

ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАГЕННОГО И ОБЩЕТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ 1,1-ДИМЕТИЛГИДРАЗИНА И ПРОДУКТОВ ЕГО ТРАНСФОРМАЦИИ НА КЛЕТКИ БИОСЕНСОРНЫХ ШТАММОВ *E. COLI* И КЛЕТКИ ЭУКАРИОТ

Анатолий Борисович БЕКЛЕМИШЕВ¹, Игорь Алексеевич ЛАВРИНЕНКО¹,
Александр Владимирович РЯБЧЕНКО¹, Виктор Иванович ТКАЧЕНКО¹,
Светлана Есимбековна БАТЫРБЕКОВА², Валентина Александровна ЛАВРИНЕНКО³,
Алина Витальевна БАБИНА³

¹НИИ биохимии СО РАМН
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

²Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Центр физико-химических методов анализа
050012, г. Алматы, ул. Карасай батыра, 95а

³ГОУ ВПО Новосибирский государственный университет
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Цельноклеточный биосенсор — штамм *E. coli* BL-21(DE3), содержащий рекомбинантную плазмиду pRAC-GFP, отвечает на воздействие 1,1-диметилгидразина (1,1-ДМГ) и продуктов его трансформации — диметилгидразонацетальдегида, перекиси водорода и формальдегида, — индуцированным синтезом белка GFP. Индукция обусловлена включением системы SOS-репарации путем активации промотора *recA*, под регуляцией которого находится в составе плазмиды pRAC-GFP ген *gfp*. SOS-ответ клеток биосенсора на 1,1-ДМГ, перекись водорода и формальдегид носит дозозависимый характер. 1-метил-1Н-1,2,4-триазол, 1,1,4,4-тетраметил-2-тетразен и нитрозодиметиламин не были генотоксичны, однако в присутствии окислителей оказывали существенное цитотоксическое воздействие на клетки цельноклеточного биосенсора, несущие плазмиду pETm-GFP, регистрируемое по подавлению синтеза белка GFP.

Ключевые слова: цельноклеточный биосенсор, *E. coli* BL-21(DE3), плазмиды pRAC-GFP, плазмиды pETm-GFP, генотоксиканты, экотоксиканты, SOS-репарация, *recA* промотор, 1,1-диметилгидразин.

Запуски космических ракет во многих странах осуществляются с использованием в качестве жидкого ракетного топлива 1,1-диметилгидразина (1,1-ДМГ). В результате аварий и при падении первых ступеней тяжелых ракетных носителей в окружающую среду может попасть от нескольких сот килограммов до нескольких тонн этого опасного экотоксиканта, что создает значительный риск для здоровья людей. Детальный механизм цитотоксического эффекта 1,1-ДМГ изучен недостаточно полно [1–6]. Не выяснен и вопрос, оказывают ли 1,1-ДМГ и продукты его трансформации мутагенное воздействие на геном клетки эукариот и прокариот. Существующие физико-химические методы определения содержания гидразинов в организме и окружающей среде (спектрометрия, газовая хроматография, ядерный магнитный резонанс,

хроматография высокого давления) и генетические методы (Ames-тест, Mutatox-анализ, иму-тест, rec-lac-тест, SOS-хроматест, Pro-tox-анализ), позволяющие оценить мутагенный потенциал этих соединений, требуют дорогостоящего оборудования, квалифицированного персонала и не пригодны для рутинного использования. В этой связи создание и применение высокочувствительных биосенсоров, позволяющих осуществлять быстрый скрининг исследуемых образцов веществ на их гено- и цитотоксичность, является актуальной задачей экологии и биотехнологии.

Цель настоящей работы — конструирование цельноклеточных биосенсоров на основе рекомбинантных штаммов *E. coli* BL-21(DE3) для обнаружения гено- и экотоксикантов в объектах окружающей среды и оценка токсического и возможного мутаген-

Беклемишев А.Б. — д.б.н., зав. лабораторией генной инженерии, e-mail: beklem@soramn.ru
Лавриненко И.А. — к.б.н., ведущ.н.с. лаборатории генной инженерии, e-mail: igor@academ.org
Рябченко А.В. — к.б.н., старш.н.с. лаборатории генной инженерии, e-mail: masterbio@soramn.ru
Ткаченко В.И. — н.с. лаборатории генной инженерии, e-mail: dikoeppole_vt@mail.ru
Батырбекова С.Е. — д.х.н., зав. лабораторией экологии Казахского национального университета им. аль-Фараби, Центра физико-химических методов анализа, e-mail: batyrbekova@cshma.kz
Лавриненко В.А. — проф. кафедры физиологии Новосибирского государственного университета, e-mail: igor@academ.org
Бабина А.В. — аспирант кафедры физиологии, e-mail: phisiol@nsu.fen.ru

ного воздействия на клетки биосенсоров 1,1-ДМГ и продуктов его трансформации – 1,1,4,4-тетраметилтетразена (ТМТ), 1-метил-1,2,3-триазола (МТ), N-нитрозодиметиламина (НДМА), диметилгидразонацетальдегида, формальдегида и перекиси водорода. В данной работе предполагалось также исследовать токсическое воздействие 1,1-ДМГ, НДМА, ТМТ и МТ на ткани эукариот – периферическую нервную систему лягушки.

Материал и методы

Конструирование биосенсорных штаммов *E. coli* и определение с их помощью возможного мутагенного и токсического воздействия 1,1-ДМГ и продуктов его трансформации на клетки прокариотов.

При конструировании рекомбинантных штаммов *E. coli* использовали стандартные генно-инженерные методы [7]. Определение возможного мутагенного и токсического действия 1,1-ДМГ и продуктов его трансформации на биосенсорные штаммы *E. coli* BL-21(DE3), несущие плазмиду pRAC-GFP и pETm-GFP, осуществляли по следующей схеме. Ночные культуры биосенсорных штаммов *E. coli* пересеивали в пробирки со свежей средой Лурия – Бергана и выращивали на шейкере при 37 °C до оптической плотности $D_{600} = 0,4–0,5$. Затем в пробирки вносили различные количества 1,1-ДМГ или продуктов его трансформации и продолжали растить культуры 1,5 ч, после чего пробирки, содержащие биосенсорный штамм, несущий плазмиду pRAC-GFP, инкубировали при температуре 4–6 °C в течение 1,5 ч для созревания хромофора GFP. В пробирки с культурой биосенсорного штамма, несущего плазмиду pETm-GFP, вносили изопропил-бета-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до концентрации 1 мМ и продолжали растить культуры еще 1 ч, после чего инкубировали при температуре 4–6 °C в течение 1,5 ч для созревания хромофора GFP. На конечной стадии определяли оптическую плотность при 600 нм клеток в каждой из пробирок и измеряли флуоресценцию клеток (длина волны возбуждения 491 нм, длина волны эмиссии 511 нм) на спектрофлуорофотометре RF-5301PC «Shimadzu» (Япония). На основе полученных данных по оптической плотности и флуоресценции вычисляли фактор индукции (Fi) по формуле: $Fi = (E_{exp} \times D_{cont}) / (E_{cont} \times D_{exp})$ [8], где E_{exp} – флуоресценция, измеряемая в опытных пробах; E_{cont} – флуоресценция, измеряемая в контрольных пробах; D_{cont} – оптическая плотность в контрольных пробах; D_{exp} – оптическая плотность в опытных пробах.

Определение токсического действия 1,1-ДМГ и продуктов его трансформации на периферическую нервную систему лягушки.

Работу по оценке токсического действия 1,1-ДМГ и продуктов его трансформации выполняли на нервно-мышечном препарате лягушки, состоящем из седалищного нерва и икроножной мышцы (n. ischiadicus – m. gastrocnemius). Во всех выпол-

ненных экспериментах руководствовались правилами проведения работ на животных (приложения 1, 2, 3 к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977). Регистрировали составной потенциал действия седалищного нерва с помощью исследовательского комплекса «Biopac System, Inc.» (США). В экспериментах исследовали токсическое влияние 1,1-ДМГ, ТМТ, МТ и НДМА на некоторые электрофизиологические характеристики составного потенциала действия седалищного нерва лягушки. Во всех экспериментах использовали максимальную силу раздражения, равную 0,5 вольтам. Регистрацию составного потенциала осуществляли в течение 5 минут с момента аппликации препарата, через 30, 60, 120, 180, 300 секунд. Для оценки токсичности использовали величину амплитуды и скорость проведения сигнала возбуждения. Работа выполнена на 20 нервно-мышечных препаратах.

Обработку полученных результатов вели с помощью пакета программ «Biopac BSL Pro». Вычисляли среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m) и представляли в виде $M \pm m$.

Результаты и обсуждение

Одной из задач данного исследования была разработка цельноклеточного биосенсора для оценки мутагенного воздействия различных химических соединений на геном. Ранее в нашей лаборатории был разработан вектор pREB-6His, предназначенный для индуцируемой экспрессии клонированных в его составе целевых генов [9], которая осуществлялась под контролем регуляторной области гена *recA Proteus mirabilis*. Индукцию экспрессии генов проводили с применением налидиксовой кислоты, митомицина C или ультрафиолетового излучения. Это наблюдение натолкнуло нас на мысль о возможности создания на основе клеток *E. coli*, несущих плазмиду, аналогичную pREB-6His, биосенсора для обнаружения мутагенов химической и физической природы в окружающей среде. На первом этапе работы был сконструирован индикаторный штамм *E. coli* BL-21(DE3), содержащий плазмиду pREB-GFP (pREB2), в составе которой был клонирован кодирующий район гена зеленого флуоресцирующего белка GFP. Экспрессия гена *gfp* в индикаторном штамме осуществлялась под контролем регуляторной области гена *recA Proteus mirabilis*. При воздействии на клетки этого штамма УФ-излучения или химических мутагенов клетки отвечали быстрым возрастанием синтеза GFP, что, по-видимому, было обусловлено включением системы SOS-репарации в ответ на генотоксический эффект. Полученные результаты позволили сделать заключение о возможности использования полученного рекомбинантного штамма *E. coli* в качестве цельноклеточного биосенсора. Однако полученные конструкции плазмид pREB и pREB2 обладают некоторыми недостатками. В частности, терминатор транскрипции в этих плаزمидас рас-

SD Start

(1) –ATCTTTATGCTTCACTGCCAGAGGGAGAATTCATG – pREB2

(2) –*****TATG – pREB3

(3) -----ATTAACTTTATACAGGAACA*****TATG – pRAC

Enhancer SD Start

Рис. Сравнение нуклеотидных последовательностей в области сайта связывания рибосом исходного и модифицированного регуляторного района гена *recA* *Proteus mirabilis* в составе сконструированных векторов экспрессии pREB2 (1), pREB3 (2) и pRAC (3). ENH – энхансер трансляции гена 10 фага T7, SD – сайт связывания рибосом, Start – кодон инициации трансляции ATG, * – нуклеотиды, гомологичные представленным в нуклеотидной последовательности вектора pREB2 (1).

положен на 565 пар нуклеотидов правее терминатора трансляции, что приводит к синтезу более длинного транскрипта. Сайт связывания рибосом расположен не на оптимальном расстоянии от иницирующего кодона. В этой связи были сконструированы производные вектора pREB2, которые были лишены вышеперечисленных недостатков. В частности, были проведены следующие модификации при получении конечной конструкции вектора, получившего название pRAC и содержащего клонированный в его составе ген *gfp* (рис.):

1) выполнена замена района, включающего сайт связывания рибосом и последовательность слева от ATG кодона регуляторной области гена *recA* *P. Mirabilis*, на соответствующую область регуляторного района сильного синтетического промотора Ptaq;

2) слева от встроенного сайта связывания рибосом промотора Ptaq был встроен энхансер трансляции гена 10 фага T7;

3) район плазмиды pREB2, расположенный между терминатором трансляции и терминатором

транскрипции T0, был удален, в результате чего расстояние между обоими терминаторами было значительно сближено. Полученная конструкция рекомбинантной плазмиды (pRAC) обеспечивала 3-кратное по сравнению с плазмидой pREB2 увеличение экспрессии гена *gfp* в клетках *E. coli*. Штамм *E. coli* BL-21(DE3), несущий плазмиду pRAC, был использован в дальнейшей работе в качестве цельноклеточного биосенсора для определения генотоксичности 1,1-ДМГ и продуктов его трансформации. В серии независимых экспериментов было показано, что клетки этого штамма отвечают на воздействие 1,1-ДМГ (100 мМ) и продуктов его трансформации – диметилгидразонацетальдегида (100 мМ), перекиси водорода (200–1300 мкМ) и формальдегида (300–1300 мкМ) – индуцированным синтезом белка GFP, возрастающим по сравнению с контролем в 5, 2, 9 и 2,5 раза соответственно. SOS-ответ клеток биосенсора на перекись водорода и формальдегид носит дозозависимый характер. Такие продукты трансформации 1,1-ДМГ, как МТ, ТМТ и НДМА, не оказывают генотоксического воздействия на клетки.

Второй вариант цельноклеточного биосенсора предполагалось создать на основе штамма *E. coli* BL-21(DE3), несущего плазмиду, обеспечивающую индуцируемую ИПТГ экспрессию входящего в ее состав гена *gfp*. Ожидалось, что токсическое воздействие каких-либо исследуемых веществ на клетки биосенсора должно сопровождаться подавлением макромолекулярных синтезов, в т. ч. синтеза белка и, в частности, индуцируемого ИПТГ синтеза GFP. В целях получения этого варианта биосенсора на основе исходного вектора pET-36b⁽⁺⁾, содержащего сильный промотор фага T7, была получена рекомбинантная плаزمида pETm-GFP, содержащая полилинкер для клонирования целевых генов и встроенную по сайту XhoI кодирующую область гена *gfp*, находящуюся в рамке трансляции с по-

Таблица 1

Влияние 1,1-ДМГ на индуцированный ИПТГ (2 мМ) синтез GFP
штаммом *E. coli* BL-21(DE3), несущим плазмиду pETm-GFP

Концентрация 1,1-ДМГ, мМ	Флуоресценция (F), у.е.	Оптическая плотность (D600нм), о.е.	Подавление синтеза белка GFP (%)
100	152 ± 27	0,26 ± 0,03	95
50	335 ± 31	0,3 ± 0,03	90
25	155 ± 4	0,5 ± 0,03	83
12	99 ± 2	1,3 ± 0,08	70
6	2000	1,8 ± 0,14	30
3	2500	1,9 ± 0,05	20
Контроль (–): без внесения IPTG и 1,1-ДМГ	1015 ± 46	1,7 ± 0,1	
Контроль (+): без внесения 1,1-ДМГ с индукцией IPTG	3045	1,6 ± 0,1	

Таблица 2

Характеристики составного потенциала действия седалищного нерва лягушки при аппликации исследуемых препаратов

Препарат	Концентрация, %	Амплитуда, вольт						Скорость проведения (м/с)					
		Контроль	Время действия (с)					Контроль	Время действия (с)				
			30	60	120	180	300		30	60	120	180	300
НДМА	0,001	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	45	37,5	37,5	36	42	42
	0,1	0,018	0,018	0,017	0,018	0,02	0,02	51	38	36	39	39	41
ТМТ	0,001	0,02	0,018	0,02	0,02	0,02	0,02	50	31	29	32	27	27
	0,1	0,02	0,02	0,016	0,014	0,007	0,006	47	31	29	32	27	27
МТ	0,001	0,02	0,02	0,018	0,015	0,008	0,006	56	46	44	46	44	45
	0,1	0,02	0,015	0,006	Препарат погиб			46	33	22	Препарат погиб		
1,1-ДМГ	0,001	0,02	0,02	0,02	0,019	0,02	0,02	51	34	36	31	33	25
	0,1	0,02	0,013	0,006	Препарат погиб			50	35,7	32,6	Препарат погиб		

следовательностью полилинкера. Экспрессия гена *gfp* индуцировалась ИПТГ и по подавлению синтеза GFP под воздействием экотоксикантов можно было судить об общетоксическом влиянии на клетку исследуемых соединений.

Данные, полученные при изучении влияния 1,1-ДМГ на клетки биосенсорного штамма *E. coli* BL-21(DE3), содержащие плазмиду pETm-GFP, представлены в табл. 1. Из этих данных очевидно, что при воздействии на клетки, содержащие рекомбинантную плазмиду pETm-GFP, возрастающих концентраций 1,1-ДМГ наблюдается значительное снижение индуцируемого ИПТГ синтеза GFP. Снижался и неиндуцированный синтез белка GFP. Как отмечалось выше, МТ, ТМТ и НДМА не обладали генотоксическим эффектом. Однако в присутствии окислителей (2 мМ феррицианида калия или 100 мкМ перекиси водорода) МТ и ТМТ, но не НДМА, оказывали существенное цитотоксическое воздействие на клетки цельноклеточного биосенсора, несущие плазмиду pETm-GFP, регистрируемое по подавлению синтеза белка GFP. Полученные результаты свидетельствуют о высокой токсичности 1,1-ДМГ и продуктов окисления МТ и ТМТ по крайней мере для клеток прокариот.

Из табл. 2, в которой представлены данные о токсичности 1,1-ДМГ и продуктов его трансформации (МТ, ТМТ и НДМА) для клеток эукариот, видно, что электрофизиологические показатели составного потенциала действия седалищного нерва лягушки лежат в пределах, характерных для данно-

го вида животных. Аппликация 1,1-ДМГ в концентрации 0,001 % не приводила к изменению амплитуды потенциала действия, и лишь МТ вызывал ее понижение. При этом уменьшалась скорость проведения сигнала возбуждения, что свидетельствует о токсическом действии препаратов. Наиболее заметной токсичностью обладали 1,1-ДМГ и ТМТ. При использовании 0,1 % концентрации исследуемых соединений их токсическое действие стало более выражено. Так, ТМТ, МТ и 1,1-ДМГ вызывали падение амплитуды и снижение скорости проведения сигнала возбуждения примерно в два раза (табл. 1). Аппликация МТ и 1,1-ДМГ приводила к гибели препарата на второй минуте эксперимента. На основании проведенных экспериментов можно сделать вывод о токсическом действии 1,1-ДМГ и некоторых продуктов его трансформации (ТМТ, МТ) на нервную систему эукариот.

Заключение

1. Рекомбинантный штамм *E. coli*, несущий плазмиду pRAC-GFP, может служить в качестве цельноклеточного биосенсора для определения генотоксикантов в окружающей среде и изучения мутагенных свойств создаваемых новых лекарственных средств, биологически активных препаратов и антибиотиков.

2. 1,1-диметилгидразин и некоторые продукты его трансформации (диметилгидразон ацетальдегида, перекись водорода, формальдегид) оказывают генотоксическое действие на клетки биосенсорного штамма.

3. 1,1-диметилгидразин, 1-метил-1,2,4-триазол, 1,1,4,4-тетраметил-2-тетразен высокотоксичны как для прокариот, так и для эукариот.

Данная работа была поддержана грантом МНТЦ № К-1482.

Список литературы

1. Delft J.-H., Steenwinkel M.-J., Groote J.-L. Determination of ^7N - ^6O -methylguanine in rat liver DNA after oral exposure to hydrazine by use of immunochemical and electrochemical detection methods // *Fundam. Appl. Toxicol.* 1997. 35. 131–137.
2. Gamberini M., Cidade M.R., Valotta L.A. et al. Contribution of hydrazine-derived alkyl radicals to cytotoxicity and transformation induced in normal c-myc-over expression mouse fibroblasts // *Carcinogenesis*. 1998. 19. 147–155.
3. Sinha B.H. Enzyme activation of hydrazine derivatives // *J. Biol. Chem.* 1983. 258.7 96–801.
4. Malca-Mor L. Mutagenicity and toxicity of carcinogenic and other hydrazine derivatives // *Appl. Environ. Microbiol.* 1982. 44. 801–805.
5. Parody S., DeFlora S., Cavanho M. et al. DNA-damaging activity *in vivo* and bacterial mutagenicity of sixteen hydrazine derivatives as related quantitatively to their carcinogenicity // *Cancer Res.* 1981. 41. 1469–1481.
6. Fitzgerald B.E., Shank R.C. Methylation status of DNA cytosine during the course of induction of liver cancer in hamster by hydrazine sulfate // *Carcinogenesis*. 1996. 17. 2703–2709.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., 1984. 480 с.
8. Maniatis T., Fritsch E.E., Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual. М., 1984. 480 p.
9. Kostrzynska M., Leung K.T., Lee H., Trevors J.T. Green fluorescent protein-based biosensor for detecting SOS-inducing activity of genotoxic compounds // *J. Microbiol. Methods*. 2002. 48. 43–51.
10. Иванов И.Д., Беклемишев А.Б. Клонирование и анализ экспрессии фрагмента гена *fla b* новосибирского изолята *Borrelia garinii* NT29 в клетках *E. coli* и исследование антигенных свойств рекомбинантного белка // *Бюл. СО РАМН*. 2002. (1). 97–102.
11. Ivanov I.D., Beklemishev A.B. Cloning and analysis of expression of *fla b* gene's fragment from Novosibirsk isolate of *Borrelia garinii* NT29 in *E. coli* C600, and study of antigenic characteristics of the recombinant protein // *Bul. SO RAMN*. 2002. (1). 97–102.

STUDY THE MUTAGENIC AND GENERALLY TOXIC INFLUENCE OF 1,1-DIMETHYLHYDRAZINE AND PRODUCTS OF ITS TRANSFORMATION ON *E. COLI* BIOSENSOR CELLS AND EUKARYOTIC CELLS

Anatoliy Borisovich BEKLEMISHEV¹, Igor' Alekseevich LAVRINENKO¹,
Aleksandr Vladimirovich RYABCHENKO¹, Viktor Ivanovich TKACHENKO¹,
Svetlana Esimbekovna BATYRBEKOVA², Valentina Aleksandrovna LAVRINENKO³,
Alina Vital'evna BABINA³

¹Scientific Research Institute of Biochemistry of SB RAMS
630117, Novosibirsk, Timakov st., 2

²Kazakh National University named after al-Faraby, Center of physical and chemical methods of analysis
050012, Almaty, Karasai batyr st., 95

³Novosibirsk State University
630090, Novosibirsk, Pirogov st., 2

Whole-cellular biosensor – strain of *E. coli* BL-21 (DE3), which contains the pRAC-GFP recombinant plasmid, responds to the effects of 1,1-dimethylhydrazine (1,1-DMH) and products of its transformation (dimethylhydrazone acetaldehyde (DMHAA), hydrogen peroxide and formaldehyde) by induced synthesis of the GFP. Induction is due to the initiation of SOS-repair system through the activation of *recA* promoter, that regulates expression of *gfp* gene in composed of pRAC-GFP plasmid. SOS-responses of biosensor cells for hydrogen peroxide and formaldehyde were dose dependent. 1-methyl-1H-1,2,4-triazol, 1,1,4,4-tetramethyl-2-tetrazen and N-nitrosodimethylamine have no genotoxic effects on cells. However, in the presence of oxidants these compounds exert significant cytotoxic influence on the biosensor cells which contain the pETm-GFP plasmid. Cytotoxic influence of these compounds was recorded by determination of the suppression of the GFP synthesis.

Key words: whole-cellular biosensor, *E. coli* BL-21 (DE3), pRAC-GFP plasmid, pETm-GFP plasmid, genotoxicants, ecotoxicants, SOS-repair, *recA* promoter, 1,1-dimethylhydrazine.

Beklemishev A.B. – doctor of biological sciences, head of laboratory of gene engineering,
e-mail: beklem@soramn.ru

Lavrinenko I.A. – candidate of biological sciences, leading research scientist of laboratory of gene engineering,
e-mail: igor@academ.org

Ryabchenko A.V. – candidate of biological sciences, scientific researcher of laboratory of gene engineering,
e-mail: masterbio@soramn.ru

Tkachenko V.I. – scientific researcher of laboratory of gene engineering, e-mail: dikoepole_vt@mail.ru

Batyrbekova S.E. – doctor of chemistry sciences, head of laboratory of ecology, Kazakh National University named after al-Farabi, Center of physical and chemical methods of analysis, e-mail: batyrbekova@cfxma.kz

Lavrinenko V.A. – professor of chair of physiology of Novosibirsk State University, e-mail: igor@academ.org

Babina A.V. – post-graduate student of chair of physiology, e-mail: phisiol@nsu.fen.ru