

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 575.113+597.113:597

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИТЕЛЛОГЕНИНА В КРОВИ МЕЛКОЧЕШУЙНОЙ КРАСНОПЕРКИ-УГАЙ *TRIBOLODON BRANDTII*

**А. М. Андреева¹, Р. А. Федоров¹, И. П. Рябцева¹, Н. Е. Ламаш^{2,3},
А. Э. Филиппова¹**

¹ Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН, Борок

² Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток

³ Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

В сыворотке крови преднерестовых самок мелкочешуйной красноперки-угай из Японского моря идентифицировали белок вителлогенин с помощью методов протеомики – 2D-SDS-электрофореза и последующей масс-спектрометрии MALDI в тандемном режиме. Поиск гомологов в базе данных NCBI по спектрам фрагментации анализируемого белка позволил идентифицировать вителлогенин красноперки-угай с высоким критерием достоверности. Результаты работы показали возможность успешной идентификации вителлогенина по его С-концевому фрагменту, не входящему в состав консервативных мотивов. Полученные результаты предполагают использование методов протеомики для мониторинга состояния водоемов.

Ключевые слова: мелкочешуйная красноперка-угай; кровь; вителлогенин; электрофорез; масс-спектрометрия.

**A. M. Andreeva, R. A. Fyodorov, I. P. Ryabtseva, N. E. Lamash,
A. E. Philippova. IDENTIFICATION OF VITELLOGENIN IN THE BLOOD
SERUM OF THE PACIFIC REDFIN *TRIBOLODON BRANDTII***

We identified the protein vitellogenin in the blood serum of the pre-spawning females of *Tribolodon brandtii* from the Sea of Japan using proteomic methods – 2d-SDS-electrophoresis and MALDI mass spectrometry in the tandem mode. The search for homologues in the DB NCBI by the spectra of fragmentation of the analyzed protein made it possible to identify the vitellogenin of *Tribolodon brandtii* with the high «score» criterion. The results showed vitellogenin can be successfully identified by its C-terminal region, which is not part of conservative motifs. The results suggest proteomic methods can be used to monitor waterbodies.

Key words: *Tribolodon brandtii*; blood; vitellogenin; electrophoresis; mass spectrometry.

Введение

Вителлогенин входит в состав семейства белков, транспортирующих липиды и содержащих в структуре консервативный домен «lipid transport domain»; структурную формулу этого димерного белка можно представить как $Vg = \text{lipid} ([Lv-Pv])_2$, где Vg – белок вителлогенин, Lv – белок липовителлин, Pv – белок фосвитин [Anderson et al., 1998; Babin et al., 1999; Wang et al., 2000]. Белок синтезируется в печени, после чего поступает в кровь в виде Ca-фосфолипопротеина. Известно, что он отсутствует в крови самцов и имеется в незначительных количествах в крови самок; после эстрадиоловой индукции появляется у самцов и резко нарастает в крови у самок [Нейфах, Тимофеева, 1978]. Данным обстоятельством обусловлен интерес к вителлогенину как к индикатору загрязнений водоемов, так как некоторые сбрасываемые в водоемы соединения имитируют действие эстрогенов и приводят к феминизации популяций рыб, например, эндокринные дизрупторы (EDs) с эстрогенными свойствами [Sonnenschein, Soto, 1998].

Наиболее доступными методами идентификации вителлогенина рыб являются иммунологические методы, основанные на специфическом взаимодействии антител и антигенов, – иммуноблоттинг, иммуноферментные методы. Однако такой подход чаще всего выявляет не один, а несколько белков – претендентов на роль вителлогенина, часть которых связывает антитела специфично, а часть – неспецифически. Проблема заключается в сложности оценки специфичности такого связывания и трактовки полученных результатов не только в случае вителлогенина [Johanning, Specker, 1995; Matsubara et al., 1995, 1999; Finn et al., 2000; Shved et al., 2010], но и других белков [Mohida et al., 1994; Bengtén et al., 2002; Vesely et al., 2006; Liu et al., 2007; Ганжа, 2011].

В сыворотке крови самок рыб с гонадами 4-й стадии зрелости вителлогенин обнаруживается в составе так называемой «половой фракции», локализованной на диск-электрофореграмме между гамма-2- и альфа-2-глобулинами: часть белков этой фракции расположена между гамма-2- и гамма-1-глобулинами, другая часть – между гамма-1- и альфа-2-глобулинами [Andreeva, 2001]. Ввиду множественности «половой фракции» мы предлагаем использовать для идентификации вителлогенина методы протеомики – 2D-SDS-электрофорез с последующей масс-спектрометрией MALDI и поиском гомологов в базе данных NCBI. Поскольку аминокислотная последовательность вителлогенина содержит консервативные мо-

тивы, такой подход дает шанс успешной идентификации белка с использованием баз данных, интегрирующих информацию о величинах молекулярных масс продуктов трипсинолиза вителлогенинов у видов (позвоночных, в их числе и рыб) с расшифрованным геномом. Надежная идентификация вителлогенина в крови рыб дает возможность адекватной оценки состояния водной экосистемы в отношении загрязняющих ее соединений с эстрогенными свойствами.

Целью данной работы является идентификация белка вителлогенина в сыворотке крови самок мелкочешуйной красноперки-угай с помощью масс-спектрометрии MALDI.

Материалы и методы

Объекты исследования. В качестве объекта исследования использовали самок мелкочешуйной красноперки-угай *Tribolodon brandtii*, отловленных в период апреля-мая в Японском море, залив Восток. В работе использовали сыворотку крови самок с гонадами 4-й стадии зрелости. Отбор крови проводили по протоколу [Андреева и др., 2007].

Методы исследования. Применяли фракционирование белков сыворотки крови в ПААГ и масс-спектрометрию MALDI (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация). Масс-спектрометрию выполняли специалисты ИБМХ РАН. Белки сыворотки крови разделяли в двумерном SDS-электрофорезе [Laemmli, 1970]. Низкий уровень «шумов» продуктов трипсинолиза белков из биологических жидкостей рыб на масс-спектрах позволил в первом направлении электрофореза использовать диск-электрофорез вместо изофокусирования [Andreeva, 2012]. В первом направлении проводили диск-электрофорез в 9%-м ПААГ; в лунку геля вносили 2 мкл сыворотки, содержащей 0,1–0,2 мг белка, в 4 мкл 40%-й сахарозы. Презэлектрофорез проводили в режиме 2,5 мА, основной электрофорез – 3,0 мА на лунку, при напряжении около 160 В и 300 В соответственно. Далее вырезали полоску геля с анализируемыми белками сыворотки и вымачивали ее в течение 15 минут в денатурирующей смеси, содержащей 0,0625 М трис-HCl (pH 6,8), 2%-й SDS, 10%-ю сахарозу и 5%-й β-МЭ. По истечении времени полоску переносили на блок SDS-геля, заливали концентрирующим гелем и полимеризовали. Каждый образец дублировали внесением в лунку 40 мкл обработанной денатурирующей смесью биологической жидкости, содержащей около 26 мкг белка. Презэлектрофорез проводили в режиме 50 мА, основной электро-

форез – 60 мА на камеру, при напряжении около 80 и 100 В соответственно. После электрофореза гели фиксировали 70%-м изопропанолом и окрашивали Coomassie R-250. Из геля вырезали окрашенные красителем участки, содержащие белки, для последующего их трипсинолиза.

Продукты трипсинолиза анализировали с помощью масс-спектрометрии. Масс-спектры m/z получали на тандемном MALDI-времяпролетно-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенный УФ-лазером (Nd) в режиме положительных ионов в линейной моде, с использованием рефлектрона и в тандемном режиме [Гоуфман и др., 2006]. Масс-спектры обрабатывали с помощью программного пакета FlexAnalysis 2.4 (Bruker Daltonics, Германия). При помощи программы Mascot (опция «пептидный фингер-принт», www.matrixscience.com) проводили поиск гомологов в базе данных NCBI среди белков всех организмов. Кандидатные белки, имеющие параметр достоверности score >83 в базе данных NCBI, считали определенными надежно ($p < 0,05$). Спектры фрагментации m/z отдельных пептидов получали в тандемном режиме, с использованием программного обеспечения Biotoools 3.0 (Bruker Daltonics, Германия) проводили поиск по m/z .

Результаты и обсуждение

В диск-электрофорезе сыворотки крови самок рыб выявлена множественная «половая фракция» (рис. 1: а).

Для масс-спектрометрии с дорожки «половой фракции» на 2D-SDS-геле были отобраны несколько субъединиц, в их числе субъединица с ММ около 26 кДа (рис. 1: б). На примере данной субъединицы рассмотрим принцип идентификации белка вителлогенина. Для идентификации белка получили масс-спектры продуктов его трипсинолиза (рис. 2). Далее проводили поиск гомологов в NCBI. Проведенный по масс-спектрам m/z поиск не дал приемлемых результатов. Для субъединицы с ММ 26 кДа кандидатные последовательности были представлены в основном библиотеками кДНК, сконструированными на основе популяций мРНК трески *Gadus morhua* (score 80), черного толстоголова *Pimephales promelas* (score 79) и других рыб (Mascot EST vertebrates).

Далее поиск гомологов был продолжен по m/z пептидной карты белка. Для фрагмента с молекулярной массой 974,4966 Da обнаружено 50 кандидатных белков, из которых 23 – вителлогенины рыб с критерием достоверности score выше 117: 1) vitellogenin precursor [*Pimephales*

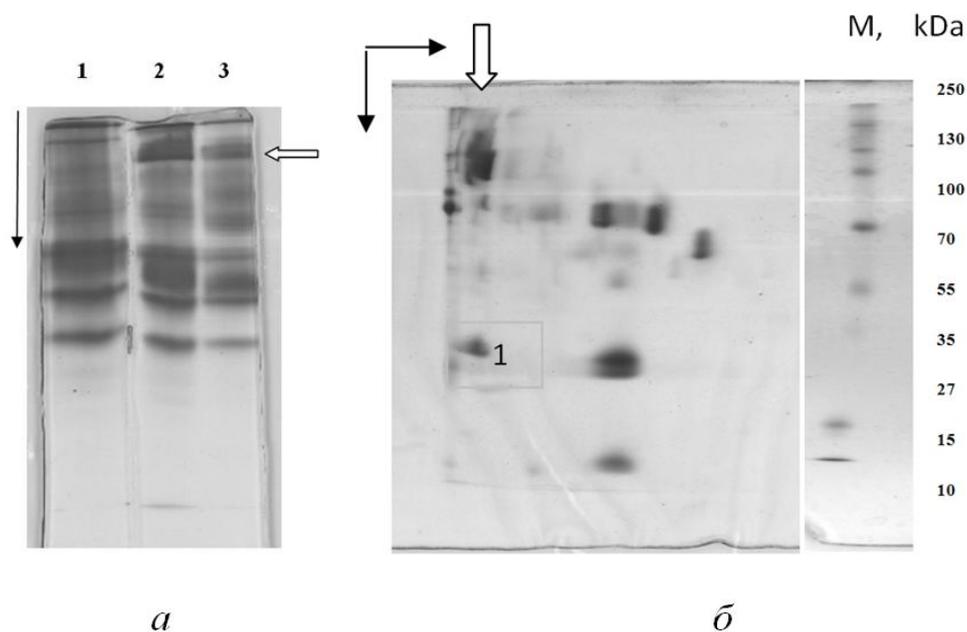


Рис. 1. Фракционирование белков сыворотки крови красноперки-угай в диск- (а) и SDS-электрофорезе (б)

а – сыворотка крови самцов (1) и самок (2, 3); вертикальная стрелка указывает направление электрофореза, горизонтальная светлая стрелка указывает на локализацию «половой фракции» в крови самок; б – электрофореграмма белков сыворотки самки красноперки-угай; горизонтальная стрелка указывает направление диск-, вертикальная – SDS-электрофореза, светлая стрелка указывает «дорожку» «половой фракции», цифра 1 обозначает локализацию субъединицы с молекулярной массой около 26 кДа; М – маркер молекулярной массы Fermentas, молекулярные массы маркерных белков представлены в килодальтонах (kDa)

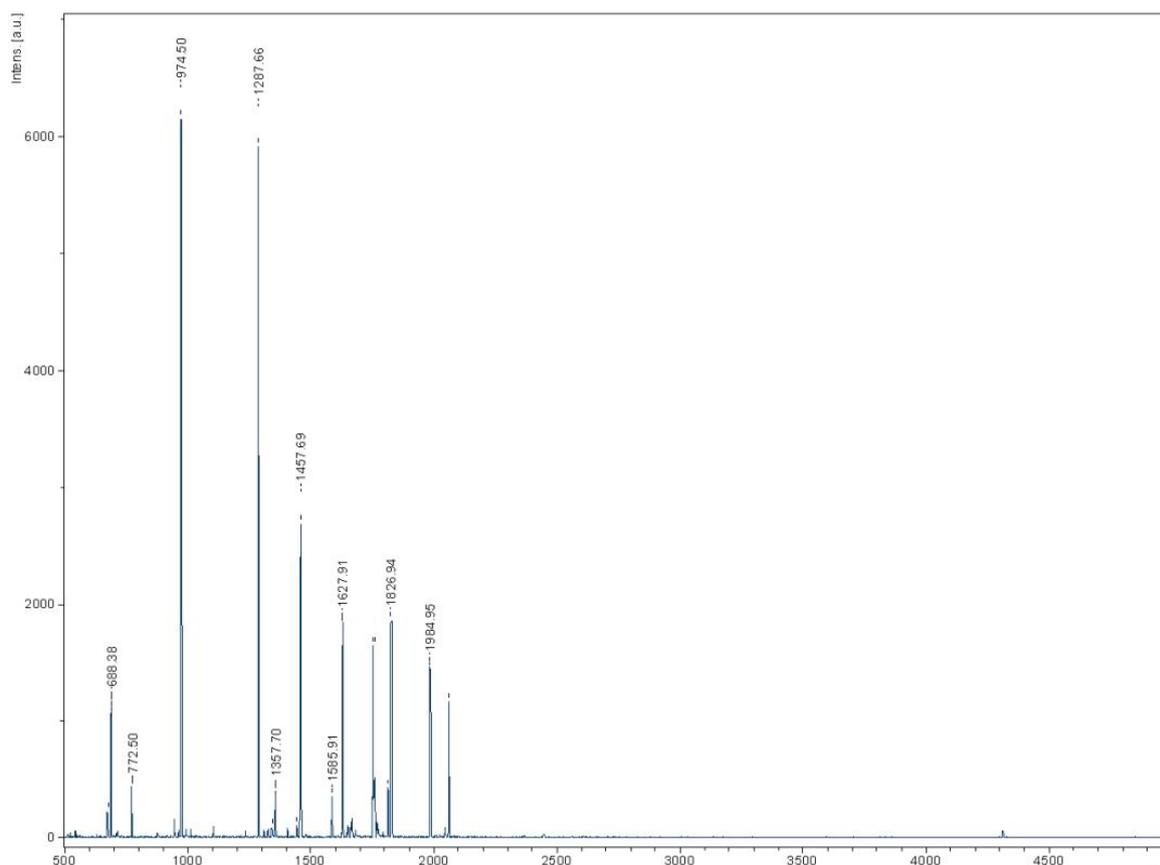


Рис. 2. Масс-спектр продуктов трипсинолиза субъединицы с молекулярной массой около 26 кДа. По оси абсцисс – отношение величины молекулярной массы к заряду продуктов трипсинолиза белков (m/z), по оси ординат – интенсивность сигнала

promelas] (score 312); 2) vitellogenin [*Cyprinus carpio*] (score 308); vitellogenin [*Carassius auratus*] (score 289); vitellogenin 1 precursor [*Danio rerio*] (score 268); vitellogenin 7 precursor [*Danio rerio*] (score 262); vitellogenin B1 [*Cirrhinus molitorella*] (score 247); и др. (Mascot NCBI). На рис. 3 представлена аминокислотная последовательность одного из этих кандидатных белков – Vg карпа.

Аминокислотная последовательность вителлогенина карпа из 1353 остатков на 4 % перекрывалась с исследуемым белком красноперки-угай (рис. 3). Для пептида K.LLGYQLAAYFDKPTAR.V score была максимальной (табл.).

Аминокислотная последовательность вителлогенина *Cyprinus carpio* и его пептидов, совпадающих с пептидами белка красноперки-угай

Start-End	Mr (calc)	Score	Peptide
433-445	1440,7105		R. EVVMLGYGSMIAR. H + oxidation (M)
433-445	1456,7054		R. EVVMLGYGSMIAR. H+ 2 oxidation (M)
1035-1050	1811,9880	14	R. LLKQISLIDEETPEGK. A
1174-1189	1825,9726	129	K. LLGYQLAAYFDKPTAR. V
1236-1248	1286,6619	76	K. AEAGVLGEFFAAR. L
1249-1255	973,4869	66	R. LELEWER. L

(<http://www.matrixscience.com/>)

Таким образом, субъединица с мол. массой около 26 кДа представляет собой С-концевой фрагмент вителлогенина красноперки-угай. Анализ аминокислотной последовательности Vg в DB CDD NCBI показал, что этот фрагмент лежит вне области консервативных мотивов.

Выводы

Результаты работы показали успешную идентификацию вителлогенина красноперки-угай с использованием баз данных по белкам рыб с секвенированным геномом с высоким критерием достоверности. Успешная идентификация прошла с использованием MALDI в тандемном режиме. Важным выводом работы является возможность идентификации вителлогенина по неконсервативному фрагменту. Полученные результаты предполагают возможность использования подходов протеомики для оценки состояния водоемов по маркерным белкам.

Авторы выражают искреннюю благодарность к. б. н. М. В. Серебряковой (ИБМХ РАН) за масс-спектрометрический анализ белков.

1 MRAVVLALTV ALVASQQINL VPEFTPGKTY VYNYEALLLG GLPHEGLARA
 51 GIKVNSKVHL SAVTENTFLM KLMDPLIY EY AGIWPKDPFV PATKLTSALA
 101 AQLQIPIKFE YANGVVGKVF APAGVSPVL NLHRGILNLI QLNKKTQNI
 151 YELQEAGAQQ VCRTHYVISE DPKANHITVT KSKDLSHCQE RIMKDVGLAY
 201 TERCAECTER IKSLIETATY NYIMKPASAG VLITEATVEE VHQFSFNEI
 251 HGAAQMEAKQ TLAPEVEIEKT LVVPEIKADYL ARGSLQYEFA TEILQTPHIL
 301 MKISDAPAQI IEVLKHLVAN NVAMVHEDAP LKFVQLIQLL RVSTLENIEA
 351 IWAQFKDKPA YRRWLLDALP SVGTPVVIKF IKEKFLAGEL TLPEFIQALV
 401 VALQMTADL DTIQLTASLA MHEKIAKMPA LREVVM LGYG SMIA RHCVAV
 451 PTCSAELLRP IHEIAAEATS KNDIREITLA LKVLGNAGHP ASLKPIMKLL
 501 PGLRTAASSL PLRVQVDAIL ALRNIAKKEP KLVQPVALQL VLDRALHPEV
 551 RMVACIVLFE SKPSVALVSS LAGALKTETN MHVVSFAYSH IKSLTRITAP
 601 DMAAVAGAAN VAIKLM SRKL DRLSFRFSRA LQLDYYHTPL MIGAAGSAYM
 651 INDAATILPR AVVAKARAYL AGAAADVLEI GVRTEGIQEA LLKSPA ADES
 701 VDRITKIKRT LRALANWKDL PNDQPLASVY IKFLGQEVAF VKIDKTIIBE
 751 AIPIVTGPKE RELKAALKA LQBGIAWQYA KPLLA AEVRR ILPTAVGVPM
 801 ELSLYTAAVA AASVNVKATI TPPLPEBIET MTLEQLKKT D VQLQAEARPS
 851 IALQTFAVMG VNTALIQAAV MARGKIRTIA PVKVAARADI LKGNKYVEAL
 901 PVEVPEHIAT LSFETLAVVR NIEEPTAERT VPLVPELAVQ NSQTHSDYLS
 951 SENQDEVVPR APAPFDKTL C LAVPYIEIKG CVELHSHNAA FIRNDPLYI
 1001 IGQHSARATV ARAEGPAVER LELEVQVGPR AAERLLKQIS LIDEETPEGK
 1051 AFLKKEIL ETEDKNRPVS SESRSSSSSR SNRSSSSSSS SSSSSSSSSS
 1101 MSSSRVSKTA TIMEPFRKEH KD RYLAPHGA SKKVVSGSSA SFFERI QKQA
 1151 KFLGNAVPPV FAVIARAVRV DHKLLGYQLA AYFDKPTARV QIVVSSIAEN
 1201 DNLKICVDGA LLSKHKVTAK LAWGPECQQY AVTAKAEAGV LGEFPAARLE
 1251 LEWERLPITV TTYAKM SKH IYMAAFQAGF RLERVMNSEK EIELTLALPN
 1301 QRSLNVIFRI PEMT LSRMGI HLPYAI PINP DGSLSIQIDE DILSWIQRHI
 1351 KEE

Рис. 3. Аминокислотная последовательность вителлогенина карпа. Mascot, Protein View: gi|151558991|vitellogenin [Cyprinus carpio]. Жирным шрифтом выделены перекрывающиеся пептиды карпа и красноперки-угай.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 13-04-00427-а).

Литература

Андреева А. М., Чалов Ю. П., Рябцева И. П. Особенности распределения белков плазмы между специализированными компартментами внутренней среды на примере карпа *Cyprinus carpio* (L.) // Журн. эвол. биохимии и физиологии. 2007. Т. 43, № 6. С. 501–504.

Ганжа Е. В. Некоторые показатели иммунитета триплоидной радужной форели *Oncorhynchus mykiss* при её культивировании в условиях южного Вьетнама // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб: материалы международной конференции (Борок, 2011 г.). Москва, 2011. С. 90–95.

Гоуфман Е. И., Мошковский С. А., Тихонова О. В., Лохов П. Г., Згода В. Г., Серебрякова М. В., Торопыгин И. Ю., Власова М. А., Арчаков А. И., Сафарова М. Р., Макаров О. В. Протеомное исследование термостабильной фракции сыворотки пациентов с различными опухолями с применением двумерного электрофореза // Биохимия. 2006. Т. 71, вып. 4. С. 445–453.

Нейфах А. А., Тимофеева М. Я. Проблемы регуляции в молекулярной биологии развития. М.: Наука, 1978. 307 с.

Anderson T. A., Levitt D. G., Banaszak L. J. The structural basis of lipid interactions in lipovitellin, a soluble lipoprotein // Structure. 1998. Vol. 6 (7). P. 895–909. doi:10.1016/S0969-2126(98)00091-4.

Андреева А. М. Serum gamma-globulins of the fishes // Journal of Ichthyology. 2001. V. 41 (6). P. 464–470. Original Russian text is published in Voprosy Ikhtology, 2001, V. 41 (4). P. 550–556.

Андреева А. М. Structural and functional organization of fish blood proteins. N. Y.: Nova Science Publisher, 2012, 188 p.

Babin P. J., Bogert J., Kooiman F. P., Van Marrewijk W. J. A., Van der Horst D. J. Apolipoprotein II/I, apolipoprotein B, vitellogenin, and microsomal triglyceride transfer protein genes are derived from a common ancestor // J. Mol. Evol. 1999. Vol. 49, N 150. P. 1–9.

Bengtén E., Quiniou S. M., Stuge T. B., Katagiri T., Miller N. W., Clem L. W., Warr G. W., Wilson M. The IgH locus of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*, contains multiple constant region gene sequences: different genes encode heavy chains of membrane and secreted IgD // J. Immunol. 2002. Vol. 169 (5). P. 2488–2497.

Finn R. N., Fyhn H. J., Norberg B., Munholland J. and Reith M. Oocyte hydration as a key feature in the adaptive evolution of teleost fishes to seawater // Proc. 6 Int. Symp. Reprod. Physiol. Fish. 2000. P. 289–291.

Johanning K. M., Specker J. L. Characterization of yolk proteins during oocyte development of tilapia, *Oreochromis mossambicus* // *Comp. Biochem. Physiol.* 1995. Vol. 112B. P. 177–189.

Laemmler U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // *Nature (Gr. Brit.)*. 1970. Vol. 227 (4), N 5259. P. 680–685.

Liu J. L., Anderson G. P., Goldman E. R. Isolation of anti-toxin single domain antibodies from a semi-synthetic spiny dogfish shark display library // *BMC Biotechnology*. 2007. 7:78. doi:10.1186/1472-6750-7-78.

Matsubara T., Adachi S., Ijiri S. and Yamauchi K. Change of lipovitellin during in vitro oocyte maturation in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Sci.* 1995. 61:478–481.

Matsubara T., Ohkubo N., Andoh T., Sullivan C. V., Hara A. Two forms of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of barfin flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost spawning pelagic eggs // *Dev. Biol.* 1999. Vol. 213 (1). P. 18–32.

Mohida K., Lou Y.-H., Harat A., Yamauchi K. Physical biochemical properties of IgM from a teleost fish // *Immunology*. 1994, 83. P. 675–680.

Shved N. A., Syasiana I. G., Kumeiko V. V. Enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) measurement of vitellogenin in plasma and liver histopathology in barfin plaice *Liopsetta pinnifasciata* from Amursky Bay, Sea of Japan // *Fish. Physiol. Biochem.* 2010. Vol. 37, N 4. P. 781–799.

Sonnenschein C., Soto A. M. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics, antagonists // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1998. Vol. 65. P. 143–150.

Vesely T., Reschova S., Pokorova D., Hulova J., Nevorankova Z. Production of monoclonal antibodies against immunoglobulin heavy chain in common carp (*Cyprinus carpio* L.) // *Veterinarni Medicina*. 2006 (5), 51. P. 296–302.

Wang H., Yan T., Tan J. T. T., Gong Z. A zebrafish vitellin gene (vg3) encodes a novel vitellogenin without a phosvitin domain and may represent a primitive vertebrate vitellogenin gene // *Gene*. 2000. Vol. 256. P. 303–310.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Андреева Алла Михайловна

зав. ЦКП «Молекулярные технологии», д. б. н.
Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН
пос. Борок, Некоузский район, Ярославская обл.,
Россия, 152742
эл. почта: aam@ibiw.yaroslavl.ru
тел.: (48547) 24119

Федоров Роман Александрович

младший научный сотрудник
ЦКП «Молекулярные технологии»
Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН
пос. Борок, Некоузский район, Ярославская обл.,
Россия, 152742
эл. почта: fedor-off@yandex.ru

Рябцева Ирина Павловна

научный сотрудник ЦКП «Молекулярные технологии»
Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН
пос. Борок, Некоузский район, Ярославская обл.,
Россия, 152742
эл. почта: molbiol@ibiw.yaroslavl.ru

Ламаш Нина Евгеньевна

старший научный сотрудник
Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского
Дальневосточного отделения РАН
лаб. фармакологии
ул. Пальчевского, д. 17, Владивосток,
Россия, 690059
Дальневосточный федеральный университет
ул. Суханова, 8, Владивосток,
Россия, 690950
эл. почта: ninalamash@yandex.ru

Филиппова Александра Эльдаровна

старший лаборант ЦКП «Молекулярные технологии»
Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН
пос. Борок, Некоузский район, Ярославская обл.,
Россия, 152742
эл. почта: antury@yandex.ru

Andreeva, Alla

I. P. Papanin Institute for Biology of Inland Waters
Russian Academy of Sciences,
152742, Borok, Nekouzskiy District, Yaroslavl Region
Russia
e-mail: aam@ibiw.yaroslavl.ru
tel.: (48547) 24119

Fedorov, Roman

I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters
Russian Academy of Sciences,
152742, Borok, Nekouzskiy District, Yaroslavl Region
Russia
e-mail: fedor-off@yandex.ru

Ryabtseva, Irina

I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters
Russian Academy of Sciences,
152742, Borok, Nekouzskiy District, Yaroslavl Region
Russia
e-mail: molbiol@ibiw.yaroslavl.ru

Lamash, Nina

A. V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology
Far Eastern Branch of the
Russian Academy of Sciences
17 Palcheyevskogo St.,
690059 Vladivostok, Russia
Far Eastern Federal University,
8 Sukhanova St., 690059
Vladivostok, Russia
e-mail: ninalamash@yandex.ru

Philippova, Alexandra

I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters
Russian Academy of Sciences,
152742 Borok, Nekouzskiy District, Yaroslavl Region
Russia
e-mail: antury@yandex.ru