

© Коллектив авторов. 2009

ОБРАЗОВАНИЕ КОСТИ И ОЧАГОВ ЭКТОПИЧЕСКОГО КРОВЕТВОРЕНИЯ ПРИ СОВМЕСТНОМ ПРИМЕНЕНИИ КАЛЬЦИЕВЫХ НОСИТЕЛЕЙ С КЛЕТКАМИ КОСТНОГО МОЗГА ИЛИ С КУЛЬТИВИРОВАННЫМИ МЕЗЕНХИМНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ

И.Н. Шипунова, Д.А. Свинаярева, Т.В. Петрова, М.М. Ряшенцев, В.Е. Мамонов, Н.И. Дризе

УРАМН «Гематологический научный центр РАМН», Москва

Изучалась возможность использования кальциевых носителей в сочетании с костным мозгом или с подслоем прилипающих клеток из длительных культур костного мозга, содержащим мезенхимные стволовые клетки, для индукции роста костной ткани у мышей. На модели эктопической трансплантации под кожу и капсулу почки мышей протестированы два носителя — Osteoset™ и Prodens®. Показано, что Prodens и, менее эффективно, Osteoset могут быть использованы для индукции роста кости в сочетании с клетками костного мозга или, более эффективно, с культивированными мезенхимными стромальными клетками. Большое влияние на процесс новообразования кости оказывают такие факторы, как место трансплантации и предварительная индукция костной дифференцировки используемых стромальных клеток.

Ключевые слова: кальциевые носители, костный мозг, длительная культура костного мозга, образование кости.

Formation of Bone and Foci of Ectopic Hemopoiesis at Joint Application of Calcium Scaffolds with Bone Marrow Cells or Cultivated Mesenchymal Stromal Cells

I.N. Shipunova, D.A. Svinaryova, T.V. Petrova, M.M. Ryashentsev, V.E. Mamonov, N.I. Drize

Potential application of calcium scaffolds in combination with either bone marrow or adherent cell layers from long-term cultures containing mesenchymal stem cell for the induction of bone tissue growth was studied in mice. Two scaffolds, i.e. Osteoset® and Prodens® were tested on the model of ectopic grafting under the skin and renal capsule of mice. It was demonstrated that Prodens® and less effectively Osteoset® could be used for the induction of bone growth in combination with bone marrow cells but even more effectively in combination with cultivated mesenchymal stromal cells. Both the site of transplantation and preliminary induction of bone differentiation of stromal cells exerted a great influence upon the process of bone formation.

Key words: calcium scaffolds, bone marrow, long-term bone marrow culture, bone formation.

Устранение массивных дефектов кости остается сложной задачей реконструктивной хирургии. Применение для этой цели деминерализованного костного матрикса, способного индуцировать рост костной ткани, выявило различные ограничения и вызвало разноречивые оценки [6, 7]. В некоторых случаях используют аутологичную кость, однако данный метод часто связан с трудностью и болезненностью процедуры извлечения кости, с высоким риском инфекций, геморрагий, повреждения нервов и утраты функций [4]. Избежать этих проблем можно, используя носители из синтетических и натуральных биоматериалов, которые в сочетании с клетками костного мозга или с выделенной популяцией мезенхимных стромальных клеток (МСК) индуцировали бы пролиферацию, миграцию и дифференцировку клеток кости [3]. МСК можно выделить в условиях культивирования клеток костного мозга в пластиковой посуде. Они способны дифференцироваться в клетки костной, хрящевой, жировой ткани [11].

Комбинация МСК с различными носителями может значительно улучшить восстановление костной ткани при обширных повреждениях кости. Одним из наиболее эффективных биоматериалов оказался очищенный от органических веществ натуральный скелет кораллов. Использование его в сочетании с МСК позволило полностью заместить большой костный дефект у овцы [10]. Понятно, что применение кораллов в широкой практике затруднено из-за сложности очистки и неоднородности исходного материала. Показано, что использование в качестве носителя вещества кости в сочетании с МСК дает субоптимальные результаты [2]. Предпринимались также попытки использовать керамические носители, такие как гидроксиапатит — трикальций фосфат, однако выяснилось, что в чистом виде он затрудняет рост новой кости и не имеет достаточных поддерживающих механических свойств [8].

Целью нашего исследования было определить наиболее пригодный для роста МСК и одновре-

менно применяемый в восстановительной хирургии биоматериал.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследовано два носителя — Osteoset® и Prodens®, оба фирмы «Wright Medical Technology, Inc.». Osteoset представляет собой специально обработанные кристаллы сульфата кальция, которые деградируют в организме в течение 6 нед. Prodens является композитным материалом, на 93% состоящим из сульфата кальция и на 7% — из гидроксипатита. Носители тестировали как без добавления клеток, так и помещая на них взвесь клеток костного мозга или слой прилипающих клеток (СПК) из длительной культуры костного мозга (ДККМ) [5]. СПК содержит мезенхимные стволовые клетки, обладающие самоподдержанием и способные при ретрансплантации образовывать полноценное кроветворное микроокружение, МСК и их потомки, представленные всеми линиями мезенхимной дифференцировки [1].

В качестве модельной системы, позволяющей оценить пригодность биоматериалов, использовали трансплантацию носителей с клетками и без клеток под кожу и под капсулу почки мышей. Помещение анализируемых гранул под кожу моделировало образование костной ткани в месте с ограниченным кровоснабжением, имплантация гранул под капсулу почки позволяла оценить индукцию костной ткани при интенсивном кровоснабжении. Известно, что при помещении костномозгового цилиндра под капсулу почки сингенных мышей через 6 нед образуется очаг эктопического кроветворения с развитой стромой костного мозга и костной раковиной. В очаге эктопического кроветворения строма принадлежит донору, а кроветворение — реципиенту [1]. Помещение взвеси клеток костного мозга под капсулу почки на нитроцеллюлозных фильтрах не индуцирует образование очага.

В работе использовали самок мышей-гибридов (СВА × С57В16)F1 в возрасте 3–4 мес к началу экспериментов и беспородных кроликов массой 2,5–3 кг.

Для проверки эффективности адсорбции клеток на носителях использовали МСК кролика. МСК получали из костного мозга кролика, аспирированного в физиологический раствор, содержащий 500 ЕД гепарина. МСК культивировали в среде α MEM с 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Nuclo»), 2 мМ L-глутамин (ICN), 100 ед/мл пенициллина («Ферейн»), 50 мг/мл стрептомицина («Ферейн»). После формирования конфлюэнтного монослоя клетки снимали 0,25% раствором трипсина, приготовленного на 0,02% EDTA (ICN) в физиологическом растворе («Sigma»), и рассаживали из расчета 4×10^3 клеток на 1 см² поверхности дна флакона. Носители помещали в ячейки 96-ячеечной платы и смачивали питательной средой в течение 5 мин или 24 ч до поме-

щения на них МСК 1–3-го пассажа в количестве 50 000, 100 000 или 200 000 клеток в 200 мкл среды. Через 2 и 4 ч подсчитывали число клеток, не попавших в гранулу носителя. В качестве контроля использовали посадку клеток без носителя.

Носители со взвесью клеток костного мозга сингенных животных и без клеток помещали под кожу (Osteoset и Prodens) и под капсулу почки (Prodens) мышей. Osteoset не тестировали под капсулой почки из-за большого размера гранул. В качестве контроля использовали взвесь клеток костного мозга на синтетических фильтрах («Millipore») с диаметром пор 0,45 мкм, которые помещали под кожу и под капсулу почки. Мышей оперировали, как описано И.Л. Чертковым и соавт. [1], под наркозом (Авертин, Aldrich).

Длительную культуру костного мозга Декстеровского типа получали стандартным способом [5]. Использовали полностью сформированные подслои от 4–6-недельных культур. Для получения взвеси из СПК флаконы с культурой декантировали, дважды промывали раствором Версепа и добавляли 0,025% раствор трипсина (ICN). Действие трипсина останавливали добавлением среды с 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Полученную суспензию клеток осаждали центрифугированием при 1000 об/мин.

Чтобы установить, влияет ли предварительная индукция остеогенной дифференцировки на рост костной ткани, в течение последних 2 нед культивирования к ДККМ при каждой смене среды добавляли 10% концентрата среды следующего состава: 1 мкМ дексаметазона, 1,5 мМ аскорбат-2-фосфата, 30 мМ NaH₂PO₄ (все фирмы «Sigma»). Клетки взвеси костного мозга, СПК и взвеси СПК помещали на фильтр или на пресмоченный в течение 10–120 мин в питательной среде носитель на 2–3 ч.

Носители, любезно предоставленные ООО «IKVAA», с соответствующими клетками и без них помещали в организм на 6 нед, затем трансплантаты извлекали, фиксировали в растворе Буэна, приготавливали срезы толщиной 5 мкм, окрашивали их по Маллори для выявления разных компонентов соединительной ткани и изучали с помощью светового микроскопа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование эффективности адсорбции клеток на носителях до трансплантации показало, что МСК высокоэффективно прикрепляются на носителях уже за 2 ч (рис. 1). Очевидно, что этого времени достаточно для кокультивирования клеток с носителем.

При изучении свойств Prodens выявлено, что при помещении этого носителя как под капсулу почки, так и под кожу вокруг гранулы образуется тонкая соединительно-тканная капсула, встречаются кровеносные сосуды и области тяжелой коллапса (рис. 2, а, б). Костная ткань и участки крове-

творения отсутствует. Гранулы Osteoset под кожей растворяются, и на их месте формируются соединительно-тканые образования, аналогичные описанным выше (рис. 2, в).

При помещении взвеси клеток костного мозга на фильтре под кожу и под капсулу почки костной ткани не образуется (рис. 3). Отсутствие костной ткани наблюдается и в случае имплантации взвеси клеток костного мозга на грануле Osteoset под кожу. При использовании Osteoset выявлено, что широкая зона вокруг гранулы заполнена коллагеновыми волокнами, многочисленными фибробластами и кровеносными сосудами. Взвесь клеток костного мозга, помещенная на гранулу Prodens, под кожей также не образует костной ткани, на срезах видны соединительно-тканная капсула, коллагеновые тяжи и фибробласты (рис. 4, а). В то же время при помещении гранулы Prodens со взвесью клеток костного мозга под капсулу почки, помимо соединительно-тканной капсулы, образующейся вокруг гранулы, наблюдаются участки костной ткани и костномозгового кровотока. На рис. 4 (б) видны ткань почки, коллагеновые тяжи, образующаяся костная ткань и участок с кровеносными клетками.

Таким образом, один из двух исследованных носителей — Prodens в соответствующем месте (в данном эксперименте — только под капсулой почки) стимулирует образование костной ткани даже из предварительно разобоченных клеток костного мозга.

Известно, что разобочение клеток костного мозга и превращение их в одноклеточные суспензии ингибирует рост стромальных предшественников [1]. Поэтому в следующей серии экспериментов на носители помещали СПК из ДККМ без предварительного превращения их в суспензию. Контролем служила имплантация неразобоченных СПК без носителя под капсулу почки. В этом случае под капсулой почки формировался очаг эктопического кровотока с выраженной костной раковиной. На рис. 5 (а) отчетливо видны участки костной ткани и полноценный очаг кровотока с жировыми клетками, дифференцирующимися кровеносными клетками всех ростков кровотока, включая мегакарициты. При добавлении в ДККМ среды для остеогенной дифференцировки и последующей имплантации таких СПК без носителя под капсулу почки также образовывались очаги с хорошо выраженной костной тканью, однако кровотока в таких трансплантах практически отсутствовало. На рис. 5 (б) видны ткань почки и значительная по размеру костная раковина. Наблюдалось очень небольшое скопление кровеносных клеток в районе кости. Кроме того, СПК на фильтре под кожей формировали плотные участки коллагеновых волокон и участки кровотока (рис. 5, в). Таким образом, изучение контрольных препаратов показало, что неразобоченные СПК длительных культур костного мозга

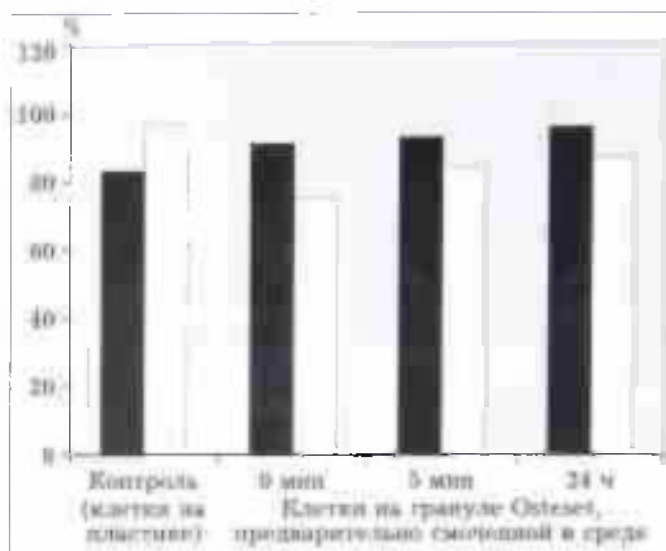


Рис. 1. Эффективность адсорбции мезенхимных стромальных клеток кролика на грануле Osteoset в 96-ячеечных платах в течение 2 ч (темные столбики) и 4 ч (светлые столбики).

По оси ординат — процент адсорбированных на носителе клеток. В контроле — процент клеток, снятых с ячейки без носителя (сумма клеток, оставшихся во взвеси и прилипших к подложке).

способны без носителей образовывать костную ткань и очаг эктопического кровотока.

При помещении под кожу неразобоченных СПК на Prodens (рис. 5, г) или на Osteoset (рис. 5, з) происходило образование костной ткани — выявлялись участки костной раковины и кровотока. При помещении СПК на Prodens под капсулу почки образовывалось гораздо больше участков костной ткани, чем при имплантации СПК без носителя (рис. 5, д). Очевидно, что биологический носитель стимулировал ее образование.

МСК чаще всего используются в виде взвеси клеток, после снятия их со дна флаконов с помощью трипсина. В связи с этим мы провели эксперименты с превращением СПК в суспензию клеток. Выявлено, что СПК в виде одноклеточной взвеси на грануле Prodens под кожей также образует участки костной ткани. На рис. 5 (е) видны костная раковина, остатки гранулы и очаги кровотока. При трансплантации под кожу СПК после остеогенной дифференцировки на Prodens (рис. 5, ж) или Osteoset наблюдались значительный рост костной ткани и образование эктопических очагов кровотока. Видимо, предварительная дифференцировка СПК в остеогенном направлении усиливает образование костной ткани.

В описанных экспериментах образование костной раковины под капсулой почки происходило значительно интенсивнее, чем под кожей. Вероятно, это связано с тем, что почка хорошо кровоснабжается, в образующийся очаг быстрее прорастают кровеносные сосуды, поэтому питание и дыхание ткани осуществляется более интенсивно.

Совокупность полученных результатов представлена в таблице.

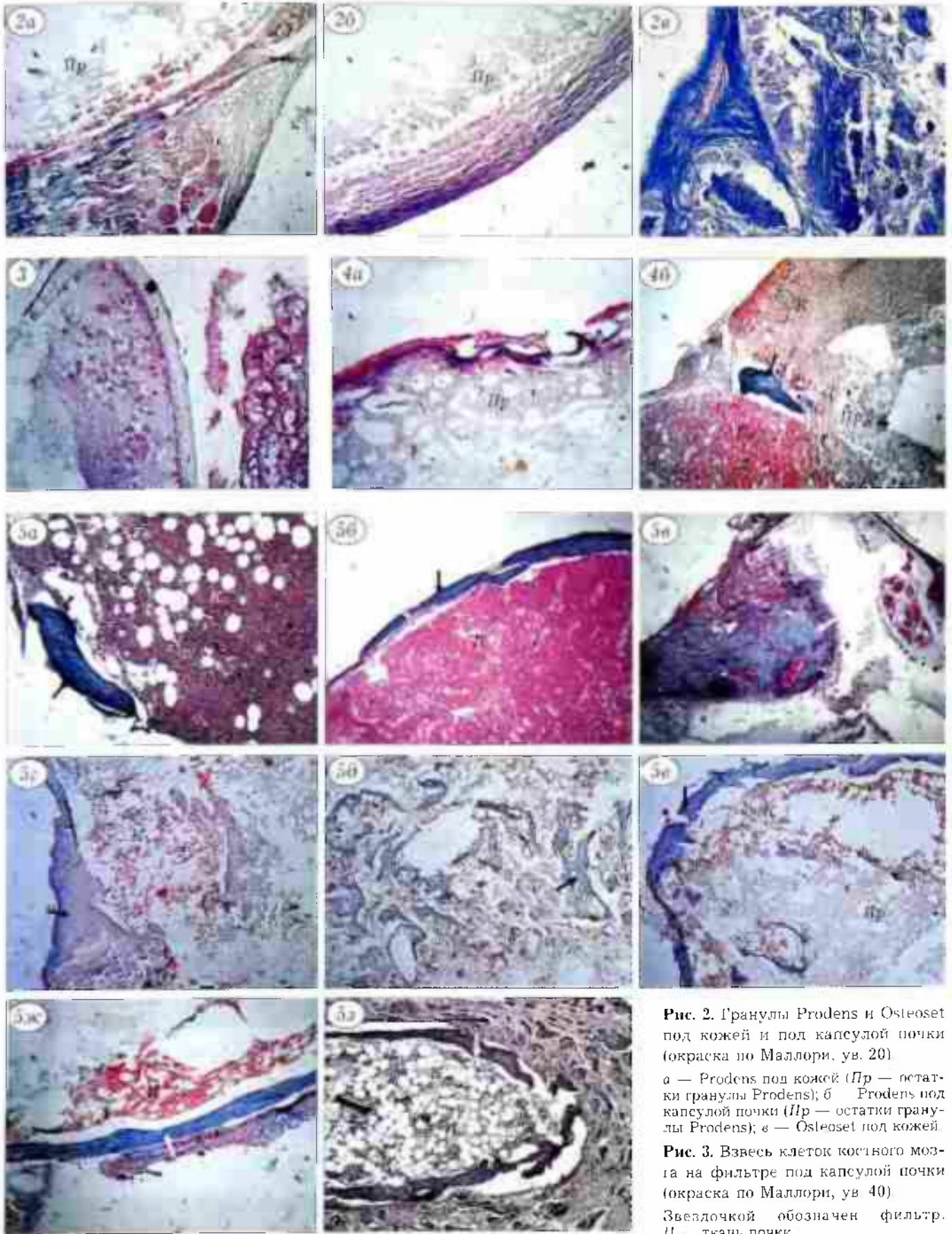


Рис. 2. Гранулы Prodens и Osteoset под кожей и под капсулой почки (окраска по Маллори, ув. 20)
 а — Prodens под кожей (Пр — остатки гранулы Prodens); б — Prodens под капсулой почки (Пр — остатки гранулы Prodens); в — Osteoset под кожей

Рис. 3. Взвесь клеток костного мозга на фильтре под капсулой почки (окраска по Маллори, ув. 40)
 Звездочкой обозначен фильтр. П — ткань почки.

Рис. 4. Взвесь клеток костного мозга на грануле Prodens, трансплантированная под кожу и под капсулу почки (окраска по Маллори, ув. 20.)
 а — под кожей (Пр — остатки гранулы); б - под капсулой почки (стрелкой обозначена костная ткань, Пр — остатки гранулы, П — ткань почки, К — кровеносная ткань).

Формирование костной и кроветворной ткани при использовании кальциевых носителей и клосток костного мозга

Носители и клетки	Под кожей			Под капсулой почки		
	остео-генез	гемато-поэз	фиброз	остео-генез	гемато-поэз	фиброз
Кальциевые носители без клеток:						
Osteoset	-	-	++	НП	НП	НП
Prodens	-	-	++	-	-	++
Взвесь костного мозга (ВКМ) с кальциевыми носителями:						
ВКМ + Osteoset	-	-	++	НП	НП	НП
ВКМ + Prodens	-	-	+++	++	++	++
ВКМ + фильтр	-	-	+	-	-	+
Слой прилипающих клеток (СПК) длительной культуры костного мозга с кальциевыми носителями						
СПК + Osteoset	++	++	++	НП	НП	НП
СПК + Prodens	++	++	+	+++	+++	-
СПК без носителей	++	++	+	++	+++	-
Взвесь слоя прилипающих клеток (ВСПК) длительной культуры костного мозга с кальциевыми носителями:						
ВСПК + Osteoset	-	-	++	НП	НП	НП
ВСПК + Prodens	+-	++	+	НП	НП	НП
ВСПК без носителей	НП	НП	НП	НП	НП	НП
Взвесь дифференцированной в направлении остеогенеза длительной культуры костного мозга (ДифДКМ) с кальциевыми носителями						
ДифДКМ + Osteoset	+-	++	++	НП	НП	НП
ДифДКМ + Prodens	++++	+	+	НП	НП	НП
ДифДКМ без носителей	НП	НП	НП	+++	+	-

Обозначения: «-» — отсутствует; «+» — слабо выражен; «++» — умеренно выражен; «+++» — хорошо выражен; «++++» — резко выражен, НП — не проводилось

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследованные носители сами по себе не стимулируют рост костной ткани и, в отличие от специально обработанного деминерализованного костного матрикса [9], не являются индукторами образования костной ткани и очагов эктопического кроветворения. Предварительные результаты исследования по использованию носителей показали, что для индукции и поддержания образования костной ткани большое значение имеют состав биоматериала, его свойства и место имплантации.

При помещении МСК на гранулы биоматериала уже через 2 ч более 80% клеток ассоциируются с субстратом и могут быть перенесены вместе с носителем в область трансплантации.

Так как после разобщения клеток костного мозга и превращения их в одноклеточную суспензию очаг эктопического кроветворения не образуется, было важно выяснить, может ли использование носителя клеток стимулировать рост костной ткани. Оказалось, что гранулы Prodens в сочетании со взвесью костного мозга стимулируют рост костной ткани и образование очагов кроветворения только под капсулой почки. Место имплантации биоматериала с клетками имеет большое значение: необходимо достаточное кровоснабжение и питание ткани, которое под капсулой почки существенно лучше, чем под кожей. Это следует иметь в виду при использова-

Рис. 5. Слой прилипающих клеток (СПК) без носителей и на различных биоматериалах, трансплантированный под кожу и под капсулу почки

а — под капсулой почки без носителя (окраска по Маллори, ув 20); стрелкой обозначена костная ткань, *К* — кроветворная ткань. *б* — СПК после индукции дифференцировки под капсулой почки без носителя (окраска по Маллори, ув 16); стрелкой обозначена костная ткань, *П* — ткань почки, *з* — СПК на фильтре под кожей (окраска по Маллори, ув 16); стрелкой обозначена костная ткань; *г* — СПК на грануле Prodens под кожей (окраска по Маллори, ув 10); стрелкой обозначена костная ткань, *К* — кроветворная ткань, *д* — СПК на грануле Prodens под капсулой почки (окраска по Маллори, ув 10); стрелкой обозначена костная ткань, *е* — СПК в виде взвеси на грануле Prodens под кожей (окраска по Маллори, ув 10); стрелкой обозначена костная ткань, *К* — кроветворная ткань. *Пр* — остатки гранулы Prodens; *ж* — СПК после индукции дифференцировки на грануле Prodens под кожей (окраска по Маллори, ув 10); стрелкой обозначена костная ткань, *К* — кроветворная ткань; *з* — СПК на грануле Osteoset под кожей (окраска по Маллори, ув 10); стрелкой обозначена костная ткань, *К* — кроветворная ткань

нии носителей в комбинации с кровью или костным мозгом при ортопедических операциях.

При использовании МСК для замещения костных и хрящевых дефектов встает вопрос, надо ли индуцировать их специфическую дифференцировку перед трансплантацией. Дифференцировка стволовых клеток приводит как к снижению их пролиферативного потенциала, так и к появлению зрелых клеток-потомков — остеоцитов. Следовательно, в повообразованной из индуцированных клеток костной ткани может уменьшиться число клеток, способных к обновлению пула взрослых остеоцитов, что может сказаться на поддержании функционирования костной ткани. В настоящей работе остеогенную дифференцировку индуцировали в ДККМ. Стимулированные к дифференцировке СПК при трансплантации давали обширные очаги костеобразования, а участков кроветворения практически не наблюдалось. Очевидно, дифференцировка в сторону образования костной ткани либо исчерпывает пролиферативный и дифференцировочный потенциал МСК и они не в состоянии произвести весь набор линий стромального микроокружения, необходимый для нормального поддержания кроветворения, либо вещества, индуцирующие костную дифференцировку, ингибируют дифференцировку других ростков без истощения свойств МСК. Учитывая это, при использовании МСК для восполнения больших костных дефектов стоит сочетать недифференцированные МСК с МСК, индуцированными к дифференцировке. В этом случае, с одной стороны, костная ткань будет образовываться более эффективно, а с другой, трансплантированные клетки сохраняют свой пролиферативный потенциал и будут способны к поддержанию необходимого для нормального функционирования количества зрелых клеток.

С помощью биоматериала можно преодолеть разобщение стромальных клеток. Из результатов исследования видно, что клеточные суспензии и трипсинозированные СПК образуют костную ткань и очаги эктопического кроветворения при помещении их на Prodens. Следовательно, МСК могут быть трансплантированы как после снятия их трипсином и превращения в одноклеточную суспензию, так и пластом при снятии со дна флакона с помощью скрепера.

Суммируя полученные данные, можно утверждать, что Prodens и, менее эффективно, Osteoset пригодны для использования в качестве носителя для трансплантации МСК. Очевидно, для интенсификации роста костной ткани необходимо хотя бы

частично проводить дифференцировку МСК в остеогенном направлении перед трансплантацией. Желательно снимать МСК со дна флаконов, не разобщая их, т.е. не трипсином, а с помощью скреперов, и трансплантировать на носитель кусочки клеточных пластов.

Результаты проведенного исследования планируются подтвердить в экспериментах на кроликах, получая одновременно культуры МСК и СПК. После этого можно будет рассматривать возможность использования этих данных в клинике. Предстоит исследовать также биоматериалы другого состава. Учитывая сообщения в мировой литературе о наиболее успешном использовании кораллов, целесообразно изучать носители, наиболее близкие по составу к этим естественным кальциевым скелетам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чертков И.Л., Гуревич О.А. Стволовая кроветворная клетка и ее микроокружение. — М., 1984.
2. Bruder S.P., Kraus K.Y., Goldberg V.M., Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects //J. Bone Jt Surg. — 1998. — Vol. 80A — P. 985–996.
3. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells //J. Orthop. Res — 1991. — N 9 — P. 641–650.
4. Damien C.J., Parsons J.R. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications //J. Appl. Biomater. — 1991. — N 2 — P. 187–208.
5. Dexter T.M., Allen T.D., Lajtha L.G. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro //J. Cell Physiol. — 1977. — Vol. 91. — P. 335–344.
6. Dinopoulos H.T., Giannoudis P.V. Safety and efficacy of use of demineralised bone matrix in orthopaedic and trauma surgery //Expert. Opin. Drug Saf. — 2006. — N 5. — P. 847–866.
7. Drosos G.I., Kazakos K.I., Kouzoumpasis P., Veretas D.A. Safety and efficacy of commercially available demineralised bone matrix preparations: a critical review of clinical studies //Injury. — 2007. — Vol. 38, Suppl 4 — P. S13–S21.
8. Grundel R.E., Chapman M.W., Yee T., Moore D.C. Autogenic bone marrow and porous biphasic calcium phosphate ceramic for segmental bone defects in the canine ulna //Clin. Orthop. — 1991. — N 266 — P. 244–258.
9. Gurevitch O., Kurkalli B.G., Prigozhina T. et al. Reconstruction of cartilage, bone, and hematopoietic microenvironment with demineralized bone matrix and bone marrow cells //Stem Cells — 2003 — Vol. 21 — P. 588–597.
10. Petite H., Viuteau V., Bensaid W. et al. Tissue-engineered bone regeneration //Nat. Biotechnol. — 2000 — Vol. 18. — P. 959–963.
11. Prockop D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues //Science — 1997. — Vol. 276 — P. 71–74.

Сведения об авторах: Шипунова (Нифонтова) И.Н. — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории физиологии кроветворения ГНЦ; Свиная Д.А. — канд. биол. наук, науч. сотр. той же лаборатории; Петрова Т.В. — аспирант той же лаборатории; Ряшенцев М.М. — канд. мед. наук, старший науч. сотр. отделения реконструктивно-восстановительной хирургии для больных гемофилией ГНЦ; Мамонтов В.Е. — канд. мед. наук, науч. руководитель того же отделения; Дризе Н.И. — профессор, доктор биол. наук, зав. лабораторией физиологии кроветворения ГНЦ.

Для контактов: Шипунова (Нифонтова) Ирина Николаевна. 125167, Москва, Новозыковский пр., дом 4а, ГНЦ РАМН, лаборатория физиологии кроветворения. Тел.: (495) 612-35-21, Факс: (495) 614-92-69. E-mail: iranifontova@yandex.ru