

МЕРЗЛИКИНА  
Наталья Викторовна

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ  
ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК И МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ  
КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕННОЙ СИЛЫ ТЯЖЕСТИ

14.00.32 — авиационная, космическая и морская медицина  
03.00.25 - гистология, цитология, клеточная биология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва - 2005

Работа выполнена в Государственном научном центре РФ -  
Институте медико-биологических проблем РАН

Научные руководители:

доктор медицинских наук Буравкова Людмила Борисовна

доктор биологических наук Таирбеков Мурад Гарунович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Миташов Виктор Иванович

доктор биологических наук Шенкман Борис Стивович

Ведущая организация:

факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М.В.  
Ломоносова

Защита диссертации состоится «    » \_\_\_\_\_ 2005 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании  
диссертационного совета K002.111.01 в Государственном научном центре РФ - Институте  
медико-биологических проблем РАН по адресу: 123007, г. Москва, Хорошевское шоссе, д. 76а.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНЦ РФ - Института медико-биологических  
проблем РАН.

Автореферат « разослан » \_\_\_\_\_ 2005 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук



И.П. Пономарева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Освоение человеком космического пространства поставило вопросы о влиянии микрогравитации на живые системы различного уровня организации с целью использования полученных знаний как для установления механизмов действия гравитационного фактора и создания средств профилактики неблагоприятного воздействия факторов космического полета, так и для анализа возможностей использования микрогравитации в биотехнологических разработках.

Исследования, проведенные с использованием различных клеточных моделей в условиях реальной и моделируемой микрогравитации, выявили разнообразные морфофункциональные изменения культивируемых клеток [Cogoli, Tschopp, 1984; **Gmünder**, Cogoli, 1988; 1991; Cogoli et al., 1989; Genty, 1993; Hammond et al, 2000; Buravkova, Romanov, 2000; Lewis, 1999, 2002; Papaseit et al., 2000]. При этом различия в выявленных эффектах могут быть объяснены как разной гравичувствительностью клеток, так и методами моделирования и исследуемыми параметрами. Концепция о гравитационной индифферентности клеток, выдвинутая в 1970<sup>ых</sup> – 1980<sup>ых</sup> годах прошлого столетия [Парфенов, 1981; Таирбеков, Парфенов, 1981], в настоящее время существенно скорректирована [Cogoli, 1996; Schmitt et al., 1996; Lewis et al., 1998; Hughes-Fulford, 2001; Романов, Буравкова, 2000; Таирбеков, 2002].

Несмотря на широкий спектр используемых в гравитационной биологии клеточных культур, чувствительность эндотелиальных клеток (ЭК) к гравитационному стимулу не изучалась, хотя результаты фундаментальных исследований говорят о непосредственном участии клеточных элементов сосудистой стенки в формировании ответа организма на микрогравитацию [Convertino et al., 1997]. К тому же известно, что именно эндотелий, обладая механочувствительностью, регулирует сосудистый тонус через взаимодействие с гладкомышечными клетками [Ткачук и др., 1998, 2001; Vanhoutte, Mombouli, 1996] и, следовательно, может играть важную роль в функционировании сердечно-сосудистой системы в условиях измененной гравитации. Немаловажным фактором, привлекающим внимание к исследованию свойств эндотелия, является его биологическая активность, а также участие в воспалительных и иммунных реакциях организма, регуляции кроветворения и процессов свертывания крови.

Снижение пролиферативной активности клеток, ингибирование митогенных сигналов в условиях микрогравитации [Hughes-Fulford, Lewis, 1996; Rucci et al., 2002], а также атрофические перестройки опорно-двигательного аппарата [Oganov et al., 1991; Шенкман, 2002], изменение способности к восстановлению и самообновлению тканей в условиях космического полета [Mitashov et al., 1996] позволяют предположить, что микрогравитация

может приводить к морфофункциональным модификациям клеток-предшественников, перестройке их функциональной активности и способности дифференцироваться в тканевые элементы.

Основным источником стволовых клеток во взрослом организме является костный мозг, способный генерировать как гемопоэтические, так и мезенхимальные клетки, которые могут дифференцироваться в большинство известных клеточных типов, таких как остеобласты, хондроциты, адипоциты, а также другие типы клеток [Friedenstem, 1987; Pittenger et al., 1999; Kassem et al., 2004]. Недавно несколькими исследовательскими группами описано получение эндотелиальных клеток (ЭК) и их предшественников из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (МСК) [Reyes et al., 2002; Pittenger, Martin, 2004; Oswald et al., 2004]. Важную роль во взаимодействии стволовых и дифференцированных клеток в органах и тканях играют коммитированные клетки-предшественники. Однако вопрос о механочувствительности МСК и, в частности, их гравитационной чувствительности, остается открытым, хотя ряд экспериментальных работ свидетельствует о реакции этих клеток в культуре на широкий спектр факторов микроокружения.

Таким образом, исследование свойств низкодифференцированных мезенхимальных стволовых клеток - важного элемента регуляции системы функционирования тканевых систем - в условиях измененной силы тяжести является актуальной проблемой наряду с изучением другого ее значимого компонента, тесно связанного с МСК — дифференцированного эндотелия сосудов.

Цель и задачи исследования. Целью работы являлось изучение морфофункциональных особенностей эндотелиальных клеток и мезенхимальных стволовых клеток человека в модельных условиях измененной силы тяжести *in vitro*.

В соответствии с поставленной целью решались следующие основные задачи:

1. Исследование пролиферативной активности эндотелиальных клеток человека при длительном клиностатировании.
2. Изучение особенностей организации актинового цитоскелета ЭК человека в условиях измененного вектора гравитации.
3. Определение продукции цитокинов и экспрессии молекул адгезии эндотелиальными клетками при клиностатировании.
4. Отработка методов культивирования мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека, изучение пролиферативной активности и экспрессии маркеров МСК при длительном клиностатировании.

5. Исследование особенностей организации актинового цитоскелета мезенхимальных стволовых клеток человека в условиях измененного направления вектора гравитации.

6. Определение продукции цитокинов МСК при длительном изменении вектора гравитации *in vitro*.

**Научная новизна.** Получены первые доказательства высокой чувствительности культивируемых ЭК пупочной вены человека и МСК костного мозга человека к изменению гравитационного окружения. Впервые выявлено угнетение пролиферативной активности культивируемого эндотелия при длительном воздействии измененного направления вектора гравитации. Впервые установлено, что реорганизация архитектуры актиновых филаментов эндотелия начинается уже в первые часы клиностатирования, при этом ремоделирование в ответ на изменение гравитационного окружения носит обратимый характер и протекает быстрее, чем его восстановление. Выявленное увеличение концентрации «стрессового» провоспалительного цитокина ИЛ-6 (интерлейкина-6) в культуральной среде эндотелиальных клеток после кратковременного клиностатирования также указывает на их чувствительность к гравитационному стимулу.

Впервые показано снижение пролиферативной активности культивируемых МСК человека при длительном клиностатировании, которое является обратимым и восстанавливается при возвращении клеток в стандартные условия культивирования. Выявлена реорганизация структуры актинового цитоскелета как в первые часы изменяющегося вектора гравитации, так и при более длительном воздействии. Установлено повышение концентрации ИЛ-6 в культуральной среде МСК человека при кратковременном клиностатировании. Впервые показано изменение экспрессии клеточных маркеров *α*-SMA (*α*-актина гладкомышечных клеток), CD105, HLA class I при длительном культивировании под воздействием измененного гравитационного микроокружения.

**Научно-практическая значимость работы.** Представленные экспериментальные данные являются важным шагом на пути к пониманию механизмов действия гравитационного сигнала на клетку. Результаты исследования способствуют расширению сложившихся представлений о клеточной биологии эндотелия и мезенхимальных стволовых клеток человека в условиях измененного гравитационного окружения. Полученные данные позволяют приблизиться к более глубокому пониманию влияния измененной гравитации на низкодифференцированные стволовые и дифференцированные эндотелиальные клетки человека. Результаты работы необходимо учитывать при анализе функциональных изменений сердечно-сосудистой системы и процессов регенерации в условиях микрогравитации.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Экспериментально доказана гравитационная чувствительность культивируемых эндотелиальных и мезенхимальных стволовых клеток человека.
2. Условия измененной силы тяжести (клиностамирование) приводят к реорганизации элементов цитоскелета (F-актин) ЭК и МСК, при этом перестройка структуры актиновых филаментов носит обратимый характер.
3. При одновременном действии клиностамирования и активации клеток провоспалительным цитокином ФНО- $\alpha$  модифицируется экспрессия молекул клеточной адгезии (E-селектина, VCAM-1, ICAM-1) на поверхности ЭК, что может приводить к изменению взаимодействия «клетка - субстрат» и «клетка - клетка».
4. Различные типы культивируемых клеток человека: дифференцированные (ЭК) и низкодифференцированные (МСК) демонстрируют сходные ответные реакции, проявляющиеся в снижении пролиферативной активности, увеличении продукции ИЛ-6 и перестройке актинового цитоскелета.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены на VI Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2003 г.), Конференциях молодых специалистов, аспирантов и студентов, посвященных Дню космонавтики (Москва, 2003, 2004, 2005 г.), 54<sup>th</sup> International Astronautical Congress (Bremen, Germany, 2003 г.), Международном симпозиуме «Биологическая подвижность», посвященном памяти академика Г.М. Франка (Пушино, Россия, 2004), 25<sup>th</sup> International Gravitational Physiology Meeting (Moscow, 2004), Международном симпозиуме «Стволовые клетки, регенерация, клеточная терапия» (Санкт-Петербург, 2004), VII Всероссийской конференции по патологии клетки (Москва, 2005).

Диссертация апробирована на заседании секции Ученого совета ГНЦ РФ — ИМБП РАН «Космическая биология и физиология».

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Текст диссертации изложен на 167 страницах, иллюстрирован 30 рисунками и 3 таблицами. Список литературы содержит 234 работы, из них 35 отечественных и 199 иностранных авторов.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Выделение и культивирование ЭК человека.* Для получения первичных культур ЭК пупочной вены человека использовали метод Gunbrone et al. (1974) в модификации Антонова и соавт. (1981); вместо коллагеназы использовали 0,15% раствор диспазы. Средой роста для ЭК являлась среда 199 с добавлением 25 мМ НЕРЕС, 2 мМ L-глутамина, 100 Ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 1мМ пирувата натрия, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 5 Ед./мл гепарина и 50 мкг/мл фактора роста ECGF. Клетки высевали на предварительно покрытые 0,2% раствором желатина чашки Петри. Культуру помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор в условиях 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% воздуха, 100% влажности. Через 18 — 24 ч культуры отмывали раствором Эрла и заменяли среду культивирования на свежую, в дальнейшем смену среды проводили через 48 ч.

*Культивирование МСК человека.* Мезенхимальные стволовые клетки, выделенные из костного мозга человека, были любезно предоставлены д.б.н. Ю.А. Романовым (ИЭК РКНПК МЗ РФ). Для культивирования использовалась среда DMEM-LG с 20 мМ НЕРЕС, 2 мМ L-глутамином, 1 мМ пируватом натрия, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 10% эмбриональной телячьей сывороткой, 4% сывороткой из пуповинной крови человека. Первичные культуры через две недели после выделения отмывали сбалансированным солевым раствором Хенкса, снимали с флакона раствором 0,05% трипсина - 0,02% ЭДТА и пересевали в новый флакон с культуральной поверхностью 75 см<sup>2</sup>. Смена среды осуществлялась через 2 - 3 дня.

*Моделирование измененной силы тяжести* осуществляли в лабораторных условиях, используя метод клиностаტიрования, позволяющий за счет постоянного вращения флакона с культурами вокруг оси, изменять направление вектора силы тяжести (гравитационного вектора) по отношению к моносолю. Для этого конфлуэнтные первичные культуры или культуры 1 - 2-го пассажей ЭК из флакона 75 см<sup>2</sup> (с плотностью  $5 \times 10^6$  клеток) снимали трипсином - ЭДТА и пересевали с разведением 1:3 на покрытые 0,2% раствором желатина культуральные флаконы с площадью поверхности 25 см<sup>2</sup>. Через 18 - 24 ч клетки отмывали раствором Эрла, который заменяли свежей средой культивирования. При этом флаконы заполняли средой полностью, не оставляя пузырьков воздуха, после чего дополнительно герметизировали эластичной пленкой «Парафильм» и закрывали крышками. Клиностаტიрование клеток осуществляли непосредственно в CO<sub>2</sub>-янкубаторе на горизонтальном клиностате со скоростью вращения 6 об/мин при 37°C. Контрольные культуры находились в аналогичных флаконах в стационарных условиях. Для дополнительного контроля использовали шейкер, обеспечивающий постоянное

перемешивание среды культивирования, наблюдаемое при длительном клиностаტიровании [Романов, Буравкова, 2000].

Субконфлуэнтные культуры МСК снимали с поверхности флаконов 75 см с плотностью посадки  $4 \times 10^6$  клеток и пассировали во флаконы с поверхностью 25 см<sup>2</sup> при разведении 1:3. В экспериментах использовали клетки 2, 3, 6-го пассажей. Условия клиностаტიрования не отличались от условий, описанных для ЭК. Контрольные культуры растили в аналогичных флаконах в стационарных условиях.

*Анализ пролиферативной активности.* Дня подсчета количества клеток использовали метод компьютеризированной видео-микроскопии (использовался микроскоп Axiovert 25 (Zeiss, Германия), оборудованный цифровой видеокамерой Mintron OS-75D, (Тайвань). Клетки на полученных фотографиях подсчитывали с использованием программы SigmaScan Pro5 (Sigma-Aldrich, США). Фотографирование опытных и контрольных культур клеток проводили через 2, 4, 24 ч культивирования с последующим возвращением клиностаტიрованных клеток на 4 ч в стандартные условия роста, а также через 48, 72, 96, 120 и 144 ч с последующим культивированием клиностазируемых клеток в стационарных условиях в течение 24 ч. В каждом флаконе было изучено не менее трех стационарных полей (равных полям зрения микроскопа площадью 1,55 мм<sup>2</sup>), в которых подсчитывали число клеток.

*Флуоресцентная микроскопия актиновых филаментов.* Для выявления актиновых филаментов (F-актина) культуры фиксировали 4% раствором параформальдегида на фосфатном буфере Дульбекко (ФБД) с добавлением 0,1% раствора тритона X-100 и выдерживали клетки в 1мкг/мл растворе РИПЦ-фаллоидина [Lacerda et al., 1996]. Препараты клеток анализировали на флуоресцентном микроскопе Axiovert 25 или Axiovert 200 (Zeiss) (X = 450 - 490 нм).

*Количественное определение цитокинов в среде роста клеток.* Уровень цитокинов в культуральной среде измеряли методом иммуноферментного анализа с использованием наборов "Human IL-1a", "Human IL-6", "Human TNF- $\alpha$ ", "Human VEGF" (BioSource International Inc., Бельгия) в соответствии с рекомендациями изготовителя. Концентрацию цитокинов определяли по калибровочной кривой, построенной по стандартам с известными концентрациями.

*Исследование экспрессии молекул клеточной адгезии.* Экспрессию E-селектина, ICAM-1 и VCAM-1 на поверхности эндотелия изучали с использованием авидин-биотин-пероксидазного метода. Культуры отмывали от среды и фиксировали в 1% параформальдегиде, приготовленном на ФБД, в течение 15 мин. Затем препараты промывали несколько раз раствором 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) - ФБД и



инкубировали в течение 45 мин при +37°C с первичными мышинными моноклональными антителами (Becton Dickinson). Последующие шаги определения были выполнены с использованием Monoclonal Detector Kit (Biomeda, США). Клеточные ядра дополнительно окрашивали гематоксилином Маера. Препараты анализировали на микроскопе Axiovert 25 (Zeiss, Германия).

*Имунофенотипирование МСК человека.* Для подтверждения статуса МСК клетки костного мозга фенотипировали на разных стадиях культивирования (2, 3, 6-е пассажи) с помощью проточной цитофлуориметрии. Для идентификации клеточных культур использовали антитела к поверхностным маркерам CD34, CD36, CD38, CD45, CDw90, CD105, CD106, CDH7 (Immunotech, Франция), HLA class I, HLA-DR и внутренним маркерам: виментин, коллаген I,  $\alpha$ -SMA (Sigma-Aldrich, США). В качестве изотипического контроля использовали IgG1. Имунофенотипирование проводили обязательно перед началом экспериментов с клиностаტიрованием для определения статуса и состояния МСК. Количественную оценку изменения экспрессии маркеров мезенхимальными стволовыми клетками под воздействием измененного направления вектора гравитации проводили в пролиферирующих культурах после 144 ч клиностаტიрования и в субконфлуэнтных культурах после 72 ч клиностаტიрования (использовались маркеры HLA class I, CD105, ASMA).

Для анализа поверхностных маркеров клетки снимали раствором трипсина — ЭДТА, фиксировали 1% раствором параформальдегида и отмывали центрифугированием в 1% растворе бычьего сывороточного альбумина, приготовленного на фосфатном буфере Дюльбекко (ФБД-БСА). Для выявления внутренних клеточных маркеров клетки дополнительно инкубировали в течение 10 мин в 0,1% растворе TX-100 на ФБД после фиксации. МСК инкубировали в течение 45 мин с моноклональными мышинными антителами к соответствующему антигену («первые антитела») или изотипическим контролем, приготовленными на ФБД-БСА. После отмывки центрифугированием в ФБД-БСА клетки инкубировали с ФИТЦ-мечеными козыими антителами («вторые антитела») в течение 30 мин. Затем МСК отмывали ФБД-БСА и анализировали в ФБД. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре Epics XL (Beckman Coulter, США). В каждом образце анализировали 3000 - 7000 событий.

*Статистический анализ.* Все данные были получены в нескольких независимых сериях. Достоверность различий между экспериментальными данными определяли с использованием параметрических (критерий Стьюдента) и непараметрических (критерий Крускала-Уоллиса) методов. Отклонения от среднего значения, приведенные в тексте работы, соответствуют SD (среднеквадратичному отклонению).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Исследование влияния клиностаტიрования на культуру ЭК человека.

При выделении эндотелиальных клеток из пупочной вены ферментативной обработкой (диспазой) получается суспензия, состоящая из агрегатов и одиночных клеток. Через 3 - 4 суток после посадки клетки вытягивались и становились веретеновидными. На 5 — 7-е сутки культивирования ЭК формировали конфлуэнтный монослой, состоящий из полигональных, плотно прилегающих друг к Другу клеток. При увеличении времени культивирования до 10 суток не наблюдалось характерного для фибробластов и гладкомышечных клеток наслаивания друг на друга. Клетки ранних (1 — 3-го) пассажей обладали сходной морфологией, достигали конфлуэнтного монослоя на 5 — 7-е сутки (как и первичные культуры), что подтверждало описанную в литературе способность ЭК к быстрой пролиферации.

Доказательствами эндотелиальной природы получаемых культур служили контактное ингибирование пролиферации и экспрессия специфических маркеров ЭК (PECAM-1, фактора фон Виллебранда).

*Проллиферативная активность ЭК человека при клиностаტიровании.* Литературные данные об изменении пролиферативной активности многих типов клеток в условиях микрогравитации [Таирбеков, 1997; Cogoli et al., 1993; Hughes-Fulford, 2003] позволили предположить, что если культивируемые ЭК чувствительны к гравитационному стимулу, то они должны отвечать изменением скорости роста. При исследовании пролиферативной активности ЭК *in vitro* в условиях кратковременного клиностаტიрования не выявлено значительных изменений пролиферации в первые часы воздействия (рис1). Через 24 ч воздействия наблюдалось снижение пролиферативной активности клиностазируемых ЭК по сравнению с контрольными клетками. После 4 ч культивирования в стандартных условиях ЭК, клиностазируемых до этого в течение 24 ч, регистрировали частичное восстановление пролиферации. Сходные изменения пролиферативной активности отмечались при вертикальном клиностаტიровании ЭК.

При продолжении клиностаტიрования наблюдалось дальнейшее снижение темпов пролиферации ЭК (в среднем в 1,7 раза), которое сохранялось во время всего периода клиностаტიрования. Эти результаты согласуются с показанным ранее снижением пролиферации ЭК человека при длительном клиностаტიровании [Романов, Буравкова, 2000]. Возвращение культур в стандартные условия после 144 ч клиностаტიрования приводило к восстановлению темпов пролиферации. Максимальная плотность эндотелиальных монослоев, сформированных в условиях клиностаტიрования, составляет

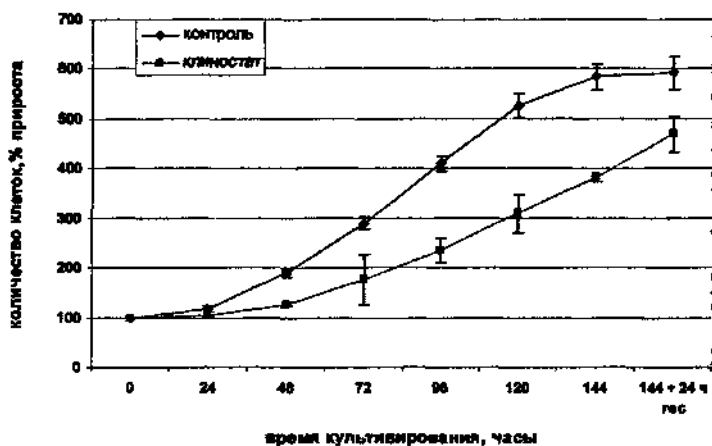


Рисунок 1. Проллиферативная активность культивируемых ЭК человека при длительном клиностагировании ( $p < 0,01$ , начиная с 48 часов воздействия).

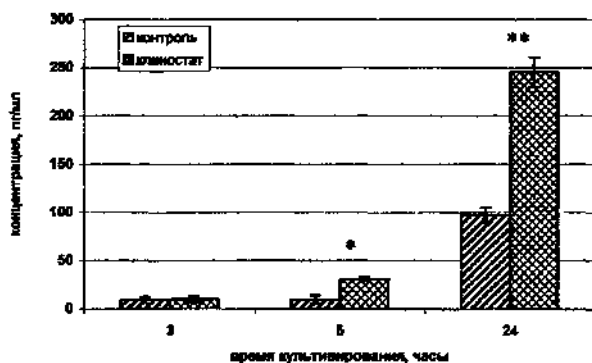


Рисунок 2. Продукция ИЛ-6 контрольными и клиностагируемыми ЭК человека (\* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$  по сравнению с контролем).

670±52 клеток на 1 мм<sup>2</sup>, а максимальная плотность контрольных культур равна 820±25 клеткам на 1 мм<sup>2</sup>.

Таким образом, данное исследование продемонстрировало и подтвердило значительное снижение пролиферативной активности ЭК человека в условиях длительного клиностаტიрования по сравнению со стандартными условиями культивирования, что свидетельствует о гравитационной чувствительности эндотелия *in vitro*.

*Ремоделирование танинового цитоскелета ЭК человека при клиностаტიровании.* Актиновый цитоскелет является одной из наиболее лабильных структур клетки, быстро реагирующих на изменение окружающей среды, в том числе микрогравитации, что выражается в реорганизации его архитектуры [Hughes-Fulford, Lewis, 1996; Lewis et al., 1998]. Эти данные в совокупности с полученными ранее доказательствами перестройки актинового цитоскелета конфлуэнтных культур ЭК человека [Романов, Буравкова, 2001] поставили вопрос о динамике изменений в структуре цитоскелета на ранних и длительных сроках воздействия у пролиферирующих ЭК, а также о возможности его ремоделирования при возвращении клеток к нормальным условиям культивирования.

В контрольных пролиферирующих культурах ЭК, окрашенных через сутки после начала эксперимента, F-актин был представлен организованной сетью филаментов, расположенных как в центре клетки, так и по ее периферии. Эта картина не изменялась в контрольных клетках до конца эксперимента (рис.3А,Б). Через 2 ч клиностаტიрования выявлялись клетки с ярко очерченным краем, обогащенным F-актином. Количество фибрилл в центре заметно уменьшалось по сравнению с контрольными клетками, и волокна становились более тонкими (рис3В). Через 24 ч наблюдалась полная перестройка актинового цитоскелета: тонкие филаменты, перераспределенные к периферии клетки, и практически свободная от актиновых фибрилл центральная часть. В то же время в большинстве клеток в области межклеточных контактов формировался так называемый «волнистый» край, обогащенный F-актином. Кроме этого в культивируемых ЭК наблюдались глыбки неструктурированного актина (рис3Г). Увеличение длительности клиностаტიрования до 144 ч не выявило каких-либо дополнительных перестроек архитектуры цитоскелета по сравнению с 24-часовой экспозицией (рис.3Д).

Для анализа возможности восстановления архитектуры цитоскелета ЭК после длительного воздействия исследовали культуры, клиностаტიрованные в течение 144 ч и затем помещенные на 24 ч в нормальные условия, подобно контролю. После периода реадaptации структура актинового цитоскелета клиностаტიрованных ЭК практически не отличалась от контрольных клеток (рис. 3Е). Эксперименты, проведенные на культурах ЭК

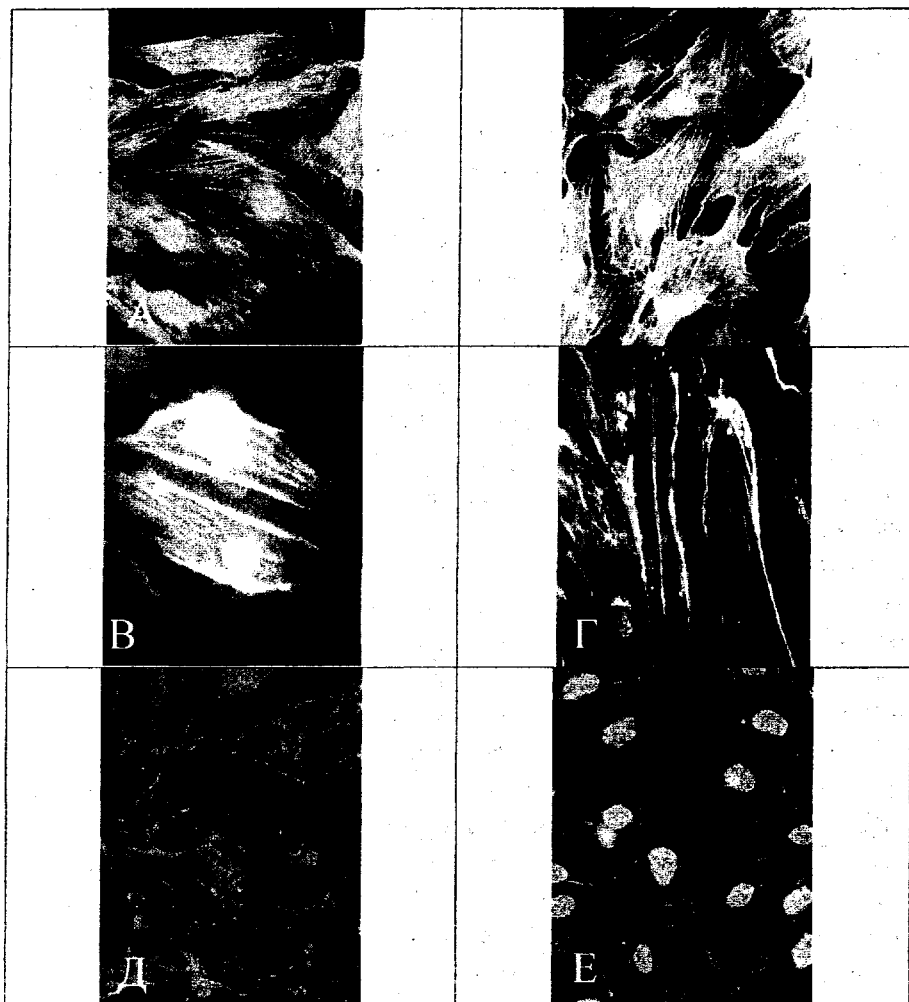


Рисунок 3. Структура актинового цитоскелета контрольных и клиностатируемых ЭК человека. А – контроль, 24 часа культивирования, X600; Б – контроль, 144 ч культивирования, X600; В – клиностат, 2 часа культивирования, X945; Г – клиностат, 24 часа культивирования, X945; Д – клиностат, 144 часа культивирования, X600; Е – клиностат, 144 часа клиностатирования и 24 часа культивирования в стандартных условиях, X600.

человека в условиях вертикального клиностаტიрования, выявили сходные изменения актинового цитоскелета.

Полученные данные свидетельствуют о том, что цитоскелет культивируемых ЭК является структурой, чувствительной к изменению направления вектора гравитации, и его реорганизация начинается уже в первые часы клиностаტიрования. Ремоделирование актинового цитоскелета в ответ на изменение гравитационного окружения носит обратимый характер и протекает быстрее, чем его восстановление.

Участие цитоскелета в сигнальной трансдукции и переходе клеток из стадии покоя к стадии активной пролиферации, его чувствительность к изменениям гравитации, были показаны в работе Ингбера [Ingber, 1999]. Было отмечено, что группа высокоаффинных рецепторов ростовых факторов концентрируется на комплексах фокальной адгезии, тесно связанных с актиновыми филаментами [Ingber, 1999]. Микрофиламенты, связанные с ними Rho GTPазы и интегрины, по данным ряда исследователей, оказывают значительное влияние на процессы клеточного цикла и клеточную пролиферацию [Boyd et al., 1995; Ingber et al., 1995; Iwig, 1995; Ridley, 1995].

Таким образом, приведенные данные позволяют предположить тесную взаимосвязь между выявленными нами реорганизацией актинового цитоскелета и снижением пролиферативной активности ЭК и выдвинуть гипотезу, что изменения актиновой сети являются одним из важных компонентов перестройки клеточной структуры, приводящей к снижению скорости пролиферации в условиях измененного вектора гравитации. Наблюдаемая реорганизация актинового цитоскелета может носить приспособительный характер.

*Определение количественного содержания иттоокинов в культуральной среде ЭК человек при клиностаტიровании.* Экспрессия ИЛ-6 в клетках *in vitro* может регулироваться механическим [Kawai et al., 2002; Kobayashi et al., 2003] и, в частности, гравитационным стимулом [Kumei et al., 1996; Lambert et al., 2000]. Вероятно, данный цитокин участвует в сигнальных путях механотрансдукции в клетке [Kawai et al., 2002; Lambert et al., 2000]. Эти данные позволили предположить, что в условиях постоянно изменяющегося направления вектора гравитации продукция ИЛ-6 эндотелиальными клетками будет изменяться, подтверждая гипотезу о чувствительности ЭК не только к механическому напряжению и «сдвигу жидкости» (shear stress), но и к гравитационному стимулу.

Результаты экспериментов показали, что после 3 ч воздействия постоянно изменяющегося вектора гравитации не происходит повышения продукции ИЛ-6 клиностазируемыми культурами (рис.2). Значительное увеличение экскреции ИЛ-6 ЭК в

среду инкубации наблюдается через 5 ч клиностаტიрования по сравнению с контрольными культурами ( $p < 0,05$ ). Продукция ИЛ-6 продолжала нарастать в течение 24 ч воздействия и была почти в 2,5 раза выше концентрации ИЛ-6 контрольных клеток ( $p < 0,01$ ).

Сходные результаты были показаны в экспериментах с механической стимуляцией, выполненных также на эндотелиальных клетках пупочной вены человека [Sasamoto et al., 2004]. В условиях механического растяжения (напряжения) увеличивались экспрессия тРНК ИЛ-6 и синтез ИЛ-6 через активацию интегринов и сигнального каскада, включающего протеинкиназу С (PKC) и ядерный фактор транскрипции NF- $\kappa$ B.

Исследования других цитокинов (VEGF, ИЛ-1 $\alpha$  и ФНО- $\alpha$ ) выявили их следовые количества в культуральной среде как контрольных, так и клиностаტიрованных ЭК.

Полученные результаты и литературные данные позволяют предположить, что любое изменение механической нагрузки со знаком «+» или «-» вызывает реакции стрессового характера, модифицирующиеся по мере адаптации клеток к новым условиям существования. Повышенная продукция ИЛ-6 эндотелиальными клетками в период до 24 часов клиностаტიрования по сравнению с контрольными образцами, позволяет предположить, что при изменении гравитационного сигнала в комплексный ответ ЭК на стимуляцию вовлечены интегрины и протеинкиназа С.

*Исследование экспрессии молекул клеточной адгезии при клиностаტიровании.* В условиях измененной силы тяжести рядом исследователей отмечается изменение адгезивных свойств клеток *in vitro* [Таирбеков, 1997; Dintenfass et al., 1986, 1990]. На модификацию адгезивных свойств эндотелия косвенно указывают также увеличение «растластывания» клеток на субстрате и повышение их миграционной активности [Буравкова, Романов, 2001] при клиностаტიровании. Одной из причин этого может быть индукция экспрессии молекул клеточной адгезии на поверхности ЭК. Для проверки данного предположения изучали экспрессию поверхностных молекул ICAM-1, VCAM-1 и E-селектина. Дополнительно в экспериментах был использован фактор некроза опухолей (ФНО- $\alpha$ ), повышающий экспрессию адгезивных молекул на поверхности эндотелия.

Исследования, проведенные совместно с д.б.н. Ю.Л. Романовым, показали, что контрольные ЭК, за редким исключением, не содержали на своей поверхности определяемых количеств E-селектина и VCAM-1, но были положительными к ICAM-1 (табл.1). Это подтверждает экспериментальные данные о низком спонтанном уровне экспрессии молекул исследуемых молекул адгезии. Добавление провоспалительного цитокина ФНО- $\alpha$  уже в течение 6 - 8 ч индуцировало экспрессию E-селектина и VCAM-1 и приводило к значительному повышению ICAM-1. Через 24 ч клиностаტიрования неактивированные клетки аналогично контролю практически не экспрессировали E-

селектин и VCAM-1, но интенсивность окрашивания на ICAM-1 значительно возростала. В ответ на добавление ФНО- $\alpha$  экспрессия E-селектина и VCAM-1 была значительно ниже при клиностаировании, а экспрессия ICAM-1 существенно увеличивалась. Результаты экспериментов позволяют предположить, что такие изменения экспрессии молекул адгезии могут модифицировать способность ЭК взаимодействовать с клетками крови, что подтверждается результатами экспериментов межклеточного взаимодействия между эндотелием и лимфоцитами [Romanov, Buravkova, 2004]. Вероятно, в основе нарушения процессов клеточного взаимодействия лежит блокирование селектин-зависимого механизма распознавания клеток.

**Таблица. 1. Экспрессия молекул клеточной адгезии ЭК человека в условиях клиностаирования,**

	ФНО- $\alpha$	E-селектин	VCAM-1	ICAM-1
<b>контроль</b>	-	-	-	+
	<b>добавление</b>	++	+++	++
<b>клиностаг</b>	-	-	-	++
	<b>добавление</b>	+	+	+++

Таким образом, регистрируемые при клиностаировании снижение пролиферативной активности культивируемого эндотелия, перестройка актинового цитоскелета, повышенная продукция ИЛ-6 и изменение экспрессии молекул клеточной адгезии свидетельствуют о модификации морфофункционального статуса и восприимчивости к гравитационному стимулу ЭК человека.

Исследование влияния клиностаирования на культуру МСК человека.

*Культивирование МСК человека.* Исследования показали, что в первичных культурах мезенхимальные стволовые клетки человека, выделенные из костного мозга, формировали типичные колонии адгезивных, активно пролиферирующих фибробластоподобных клеток и достигали стадии субконфлуэнта к концу второй недели. МСК 2, 3 и 6-го пассажей представляли собой гомогенную и однородную по морфологии популяцию, что свидетельствовало об оптимальных условиях культивирования, позволяющих удерживать клетки от процессов спонтанной дифференцировки. Время культивирования от момента



пассирования клеток до достижения культурой стадии конфлуэнта составляло пять - семь дней, и было практически одинаковым на всех изученных нами пассажах.

Идентификация выделенных и культивируемых МСК с помощью проточной цитофлуориметрии показала, что клетки экспрессировали следующие клеточные маркеры: HLA class I, CDw90, CD105,  $\alpha$ -SMA, коллаген I, фибронектин и виментин, и не экспрессировали HLA-DR, CD34, CD36, CD38, CD45, CD106, CD117. Таким образом, по морфологическим свойствам и результатам иммунофенотипирования клеток можно сделать вывод, что культуры МСК по своим характеристикам обладали свойствами, сходными с описанными в литературе [Minguell et al., 2001; Jones et al., 2002; Lee et al., 2004; Pittenger, Martin, 2004].

*Пролиферативной активностью МСК человека при клиностаировании.* Выявленные нами изменения актинового цитоскелета и пролиферации ЭК человека при клиностаировании, а также показанное в условиях микрогравитации снижение митогенной активности многих дифференцированных и преддифференцированных клеток [Bierkens et al., 1993; Cogoli, 1993, 1997] позволили предположить, что недифференцированные МСК также могут изменять пролиферативную активность в ответ на гравитационный стимул.

Полученные данные в экспериментах *in vitro* показали, что динамика снижения пролиферации МСК на разных пассажах при клиностаировании была практически одинаковой. Пролиферативная активность клиностаируемых МСК незначительно отличалась после 24 ч воздействия от пролиферативной активности контрольных МСК (рис. 5). Через 48 ч клиностаирования прирост опытных клеток составлял 41,7% по отношению к фону, а прирост контрольных клеток - 132,2%, что свидетельствовало о значительных изменениях пролиферации клиностаируемых культур. Низкая пролиферация сохранялась в последующем и незначительно возрастала после перевода клеток на 24 ч в стандартные условия после 144 ч воздействия измененного вектора гравитации. Максимальная плотность культур МСК, сформированных в условиях клиностаирования составляла  $119 \pm 35$  клеток на  $1 \text{ мм}^2$ , а максимальная плотность контрольных культур равнялась  $222 \pm 21$  клеткам на  $1 \text{ мм}^2$ .

Снижение пролиферативной активности МСК, относящихся к достаточно быстро пролиферирующим культурам [Tocci, Fortel, 2003], может указывать на протекание серьезных перестроек в клетках при клиностаировании. Ряд исследователей считает, что пролиферация или клеточный цикл могут быть связаны с направленностью дифференцировки [Shao, Lazar, 1997; Fajas, 2003; McBeath, 2004]. Это позволило предположить, что выявленное снижение пролиферации может отчасти активировать дифференцировочные процессы в МСК человека.

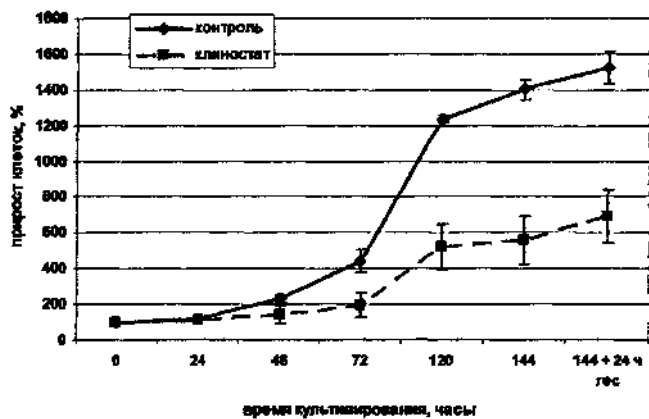


Рисунок 5. Пролиферативная активность культивируемых МСК человека при длительном клиностаировании ( $p < 0,01$ , начиная с 48 ч воздействия).



Рисунок 6. Продукция ИЛ-6 контрольными и клиностаируемыми МСК человека (\* -  $p < 0,01$ , \*\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем).

*Ремоделирование малинового цитоскелета МСК неломка в условиях клиностаტიрования.* Влияние измененного направления вектора гравитации на структуру актинового цитоскелета мезенхимальных стволовых клеток было изучено после 2, 4, 6, 8, 24 ч клиностаტიрования. Показано, что в контрольных пролиферирующих культурах, окрашенных после 6 и 24 ч культивирования, F-актин был представлен организованной сетью филаментов, расположенных как в центре клетки, так и по ее периферии (рис.7А,Б). После 2 ч клиностаტიрования большое число клеток изменяли свои очертания, приобретая «амебоидную» форму. Края клеток становились неровными, с многочисленными выемками, происходило некоторое утончение микрофиламентов (рис.7В).

Через 4 ч воздействия клетки сохраняли «амебоидную» форму, у некоторых из них усиливалось образование выемок на границах. Края клеток становились более ярко очерченными и «сворачивались» у некоторых клеток. Наблюдалось снижение количества филаментов в клетках и их истончение (рис.7Г). После 6 ч клиностаტიрования отмечалось усиление тенденций «сворачивания» клеток и утончения фибрилл (рис.7Д). Визуализация актиновых филаментов клеток, клиностазируемых в течение 8 ч выявило аналогичную картину структуры цитоскелета. Через 24 ч клиностаტიрования клетки сохраняли измененную форму с неровными краями, однако уменьшалось количество «свернутых» клеток. Наблюдалось некоторое утолщение филаментов клеток по сравнению с 4 - 8 ч клиностаტიрования, которое, однако, не достигало контрольного состояния (рис.7Е).

Изучение свойств низкодифференцированных клеток позволило предположить, что реорганизации клеточной структуры МСК могут быть связаны с модификацией их статуса «стволовости». Данные, представленные в литературе, свидетельствуют, что изменения экспрессии интегринов, кадгеринов и цитоскелетных белков во время коммитирования стволовых клеток определяют дальнейшую морфологию и судьбу клеток [Gumbiner, 1996]. Следует также отметить, что состояние сети актиновых филаментов по-разному действует на процессы дифференцировки клеток. Так, разрушение актинового цитоскелета способствует адипогенной дифференцировке [Spiegelman, Ginty, 1983; Fernandez, Ben-Ze'ev, 1989]. Остеогенная дифференцировка требует присутствия неповрежденного, интактного цитоскелета [Toma et al, 1997; Pavalko et al., 1998]. Таким образом, приведенные данные предполагают важную роль организации актинового цитоскелета в процессах коммитирования клеток. Модификация актинового цитоскелета гравиточувствительных клеток [Hughes-Fulford, 2001; Rucci et al., 2002] при изменении гравитационного сигнала позволяют предположить, что перестройка F-актина и снижение пролиферативной активности этих клеток в условиях клиностаტიрования могут свидетельствовать о гравитационной чувствительности МСК человека. Эти доводы

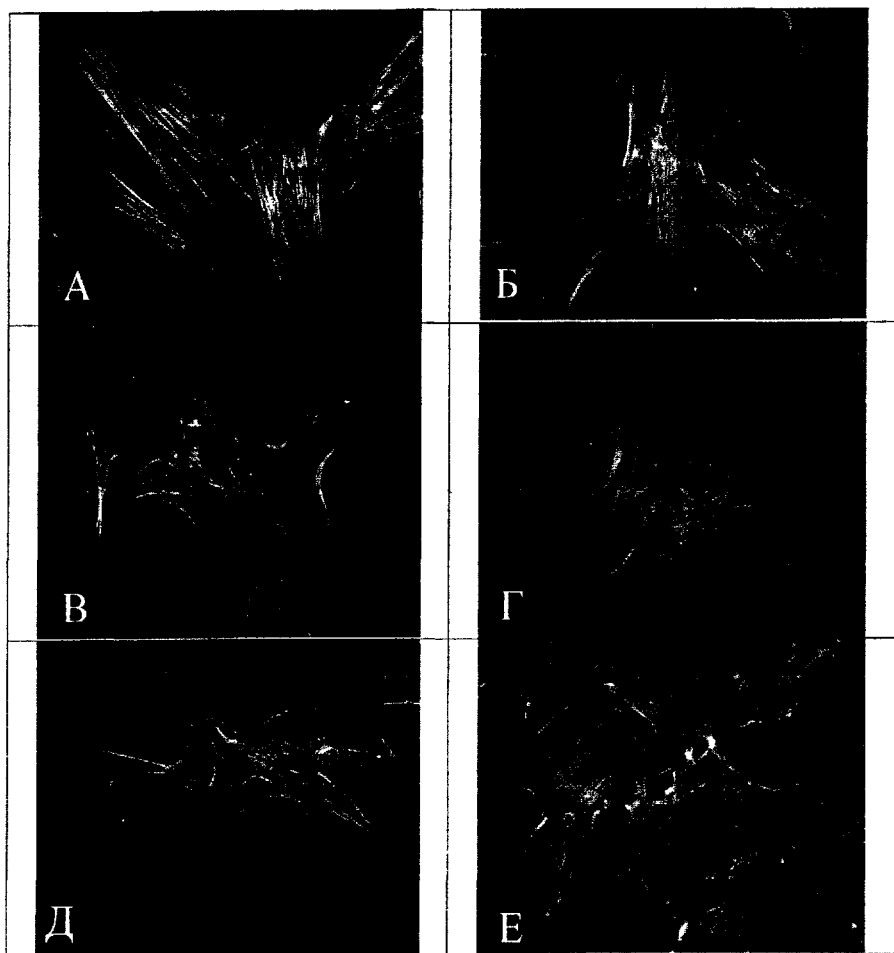


Рисунок 7 Структура актинового цитоскелета контрольных и клиностазируемых МСК человека

А – контроль 6 часов культивирования, Б – контроль, 24 ч культивирования, В – клиностат, 2 часа культивирования, Г – клиностат, 4 часа культивирования, Д – клиностат, 6 часов культивирования, Е – клиностат, 24 часа культивирования Х945

поддерживаются высокой чувствительностью МСК к восприятию внешних сигналов, в том числе из их микроокружения [Bianco, 2002]. Показанные перестройки актинового цитоскелета и снижение пролиферативной активности МСК позволяют предположить изменение функциональной активности и модификацию статуса стволовых клеток, а также возможное начало клеточного коммитирования.

*Определение количественного содержания цитокинов в культуральной среде МСК человека при клиностаტიровании.* В результате проведенных экспериментов было показано, что одновременно со снижением скорости пролиферации МСК возрастает секреция ИЛ-6 в клиностазированных культурах, причем контрольные культуры при большем количестве клеток продуцируют меньше ИЛ-6 (рис. 6). Увеличение продукции ИЛ-6 наблюдалось в течение 4–6 ч клиностаტიрования ( $p < 0,01$ ). Через 24 ч воздействия разница между уровнем экспрессии ИЛ-6 контрольных и клиностазируемых клеток была менее выраженной ( $p < 0,05$ ).

Исследования других цитокинов (VEGF, ИЛ-1 $\alpha$  и ФНО- $\alpha$ ) выявили их следовые количества в культуральной среде как контрольных, так и клиностазированных ЭК.

Анализ литературных данных и полученных нами результатов позволяет сделать вывод о том, что высокая продукция ИЛ-6 может свидетельствовать о протекании стрессовых реакций в стромальных клетках костного мозга. Увеличенная экспрессия данного цитокина согласно работам, проведенным на ЭК, фибробластах и остеобластах [Lambert et al., 2000; Kawai et al., 2002; Rucci et al., 2002; Sasamoto et al., 2004], дает основание говорить о механочувствительности МСК, а также в совокупности с другими показанными структурными и функциональными изменениями - о способности мезенхимальных стволовых клеток воспринимать гравитационный стимул и реагировать на него изменениями физиологического статуса.

*Иммунофенотипирование МСК после клиностаტიрования.* Как уже упоминалось, модификация клеточной формы, актинового цитоскелета и, соответственно, тесно связанной с ними митогенной активности клеток могут влиять на процессы дифференцировки, поэтому оценка статуса МСК по экспрессии маркеров являлась одной из задач работы.

При клиностаტიровании не было обнаружено достоверных изменений в экспрессии  $\alpha$ -SMA между контролем и культурами, клиностазируемыми на стадии субконфлуэнта в течение 72 ч ( $35,51 \pm 2,72\%$  против  $38,93 \pm 3,15\%$  от общего количества клеток), а также между контрольными МСК и клетками, клиностазируемыми на стадии активной пролиферации в течение 144 ч ( $27,34 \pm 3,51\%$  против  $31,1 \pm 2,32\%$ ). Напротив, выработка

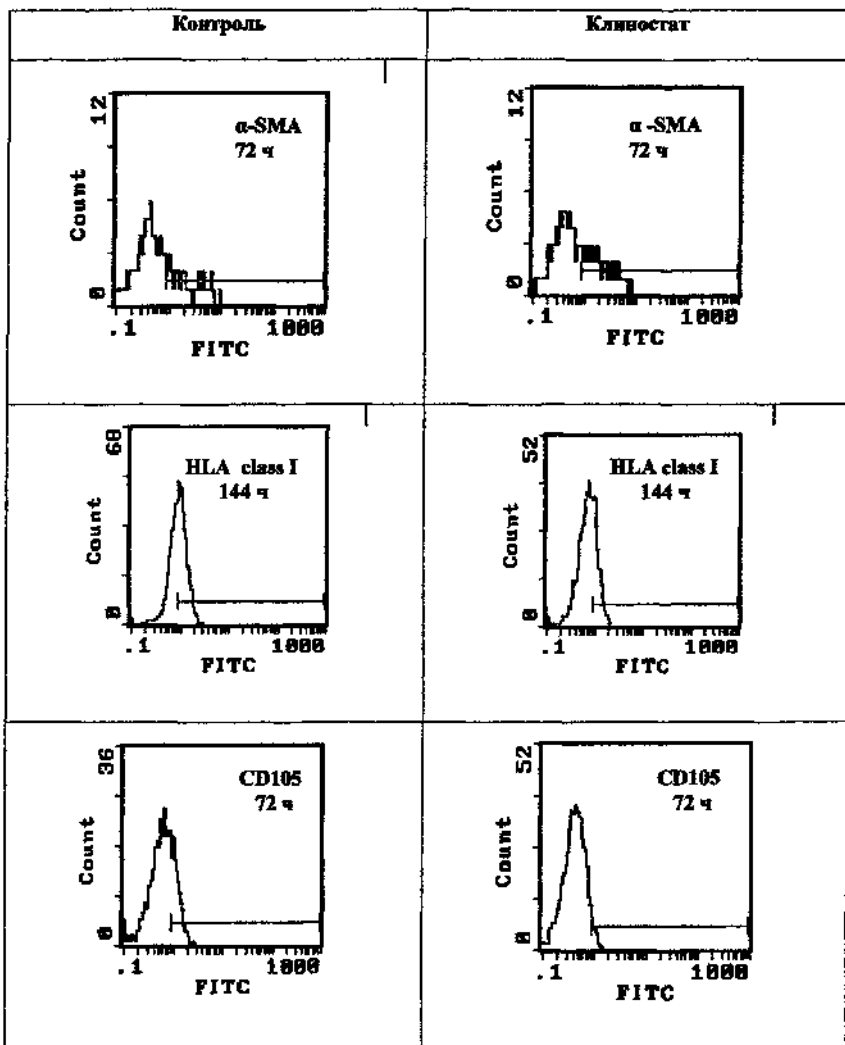


Рисунок 8. Экспрессия маркеров МСК человека при длительном клиностагировании по результатам проточной цитофлуориметрии.

молекул антигенов HLA class I МСК достоверно понижалась после 144 ч клиностагирования пролиферирующих культур по сравнению с контрольными клетками (клиностагируемые МСК -  $40,7 \pm 11,77\%$ , контроль -  $60,55 \pm 9,15\%$  от общего количества клеток). Экспрессия CD 105 также снижалась в субконфлуэнтных клиностагируемых культурах по сравнению с контрольными клетками (клиностагируемые МСК -  $7,73 \pm 3,49\%$ , контрольные —  $29,78 \pm 4,27\%$ ). Результаты проточной цитофлуориметрии одного из экспериментов представлены на рисунке 8.

Интересно, что экспрессия  $\alpha$ -SMA культивируемыми стромальными клетками может быть связана с фазами роста культуры [Blank et al., 1990; Peled et al., 1991] и указывает на миоидную дифференцировку, по крайней мере, *in vitro* [Preston et al., 2003]. Возможно, выявленная тенденция к увеличению экспрессии  $\alpha$ -SMA в культурах, клиностагируемых на стадии пролиферации, связана с обнаруженным ранее угнетением пролиферативной активности клеток. Следует отметить, что механическое воздействие может регулировать выработку  $\alpha$ -SMA у миобластов и мезенхимальных стволовых клеток [Peled et al., 1991; Tomasek et al., 2002; Park et al., 2004].

Изменение экспрессии CD 105 и HLA class I также может указывать на серьезные перестройки культивируемых МСК при клиностагировании. Известно, что CD105 является рецептором трансформирующего ростового фактора- $\beta$ , и, следовательно, может быть вовлечен в регулирование клеточной адгезии, пролиферации и миграции. Данный факт позволяет предположить, что уменьшение экспрессии CD105 в клиностагируемых МСК может быть связано с откреплением клеток и снижением пролиферативной активности культур, подвергавшихся воздействию. Понижение экспрессии уровня HLA class I может вызывать изменение иммунологических реакций клеток, в том числе снижение возможности «узнавания» МСК клетками иммунной системы.

Таким образом, обнаруженные структурные и функциональные изменения в культуре МСК костного мозга человека, включая снижение пролиферативной активности, реорганизацию актинового цитоскелета, изменение экспрессии клеточных маркеров и повышение продукции ИЛ-6, свидетельствуют о гравитационной чувствительности этого типа клеток. Выявленные признаки модификации клеток являются доказательством значительных, хотя и обратимых функциональных и структурных перестроек биохимических и физиологических процессов в МСК человека *in vitro*. Полученные результаты указывают на преобразование статуса МСК при изменении гравитационной стимуляции, что позволяет предположить возможность индукции дифференцировки в этих условиях.

## ВЫВОДЫ

1. Моделируемое изменение гравитационного окружения с помощью клиностатирования приводит к снижению пролиферации ЭК и МСК *in vitro*. После возвращения клеток в стандартные условия культивирования пролиферативная активность восстанавливается до нормального уровня.
2. Актиновый цитоскелет ЭК и МСК человека является структурой, восприимчивой к постоянному изменению направления вектора гравитации, и его реорганизация начинается уже в первые часы клиностатирования и завершается через 24 ч. Изменение структуры актиновых филаментов ЭК сохраняется при увеличении времени воздействия до 144 ч.
3. Ремоделирование актинового цитоскелета ЭК человека в ответ на изменение гравитационного окружения носит обратимый характер. Восстановление структуры актиновых филаментов протекает несколько медленнее, чем ее перестройка, вызываемая постоянным изменением вектора гравитации.
4. Клиностатирование неактивированных ЭК в течение 24 ч приводило к увеличению экспрессии ICAM-1. Добавление провоспалительного цитокина ФНО- $\alpha$  при клиностатировании не вызывало выраженного увеличения экспрессии E-селектина и VCAM-1, но повышало выработку ICAM-1. Регистрируемые изменения экспрессии молекул клеточной адгезии свидетельствуют о нарушениях процессов межклеточного взаимодействия в условиях измененного направления вектора гравитации.
5. В условиях клиностатирования *in vitro* происходит увеличение продукции «стрессового» провоспалительного цитокина ИЛ-6 в ЭК и МСК человека уже в первые часы воздействия, которое сохраняется в течение 24 часов клиностатирования.
6. Экспрессия клеточных маркеров CD10S и HLA class I мезенхимальных стволовых клеток человека снижается в условиях длительного воздействия измененного вектора гравитации, а экспрессия  $\alpha$ -SMA незначительно увеличивается, что свидетельствует об изменениях фенотипа и функциональной активности МСК.
7. Различные типы культивируемых клеток, к которым относятся дифференцированные ЭК и низкодифференцированные МСК человека, обладают способностью воспринимать гравитационный стимул и демонстрируют сходные ответные реакции, проявляющиеся в снижении пролиферативной активности, увеличении продукции интерлейкина-6 и перестройке актинового цитоскелета.



### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:**

1. Исследования изменений актинового цитоскелета эндотелиальных клеток человека в условиях клиностатирования // Тезисы докладов Шестой Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье». Санкт-Петербург, 2003. С. 109 -110 (соавт. Андреева Е.А.).
2. Восстановление цитоскелета культивируемых эндотелиальных клеток человека после клиностатирования // Конференция молодых специалистов, аспирантов и студентов, посвященная Дню космонавтики. Москва, 2003. С. 14 -15.
3. Исследование процессов апоптоза культивируемых клеток методом проточной цитофлуориметрии // Конференция молодых специалистов, аспирантов и студентов, посвященная Дню космонавтики. Москва, 2004. С. 19 - 21.
4. F-actin architecture changes of human endothelial cells cultured in long-term clinorotation // Abstracts of International symposium «Biological mou'lity». Pushchino, 2004. P. 192 - 193 (соавт. Buravkova L.B., Romanov Yu.A., Buravkov S.V.).
5. The effects of clinorotation on cultured mesenchymal stem cells // Abstracts of 25<sup>th</sup> International Gravitational Physiology Meeting, 2004. P. 95. (соавт. Buravkova L.B., Romanov Yu.A.).
6. Ремоделирование актинового цитоскелета культивируемых эндотелиальных клеток человека в условиях клиностатирования // Авиакосм, и эколог, мед, 2004. Т. 38. №6. С. 56-61 (соавт. Буравкова Л.Б.).
7. The primary effects of clinorotation on cultured mesenchymal stem cells // J. Gravit. Physiol., 2004. Vol.11. №2. P. 177 -180. (соавт. Buravkova L.B., Romanov Yu.A.).
8. Первичные эффекты, наблюдаемые при клиностатировании культивируемых мезенхимальных стволовых клеток человека // Цитология, 2004. Т. 46. №10. С. 900 - 901. (соавт. Буравкова Л.Б., Романов Ю.А.).
9. Исследование актинового цитоскелета методом флуоресцентной микроскопии в условиях длительного клиностатирования // Тезисы VII Всероссийской конференции по патологии клетки. Москва, 2005. С. 82-83. (соавт. Буравков С.В.).
10. Исследование архитектуры актинового цитоскелета мезенхимальных стволовых клеток человека методом флуоресцентной микроскопии в условиях клиностатирования // Конференция молодых специалистов, аспирантов и студентов, посвященная Дню космонавтики. Москва, 2005. С. 31 - 32.



**Типография ООО «Телер»**

**127299 Москва, ул. Космонавта Волкова, 12**

**Лицензия на полиграфическую деятельность ПД № 00595**

Подписано в печать 08.06.2005 г. Формат 60x90 1/16. Тираж 100 экз.

Бумага «Снегурочка» 1,5 печ.л. Заказ № П 423

11 ИЮЛ 2005

