

А. Б. Смолянинов

**КЛЕТОЧНЫЕ И ГЕННЫЕ
ТЕХНОЛОГИИ
В КАРДИОЛОГИИ**

Руководство для врачей

Санкт-Петербург
СпецЛит
2009

УДК 616.127–08:615.324
С51

Автор:

Александр Борисович Смолянинов —
доктор медицинских наук, профессор медицинского факультета
Санкт-Петербургского государственного университета,
генеральный директор Покровского банка стволовых клеток
Центра клеточной и геной терапии, заслуженный рационализатор РФ

Рецензенты:

Андрей Григорьевич Обрезан — доктор медицинских наук,
профессор, заведующий кафедрой госпитальной терапии
медицинского факультета Санкт-Петербургского
государственного университета

Михаил Владимирович Дерюгин — доктор медицинских наук,
доцент кафедры госпитальной терапии
Санкт-Петербургского государственного университета

Смолянинов А. Б.

С51 Клеточные и геной технологии в кардиологии / А. Б. Смолянинов. — СПб. : СпецЛит, 2009. — 175 с. ISBN 978-5-299-00405-2

В руководстве обобщены научные данные, полученные за последние 10 лет в области клеточных и геной технологий лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Клеточные и геной технологии интенсивно развиваются в последние годы, идет процесс перехода от лабораторных исследований к клиническим. В работе рассмотрены биологические основы применения стволовых клеток в кардиологии, представлено их патофизиологическое обоснование, изложены теоретические основы клеточной терапии. Автором представлены результаты первых клинических исследований в области клеточной терапии сердечно-сосудистых заболеваний разных научных школ и клиник. В работе освещается генетика заболеваний сердечно-сосудистой системы. Описаны перспективы применения методов геной терапии в кардиологии.

Руководство предназначено для ученых и врачей, которые изучают проблему клеточных и геной технологий, пытаются обосновать новые терапевтические подходы в диагностике и лечении сердечно-сосудистых заболеваний.

УДК 616.127–08:615.324

ОГЛАВЛЕНИЕ

Условные сокращения	5
Предисловие	8

Глава 1

БИОЛОГИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ	9
1.1. Стволовые клетки мезодермального происхождения	11
1.2. Трансдифференцировка стволовых клеток	23

Глава 2

ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В КАРДИОЛОГИИ	26
2.1. Гемопозитические ростовые факторы как факторы мобилизации стволовых клеток при заболеваниях сердечно-сосудистой системы	26
2.2. Идентификация и подсчет стволовых клеток	27
2.3. Источники стволовых клеток	29
2.4. Иммунологические аспекты трансплантации. Виды трансплантации	34
2.5. Главный комплекс гистосовместимости и HLA-типирование . . .	35

Глава 3

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ СЕРДЕЧНО- СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ	41
3.1. Молекулярные пути развития миокарда	42
3.2. Регуляторные модули в развивающемся сердце	48
3.3. Трансдифференцировка стволовых клеток взрослого организма	55
3.4. Методология исследований по трансплантации миогенных стволовых клеток в сердце	59
3.5. Выбор типа стволовых клеток для кардиомиопластики	65
3.6. Васкулогенез <i>de novo</i> в сердце	72

Глава 4

СОВРЕМЕННЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ	81
4.1. Стволовые клетки костного мозга в лечении сердечно-сосу- дистых заболеваний	81
4.2. Эндотелиальные клетки-предшественники в ангиологии	86
4.3. Аллотрансплантаты миобластов в регенерации человеческого сердца	91
4.4. Методологические проблемы клеточной терапии сердца	92

Глава 5

ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА И ГЕНЕТИКА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ	100
5.1. Геном человека	100
5.2. <i>Human Genome Project</i>	103
5.3. Моногенные болезни сердечно-сосудистой системы человека. . .	107
5.4. Полигенные болезни сердечно-сосудистой системы	111

Глава 6

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ГЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В КАРДИОЛОГИИ.	136
6.1. Генный трансфер как инструмент исследований.	136
6.2. Использование вирусных векторов в генной терапии человека. .	141
6.3. Вирусные векторы, используемые для переноса генов в мышцы	146
6.4. Генный трансфер потенциально лечебных генов	148
Заключение	153
Словарь терминов, применяемых в клеточных и генных технологиях.	154
<i>Литература</i>	168

Условные сокращения

- АПК — антиген-презентирующие клетки
БОЕ-Э — эритроидная бурсообразующая единица
ГМК — гладкомышечные клетки
ГСК — гемопоэтические стволовые клетки
ГТФаза — гуанозин-5-трифосфатаза
ЖКТ — желудочно-кишечный тракт
ИБС — ишемическая болезнь сердца
КОЕ — колониеобразующая единица
КОЕ-ГЭММ — гранулоцитарно-эритроцитарно-моноцитарно-мегакариоцитарная КОЕ
КОЕ-Э — эритроидная колониеобразующая единица
МККМ — моноклеарные клетки костного мозга
ММП — матриксные металлопротеиназы
мРНК — матричная рибонуклеиновая кислота
МСК — мезенхимальные стволовые клетки
ОЭД — домен кислородзависимой деградации
ПЦР — полимеразная цепная реакция
РТПХ — реакция «трансплантат против хозяина»
РХПТ — реакция «хозяин против трансплантата»
СК — стволовая клетка
СКПК — стволовые клетки периферической крови
СКС — стволовые клетки сердца
ЦНС — центральная нервная система
ЭКП — эндотелиальные клетки-предшественники
- AAV — адено-ассоциированные вирусы
ABI — *ankle-brachial index*
ACAT — *acyl coenzyme-A: cholesterol acyltransferase*
AGF-1 — *insulin-like growth factor-1*
ANF — *atrial natriuretic factor*
ANP — *atrial natriuretic protein*
AVC — атриовентрикулярный канал
BDNF — *brain derived neurotrophic factor*
BMP — *bone morphogenetic protein*
BMPR — *bone morphogenetic protein receptor*
Bves — *blood vessel/epicardial substance*
CARP — *cardiac ankyrin-repeat protein*
 α CA — *α cardiac actin*
cTnI — *cardiac troponin I* — изоформа тропонина I
ecNOS — *endothelial constitutive nitric oxide synthase*
EGF — *epidermal growth factor*
EGFP — *enhanced green fluorescens protein*
EPO — *erythropoietin*

ErbB — рецептор *EGF*
 FACS — *fluorescence-activated cell sorting*
 FGF — *fibroblast growth factor*
 Flk-1 — *fetal liver kinase 1*
 FL-FLT — лиганд
 FOG-2 — *friend of GATA-2*
 GATA-1—GATA-6 — белки, содержащие ДНК-связывающий мотив WGATAR и родственные последовательности CGATGG и AGATTA
 G-CSF — *granulocyte colony-stimulating factor*
 GFP — *green fluorescence protein* — зеленый флуоресцирующий белок
 GlyA — *glycophrin A*
 GM-CSF — *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
 GSK- β — *glycogen synthase kinase- β*
 JNK — *Jun N-terminal kinase*
 Has2 — *hyaluronic acid synthase 2*
 hHO-1 — гемоксигеназа-1
 HDL — липопротеины высокой плотности
 HGF — *hepatocyte growth factor*
 HLA — *human leukocyte antigenes* — лейкоцитарные антигены человека
 Hsp — *homeodomain only protein*
 Hsp70 — *heat shock protein 70*
 ICAM-1 — *intercellular cell adhesion molecule 1*
 IGF-1 — *insulin-like growth factor-1*
 LDL — липопротеины низкой плотности
 LFA-1 — *leukocyte function-associated antigen 1*
 LDLR — лиганд рецептора липопротеинов низкой плотности
 LTCIC — *long-term culture-initiating cell*
 MACS — *magnetic affinity cell sorting*
 MAPC — *multipotent adult progenitor cells* — мультипотентные клетки-предшественники взрослого организма
 M-CSF — *macrophage colony-stimulating factor*
 Mef2 — *myocyte enhancer factor 2*
 MHC — *major histocompatibility complex* — главный комплекс гистосовместимости
 α MHC — *α myosin heavy chain*
 β MHC — *β myosin heavy chain*
 MHC- β — *myosin heavy chain- β*
 MLC2V — *myosin light chain 2V*
 MLC3F — *myosin light chain 3F*
 MSAC — *mitotic spindle assembly checkpoint*
 MSC — *mesenchymal stem cells; marrow stromal cells*

NGF — *neuronal growth factor*
ODD — домен кислородзависимой деградации
PDGF — *platelet derived growth factor*
PGC — *primordial germ cell*
PKC — *protein kinase C* — протеинкиназа C
PLGF — *placental growth factor*
Raldh2 — *retinaldehyde dehydrogenase 2*
ROS — *reactive oxygen species*
Sca-1 — *stem cell antigen 1*
SCF — *stem cell factor*
SCID — *severe combine immunodeficiency*
SDF-1 — *stroma-derived factor-1*
SERCA2a — *sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase*
SM22 α — *smooth muscle 22 α*
SME — *smooth muscle element*
SP — *side-population* — побочная субпопуляция клеток
SRF — *serum response factor*
TCF — *T cell factor*
TGF- β — *transforming growth factor β*
TPO — *trombopoietin* — тромбopoэтин
VCAM-1 — *vascular cell adhesion molecule 1*
VE — *vascular endothelial*
VEGF — *vascular endothelial growth factor*
VEGFR2 (flk-1) — *vascular endothelial growth factor 2*
VLA-4 — *very late antigen-4*
VLDL — липопротеины очень низкой плотности

ПРЕДИСЛОВИЕ

В последнее десятилетие в медицину пришли новые технологии. Они позволили совершенно по-другому посмотреть на этиологию, патогенез и терапию сердечно-сосудистых заболеваний. Это клеточные и генные технологии, благодаря которым кардиология стала высокотехнологичной и догнала кардиохирургию.

Клеточные и генные технологии — это механизм, который открывает многие причины сердечно-сосудистых заболеваний. В научном аспекте применение данной технологии в кардиологии кажется безграничным, но этические соображения и нормы уже сейчас ставят барьеры на пути ее развития. Технология применения стволовых клеток и генная терапия могут привести к новому пониманию развития и дифференциации клеток: как и почему развиваются определенные ткани, почему возникают сердечно-сосудистые заболевания и как их лечить.

Изучение стволовых клеток началось в начале XX столетия с работ профессора А. А. Максимова. За прошедшие сто лет ученые прошли огромный путь. Наступило время, когда фундаментальные знания, переходя в практическую медицину, выводят ее на новый этап развития. Стволовые клетки могут быть использованы для получения тканей или целых органов, специально адаптированных к будущим реципиентам. Заместительная клеточная терапия при сердечно-сосудистых заболеваниях — это наиболее актуальное направление исследований. Трансплантация стволовых клеток является альтернативой современной фармакологической терапии.

Автор

Глава 1

БИОЛОГИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

Стволовая клетка (СК) — это такая клетка, которая делится и образует две дочерние клетки, из которых одна остается стволовой, идентичной материнской, а другая продуцирует дифференцированное потомство. В отличие от эмбриональных СК, способных дифференцироваться в любой клеточный тип, СК взрослого организма, изолированные из стромы костного мозга, жировой, нервной и мышечной тканей, имеют ограниченный дифференцировочный потенциал и в большинстве случаев более ограниченную продолжительность жизни. Эти различия справедливы только при допущении, что экстремальные условия тестирования дифференцировочного и пролиферативного потенциала СК известны и что все исследования выполнены со строгим соблюдением этих условий.

В настоящее время атрибутами стволовой клетки считаются клональность, способность к самовоспроизведению и мультипотентность, т. е. способность генерировать несколько типов дифференцированных клеток.

Относительно происхождения СК полная ясность отсутствует. Схемы, приведенные на рис. 1, иллюстрируют основные гипотезы, касающиеся происхождения СК.

На ранней стадии эмбрионального развития (стадии цилиндрического яйца) идентифицирована популяция так называемых PGC, которые впоследствии исключаются из соматической спецификации, мигрируют в генитальный гребень и генерируют функционально зрелые половые клетки и гаметы.

Согласно одной из гипотез (дерево 1), СК обнаруживаются после формирования зародышевых листков. Эти СК коммитированы соответственно зародышевым листкам, из которых они развиваются. Например, мезодерма формируется, давая начало ГСК и МСК. Альтернативная возможность представлена деревом 2 и заключается в том, что СК могут развиваться подобно предшественникам половых клеток PGC и, не будучи коммитированы на стадии гастрюлы, впоследствии мигрируют в специфические тканевые и органые ниши.

При этом допускается возможность того, что PGC представляют собой разновидность плюрипотентных СК, равно как и то, что СК взрослого организма ведут свое происхождение из PGC (Jiang Y. [et al.], 2002).

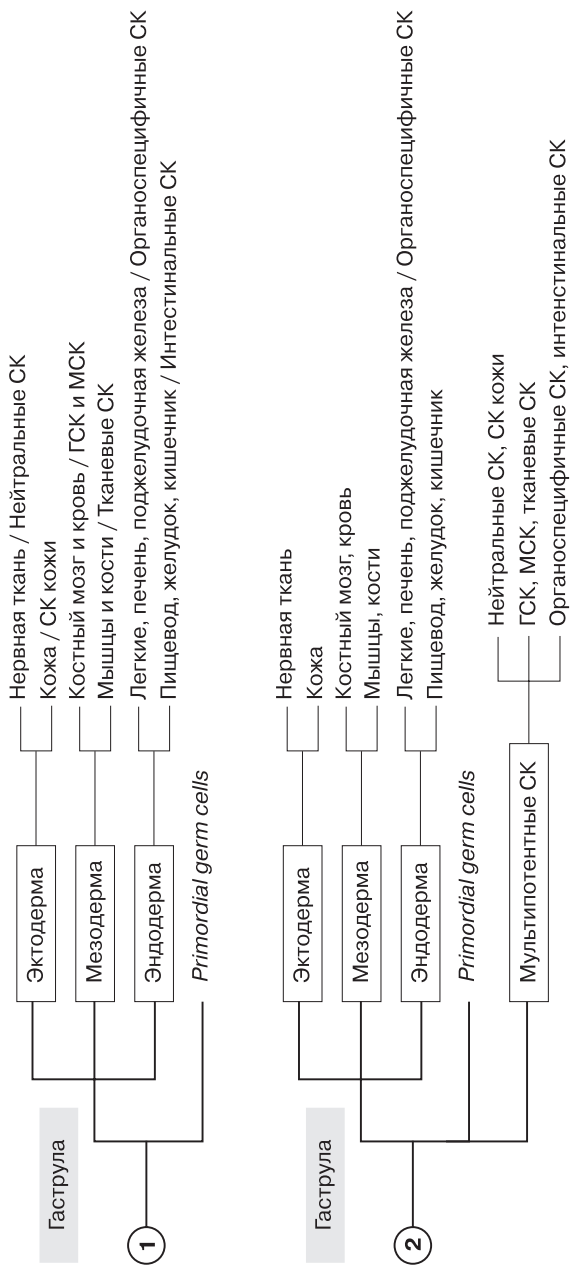


Рис. 1. Предполагаемое происхождение и онтогенетическое развитие стволовых клеток (Melton D. A., Cowan C., 2004): 1, 2 – гипотезы происхождения СК

1.1. Стволовые клетки мезодермального происхождения

Мезенхимальные стволовые клетки

Мезенхимальные СК (*mesenchymal stem cells, MSC*), называемые также стромальными клетками костного мозга (*marrow stromal cells, MSC*) (Vestaille C. M., 2004), изолированы из множества тканей: прежде всего из аспиратов костного мозга (Pittenger M. F. [et al.], 1999), а также из подкожной жировой ткани (Zuk P. A. [et al.], 2001), легкого (Noort W. A. [et al.], 2002), мышц (Deasy B. M. [et al.], 2002), кожи (Mizuno S. [et al.], 1996), хряща (Tallheden T. [et al.], 2003), кости и стенок кровеносных сосудов (Nutall M. E. [et al.], 1998). Антигенные детерминанты, позволяющие отбирать MSC из костного мозга человека и грызунов, практически одинаковы.

Мезенхимальные СК (МСК) являются мультипотентными клетками-предшественниками и участвуют в так называемом мезенгеном процессе — мультилинейной дифференцировке в клетки мезенхимальных тканей, схематически представленном на рис. 2.

В литературе по гемопоэзу авторы часто отождествляют МСК и гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) на том основании, что стволовая клетка спасает летально облученных животных. Однако в процессе восстановления кроветворения у таких животных участвуют именно ГСК, тогда как МСК используются для поддержания естественного тканевого гомеостаза. Это фундаментальное отличие, которое ускользает от внимания некоторых исследователей, имеет большое значение для понимания функции МСК. Мезенхимальные ткани взрослого организма имеют уникальную динамику клеточного обмена — терминально дифференцированные клетки умирают и замещаются новыми. Поддержание гемопоэза стромальными клетками костного мозга нуждается в непосредственной близости МСК, которые являются предшественниками различных стромальных элементов. При системном назначении мобилизационных ростовых факторов G-CSF и GM-CSF в циркуляцию мобилизуется большое количество гемопоэтических предшественников, но МСК не обнаруживаются в периферической крови (Lazarus H. M. [et al.], 1998). Этот факт объясняют тем, что МСК и их дифференцированные потомки должны оставаться в костном мозге и обеспечивать адекватную поддержку ускоренного гемопоэза. МСК обладают так называемой пластичностью, под которой понимается способность клеток одной линии быть индуцированными к дифференцировке в другую линию. Если мезенхимальные клетки известного фенотипа, например, адипоциты, содержащие жировые капельки, экспонировать к индуцирующим дифференцировку факторам, то клетки могут быть перепрограммированы в другой фенотип. Такие клетки перестают

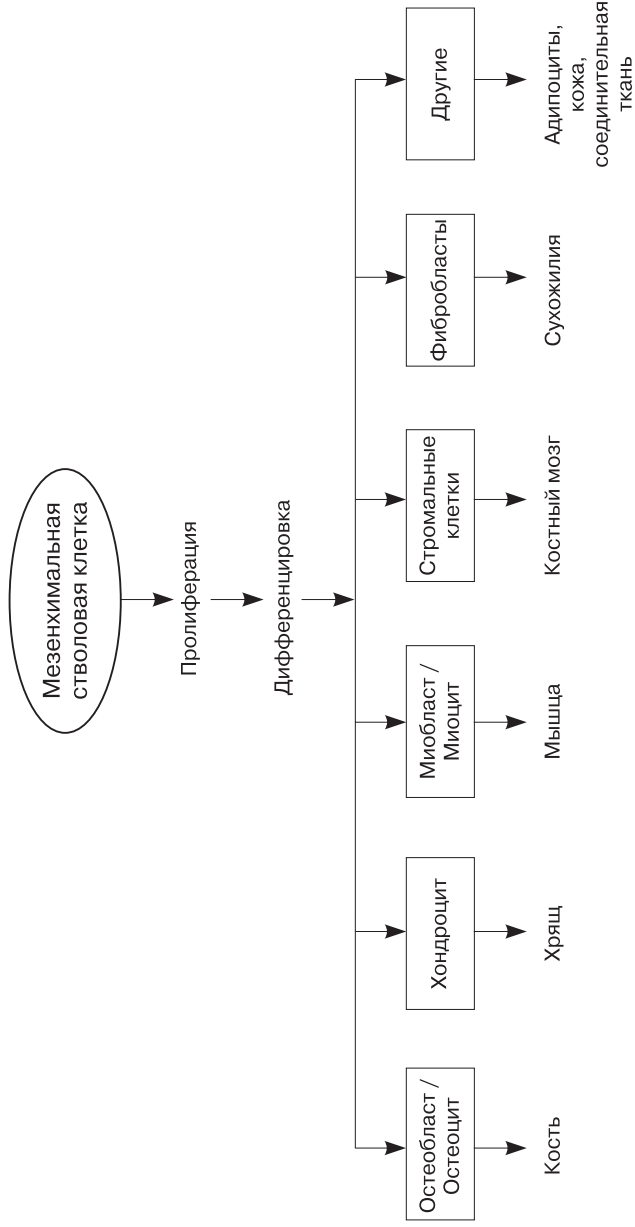


Рис. 2. Мезенхимный процесс (Sarlan A. I., 2004)

продуцировать специфичные для исходного фенотипа молекулы и начинают продуцировать другие (например, специфичные для костной ткани молекулы в остеогенной среде). Следует подчеркнуть, что эта экспериментальная ситуация может не соответствовать событиям, происходящим *in vivo*, хотя само существование феномена пластичности считается доказанным (Carlan A. I., 2004).

Не все МСК обладают пластичностью в равной мере. Чтобы доказать это, изолировали МСК из костного мозга трансгенных мышей линии *Immortomouse*. Анализ клонов из этих МСК, выращенных в различных фенотип-индуцирующих условиях, показал, что среди них были моно-, ди-, три- и мультипотентные клетки.

Потребность организма в МСК значительно изменяется с возрастом. Мезенхимальные ткани эмбриона формируются из предшественников, которые относительно плотно размещены в жидком экстраклеточном матриксе. По мере роста и развития организма клетки-предшественники дифференцируются, экстраклеточный матрикс уплотняется, соотношение клетки/матрикс в тканях изменяется от высокого до низкого и относительное количество МСК резко уменьшается. Этот процесс продолжается и в постнатальном периоде. Поэтому, если у ребенка до 5 лет с высоким содержанием МСК в организме поврежденная мезенхимальная ткань регенерирует, то в 20-летнем возрасте та же самая ткань репарируется в основном за счет образования фиброзного рубца.

В настоящее время невозможно определить титр МСК во всем организме, однако измерение числа колониеобразующих единиц в аспиратах костного мозга косвенно подтверждает уменьшение с возрастом числа МСК на один-два порядка. В этом заключается важное отличие МСК от ГСК, титр и регенеративный потенциал которых относительно постоянны от рождения до старости (Carlan A. I., 2004).

Из этого следует, что для регенеративной репарации мезенхимальных тканей требуется увеличение числа МСК в месте повреждения, что может быть достигнуто различными способами, в зависимости от возраста и состояния здоровья индивида. Разработка методов выделения, хранения, размножения, концентрации и доставки МСК в место повреждения составляет суть новой научной дисциплины — тканевой инженерии (Carlan A. I., 1999).

Трансплантированные в брюшную полость, МСК человека могут мигрировать через эндотелиальный барьер, несмотря на свои довольно крупные размеры, и приживляться в различных тканях, включая селезенку, тимус, сердце, мозг и легкое, не вызывая при этом иммунный ответ. Отсутствие иммунной реакции объясняется отсутствием у МСК экспрессии антигенов HLA класса II (Liechty K. W. [et al.], 2000).

Для выделения МСК используется панель мезенхимальных и немезенхимальных маркеров. МСК человека экспрессируют антигены CD29, CD44, CD90, CD105, CD106, SH2, SH3 и Stro-1 и не экспрессируют CD14, CD31, CD33, CD34, CD45 и CD62E. Экспрессия антигена Stro-1 отличается высокой вариабельностью. Дело, вероятно, в том, что культуры МСК содержат клетки различного уровня зрелости. Предполагается, что антиген остеопредшественников Stro-1 экспрессируется более зрелыми МСК.

В будущем МСК можно будет использовать для генной цитотерапии, так как трансдуцированные МСК стабильно экспрессируют транген при размножении *in vitro* и дифференцировке *in vivo* в течение нескольких месяцев (Lee K. [et al.], 2001).

Мультипотентные клетки-предшественники взрослого организма

Мультипотентные клетки-предшественники взрослого организма (*multipotent adult progenitor cells*, MAPC) — редкая популяция клеток костного мозга, идентифицированная в ходе исследований по селекции и культивированию МСК человека, которая, в отличие от большинства СК взрослых, пролиферирует без старения и обладает мультипотентным дифференцировочным потенциалом *in vitro* и *in vivo* (Adassi A., Verfaillie C. M., 2004).

MAPC также присутствует в костном мозге крыс и мышей. В отличие от МСК, MAPC не экспрессируют антигены МНС I класса, не экспрессируют или экспрессируют на очень низком уровне антиген CD44 и негативны по антигену CD105/SH2/эндоглин. В отличие от ГСК, MAPC не экспрессируют маркеры CD45, CD34 и c-Kit, но подобно ГСК, они экспрессируют антигены Thy1, AC133 (MAPC человека), SCA1 (MAPC мыши) — хотя и на низком уровне (Jiang Y. [et al.], 2002).

Как уже упоминалось, в отличие от большинства соматических СК, MAPC пролиферируют без признаков старения и содержат активную теломеразу. Длина теломер в этих клетках значительно превышает таковую в нейтрофилах и лимфоцитах и не отличается в MAPC молодых и старых доноров. Это позволяет предположить, что MAPC происходят из популяции клеток, содержащих активную теломеразу *in vivo* либо стабильно находящихся *in vivo* в покоящемся состоянии и не подвергающих свои теломеры укорочению. В них обнаруживаются цитогенетические аномалии, однако некоторые субпопуляции после замораживания и оттаивания становятся анеуплоидными.

MAPC человека, мыши и крысы могут дифференцироваться в типичные мезенхимальные клеточные линии, в том числе остео-

бласты, хондробласты, адипоциты и скелетные миобласты, а также могут быть индуцированы к дифференцировке в клетки с морфологическими, фенотипическими и функциональными признаками эндотелиальных клеток, гепатоцитов (Reyes M. [et al.], 2002) и клеток нейроэктодермальных линий (Jiang Y. [et al.], 2002).

Плюрипотентная природа МАРС строго доказана *in vitro* тем, что единичная МАРС может дифференцироваться в клетки мезодермального (мезенхимальные и немезенхимальные) и нейроэктодермального происхождения, а также в гепатоцитоподобные клетки человека (Schwartz R. J. [et al.], 1999) и крысы (Jiang Y. [et al.], 2002; Schwartz R. J. [et al.], 2002). При инъекции единичной МАРС в бластоцисту треть животных рождаются химерными, причем степень химеризма достигает 45 % (Jiang Y. [et al.], 2002).

МАРС, инъецированные в бластоцисту мыши, участвуют в формировании миокарда (Jiang Y. [et al.], 2002), однако кардиомиобласты выделить не удается. Другим авторам не удалось индуцировать дифференцировку МАРС в кардиомиобласты, даже когда их инъецировали в миокардиогенную область эмбриона. Можно индуцировать *in vitro* экспрессию белков мРНК GATA4 и Nkx2-5, которые являются ключевыми факторами кардиогенной дифференцировки, а также экспрессию мРНК и белков МНС. Но получить клетки с типичными функциональными характеристиками кардиомиобластов, такими как спонтанные ритмичные сокращения или пульсация, несмотря на экспрессию основных молекулярных маркеров кардиальной дифференцировки, по неизвестным пока причинам, все еще не получается (Adassi A., Verfaille C. M., 2004).

МАРС могут сливаться с другими клетками с образованием тетраплоидных и анеуплоидных клеток, что расширяет их дифференцировочный потенциал. Но, по всей вероятности, слияние не является единственным механизмом плюрипотентности МАРС, однако для окончательного решения этого вопроса требуются дополнительные исследования (Medvinsky A. [et al.], 2003).

Хотя попытки изолировать МАРС из циркулирующей или пуповинной крови были до сих пор безуспешными, эти клетки потенциально обладают терапевтической ценностью, так как, во-первых, их способность к перепрограммированию доказана и, во-вторых, они превосходят гемопоэтические СК по своим пролиферативным характеристикам. В связи с этим развиваются банки по хранению пуповинной крови, которая может эффективно использоваться в терапии многих заболеваний.

Учебное издание

Смолянинов Александр Борисович

КЛЕТОЧНЫЕ И ГЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В КАРДИОЛОГИИ

Руководство для врачей

Подписано в печать 14.04.2009. Печать офсетная. Формат 60 × 88¹/₁₆.
Гарнитура «Октава». Усл. печ. л. 11,0. Тираж 2000 экз. Заказ №

ООО Издательство «СпецЛит»
190005, Санкт-Петербург, Измайловский пр., 29
Тел./факс: (812) 251-16-94, 251-66-54
<http://www.speclit.spb.ru>

Отпечатано с диапозитивов ООО «Издательство „СпецЛит“»
в ГП ПО «Псковская областная типография»
180004, г. Псков, ул. Ротная, 34

ISBN 978-5-299-00405-2



9 785299 004052