01	99,87
9	5,48 \pm 0,32	92,17	0,05 \pm 0,01	99,93
10	6,09 \pm 0,35	91,30	0,05 \pm 0,01	99,92
11	10,75 \pm 0,74	84,65	0,38 \pm 0,05	99,46
12	7,25 \pm 0,42	89,64	0,20 \pm 0,04	99,97

Примечание: * – эффективность осаждения (%) = [исходное содержание белка – остаточное содержание белка]*100/исходное содержание белка; исходное содержание белка принято как 70 г/л = 70 мг/мл [12].

Остаточное содержание белка в пробах после их обработки различными осадителями составило примерно 2–11 мг/мл по данным анализа методом прямой спектрофотометрии, около 0,02–0,38 мг/мл – по результатам анализа методом Бредфорд

(табл. 2). Абсолютные значения содержания белка в пробах, полученные методом прямой спектрофотометрии, существенно выше, чем результаты по методу Бредфорд. Это связано с тем, что метод Бредфорд более специфичен, в то время как при

прямой спектрофотометрии существенный вклад в общее поглощение проб в ультрафиолетовой области могут вносить различные сопутствующие соединения небелковой природы. С нашей точки зрения, правомочно данные прямой спектрофотометрии рассматривать как предварительную оценку очистки от эндогенных компонентов, поглощающих в УФ-свете и потенциально обуславливающих дальнейшее формирование фонового сигнала (базовой линии) при ВЭЖХ-УФ анализе. Если принять, что исходной уровень общего белка в плазме крови кроликов составляет около 50–70 г/л [12], то остаточное содержание белка, согласно данным, полученным методом Бредфорд, составило примерно 0,03–0,5% от исходного уровня, а эффективность осаждения – более 99,5% (табл. 2). Этот факт свидетельствовал о практически полном осаждении белка во всех рассмотренных вариантах пробоподготовки. В целом данные, полученные двумя методами, демонстрировали схожие закономерности.

Наименьшие уровни остаточного белка обнаружены в пробах после обработки ацетонитрилом – по данным прямой спектрофотометрии примерно 2,4–3,7 мг/мл; по методу Бредфорд – около 0,03–0,04 мг/мл.

К сравнительно полному осаждению белка приводила и обработка 50%-ным раствором ТХУ – результаты оценки содержания белка по методу Бредфорд для этого способа обработки проб (примерно 0,05–0,06 мг/мл) близки к данным, полученным при осаждении ацетонитрилом. Однако влияние небелковых соединений, поглощающих в УФ-свете, в случае ТХУ существенно выше – по данным прямой спектрофотометрии получены значения порядка 5,5–6,1 мг/мл.

Наибольшие уровни остаточного белка определены в пробах, обработанных раствором хлорной кислоты. Этот осадитель является сравнительно мягким реагентом и в некоторых случаях подходит для дальнейшего анализа соединений, способных соосаждаться с белками (например, пептидной природы) [4]. Еще одним преимуществом его применения, как и раствора ТХУ, является возможность минимизировать разбавление проб и исключить дальнейшую стадию замены растворителя.

Промежуточное положение занимала процедура обработки проб метанолом: по данным прямой спектрофотометрии получены значения примерно 4,2–4,8 мг/мл; по методу Бредфорд – около 0,1 мг/мл. То есть в этом случае в супернатанте

осталось несколько больше белка и несколько меньше УФ-поглощающих соединений, чем при использовании раствора ТХУ.

Для всех вариаций осадителей использование более жестких условий центрифугирования (увеличение числа оборотов) не приводило к более полному осаждению белков.

При сравнительном анализе результатов, полученных при разных соотношениях пробы и осадителя, как для ацетонитрила, так и для метанола можно отметить несколько более полное осаждение белков при применении большего избытка реагента, что согласуется с данными [2]. Вместе с тем снижение не очень велико, а расход растворителей и временные затраты на его последующее удаление могут быть существенны. Это следует принимать во внимание при разработке конкретных методик анализа. Единого мнения об оптимальном объемном соотношении биопроба:органический растворитель нет, но наиболее частые рекомендации для ацетонитрила 1:2–3, для метанола 1:2–4 [2, 8]. На основании полученных результатов для дальнейшего использования могут быть рекомендованы соотношения плазма:растворитель 1:3 для ацетонитрила и 1:4 для метанола.

Ранее авторы сообщали, что в большинстве (64%) случаев осадительная пробоподготовка оказалась оптимальной для подготовки биопроб плазмы крови перед дозированием в ВЭЖХ систему. Наиболее употребительным оказалось осаждение белков плазмы ацетонитрилом (64%); метанол (15,5%) и кислотные или иные осадители (20,5%) были оптимальны в примерно одинаковом числе случаев [4]. Полученные результаты по оценке остаточного содержания белка согласуются с этими данными. Они являются экспериментальным обоснованием предпочтительного использования ацетонитрила, по крайней мере, в случае выбора органических растворителей для осаждения белков, а также 50%-ного раствора ТХУ – в случае выбора в качестве осадителей кислых растворов. Метанол и ацетонитрил хорошо смешиваются с гидрофильной средой биопроб (плазма крови), легко удаляются (процедура пробоподготовки часто предусматривает замену растворителя, необходимую для компенсации разбавления пробы осадителем), оптимальны для последующего перерастворения проб и совместимы с элюентами, используемыми в ВЭЖХ, в то время как кислые осадители (растворы трихлоруксусной, трифторуксусной кислот) позволяют избежать значимого разбавления проб и стадии замены растворителя.

ВЫВОДЫ

1. Оценено остаточное содержание белка в биообразцах плазмы крови лабораторных животных (кроликов) после подготовки проб к анализу методом ВЭЖХ-УФ, включающей осаждение кислыми растворами, ацетонитрилом и метанолом. Показано, что метод Бредфорд позволяет получить более низкие результаты по сравнению с методом прямой спектрофотометрии. При использовании различных осадителей и их соотношений, а также двух режимов центрифугирования остаточное содержание белка, определенное по методу Бредфорд, составило примерно 0,02–0,5 мг/мл, что свидетельствует о практически полном осаждении белков (более 99,8%) и подтверждает корректность использования осадительной пробоподготовки для дальнейшего анализа проб методом ВЭЖХ-УФ.
2. Наиболее предпочтительным с точки зрения минимального остаточного содержания белка является применение в качестве осадителя ацетонитрила; наибольший уровень белка обнаружен в пробах после обработки 15%-ным раствором хлорной кислоты, то есть применение этого осадителя наименее желательно для дальнейшего ВЭЖХ-анализа.
3. Показано, что осаждение является эффективным способом очистки биообразцов от белков, а выявленные особенности применения различных осадителей могут быть использованы при создании биоаналитических методик, основанных на ВЭЖХ-анализе.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Косман В.М., Карлина М.В., Пожарицкая О.Н.* Влияние условий пробоподготовки и режима хроматографирования на уровень фонового сигнала при ВЭЖХ-УФ-анализе плазмы крови. *Ведомости НЦЭСМП.* 2020; 2: 121-128.
2. *Polson C., Sarkar P., Inledon B., Raduvaran V., Grant R.* Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography.* 2003; 785 (2): 263–75.
3. *Alshammari T.M., Al-Hassan A.A., Hadda T.B., Aljofan M.* Comprasion of different serum sample extraction metods and their suitability for mass spectrometry analysis. *Saudi pharmaceutical journal.* 2015; 63: 689–687.
4. *Косман В.М., Карлина М.В., Макарова М.Н.* Опыт разработки биоаналитических методик методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. *Фармация.* 2020; 69(3): 23–35.
5. *Досон Р., Элиот Д., Элиот У., Джонс К.* Справочник биохимика: Пер. с англ. М.: Мир, 1991: 544 с.
6. ОФС.1.2.3.00012.15 Определение белка. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.: МЗРФ, 2018; Т. 1–4: 7019 с.
7. *Krohn R.I.* The Colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein. *Current Protocols in Cell Biology.* 2002; 15: A.3H.1–28.
8. *Majors R.E.* Sample preparation fundamentals for chromatography. Agilent Inc: Canada. 2013: 364 p.
9. Phree™. Phospholipid removal solutions. General Protocol. Phenomenex, USA, 2013: 12 p.
10. *Blanchard J.* Evaluation of the relative efficacy of various techniques for deproteinizing plasma samples prior to high-performance liquid chromatographic analysis. *J. of Chromatogr.* 1981; 226: 455–60.
11. *Суховская И.В., Боровинская Е.В., Смирнов Л.П., Немова Н.Н.* Сравнительный анализ методов определения концентраций белка – спектрофотометрии в диапазоне 200-220 нм и по Бредфорд. *Труды Карельского научного центра РАН.* 2010; 2: 68–71.
12. *Varga M.* Textbook of rabbit medicine. Butterworth-Heinemann. 2013: 512 p.

Поступила 29 июня 2020 г.

RESIDUAL PROTEIN CONTENT IN THE BLOOD PLASMA BIOSAMPLES OF LABORATORY ANIMALS (RABBITS) AFTER THEIR PREPARATION FOR HPLC-UV ANALYSIS

© V.M. Kosman, M.V. Karlina, 2020

V.M. Kosman

Ph.D. (Pharm.),

St.-Petersburg Institute of Pharmacy (Leningrad region, Vsevolozhski municipal district, Kuzmolovo)

E-mail: kosmanvm@doclinika.ru

M.V. Karlina

Ph.D. (Biol.),

St.-Petersburg Institute of Pharmacy(Leningrad region, Vsevolozhski municipal district, Kuzmolovo)

Relevance. The main limitation of the sensitivity of HPLC-UV techniques widely used for the analysis of drugs in biological samples (blood plasma, tissues and organs) is due to the significant background influence of biologic matrices. Precipitation of proteins is the simplest, most versatile and reasonably efficient way to prepare biosamples for HPLC analysis. Information on the effectiveness of the protein deposition methods used and the level of their residual content in the analyzed biosamples is limited in the available literature.

The aim: to evaluate the residual protein content in the blood plasma biosamples of laboratory animals (rabbits) after samples preparation for HPLC-UV analysis.

Material and methods. The residual protein content in the rabbits blood plasma biosamples was evaluated by spectroscopic methods after samples treatment for HPLC-UV analysis, including precipitation with acidic solutions, acetonitrile and methanol.

Results. The Bradford method has been shown to produce lower level results compared to the direct spectrophotometry method. Using different precipitation agents, their ratios and two centrifugation modes, the residual protein content determined by the Bradford method was about 0.02–0.4 mg/ml, indicating almost complete precipitation of the proteins (more than 99.5%) and confirming the correctness of using the precipitation sample preparation for further HPLC-UV analysis of the samples. Most preferred in terms of minimum residual protein content is the use of acetonitrile as a precipitation agent. The highest level of protein was found in the samples after treatment with 15% chloric acid, i.e. the use of this precipitation agent is least desirable for further HPLC analysis.

Conclusions. Precipitation is effective way for sample protein removing; established features of various precipitation agent application may be used for development of bioanalytical methods, based on HPLC-analysis.

Key words: plasma, rat, sample treatment, protein, residue quantification.

For citation: Kosman V.M., Karlina M.V. Residual protein content in the blood plasma biosamples of laboratory animals (rabbits) after their preparation for HPLC-UV analysis. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2020;23(10):53–58. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-10-08>

REFERENCES

1. Kosman V.M., Karlina M.V. Pozharickaja O.N. Vlijanie uslovij probopodgotovki i rezhima hromatografirovanija na uroven' fonovogo signala pri VJeZhH-UF-analize plazmy krovi. Vedomosti NCJeSMP. 2020; 2: 121–128.
2. Polson C., Sarkar P., Incledon B., Raduvaran V., Grant R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography. 2003; 785 (2): 263–75.
3. Alshammari T.M., Al-Hassan A.A., Hadda T.B., Aljofan M. Comprasion of different serum sample extraction metods and their suitability for mass spectrometry analysis. Saudi pharmaceutical journal. 2015; 63: 689–687.
4. Kosman V.M. Karlina M.V., Makarova M.N. Opyt razrabotki bioanaliticheskikh metodik metodom VJeZhH s UF-detektirovaniem. Farmacija. 2020; 69(3): 23–35.
5. Doson R., Jeliot D., Jeliot U., Dzhons K. Spravochnik biohimika: Per. s angl. M.: Mir, 1991: 544 s.
6. OFS.1.2.3.00012.15 Opredelenie belka. Gosudarstvennaja Farmakopeja Rossijskoj Federacii. XIV izd. M.: MZRF, 2018; T. 1-4: 7019 s.
7. Krohn R.I. The Colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein. Current Protocols in Cell Biology. 2002; 15: A.3H.1–28.
8. Majors R.E. Sample preparation fundamentals for chromatography. Agilent Inc: Canada. 2013: 364 p.
9. Phree™. Phospholipid removal solutions. General Protocol. Phenomenex, USA, 2013: 12 p.
10. Blanchard J. Evaluation of the relative efficacy of various techniques for deproteiniing plasma samples prior to high-performance liquid chromatographic analysis. J. of Chromatogr. 1981; 226: 455–60.
11. Suhovskaja I.V., Borovinskaja E.V., Smirnov L.P., Nemova N.N. Sravnitel'nyj analiz metodov opredelenija koncentracij belka – spektrofotometrii v diapazone 200–220 nm i po Bradford. Trudy Karel'skogo nauchnogo centra RAN. 2010; 2: 68–71.
12. Varga M. Textbook of rabbit medicine. Butterworth-Heinemann. 2013: 512 p.



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
лекарственных и ароматических растений»

приглашает к сотрудничеству
фармпроизводителей и сельхозпредприятия
для совместного продвижения наших научных разработок.
Мы предлагаем лекарственные фитопрепараты к производству
и агротехнологии лекарственных и ароматических культур
для выращивания в различных регионах России

Тел. контакта: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45

Fax: 8(495)712-09-18

e-mail: vilarnii.ru

www.vilarnii.ru