

ДЕЙСТВИЕ ЛИПОСОМ, СОДЕРЖАЩИХ ЭФИРЫ АСТАКСАНТИНА, НА СЕКРЕЦИЮ ЦИТОКИНОВ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ

И.К. Малашенкова

к.м.н., Национальный исследовательский центр «Курчатовский Институт»;
ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России (Москва, Россия)
E-mail: malashenkova.irina@bk.ru

С.А. Крынский

к.м.н., Национальный исследовательский центр «Курчатовский Институт» (Москва, Россия)

Д.П. Огурцов

к.м.н., Национальный исследовательский центр «Курчатовский Институт» (Москва, Россия)

А.Ю. Ратушный

к.б.н., ФГБУН Государственный научный центр РФ Институт медико-биологических проблем РАН (Москва, Россия)

Н.Ю. Лотош

к.х.н., Национальный исследовательский центр «Курчатовский Институт» (Москва, Россия)

Е.П. Куликов

мл. науч. сотрудник, Национальный исследовательский центр «Курчатовский Институт» (Москва, Россия)

А.Р. Акулова

лаборант-исследователь, Национальный исследовательский центр «Курчатовский Институт» (Москва, Россия)

С.Н. Москвина

к.б.н., Национальный исследовательский центр «Курчатовский Институт» (Москва, Россия)

А.А. Селищева

д.х.н., Национальный исследовательский центр «Курчатовский Институт»;
биологический факультет, МГУ им. М. В. Ломоносова (Москва, Россия)

Н.А. Дидковский

д.м.н., ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России (Москва, Россия)

Актуальность. В литературе показано выраженное нейропротективное и противовоспалительное действие эфиров каротиноида астаксантина (АСТ) у экспериментальных животных с нейродегенерацией. В связи с малой растворимостью в воде перспективно применение эфиров АСТ в форме наноземulsionей. К основным механизмам нейропротекторного эффекта эфиров АСТ по данным литературы относится противовоспалительное действие, поэтому актуально исследование противовоспалительного и иммуномодулирующего эффекта наноземulsionей эфиров АСТ.

Цель работы – изучение влияния наноземulsionей эфиров АСТ на основе фосфолипидов на секрецию основных цитокинов и медиаторов воспаления (GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), IL-1 β , IL-6, IFN γ) мононуклеарными клетками крови человека (МНК).

Материал и методы. Липидные наноземulsionей готовили из препарата Lipoid S75 методом «горячей эмульсификации». Для включения в наноземulsionей использовали эфиры АСТ из *Haematococcus pluvialis*. Мононуклеары крови 6 здоровых добровольцев (мужчины, возраст 21–31 год) выделяли из периферической крови человека в одноступенчатом градиенте плотности фиколлурографина. Культивацию проводили в следующих условиях: 1) Без добавления наноземulsionей и митогена фитогемагглютинина А (ФГА); 2) С ФГА, без наноземulsionей; 3) С ФГА и наноземulsionей эфиров АСТ; 4) С ФГА и наноземulsionей, не содержащими эфиры АСТ; 5) С наноземulsionей эфиров АСТ; 6) С наноземulsionей, не содержащими эфиры АСТ. Для определения цитокинов в супернатантах использовали мультиплексный анализ.

Результаты. Наноземulsionей с эфирами АСТ подавляли стимулированную ФГА секрецию МНК цитокинов врожденного и адаптивного иммунитета (GM-CSF, IL-1 β , IL-6, IFN γ). Добавление к МНК наноземulsionей без АСТ частично подавляло активацию клеток, угнетая секрецию цитокина адаптивного иммунитета IFN γ , но не влияло на уровень изученных провоспалительных цитокинов.

Выводы. Результаты указывают на противовоспалительный и иммуномодулирующий эффект эфиров АСТ в виде наноземulsionей, что показывает перспективность дальнейшего изучения их свойств, обуславливающих нейропротекцию на моделях нейродегенеративных заболеваний.

Ключевые слова: липосомы, мононуклеарные клетки, наноземulsionей цитокины, эфиры астаксантина.

Для цитирования: Малашенкова И.К., Крынский С.А., Огурцов Д.П., Ратушный А.Ю., Лотош Н.Ю., Куликов Е.П., Акулова А.Р., Москвина С.Н., Селищева А.А., Дидковский Н.А. Действие липосом, содержащих эфиры астаксантина, на секрецию цитокинов мононуклеарными клетками крови. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2022;25(9):47–52. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-09-07>

Астаксантин (АСТ) относится к группе каротиноидов – природных органических пигментов, и обладает антиоксидантными свойствами. В ряде исследований с участием добровольцев обнаружено, что АСТ блокирует окисление липопротеинов низкой плотности, увеличивает содержание липидов высокой плотности и адипонектина, а также снижает уровень воспаления, угнетая экспрессию рецепторов-мусорщиков и провоспалительных цитокинов макрофагами [1]. В отдельных работах показано иммуномодулирующее действие АСТ: в культуре лимфоцитов он стимулирует продукцию цитокинов IL-2 и интерферона- γ (IFN γ), необходимых для противовирусного и противоопухолевого иммунного ответа [2]. Показана эффективность АСТ и его противовоспалительный эффект в моделях болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваний [3, 4]. Большую роль в развитии нейродегенерации играют хроническое системное воспаление, процессы избыточной активации микроглии и окислительный стресс, стимулирующие и поддерживающие гибель нейронов [5]. Астаксантин, с учетом его эффектов и способности проходить через гематоэнцефалический барьер, вызывает большой интерес как потенциальное средство для профилактики и терапии ранних этапов нейродегенерации [2]. Астаксантин используют в виде биологически активных добавок, основным источником его являются водоросли *Haematococcus pluvialis*, где он представлен в форме сложных эфиров с жирными кислотами [6]. Данных литературы о противовоспалительных и нейропротективных свойствах эфиров АСТ мало, и они были получены на экспериментальных животных, в то время как в клинических исследованиях и на клетках человека их эффект не изучен. В единичных работах показано большее нейропротективное и противовоспалительное действие эфиров АСТ по сравнению с АСТ в ЦНС у экспериментальных животных с нейродегенерацией (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона) [4, 7]. Однако влияние эфиров АСТ на системное воспаление и системные иммунные процессы, а также на активацию клеток иммунной системы остаётся неизученным.

Исследования с использованием АСТ и его эфиров сложны ввиду малой растворимости вещества в водной фазе, из-за чего АСТ применяют в масле или в составе эмульсий масло/вода. Использо-

вляя различные технологии, можно получить систему наноэмульсий с АСТ и/или его эфирами с частицами размером 100–150 нм [8]. Благодаря малому размеру, такие наноэмульсии обладают значительно большей биодоступностью, чем масляные растворы. Авторами ранее сообщалось о получении наноэмульсий АСТ и его эфиров на основе фосфолипидов [8]. Были определены их характеристики при разных условиях получения, выявлено нейропротекторное действие на модели болезни Альцгеймера (мыши 5xFAD), выражающееся в уменьшении скорости развития поведенческих расстройств у мышей [8, 9]. Учитывая, что к основным механизмам нейропротекторного эффекта эфиров АСТ по данным литературы относится противовоспалительное действие, актуально исследование противовоспалительного и иммуномодулирующего эффекта полученных авторами наноэмульсий эфиров АСТ.

Ц е л ь р а б о т ы – изучение влияния наноэмульсий эфиров АСТ на основе фосфолипидов на секрецию важных цитокинов и медиаторов воспаления (GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), IL-1 β , IL-6, IFN γ) мононуклеарными клетками крови человека (МНК).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Липидные наноэмульсии готовили из препарата Lipoid S75 (в составе 75,3% фосфатидилхолина и 8% фосфатидилэтаноламина) (Lipoid GMBH, Германия). Наноэмульсии готовили методом «горячей эмульсификации». Навеску фосфатидилхолина и каротиноида растворяли в дихлорметане, растворитель отгоняли на ротаторном вакуумном испарителе (Eppendorf Concentrator 5301, Германия). Полученную липидную плёнку диспергировали в воде mQ при 75 °С, подвергали обработке на УЗ-бане (15 мин, 65 °С) (Bandelin Sonorex, Германия), гомогенизации (1 мин, 10 000 об/мин, 65°С) (Homogenizer Daiham Scientific, Республика Корея) и УЗ-дезинтеграции (условия: амплитуда 30%, импульс 1/1, энергия 0,05 Дж, обработка 1,5 мин, перерыв 1 мин, повтор цикла) (Sonic, США). Готовили наноэмульсии следующего состава: S75 2 мг/мл (контрольные наноэмульсии, не содержат каротиноидов); S75: эфиры (2:0,5 мг/мл). До использования наноэмульсии хранили при 4 °С в темноте.

Для включения в наноэмульсии использовали эфиры АСТ из *Haematococcus pluvialis* (Sigma Aldrich, США). Ранее методом ВЭЖХ-МС был определен жирнокислотный состав эфиров АСТ, состоящих из смеси моно- и диэфиров (70 и 20% соответственно) и 10%-ного свободного АСТ. Выяснили, что моноэфиры содержат следующие остатки жирных кислот (в порядке увеличения их содержания): 18:3≥18:2>18:1, то есть в составе преобладают остатки линоленовой, самой ненасыщенной жирной кислоты.

Мононуклеары крови шести здоровых добровольцев (мужчины, возраст – 21–31 год) выделяли из периферической крови человека в одноступенчатом градиенте плотности фиколл-урографина. Использовали МНК периферической крови в концентрации $1 \cdot 10^6$ клеток/мл. Клетки культивировали в течение 24 ч в CO₂-инкубаторе ($t = 37\text{ }^\circ\text{C}$, 5%-ный CO₂) в питательной среде RPMI 1640 с 25 мМ HEPES, бикарбонатом Na и 2,0 мМ глутамина, содержащей антибиотик – гентамицин (100 мкг/мл) и 10%-ную эмбриональную телячью сыворотку. Культивацию проводили в следующих условиях:

- 1) без добавления наноэмульсий и митогена фибриногена А (ФГА) (контрольная группа);
- 2) с ФГА (5,0 мкг/мл), но без наноэмульсий;
- 3) с ФГА (5,0 мкг/мл) и наноэмульсиями, содержащими эфиры АСТ (S75 2 мг/мл + эфиры 0,5 мг/мл);
- 4) с ФГА (5,0 мкг/мл) и наноэмульсиями, не содержащими эфиры АСТ (S75 2 мг/мл);
- 5) с наноэмульсиями, содержащими эфиры АСТ (S75 2 мг/мл + эфиры 0,5 мг/мл);
- 6) с наноэмульсиями, не содержащими эфиры АСТ (S75 2 мг/мл).

После культивирования МНК осаждали центрифугированием (15 мин, 1000 об/мин). Отбирали супернатанты и замораживали их при $-70\text{ }^\circ\text{C}$. Для определения цитокинов в супернатантах использовали набор для мультиплексного анализа (Merck, США).

Добровольцы дали информированное согласие на участие в исследовании, одобренном локальным этическим комитетом НИЦ «Курчатовский Институт» (№НГ-1/01.13пр от 11.03.2021 г.).

Для статистической обработки использовали программное обеспечение Excel (Microsoft, 2010) и STATISTICA 10 (StatSoft, 2010). Результаты представляли в виде медиан с 25-м и 75-м перцентилем. Для оценки различий между группами использовали критерий Краскелла–Уоллиса с последую-

щими попарными сравнениями по критерию Манна–Уитни, различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучена спонтанная и стимулированная секреция ряда цитокинов (GM-CSF, IL-1β, IL-6, IFNγ) через 24 ч инкубации МНК, с добавлением и без добавления изучаемых наноэмульсий.

Инкубация МНК с наноэмульсиями без АСТ, а также с наноэмульсиями, содержащими эфиры АСТ, в отсутствие стимуляции ФГА не влияла на секрецию исследованных цитокинов.

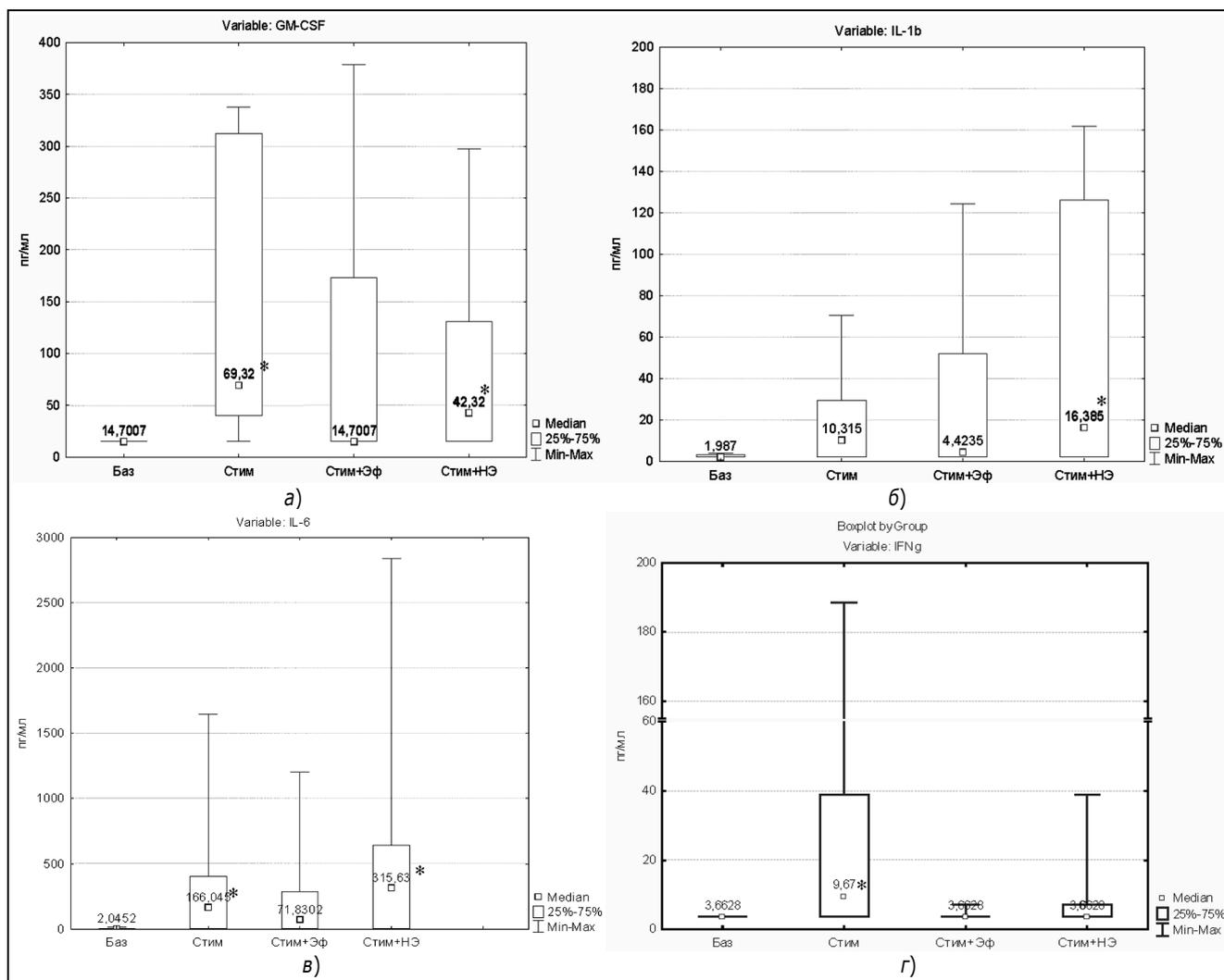
При инкубации МНК без наноэмульсий ФГА повышал уровень цитокинов GM-CSF, IL-6, IFNγ, наблюдалась тенденция к повышению IL-1β.

При добавлении к МНК, стимулированным ФГА, наноэмульсий с эфирами АСТ не наблюдалось повышения уровня исследованных цитокинов. При добавлении наноэмульсий без АСТ в пробах МНК сохранялось стимулирующее действие ФГА на секрецию GM-CSF, IL-1β, IL-6 (рисунок).

Исследование было нацелено на изучение противовоспалительного и иммуномодулирующего эффекта эфиров АСТ в виде наноэмульсий. Показано, что наноэмульсии, содержащие эфиры АСТ, и наноэмульсии без АСТ не оказывают влияния на спонтанную секрецию цитокинов МНК после 24 ч инкубации. Обнаружено, что наноэмульсии с эфирами АСТ подавляют стимулированную секрецию исследованных цитокинов: GM-CSF, IL-1β, IL-6, IFNγ. Данные свидетельствуют о наличии противовоспалительного и иммуномодулирующего эффекта эфиров АСТ на МНК, включая как лимфоциты, так и моноциты.

Добавление к МНК наноэмульсий без АСТ частично подавляло активацию клеток, угнетая секрецию цитокина адаптивного иммунитета IFNγ, но не влияло на уровень изученных провоспалительных цитокинов, что указывает на сохранность стимулированной секреции моноцитами. В частности, продукция IL-1β, одного из основных провоспалительных цитокинов моноцитов, под влиянием ФГА достоверно повышалась по сравнению с контролем.

По данным литературы, влияние наноэмульсий S75 на секрецию цитокинов МНК изучено недостаточно, однако в одной работе показано ингибирующее влияние фосфатидилхолина на активацию лимфоцитов крови [10]. Эти результаты согласуются с полученными нами данными.



Секреция цитокинов GM-CSF (а), IL-1 β (б), IL-6 (в), IFN γ (г) МНК в условиях инкубации через 24 ч. Слева направо: спонтанная секреция, секреция при добавлении ФГА, секреция при добавлении ФГА и наноземulsion S75 с эфирами АСТ, секреция при добавлении ФГА и наноземulsion S75; * – достоверные ($p < 0,05$) различия с базовым уровнем секреции

Имеется много работ, в которых изучались иммуномодулирующие эффекты АСТ, но свойства эфиров АСТ исследованы очень мало, как правило, на препаратах, где они представлены в виде смесей с АСТ. В то же время показано, что эфиры обладают более выраженным антиоксидантным действием, чем свободный АСТ, и снижение уровня оксидативных процессов может способствовать уменьшению продукции провоспалительных цитокинов [4]. По данным той же работы, эфиры также проявляли более сильное подавляющее действие, чем АСТ, на активацию в тканях мозга мышей, предрасположенных к болезни Альцгеймера, инфламмосомы NLRP3, играющей ключевую роль в стимуляции синтеза провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18.

Представляется важным сравнительное изучение антиоксидантного, противовоспалительного и иммуномодулирующего действий наноземulsion S75 и его эфиров. Учитывая более выраженный нейропротективный эффект эфиров АСТ по сравнению с АСТ, продемонстрированный *in vivo* [4, 7], можно заключить, что такие исследования могут быть важны для создания новых форм АСТ с целью его использования в профилактике и лечении на ранних этапах нейродегенерации.

Выводы

Впервые изучено иммуномодулирующее действие наноземulsion S75 эфиров АСТ на секрецию ряда цитокинов врожденного и адаптивного иммунитета (GM-CSF, IL-1 β , IL-6, IFN γ) МНК здоро-

вых добровольцев. Результаты указывают на наличие противовоспалительного и иммуномодулирующего эффектов эфиров АСТ в виде наноэмульсий, что показывает перспективность дальнейшего изучения их свойств, обуславливающих нейропротекцию на моделях нейродегенеративных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. *Kishimoto Y., Yoshida H., Kondo K.* Potential Anti-Atherosclerotic Properties of Astaxanthin. *Mar Drugs*. 2016; 14(2): 35.
2. Малашенкова И.К., Селищева А.А., Куликов Е.А. и др. Эффекты природного органического пигмента астаксантина и перспективы его применения при болезни Альцгеймера. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2021; 84(1): 14–24. (Malashenkova I.K., Selishcheva A.A., Kulikov E.A. i dr. Effekty prirodnogo organicheskogo pigmenta astak-santina i perspektivy ego primeneniya pri bolezni Al'cgejmera. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2021; 84(1): 14–24. [In Russian]).
3. *Rahman S.O., Panda B.P., Parvez S., et al.* Neuroprotective role of astaxanthin in hippocampal insulin resistance induced by A β peptides in animal model of Alzheimer's disease. *Biomed Pharmacother*. 2019; 110: 47–58.
4. *Che H., Li Q., Zhang T., et al.* Effects of Astaxanthin and Docosahexaenoic-Acid-Acylated Astaxanthin on Alzheimer's Disease in APP/PS1 Double-Transgenic Mice. *J. Agric. Food Chem*. 2018; 66(19): 4948–4957.
5. *Paouri E., Georgopoulos S.* Systemic and CNS Inflammation Crosstalk: Implications for Alzheimer's Disease. *Curr. Alzheimer. Res*. 2019; 16(6): 559–574.
6. *Zhou P., Li M., Shen B., et al.* Directed Coevolution of β -Carotene Ketolase and Hydroxylase and Its Application in Temperature-Regulated Biosynthesis of Astaxanthin. *J. Agric. Food Chem*. 2019; 67: 1072–1080.
7. *Wang C.C., Shi H.H., Xu J., et al.* Docosahexaenoic acid-acylated astaxanthin ester exhibits superior performance over non-esterified astaxanthin in preventing behavioral deficits coupled with apoptosis in MPTP-induced mice with Parkinson's disease. *Food Funct*. 2020; 11: 8038–8050.
8. *Kulikova I.S., Lotosh N.Yu., Turanova V.A., et al.* Stabilized nanoemulsions of astaxanthin esters of known fatty-acid composition. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020; 54(8): 811–815.
9. *Lotosh N.Yu., Kryuchkova A.V., Kulikov E.A., et al.* Effect of Nanoemulsions Containing Astaxanthin or Its Esters on the Spatial Behavior of 5XFAD Mice. *Nanobiotechnology Reports*. 2022; 17: 227–234.
10. *Chen S.S., Keenan R.M.* Effect of phosphatidylcholine liposomes on the mitogen-stimulated lymphocyte activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1977; 79(3): 852–858.

Поступила 3 июня 2022 г.

THE EFFECTS OF LIPOSOMES CONTAINING ASTAXANTHIN ETHERS ON CYTOKINE SECRETION BY HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS

© Authors, 2022

I.K. Malashenkova

Ph.D. (Med.), Kurchatov Institute; Federal State Budgetary Institution Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine Federal Medical Biological Agency (Moscow, Russia)
E-mail: malashenkova.irina@bk.ru

S.A. Krynskiy

Ph.D. (Med.), Kurchatov Institute (Moscow, Russia)

D.P. Ogurtsov

Ph.D. (Med.), Kurchatov Institute (Moscow, Russia)

A.Yu. Ratushnyy

Ph.D. (Biol.), Federal State Budget Institution of Science State Research Center of the Russian Federation Institute of Medical and Biological Problems Russian Academy of Sciences (Moscow, Russia)

N.Yu. Lotosh

Ph.D. (Chem.), Kurchatov Institute (Moscow, Russia)

E.A. Kulikov

Junior Research Scientist, Kurchatov Institute (Moscow, Russia)

A.R. Akulova

Research Technician, Kurchatov Institute (Moscow, Russia)

S.N. Moskvina

Ph.D. (Biol.), Kurchatov Institute (Moscow, Russia)

A.A. Selishcheva

Dr.Sc. (Chem.), Kurchatov Institute; Department of Biology, Lomonosov Moscow State University (Moscow, Russia)

N.A. Didkovsky

Dr.Sc. (Med.), Federal State Budget Institution of Science State Research Center of The Russian Federation Institute of Medical and Biological Problems Russian Academy of Sciences (Moscow, Russia)

Relevance. According to the literature, astaxanthin (AST) esters have a pronounced neuroprotective and anti-inflammatory effect in experimental animals with neurodegeneration. Due to the low water solubility, the use of AST esters in the form of phospholipid nanoemulsions is promising. The principal mechanisms of the neuroprotective effect of AST esters include anti-inflammatory action, so it is relevant to study the anti-inflammatory and immunomodulatory effect of nanoemulsions containing AST esters.

The aim of this work was to study the effect of phospholipid-based nanoemulsions of AST esters on the secretion of major cytokines and inflammatory mediators (GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), IL-1 β , IL-6, IFN γ) by human peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

Material and Methods. Lipid nanoemulsions were prepared from Lipoid S75 by hot emulsification method. AST esters from *Haematococcus pluvialis* were used for incorporation into nanoemulsions. PBMCs from 6 healthy volunteers (men, age 21–31 years) were isolated from blood in a one-step ficoll urographin density gradient. Cultivation was performed under the following conditions:

- 1) without addition of nanoemulsions and phytohemagglutinin A (PHA);
- 2) with PHA, without nanoemulsions;
- 3) with PHA and nanoemulsions of AST esters;
- 4) with PHA and nanoemulsions containing no AST esters;
- 5) with nanoemulsions of AST esters;
- 6) with nanoemulsions containing no AST esters.

Multiplex analysis was used to determine cytokines in the cell supernatants.

Results. Nanoemulsions with AST esters suppressed the PHA-stimulated secretion of innate and adaptive immunity cytokines (GM-CSF, IL-1 β , IL-6, IFN γ) by PBMCs. Addition of nanoemulsions without AST to the PBMCs partially suppressed cell activation by inhibiting the secretion of adaptive immunity cytokine IFN γ , but did not affect the levels of proinflammatory cytokines.

Conclusion. The results indicate an anti-inflammatory and immunomodulatory effect of AST esters in the form of nanoemulsions, which shows the prospects for further studies of their effects mediating neuroprotection in models of neurodegenerative diseases.

Key words: *Astaxanthin esters, cytokines, liposomes, mononuclear cells, nanoemulsions.*

For citation: Malashenkova I.K., Krynskiy S.A., Ogurtsov D.P., Ratushnyy A.Yu., Lotosh N.Yu., Kulikov E.A., Akulova A.R., Moskvina S.N., Selishcheva A.A., Didkovsky N.A. The effects of liposomes containing astaxanthin esters on cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry.* 2022;25(9):47–52. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-09-07>



Лекарственные препараты, разработанные ВИЛАР

Элеутерококк (сухой экстракт, таблетки, покрытые оболочкой) (рег. № № 92/210/3; 92/210/7) – общетонизирующее средство, получаемое из корневищ и корней элеутерококка колючего (*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.).

Сабельник болотный (*Comarum palustre*) (экстракт сухой, таблетки, гель) – оказывает противовоспалительное, анальгезирующее действие. Применяется в комплексной терапии воспалительных и дегенеративных заболеваний опорно-двигательного аппарата.

Флакозид (таблетки) (рег. №№ 90/248/3; 90/248/7) – противовирусное и антигепатотоксическое средство, получаемое из листьев бархата амурского и бархата Лавалля (*Phellodendron amurense* и *Phellodendron amurense* var. *Lavallei* Sprague). Применяется для лечения вирусных гепатитов.

Эвкалимин (раствор, суппозитории для детей и взрослых) (рег. №№ 90/249/2; 91/194/13; 91/194/12) – антибактериальное и противовоспалительное средство, получаемое из эвкалипта прутовидного (*Eucalyptus viminalis* Labill.).

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

Факс: 8(495)712-09-18;

e-mail: vilarnii.ru; www.vilarnii.ru