

Анализ ассоциации ДНК-маркеров с риском развития церебрального инсульта у лиц из славянской популяции

В.И.Скворцова¹, И.М.Шетова¹, Н.А.Шамалов¹, Д.Ю.Тимофеев¹,
О.А.Борковская¹, Е.А.Бондаренко², П.А.Сломинский², С.А.Лимборская²

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, кафедра фундаментальной и клинической неврологии и нейрохирургии медико-биологического факультета, Москва (зав. кафедрой – чл.-кор. РАМН, проф. В.И.Скворцова);

²Институт молекулярной генетики РАН, отдел молекулярных основ генетики человека, Москва (зав. отделом – проф. С.А.Лимборская)

Проведено клинко-инструментальное и молекулярно-генетическое обследование 950 пациентов (славян из московской популяции) в остром периоде церебрального инсульта в целях выявления генетического риска его развития в славянской популяции. Контрольную группу составили славяне из Московской, Смоленской и Тверской областей ($n = 715$). Молекулярно-генетическое исследование было проведено в Институте молекулярной генетики РАН. Полиморфные аллели рассмотренных генотипов исследованы с использованием технологии ДНК-микрочипов. Выявлен ДНК-маркер rs1842993 в перичентромерной области хромосомы 7, ассоциированный с развитием кардиоэмболического инсульта.

Ключевые слова: кардиоэмболический инсульт, полногеномное сканирование, геном, ДНК-маркер, ДНК-микрочип

Association analysis of DNA-markers with risk of cerebral stroke in patients of Slavonic population

V.I.Skvortsova¹, I.M.Shetova¹, N.A.Shamalov¹, D.Yu.Timofeev¹,
O.A.Borkovskaya¹, E.A.Bondarenko², P.A.Slominsky², S.A.Limborskaya²

¹N.I.Pirogov Russian National Research Medical University, Department of Fundamental and Clinical Neurology and Neurosurgery of Medical-Biological Faculty, Moscow (Head of the Department – Corr. Member of RAMS, Prof. V.I.Skvortsova);

²Institute of Molecular Genetics of Russian Academy of Science, Department of Molecular Basis of Human Genetics, Moscow (Head of the Department – Prof. S.A.Limborskaya)

Clinical-instrumental and molecular-genetic investigation was performed in 950 patients (Slavs from Moscow population) with acute cerebral stroke in order to identify genetic risk for its formation in the Slavic population. The control group consisted of Slavs from Moscow, Smolensk and Tver regions ($n = 715$). Molecular-genetic study was conducted at the Institute of Molecular Genetics of Russian Academy of Sciences. Polymorphic alleles of the examined genotypes were investigated using DNA-microchips technology. There was identified a DNA-marker rs1842993 in the pericentromeric region of chromosome 7 associated with the risk of cardioembolic stroke.

Key words: cardioembolic stroke, genome wide association study, genome, DNA-marker, DNA-microchip

Для корреспонденции:

Шетова Ирма Мухамедовна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры фундаментальной и клинической неврологии и нейрохирургии медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова

Адрес: 119415 Москва, ул. Лобачевского, 42

Телефон: (495) 936-9938

E-mail: shetova@gmail.com

Статья поступила 21.06.2011 г., принята к печати 26.10.2011 г.

Церебральный инсульт в подавляющем большинстве случаев является полигенным синдромом, клиническим исходом большого числа клеточных, молекулярных и сосудистых процессов, ни один из которых по отдельности не способен вызвать острое нарушение мозгового кровообращения, что существенно затрудняет изучение этиологических аспектов этого заболевания.

Результаты близнецовых анализов и исследования семей больных с церебральным инсультом продемонстрировали,

что наряду с неблагоприятными условиями внешней среды и индивидуальными сосудистыми факторами риска существенный вклад в развитие инсульта вносят генетические факторы. В последние десятилетия был определен круг кандидатных генов, вовлеченных в развитие острой цереброваскулярной патологии.

Генотипирование и секвенирование появились более 20 лет назад, однако основная часть детерминант инсульта остается неизвестной, так как ранее исследования были ограничены изучением отдельных генов-кандидатов, детерминирующих такие известные факторы повышенного риска, как дислипидемия, гипертоническая болезнь, нарушение гемостаза, реакции воспаления, изменение уровня гомоцистеина [1].

В современной мировой практике для идентификации локусов, контролирующих сложные признаки, широко применяют полногеномное сканирование [2], которое представляет собой тотальный анализ генома здоровых и больных лиц и позволяет агностически выявить точечные мутации, называемые однонуклеотидными полиморфизмами (ОНП) и потенциально влияющие на экспрессию генов и функцию белков [1]. Преимущество метода заключается в возможности выявления ранее неизвестных генов, определяющих фенотип, связанный с инсультом, что было невозможно при кандидатном подходе [1, 3]. Частота ошибок для новых технологий генотипирования – менее 0,5%. [1].

Однако необходимо учитывать стратификацию популяции, так как ОНП и связанный с ним признак чаще встречаются среди лиц одинакового происхождения. Зарубежными учеными в независимых исследованиях при инсульте еще не было выявлено ни одного отдельного локуса, статистически значимого в двух и более изолированных популяциях [1], что еще раз подчеркивает сложность взаимодействия метаболических путей, вовлеченных в патогенез инсульта.

В 2010 г. были опубликованы результаты нескольких масштабных исследований по полногеномному сканированию у больных с церебральным инсультом.

Выявлено, что у лиц из китайской популяции Хань минорный аллель С ОНП rs11206510 на хромосоме 1p32 ассоциирован с повышенным уровнем ЛПНП и значимым риском развития церебрального инсульта, причем у мужчин моложе 55 лет и женщин моложе 50 лет был выявлен более высокий риск, чем в общей выборке [4].

Под эгидой International Stroke Genetics Consortium было изучено влияние на риск развития острого ишемического инсульта ОНП rs1906591 и rs10033464 на хромосоме 4q25, ассоциация которых с фибрилляцией предсердий была выявлена в предыдущих исследованиях [5, 6]. Результаты оказались неожиданными. Была подтверждена ассоциация rs1906591 с фибрилляцией предсердий, а также с ишемическим инсультом в целом и с кардиоэмболическим патогенетическим вариантом в частности. Значимой ассоциации rs10033464 с ишемическим инсультом выявлено не было, а связь с фибрилляцией предсердий оказалась незначительной, что противоречит ранее полученным данным [7].

Ассоциация ОНП rs12425791 и rs11833579 на хромосоме 12p13 с церебральным инсультом у лиц европейского происхождения, о которой писали несколькими годами ранее, не

была подтверждена результатами метаанализа, проведенного International Stroke Genetics Consortium и Wellcome Trust Case-Control Consortium 2. Вероятно, причиной этого является ложноположительный результат предыдущего метаанализа [8].

На кафедре фундаментальной и клинической неврологии и нейрохирургии РНИМУ им. Н.И.Пирогова совместно с отделом молекулярных основ генетики человека Института молекулярной генетики РАН впервые в Российской Федерации проведено полногеномное сканирование для определения индивидуального генетического риска развития церебрального инсульта у славян из московской популяции. Исследование проведено ретроспективно по типу «случай–контроль».

Цель настоящего исследования – выявить и изучить однонуклеотидные полиморфизмы, ассоциированные с инсультом, у лиц славянской национальности из московской популяции. Конечным продуктом нашей работы будет диагностическая тест-система для определения индивидуальной предрасположенности к инсульту у лиц славянской национальности, позволяющая проводить скрининг на наличие распространенных маркеров в рамках одного эксперимента [1]. Создание такой тест-системы значительно облегчит и ускорит задачу выявления лиц с высоким риском развития острого нарушения мозгового кровообращения и поможет оптимизировать объем лечебно-профилактических мероприятий в каждом конкретном случае.

Пациенты и методы

В основу работы положены результаты исследования 950 больных – 473 (49,8%) мужчин и 477 (50,2%) женщин, славян из московской популяции, в остром периоде церебрального инсульта, поступивших в неврологическую клинику ГКБ №31 кафедры фундаментальной и клинической неврологии и нейрохирургии РНИМУ им. Н.И.Пирогова.

Контрольную группу составили славяне из Московской, Тверской и Смоленской областей ($n = 715$).

Диагноз церебрального инсульта устанавливали на основании жалоб, данных анамнеза и объективного обследования больных, результатов лабораторных и инструментальных методов исследования. Патогенетический вариант инсульта устанавливали в соответствии с критериями TOAST [9] на основании данных дополнительных методов исследования магистральных артерий головы (дуплексного сканирования (ДС), транскраниального ДС, эмболодетекции), сердечно-сосудистой системы (ЭКГ, трансторакальной ЭхоКГ), консультации кардиолога; церебральной ангиографии, лабораторных данных.

Для объективизации тяжести состояния и оценки выраженности неврологического дефицита использовали шкалу инсульта Национального института здоровья США (NIH) [10]. Состояние пациентов оценивали при поступлении, на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки инсульта. Степень функционального восстановления нарушенных неврологических функций определяли с использованием модифицированной шкалы Рэнкина [11] на 1-й и 21-й день развития заболевания, а также индекса повседневной активности Бартел [12] на 21-й день после инсульта.

Всем пациентам при поступлении в стационар, а также на 5-е сутки заболевания выполняли компьютерную томографию (КТ) головного мозга на 64-срезовом компьютерном томографе Toshiba Aquilion 64. Для оценки состояния внутримозговых образований производили 14 срезов, параллельных орбито-ментальной линии. При исследовании супратенториальных структур толщина среза составляла 10 мм, при сканировании структур задней черепной ямки – 5 мм. На всех срезах оценивали прямые и косвенные патологические признаки (гипо- или гиперденсивные изменения), а также наличие или отсутствие ранних КТ-признаков ишемического повреждения головного мозга.

Ультразвуковое исследование брахиоцефальных артерий и сердца выполняли на 1–2-е сутки от развития церебрального инсульта. На аппарате ESAOTE Technos проводили дуплексное сканирование магистральных артерий головы: позвоночных, общей, внутренней и наружной сонных артерий. Оценивали наличие атеросклеротических бляшек, а также степень стеноза артерии. Выполняли транскраниальную доплерографию на аппарате БИОСС Ангиодин-2К, оценивали скорость кровотока по интра- и экстракраниальным отделам церебральных артерий.

В ходе ЭхоКГ на аппарате SIEMENS Acuson Sequoia проводили исследование камер и клапанного аппарата сердца на наличие тромботических масс для верификации кардиоэмболического инсульта.

Изучали распространенность основных факторов риска сосудистой патологии головного мозга у больных с церебральным инсультом: артериальной гипертензии, мерцательной аритмии, ишемической болезни сердца, перенесенных инфарктов миокарда, стенозов магистральных артерий головы, сахарного диабета, курения, ожирения.

Молекулярно-генетические исследования проводили на базе Института молекулярной генетики РАН (проф. С.А.Лимборская и сотр.).

Для молекулярно-генетического анализа были использованы препараты ДНК, полученные из 3 мл венозной крови. ДНК больных с ишемическим инсультом и контрольной выборки русской этнической группы выделяли с помощью AxyPrep™ Blood Genomic DNA Midiprep kit. Полиморфные аллели исследуемых генов были изучены с помощью технологии ДНК-микрочипов. Для этого были использованы микрочипы HUMANCYTOSNP12 v.2, позволяющие одновременно тестировать 301 000 однонуклеотидных полиморфных сайтов. Первичные данные были обработаны в пакете программ «Genome Studio» для определения генотипов по каждому полиморфному сайту. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы HELIX STUDIO для проведения полногеномного ассоциативного анализа (GWAS) и программы GraphPad InStat, с помощью которой проверяли соответствие наблюдаемого распределения частот генотипов формуле Харди–Вайнберга и величину относительного риска (ОР). Достоверность различий частот аллелей и генотипов полиморфных локусов в сравниваемых группах определяли с помощью критерия хи-квадрат. Сравнение частот генотипов проводили с использованием таблиц сопряжения 2×3 , а частот аллелей и объединенных генотипов – таблиц сопряжения 2×2 . Достоверным считали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Из 950 пациентов с церебральным инсультом ишемический инсульт был диагностирован у 780 (82,1%), геморрагический – у 170 (17,9%). Средний возраст больных составил $67,9 \pm 11,6$ года. Впервые развившийся церебральный инсульт выявлен у 729 (76,7%) пациентов, повторный инсульт – у 221 (23,3%).

У пациентов с геморрагическим инсультом в 146 (85,9%) случаях имели место внутримозговые гематомы, в 24 (14,1%) случаях – спонтанное субарахноидальное кровоизлияние. Из 146 пациентов с внутримозговыми гематомами в 46 (31,5%) случаях отмечено поражение правого полушария головного мозга, в 74 (43,5%) – левого полушария, гематомы в двух полушариях диагностированы в 1 (0,6%) случае, гематомы в стволовых структурах и мозжечке – в 25 (14,7%) случаях.

При анализе распределения патогенетических вариантов у пациентов с ишемическим инсультом атеротромботический вариант верифицирован у 338 (43,3%) больных, кардиоэмболический патогенетический вариант – у 298 (38,2%), лакунарный – у 73 (9,4%) и неустановленный – у 71 (9,1%) пациента.

Среди больных с ишемическим инсультом в 608 (78,0%) случаях имело место нарушение мозгового кровообращения в каротидной системе, из них в 344 (56,6%) случаях отмечено поражение левого, в 255 (41,9%) – правого полушария головного мозга, в 9 (1,5%) случаях – поражение двух полушарий головного мозга. У 172 (22,1%) больных выявлено нарушение мозгового кровообращения в вертебрально-базилярной системе.

Летальный исход наблюдали у 180 (23,1%) пациентов с ишемическим инсультом и у 43 (45,3%) пациентов с геморрагическим инсультом.

Распространенность основных факторов риска церебрального инсульта представлена в таблице.

При анализе распределения пациентов по тяжести состояния по шкале NIH выявлено преобладание больных с тяжелым состоянием ($\text{NIH} \geq 14$ баллов) преимущественно на 1–3-и сутки от развития заболевания (что соответствует максимальной выраженности отека головного мозга в остром периоде инсульта). Подобная тенденция отмечена также при анализе тяжести состояния у больных с геморрагическим инсультом.

Для проведения полногеномного ассоциативного анализа на данном этапе исследования были отобраны больные с кардиоэмболическим инсультом, в выборку были включены 290 больных с этой формой инсульта и 450 человек из

Таблица. Частота встречаемости факторов риска у пациентов с церебральным инсультом

Факторы риска	Частота встречаемости, %	
	ишемический инсульт	геморрагический инсульт
Артериальная гипертензия	97,6	95,9
Ишемическая болезнь сердца	75,0	68,0
Инфаркт миокарда в анамнезе	28,5	25,9
Мерцательная аритмия	36,0	19,4
Ожирение	40,5	41,8
Сахарный диабет	25,8	22,4
Курение	37,4	35,9

случайных популяционных выборок. Данные по сканированию генома больных с инсультом и лиц из популяционных выборок были получены с использованием микрочипа HUMANCYTOSNP12 v.2, что позволило проанализировать все образцы ДНК на панели из 301 000 однонуклеотидных полиморфных ДНК-маркеров.

Полученную базу данных по частоте ОНП у больных с инсультом и здоровых лиц просканировали на три показателя: частоту минорного аллеля по всем ОНП (с исключением из дальнейшего анализа маркеров с частотой в объединенной выборке менее 5%); число типированных у каждого обследованного ДНК-маркеров (с исключением из дальнейшего анализа лиц, у которых было типировано менее 90% ДНК-маркеров); соответствие распределения частот аллелей и генотипов уравнению Харди–Вайнберга (с исключением из дальнейшего анализа ДНК-маркеров с отклонением ожидаемого и наблюдаемого распределения частот генотипов с вероятностью более 0,1 по критерию хи-квадрат в случайной популяционной выборке). В итоге из дальнейшего анализа было исключено 1400 ДНК-маркеров. Поскольку средний уровень типирования превысил 99%, на этом этапе из проведения дальнейшего анализа были исключены всего 2 человека. Скорее всего, в этих случаях имели место ошибки генотипирования, что, вероятно, связано с качеством препаратов ДНК: типировано менее 60% всех анализируемых ДНК-маркеров.

Полученные данные по спектру аллельных вариантов были обработаны по методу главных компонент (Principal Component Analysis – PCA) для выявления уровня генетической гетерогенности выборок и исключения из дальнейшего анализа лиц, сильно отличающихся по величине первой и второй главных компонент от основной группы изучаемых лиц.

На рисунке приведены данные PCA для первой и второй главных компонент и видно, что некоторые исследуемые лица значительно отличаются от основной части выборки по величине первой и второй главных компонент (величина различий между крайними точками достигала 0,45 по первой главной компоненте и 0,3 по второй главной компоненте). Эти лица ($n = 45$) были исключены из анализируемой выборки, т.е. была сформирована достаточно гомогенная выборка для проведения ассоциативного анализа, в которой различия по величине первой и второй главных компонент между крайними точками не превышали 0,1.

В рамках ассоциативного анализа сравнивали частоты аллелей по каждому из ОНП ДНК-маркеров с использованием критерия хи-квадрат с учетом поправок на множественность сравнений. Величина критерия хи-квадрат была рассчитана для каждого ОНП и сопоставлена с ожидаемой величиной хи-квадрат при предположении совпадения частоты анализируемого аллеля в сравниваемых выборках. При использованном числе маркеров (300 000 ОНП) статистически достоверными являются различия в частоте аллелей в выборке больных с инсультом и случайной популяционной выборке, для которых p не превышает 10^{-8} . Для визуализации полученных результатов был использован метод «Manhattan plot», при котором величину десятичного логарифма вероятности откладывают на графике в соответствии с положением ДНК-маркера.

В итоге был выявлен один достоверно ассоциированный с риском развития кардиоэмболического инсульта ДНК-маркер – rs1842993 в перичентромерной области хромосомы 7 ($p = 1,5 \times 10^{-8}$).

Распределение аллелей и генотипов по ДНК-маркеру rs1842993 было проанализировано во всей выборке боль-

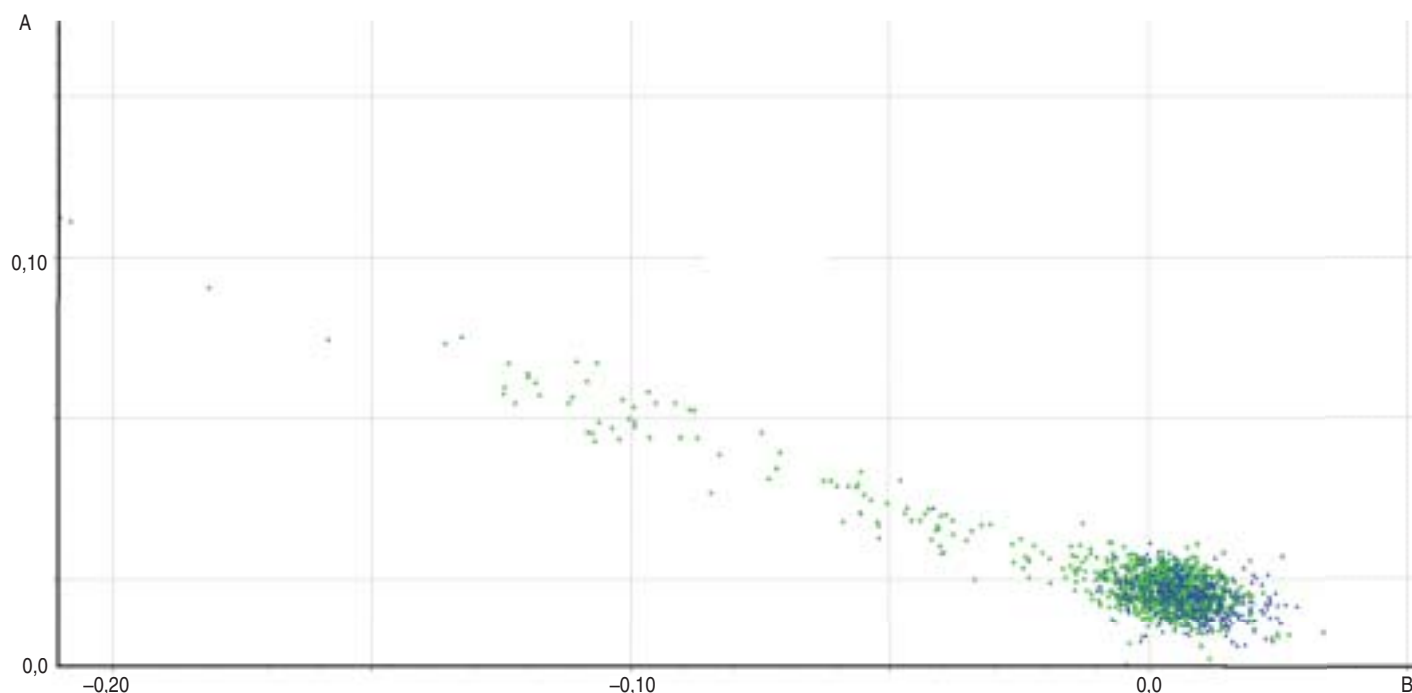


Рисунок. Анализ данных полногеномного сканирования больных с острым инсультом (зеленые точки) и лиц из популяционной выборки (синие треугольники) методом главных компонент (PCA). Приведено распределение анализируемых лиц в пространстве первой (А) и второй (В) главных компонент. Популяционная выборка формирует компактную зону, тогда как в выборке больных с острым инсультом виден шлейф по второй главной компоненте.

ных с острым инсультом. Установлено, что у таких пациентов частота редкого аллеля повышена (33,1 и 24,7% соответственно, $\chi^2 = 18,237$; Df = 1). У носителей более редкого аллеля риск развития инсульта также достоверно повышен: OR = 1,512; 95% ДИ = 1,252–1,825.

Таким образом, при проведении полногеномного сканирования на данном этапе исследования был выявлен ДНК-маркер rs1842993 в перичентромерной области хромосомы 7, ассоциированный с развитием кардиоэмболического инсульта.

Для уточнения полученных результатов необходимо продолжить проведение полногеномного сканирования на расширенных независимых выборках больных и проанализировать дополнительные ДНК-маркеры, расположенные в области ОНП rs1842993. Важно также междисциплинарно изучить влияние выявленного ОНП rs1842993 на метаболические пути, задействованные в патогенезе кардиоэмболического инсульта.

Наше исследование, направленное на поиск детерминант инсульта, продолжается. Полученные данные будут использованы в разработке диагностической тест-системы для определения индивидуальной генетической предрасположенности к инсульту у лиц из славянской популяции, что откроет новые возможности для быстрой и своевременной диагностики и индивидуализированной профилактики церебрального инсульта, а также определит основные составляющие патогенетического лечения.

Исследование выполнено в рамках приоритетного направления развития «Профилактика, диагностика и лечение заболеваний, связанных с нарушением кровообращения и гипоксией» Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова.

Литература

1. Lanktree M.B., Dichgans M., Hegele R.A. Advances in genomic analysis of stroke. What have we learned and where are we headed? // Stroke. 2010. V.41. №4. P.825–832.
2. Аульченко Ю.С. Разработка и применение методов полногеномного анализа генетических ассоциаций сложных признаков: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.02.07. Новосибирск, 2010.
3. Лимборская С.А., Сломинский П.А., Скворцова В.И. и др. Полногеномное сканирование в изучении риска развития церебрального инсульта // Журн. неврол. и психиатр. 2009. №12. С.3–7.
4. Chengqi X., Fan W., Binbin W. et al. Minor allele C of chromosome 1p32 single nucleotide polymorphism rs11206510 confers risk of ischemic stroke in the chinese Han population // Stroke. 2010. V.41. P.1587–1592.
5. Gudbjartsson D.F., Arnar D.O., Helgadóttir A. et al. Variants conferring risk of atrial fibrillation on chromosome 4q25 // Nature. 2007. V.448. P.353–357.
6. Kaab S., Darbar D., van Noord C. et al. Large scale replication and metaanalysis of variants on chromosome 4q25 associated with atrial fibrillation // Eur. Heart J. 2009. V.30. P.813–819.
7. Lemmens R., Buyschaert I., Geelen V. et al. The association of the 4q25 susceptibility variant for atrial fibrillation with stroke is limited to stroke of cardioembolic etiology // Stroke. 2010. V.41. №9. P.1850–1857.
8. Rosand J., Meschia J.F., Singleton A.B. Failure to validate association between 12p13 variants and ischemic stroke // New Eng. J. Med. 2010. V.362. №16. P.1547–1550.
9. Adams H.P. Jr., Bendixen B.H., Kappelle L.J. et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment // Stroke. 1993. V.24. №1. P.35–41.
10. Brott T., Adams H.P. Jr., Olinger C.P. et al. Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale // Stroke. 1989. V.20. P.964–970.
11. Rankin J. Cerebral vascular accidents in patients over the age of 60: II. Prognosis // Scott. Med. J. 1957. №2. P.200–215.
12. Mahoney E.L., Barthel D. Functional evaluation: the Barthel Index // Md State Med. J. 1965. V.14. P.56–61.

Информация об авторах:

Скворцова Вероника Игоревна, член-корреспондент РАМН, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой фундаментальной и клинической неврологии и нейрохирургии медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 119415, Москва, ул. Лобачевского, 42
Телефон: (495) 936-9938
E-mail: vskvor@mail.com

Лимборская Светлана Андреевна, доктор биологических наук, профессор, заведующая отделом молекулярных основ генетики человека Института молекулярной генетики РАН
Адрес: 123182, Москва, пл. акад. И.В.Курчатова, 2
Телефон: (499) 196-0210
E-mail: limbor@img.ras.ru

Шамалов Николай Анатольевич, кандидат медицинских наук, доцент кафедры фундаментальной и клинической неврологии и нейрохирургии медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 119415, Москва, ул. Лобачевского, 42
Телефон: (495) 936-9933
E-mail: shamalovn@gmail.com

Сломинский Петр Андреевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной генетики наследственных болезней отдела молекулярных основ генетики человека Института молекулярной генетики РАН
Адрес: 123182, Москва, пл. акад. И.В.Курчатова, 2
Телефон: (499) 196-0210
E-mail: slomin@img.ras.ru

Бондаренко Елена Александровна, младший научный сотрудник отдела молекулярных основ генетики человека Института молекулярной генетики РАН
Адрес: 123182, Москва, пл. акад. И.В.Курчатова, 2
Телефон: (499) 196-0210
E-mail: el.bondarenko@gmail.com

Тимофеев Дмитрий Юрьевич, соискатель кафедры фундаментальной и клинической неврологии и нейрохирургии медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 119415, Москва, ул. Лобачевского, 42
Телефон: (495) 936-9933
E-mail: podolskij@list.ru

Борковская Ольга Александровна, студентка Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 119415, Москва, ул. Лобачевского, 42
Телефон: (495) 936-9933
E-mail: borkovskaya.o.a@gmail.com