

УДК 576.08
И53

Рецензент:

Иванов Игорь Николаевич — доктор медицинских наук,
профессор кафедры судебной медицины ГБОУ ВПО СЗГМУ
им. И. И. Мечникова

Иммуногистохимическое исследование головного моз-
га / Д. Э. Коржевский, Е. Г. Гилерович, О. В. Кирик [и др.] ; под
ред. Д. Э. Коржевского. — Санкт-Петербург : СпецЛит, 2016. —
143 с.

ISBN 978-5-299-00806-7

В книге в краткой и доступной форме изложен материал, касающийся достаточно сложных вопросов изучения головного мозга с использованием различных методов иммуногистохимии. В работе представлены сведения о нейральных и глиальных маркерах, применяемых в современных клинических и экспериментальных исследованиях органов нервной системы; приведены результаты ряда нейроморфологических работ, выполненных сотрудниками Института экспериментальной медицины.

Издание адресовано широкому кругу специалистов, использующих иммуногистохимические подходы при оценке состояния органов нервной системы как в патоморфологической диагностике, так и при проведении нейробиологических исследований (неврологам, нейробиологам, физиологам, фармакологам, патологоанатомам, судебно-медицинским экспертам).

Научные исследования авторского коллектива, результаты которых представлены в этой книге, выполнены при поддержке Российского научного фонда (проект 14-15-00014). Глава 8, содержащая сведения об иммуногистохимических маркерах астроцитов, подготовлена в рамках выполнения гранта РФФИ (проект 14-04-00071а).

УДК 576.08

ISBN 978-5-299-00806-7

© ООО «Издательство „СпецЛит“», 2016

Коллектив авторов:

Коржевский Дмитрий Эдуардович — доктор медицинских наук, заведующий лабораторией функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии Института экспериментальной медицины (ФГБНУ «ИЭМ»);

Гилерович Елена Георгиевна — доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ»;

Кирик Ольга Викторовна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ»;

Григорьев Игорь Павлович — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ»;

Сухорукова Елена Геннадьевна — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ»;

Алексеева Ольга Сергеевна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук;

Колос Елена Андреевна — младший научный сотрудник Лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ»;

Гусельникова Валерия Владимировна — аспирант кафедры цитологии и гистологии биолого-почвенного факультета Санкт-Петербургского государственного университета;

Карпенко Марина Николаевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории нейробиологии интегративных функций мозга отдела физиологии им. И. П. Павлова ФГБНУ «ИЭМ»;

Безнин Глеб Владимирович — кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории психофизиологии эмоций отдела физиологии им. И. П. Павлова ФГБНУ «ИЭМ»

ОГЛАВЛЕНИЕ

Условные сокращения	7
Предисловие	8
Глава 1. Особенности пробоподготовки при проведении иммуногистохимического исследования головного мозга (Д. Э. Коржевский)	10
<i>Литература</i>	15
Глава 2. Применение методов иммуноцитохимии при изучении ультраструктуры головного мозга (Е. Г. Гилеровиц)	16
2.1. Преимбеддинг- и постимбеддинг-метод	16
2.2. Маркеры антител, используемые при изучении ультраструктуры клеток	17
2.3. Значение фиксации	19
2.4. Проведение иммуноцитохимической реакции	19
<i>Литература</i>	22
Глава 3. Изучение пролиферации клеток головного мозга: пролиферативные маркеры (Кирик О. В., Безнин Г. В., Коржевский Д. Э.)	24
3.1. Бромдезоксисуридин (BrdU)	25
3.2. Этинилдезоксисуридин (EdU)	27
3.3. Ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA)	28
3.4. Белок MCM2	29
3.5. Белок Ki-67	30
3.6. Фосфорилированный гистон H3	31
3.7. Циклины	33
<i>Литература</i>	34
Глава 4. Нейральные стволовые клетки и иммуногистохимические подходы, используемые для их выявления (Кирик О. В., Коржевский Д. Э.)	42
4.1. Белки промежуточных филаментов (нестин, виментин, GFAP)	43
4.2. Транскрипционные факторы (Sox2, Pax6)	45
4.3. Белки сигнальных путей Notch, Wnt.	47
<i>Литература</i>	50
Глава 5. Катехоламинергические нейроны головного мозга и их выявление (Сухорукова Е. Г., Алексеева О. С., Григорьев И. П., Коржевский Д. Э.)	56

5.1. Локализация катехоламинергических нейронов в головном мозге	56
5.2. Морфологические особенности катехоламинергических нейронов	58
5.3. Выявление катехоламинергических нейронов. Тирозингидроксилаза	59
<i>Литература</i>	62
Глава 6. Выявление холинергических нейронов центральной нервной системы (Колос Е. А., Коржевский Д. Э.)	66
<i>Литература</i>	71
Глава 7. Кислородсвязывающий белок нервных клеток — нейроглобин (Алексеева О. С., Коржевский Д. Э.)	75
7.1. Локализация нейроглобина в структурах мозга	75
7.2. Предполагаемые функции нейроглобина	77
7.3. Нейроглобин при нейродегенеративных заболеваниях и старении	81
<i>Литература</i>	83
Глава 8. Иммуногистохимические маркеры астроцитов (Сухорукова Е. Г., Гусельникова В. В.)	85
8.1. Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP)	86
8.2. Глутаминсинтетаза	93
8.3. Дейодиназа 2-го типа (DIO-2)	95
8.4. Альдегиддегидрогеназа (AldhL1)	97
<i>Литература</i>	99
Глава 9. Иммуногистохимические маркеры олигодендроцитов (Гусельникова В. В.)	109
9.1. Протеолипидный белок (PLP/DM-20)	109
9.2. Основной белок миелина (MBP)	110
9.3. Основной белок олигодендроцитов, связанный с миелином (MOBP)	111
9.4. 2',3'-циклический нуклеотид 3'-фосфодиэстераза (CNPase, CNP)	111
9.5. Миелин-ассоциированный гликопротеин (MAG)	112
9.6. Миелиновый гликопротеин олигодендроцитов (MOG)	113
9.7. Другие маркеры зрелых олигодендроцитов	114
<i>Литература</i>	116
Глава 10. Иммуногистохимические маркеры микроглиоцитов (Коржевский Д. Э., Кирик О. В.)	120
10.1. Белок Iba-1	121

10.2. Белок CD68	123
10.3. Белок CD11b	124
10.4. Другие маркеры микроглиоцитов	124
<i>Литература</i>	125
Глава 11. Методы микроскопического исследования объектов, применяемые после постановки иммуногистохимических реакций (Карпенко М. Н.)	131
<i>Литература</i>	138
Приложение 1. Фиксирующие среды, применяемые при иммуногистохимическом исследовании головного мозга	139
Приложение 2. Антитела, используемые при изучении головного мозга лабораторных животных и человека	141

УСЛОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

АСС	— ацетил-СоА-карбоксилаза
АХЭ	— ацетилхолинэстераза
АЦХ	— ацетилхолин
БА	— болезнь Альцгеймера
ДОФА	— дигидроксифенилаланин
ИГХ	— иммуногистохимия
НМ	— нейромеланин
НСПК	— нейральные стволовые и прогениторные клетки
Ол	— олигодендроциты
ПЗС	— прибор с зарядовой связью
ПНС	— периферическая нервная система
ПФ	— промежуточные филамены
пХАТ	— периферическая холинацетилтрансфераза
ФЭУ	— фотоэлектронный умножитель
ХАТ	— холинацетилтрансфераза
ЦНС	— центральная нервная система
ЭПС	— эндоплазматическая сеть
ЯОП	— ядро одиночного пути
Aldh1L1	— альдегиддегидрогеназа семейства 1, член L1
BrdU	— бромдезоксиуридин
CAF-1	— chromatin assembly factor-1 (фактор сборки хроматина)
CDK	— циклин-зависимые киназы
CNP, CNPase	— 2',3'-циклический нуклеотид 3'-фосфодиэстераза
DIO2	— дейодиназа 2-го типа
EdU	— этинилдезоксиуридин
GFAP	— глиальный фибриллярный кислый белок
GS	— глутаминсинтетаза
MAG	— миелин-ассоциированный гликопротеин
MBP	— основной белок миелина
MCM2	— minichromosome maintenance protein 2
MOBP	— основной белок олигодендроцитов, связанный с миелином
PCNA	— ядерный антиген пролиферирующих клеток
PLP	— протеолипидный белок
VACHT	— везикулярный транспортер ацетилхолина

ПРЕДИСЛОВИЕ

Головной мозг является наиболее сложно устроенным органом человека, для изучения морфологии которого используется особый набор методических приемов, включающий и специализированные методы иммуногистохимии. Иммуногистохимическое исследование состояния нервных центров является одним из наиболее информативных подходов, применяемых при изучении строения, развития и структурных проявлений патологии нервной системы. Высокая сложность клеточной организации головного мозга определяет тот факт, что для его изучения применяются более сложные методические приемы, чем при исследовании других органов и систем. Недостаточно полная информация об особенностях применения разнообразных иммуногистохимических маркеров наряду с возрастающей потребностью в освоении современных методов изучения нервной системы создают условия для неадекватного использования сложных иммуногистохимических протоколов, игнорирования артефактов и ошибочной интерпретации получаемых результатов. Следствием отмеченных недостатков могут явиться диагностические ошибки (если дело касается нейроморфологической диагностики) и необоснованные научные выводы (при выполнении нейробиологических исследований). В связи с этим цель настоящей работы состояла в обобщении многообразного собственного опыта разработки и использования иммуногистохимических методов изучения функциональной морфологии головного мозга и анализе литературных данных, касающихся важнейших цитоспецифических и функциональных маркеров, применяемых в исследованиях клеточной организации головного мозга млекопитающих и человека.

В представленной книге содержатся сведения об особенностях пробоподготовки при проведении иммуногистохимического исследования головного мозга с использованием парафиновых срезов и методов ультраструктурной иммуноцитохимии (главы 1 и 2). Важный раздел посвящен актуальным задачам современной нейробиологии — определению нейральных стволовых и прогениторных клеток мозга, а также выявлению пролиферирующих клеток (главы 3 и 4). Особое внимание уделено характеристике нейронов, относящихся к важнейшим катехоламинергическим медиаторным системам, и обоснованию использования реакции на тирозингидроксилазу для их выявления (глава 5). Подробно рассмотрен вопрос о селективной визуализации холинергических нейронов ЦНС (глава 6).

Отдельный раздел посвящен анализу собственных и литературных данных о локализации в нейронах головного мозга особого кислородсвязывающего белка — нейроглобина, которому отводится важная роль во внутриклеточном депонировании кислорода и регуляции окислительных процессов в нервной системе (глава 7). Последующие главы посвящены глиальным цитоспецифическим маркерам и обзору современных методов микроскопии, используемых при оценке результатов иммуногистохимического исследования.

В приложении 2 приведены выверенные данные об антителах, которые следует применять при проведении диагностических и научных исследований. Особо отмечено, какие из перечисленных реагентов допустимо, а какие недопустимо использовать при изучении головного мозга человека.

Научные исследования авторского коллектива, результаты которых представлены в этой книге, выполнены при поддержке Российского научного фонда (проект 14-15-00014). Отдельная глава (глава 8), содержащая сведения об иммуногистохимических маркерах астроцитов, подготовлена в рамках выполнения гранта РФФИ (проект 14-04-00071а).

Д. Э. Коржевский

ОСОБЕННОСТИ ПРОБОПОДГОТОВКИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Для получения достоверных результатов при постановке иммуногистохимических реакций необходимо строго соблюдать правила, установленные для всех этапов обработки биологического материала (взятия материала, фиксации, обезвоживания, заливки в парафин, изготовления и наклейки срезов, удаления парафина и самой процедуры иммуногистохимического окрашивания). В ряду этих этапов существенное место занимает предварительная подготовка материала для иммуногистохимического исследования (пробоподготовка). При подготовке головного мозга для различных вариантов иммуногистохимического исследования необходимо учитывать групповые и индивидуальные особенности протоколов обработки материала. В первую очередь, исходя из общей задачи исследования, следует выбрать подходящий вариант иммуногистохимического исследования и подготовить в соответствии с ним подробную пошаговую инструкцию, учитывающую все действия исследователя и лаборанта, вплоть до постановки иммуногистохимической реакции. Это позволит избежать грубых ошибок пробоподготовки, ведущих к утрате ценного экспериментального материала. Выбор, как правило, осуществляется из следующих восьми вариантов.

1. Постановка иммуногистохимических реакций на парафиновых срезах с последующей визуализацией продукта реакции при помощи хромогена (окрашенного продукта реакции) и анализа препаратов с использованием традиционной световой микроскопии.

2. Постановка иммуногистохимических реакций на парафиновых срезах с последующей визуализацией продукта реакции при помощи флуорохромов (флуоресцентных меток) и анализа препаратов с использованием флуоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии.

3. Постановка иммуногистохимических реакций на вибраторных срезах с последующей визуализацией продукта реакции при помощи хромогена и анализа препаратов с использованием традиционной световой микроскопии.

4. Постановка иммуногистохимических реакций на вибраторных срезах с последующей визуализацией продукта реакции при помощи флуорохромов и анализа препаратов с использованием флуоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии.

5. Постановка иммуногистохимических реакций на криостатных срезах с последующей визуализацией продукта реакции при помощи хромогена и анализа препаратов с использованием традиционной световой микроскопии.

6. Постановка иммуногистохимических реакций на криостатных срезах с последующей визуализацией продукта реакции при помощи флуорохромов и анализа препаратов с использованием флуоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии.

7. Постановка иммуногистохимических реакций на ультратонких срезах с последующей визуализацией продукта реакции при помощи металлической метки и анализа препаратов с использованием электронной микроскопии (postembedding-метод).

8. Постановка иммуногистохимических реакций на фиксированном блоке или вибраторных срезах с последующей визуализацией продукта реакции при помощи металлической (либо пероксидазной) метки и анализа препаратов с использованием электронной микроскопии (preembedding-метод).

Обработка материала для первого способа постановки иммуногистохимических реакций наиболее близка к стандартному варианту обработки гистологического материала, применяемому в диагностических патоморфологических исследованиях. Однако и в этом простейшем случае необходимо соблюдать ряд ограничений. Вместо обычного раствора формалина следует использовать 10 % нейтральный формалин (или 4 % раствор параформальдегида), приготовленный на буферном растворе (см. Приложение 1). Лучшие результаты выявления антигенов дает замена фиксатора на цинк-формалин (см. Приложение 1). При этом нет необходимости в изменении характера дальнейшей проводки, а результаты обычных гистологических окрасок неотличимы от результатов окраски после правильно проведенной стандартной формалиновой фиксации. Продолжительность формалиновой (и цинк-формалиновой) фиксации не должна превышать двух суток. При обезвоживании материала не следует пользоваться заменителями этанола и ксилола. Для заливки объектов необходимо использовать парафин с температурой плавления не выше 58 °С. Температура парафинового термостата не должна превышать 60 °С.

Заливка в целлоидин и целлоидин-парафин нежелательна, так как приводит к развитию неспецифической фоновой окраски в ходе выявления пероксидазы диаминобензидином. В случае необходимости применения целлоидина его следует перед постановкой реакций удалить из срезов жидкостью Никифорова (спирт-эфиром).

Толщина изготавливаемых срезов (в обычных случаях) должна составлять 4—6 мкм. Более толстые срезы могут потребовать модификации протоколов иммуногистохимической обработки и измене-

ния времени демаскирования антигенов. Кроме того, толстые срезы плохо удерживаются на предметных стеклах, даже при использовании специальных адгезивов. Срезы должны быть хорошо расправлены. Отсутствие складок и пузырей позволяет получить лучшее прилипание к предметному стеклу. Для наклейки срезов необходимо использовать предметные стекла с инертным (по отношению к иммуногистохимическим реагентам) высокоадгезивным покрытием. Использование покрытий на основе белка куриного яйца, сыворотки и желатина нежелательно.

При расправлении и сушке срезов нежелательно применять высокие температуры (свыше 45 °С). Оптимальным является просушивание срезов в суховоздушном термостате с вентиляцией при 40 °С в течение трех дней. Более продолжительное пребывание срезов в термостате может способствовать лучшему их приклеиванию к предметным стеклам. При необходимости работы с препаратами на следующий день после изготовления срезов желательно употреблять стекла с высокоадгезивным покрытием, нанесенным в заводских условиях (например, стекла Superfrost Plus Gold немецкого производителя Menzel).

Удаление парафина из срезов и регидратацию их перед иммуногистохимическим исследованием проводят так же, как и перед обычной окраской. При этом следует регулярно проверять спирты на загрязнение ксилолом, поскольку остатки ксилола, как и плохо удаленный парафин, могут приводить к понижению чувствительности реакции и артефактам. Наиболее простым способом выявления загрязнения спирта ксилолом является помещение нескольких капель тестируемого спирта в стаканчик с водопроводной водой. Если капли спирта, попадая в воду, смешиваются с ней без помутнения — спирт пригоден для проводки. Если на месте падения капли спирта в воде образуется мутное облачко — спирт загрязнен ксилолом и требует замены.

При взятии головного мозга для иммуногистохимического исследования следует строго соблюдать все требования, которые предъявляются к этой процедуре при обычном патоморфологическом исследовании. Материал не должен подсыхать перед погружением в фиксирующую среду и не должен промываться гипотоническими средами (например, водой). Фрагменты головного мозга не должны быть слишком крупными, поскольку большие размеры фиксируемых кусочков не позволяют добиться равномерности фиксации и хорошей сохранности центральных областей объекта, что в последующем проявляется различными артефактами. В растворах формальдегида головной мозг лабораторных животных (мышей, песчанок, крыс, кроликов) может быть фиксирован целиком. При использовании этанола и комбинированных фиксаторов головной мозг кролика следует разделять на фрагменты и вскрывать боковые желудочки.

В научных исследованиях, когда требуются максимально высокое качество гистологического препарата и хорошая сохранность антигенов, следует помимо цинк-формалина использовать и другие фиксаторы, предназначенные для применения в иммуногистохимии (см. Приложение 1). При проведении экспериментальных исследований в отдельных случаях может понадобиться перфузионная фиксация (способ, когда фиксирующая жидкость вводится через артериальное русло). Этот способ необходим при проведении фиксации головного мозга лабораторных животных перед постановкой иммуноцитохимических реакций для электронномикроскопического исследования (Gilerovitch H. [et al.], 1995).

Обычно после применения альдегидных фиксаторов (к которым относится и формалин) наступает перекрестная сшивка белковых молекул, что ведет к ухудшению выявляемости антигенов и обуславливает необходимость их протеолитического или теплового демаскирования. Кроме того, длительное пребывание фиксируемых фрагментов головного мозга в формальдегиде ведет к повышению уровня автофлуоресценции нервных структур, что существенно ухудшает результаты последующей флуоресцентной микроскопии. Коагулирующие фиксаторы (спирты и различные спиртовые композиции) дают лучшие результаты при фиксации белков и гликопротеидов с большой молекулярной массой. Они не вызывают и увеличения автофлуоресценции материала. Тем не менее для фиксации головного мозга они не являются оптимальными, поскольку вызывают более существенное сжатие ткани, чем альдегидные фиксаторы, и медленнее проникают в фиксируемые образцы.

Компромиссный подход, позволяющий использовать достоинства альдегидной и спиртовой фиксации при минимизации их отрицательных эффектов, состоит в применении непродолжительной (до 24 ч) фиксации фрагментов головного мозга лабораторных животных и человека в цинк-этанол-формальдегиде (Коржевский Д. Э., Григорьев И. П., Отеллин В. А., 2006). Этот фиксатор не только хорошо сохраняет многие антигены (Коржевский Д. Э. [и др.], 2013; Korzhevskii D. E. [et al.], 2015), но и дает возможность получить отличные результаты при окраске по Нисслю. Для фиксации небольших пептидов (нейропептидов), малых молекул и гаптен (например, моноаминов) рекомендуется использовать только альдегидные фиксаторы, поскольку в коагулирующих фиксирующих средах и комбинированных фиксаторах возможны частичное растворение либо перифокальная диффузия низкомолекулярных антигенов.

После окончания фиксации остатки фиксирующих веществ необходимо удалить из материала, тщательно его промыв в дистиллированной воде (после формалина и цинк-формалина) или этаноле (пос-

ле коагулирующих фиксаторов и спиртовых смесей). Заливка должна быть осуществлена в течение 2–5 сут после завершения фиксации. Это обеспечивает максимальную сохранность антигенов и их хорошую выявляемость в препаратах. Для оптимизации процесса заливки целесообразно использовать гистологические автоматы карусельного типа, обеспечивающие постоянное перемешивание растворов. Автоматы закрытого типа для ускоренной заливки биопсийного материала использовать не следует, поскольку в них применяются заменители этанола, включающие изопропанол и ацетон, которые негативно влияют на структурную сохранность нервной ткани.

В патогистологической практике и при проведении научных исследований иногда возникает необходимость проведения иммуногистохимического исследования перефиксированного или архивного материала. При использовании архивного материала, длительно фиксировавшегося в формальдегидных фиксаторах либо хранившегося в 80 % этаноле, следует экспериментально оценить возможность адекватного использования иммуногистохимических методов. При этом тепловое демаскирование следует проводить обязательно для всех типов антигенов, которые не подвергаются термической деструкции.

Степень «жесткости» альдегидной фиксации и пригодность архивного материала для иммуногистохимического исследования удобно контролировать, используя тест-реакцию с моноклональными антителами к виметину (клон V9). Антитела клона V9 выявляют чувствительный к перефиксации эпитоп этого белка промежуточных филаментов. Виментин в головном мозге содержится в клетках мозговых оболочек — менингоцитах (у животных и человека), эпендимоцитах выстилки мозговых желудочков (у лабораторных животных), активированных астроцитах, эндотелиоцитах кровеносных сосудов и других клетках сосудистой стенки (Кирик О. В., Коржевский Д. Э., 2012, 2013; Коржевский Д. Э. [и др.], 2007; Кирик О. В. [и др.], 2014). Поскольку эндотелиоциты капилляров присутствуют в любом фрагменте головного мозга, а виментин как у лабораторных животных, так и у человека хорошо реагирует с антителами клона V9, капилляры могут служить внутренним положительным контролем и индикатором пригодности объектов для иммуногистохимического исследования. Отрицательные результаты пробной реакции на виментин будут указывать на малую пригодность материала для постановки любых иммуногистохимических реакций. Эта же реакция позволит отработать и режим теплового демаскирования архивного материала.

Более подробно особенности отдельных этапов пробоподготовки (в том числе и теплового демаскирования антигенов), адаптированных для конкретных иммуноцитохимических маркеров и для

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Под редакцией Д. Э. Коржевского

Редактор *Пугачева Н. Г.*
Корректор *Полушкина В. В.*
Компьютерная верстка *Габерган Е. С.*

Подписано в печать 11.07.2016. Формат $60 \times 88 \frac{1}{16}$.
Печ. л. 9 + 0,25 печ. л. цв. вкл. Тираж 500 экз. Заказ №

ООО «Издательство „СпецЛит“».
190103, Санкт-Петербург, 10-я Красноармейская ул., 15
Тел.: (812) 495-38-94, 495-36-12
<http://www.speclit.spb.ru>.

Отпечатано в ООО «Литография Принт»,
191119, Санкт-Петербург, Днепропетровская ул., д. 8