

## БИОХИМИЯ

УДК 577.112

### ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ГЛЮКОКИНАЗЫ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

Л.Я. Ху, Н.Ю. Гончарова, А.М. Рубцов

(кафедра биохимии; e-mail: am\_rubtsov@mail.ru)

Предложен простой метод выделения глюкокиназы из растворимой фракции печени крысы, позволяющий получать препарат с высокой удельной активностью с сохранением нативных кинетических свойств фермента, практически лишенный примеси других молекулярных форм гексокиназы. График зависимости скорости реакции от концентрации глюкозы имеет выраженный сigmoidальный характер: при 25°C и 2°C коэффициенты Хилла во всем диапазоне концентраций субстрата равны 1,76 и 1,35; значения  $S_{0,5}$  для глюкозы составляют 6,90 мМ и 20 мМ соответственно. Обсуждается роль кинетического механизма реакции в регуляции активности глюкокиназы в печени.

**Ключевые слова:** глюкокиназа, гексокиназа, кооперативные свойства.

Глюкокиназа (ATP:D-глюкоза-6-фосфотрансфераза, КФ 2.7.1.1, ГЛК) является одной из молекулярных форм гексокиназы (ГК) млекопитающих [1]. Фермент экспрессируется в поджелудочной железе и печени, где представлен разными изоизомами [2]. По современным представлениям [1–5], ГЛК поджелудочной железы играет роль глюкозного сенсора, стимулирующего секрецию инсулина при гипергликемии, а ГЛК печени участвует в быстром удаление избытка глюкозы (Glc) из крови. На долю ГЛК в печени приходится около 80% от общей активности всех молекулярных форм ГК [4–7], причем именно ГЛК обеспечивает быстрый синтез гликогена и его депонирование в печени при гипергликемии [5, 8].

С физиологической точки зрения особый интерес представляет механизм срочной активации ГЛК, связанный со специфическим кинетическим поведением фермента [9]. В отличие от других молекулярных форм гексокиназы ГЛК демонстрирует положительную кооперативность при взаимодействии с Glc в области ее физиологических концентраций [6, 7, 10–12]. Степень кооперативности при взаимодействии ГЛК с субстратом характеризуется величиной коэффициента Хилла ( $h$ ) 1,5–2 [4, 9, 11–13]. Эта кооперативность не связана с наличием двух центров связывания Glc на молекуле фермента [1] или с его олигомерной организацией, так как ГЛК, как и другие изоформы гексокиназы, является мономерным белком [1, 14], причем олигомеризация ГЛК в ходе реакции также не наблюдается [15]. В настоящее время кооперативный характер взаимодействия ГЛК с субстратом объясняется медленной конформационной перестройкой молекулы фермента при связывании Glc, приводящей к изменению конфор-

мации субстратсвязывающего центра, что увеличивает сродство фермента к субстрату [1, 11, 12, 16]. С помощью флуоресцентной спектроскопии удалось зарегистрировать изменение конформации ГЛК после связывания Glc [16] и измерить микроскопические константы скоростей образования промежуточного комплекса Glc-ГЛК и его конформационного превращения в каталитически компетентный комплекс [12].

Проявление кооперативности ГЛК при взаимодействии с субстратом зависит от степени нативности препарата белка: кооперативность утрачивается при хранении, а также у высокоочищенных препаратов фермента [9, 17, 18]. Как правило, очистка фермента сопровождается изменением кинетических свойств и/или утратой стабильности фермента. Высокоочищенный фермент из печени кролика оказался лишенным кооперативности по Glc [17]. При степени очистки 40% препарат ГЛК из печени крысы [18] быстро инактивировался при хранении [9]. Изменение процедуры очистки [17] приводило к получению препарата фермента с высоким выходом (85%), но низкой кооперативностью по Glc [9].

В настоящей работе предложен быстрый метод получения очищенного препарата ГЛК из печени крысы с сохранением нативных свойств фермента и проанализировано влияние KCl и дитиотрейтоля (ДТТ) на кооперативность ГЛК при взаимодействии с Glc.

#### Методы исследования

В опытах использовали белых крыс весом 180–200 г, содержащихся на стандартной диете (пищевые гранулы для грызунов, *ed libitum*). Эксперименты проводили в соответствии с Международ-

ными стандартами по лабораторной практике (Good Laboratory Practice, GLP). Все процедуры по получению клеточных фракций и препаратов фермента проводили при 2°C.

**Получение растворимой фракции.** После декапитации животных печень извлекали, охлаждали и промывали ледяной водой, освобождали от жира, соединительной ткани и кровеносных сосудов и измельчали ножницами. Навеску измельченной ткани гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера (стекло-трафлон) в пятикратном объеме среды выделения (25 мМ Tris-HCl, pH 7,6; 250 мМ сахароза; 1 мМ ЭДТА; 2 мМ ДТТ) в течение 1 мин при скорости вращения пестика 800 об/мин. К гомогенату добавляли среду выделения до 10-кратного разведения и центрифугировали при 25 000 × g в течение 30 мин. Полученный супернатант представлял собой растворимую клеточную фракцию.

**Получение препарата ГЛК** из растворимой фракции проводили методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе (готовилась в виде суспензии в 10 мМ К-фосфатном буфере, pH 7,0, 90 мг ионообменника/мл). К растворимой фракции, содержащей все изозимы ГК, при перемешивании добавляли по каплям ДЭАЭ-целлюлозу до соотношения 0,1 мл суспензии на 1 мл растворимой фракции и выдерживали при постоянном перемешивании 15 мин. ДЭАЭ-целлюлозу с адсорбированными на ней белками отделяли на воронке Бюхнера. Полноту адсорбции ГЛК контролировали, измеряя активность фермента в полученном фильтрате.

Изозимы ГК с высоким сродством к Glc элюировали с ДЭАЭ-целлюлозы раствором, содержащим 150 мМ KCl, 10 мМ K-фосфатного буфера, pH 7,0, и 2 мМ ДТТ в объеме, равном объему растворимой фракции, взятой в эксперимент. Осадок ионообменника с адсорбированными ферментами суспендировали в элюирующем растворе, суспензию переносили в химический стакан и элюировали примесные изозимы ГК в течение 15 мин при постоянном перемешивании. ДЭАЭ-целлюлозу с адсорбированной ГЛК отделяли на воронке Бюхнера. Для полноты отделения изозимов ГК от ГЛК проводили повторную элюцию тем же раствором.

Элюцию глюкокиназы с ДЭАЭ-целлюлозы проводили раствором, содержащим 400 мМ KCl, 10 мМ K-фосфатного буфера, pH 7,0, и 2 мМ ДТТ. При однократной элюции выход фермента составлял 60–70%, при 2-кратной — 80–90%.

**Высаливание ГЛК** из элюата проводили сульфатом аммония при насыщении 65%. После добавления необходимого количества сухого сульфата аммония элюат инкубировали при постоянном перемешивании в течение 20 мин для формирования осадка белка. Осадок отделяли центрифугированием при 20 000 × g в течение 15 мин. ГЛК может храниться в полученном осадке при 2°C в течение нескольких дней без потери активности. Перед использованием осадок рас-

творяли в 50 мМ Tris-HCl, pH 7,8, содержащем 2 мМ ДТТ из расчета: осадок, полученный из 1 г ткани на 1 мл буфера. Непосредственно перед определением активности ГЛК препарат разводили в 10 раз буфером того же состава.

**Определение активности ГЛК при 25°C** проводили энзиматическим методом при непрерывной регистрации оптической плотности при 340 нм (за счет образования NADPH) с использованием сопряженной системы с глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой (Г6ФДГ). Проба 1 (объем 1,5 мл) для определения общей гексокиназной активности (ГЛК + ГК) содержала 2–250 мМ глюкозы; 50 мМ Tris-HCl, pH 7,8; 5 мМ ATP; 10 мМ MgCl<sub>2</sub>; 100 мМ KCl; 2 мМ ДТТ; 0,25 мМ NADP<sup>+</sup>; 1 IU Г6ФДГ; 50 мкл разведенного препарата фермента. Проба 2 (объем 1,5 мл) для определения активности изозимов ГК с высоким сродством к глюкозе содержала 0,8 мМ глюкозы и все указанные выше компоненты в тех же концентрациях. Активность ГЛК определяли по разнице активности в пробах 1 и 2. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое превращает 1 мкмоль субстрата за 1 мин при 25°C.

**Определение активности ГЛК при 2°C** проводили в пробирках Eppendorf, помещенных в лед, после установления в них температуры 2°C. Пробы 1 и 2 (см. выше) объемом 1,5 мл содержали все указанные выше компоненты, за исключением NADP<sup>+</sup> и Г6ФДГ. Реакцию начинали добавлением 200 мкл препарата фермента и инкубировали пробы 10 мин. Реакцию останавливали нагреванием пробирок в кипящей водяной бане (3 мин). Белок осаждали центрифугированием при 13 000 × g в течение 5 мин. Аликвоты количественно переносили в кюветы спектрофотометра, добавляли NADP<sup>+</sup> и Г6ФДГ и определяли количество Г6Ф, образовавшегося в ходе гексокиназной реакции.

**Исследование инактивации ГЛК** проводили, инкубируя разведенный препарат ГЛК в кювете спектрофотометра в среде для определения активности в отсутствие Glc, MgATP, KCl и ДТТ. Концентрация фермента составляла  $5 \times 10^{-3}$  ед./мл, время инкубации — 1–6 мин при 25°C. Остаточную активность ГЛК определяли после добавления субстратов (Glc и MgATP). В качестве контроля использовали пробу, не содержащую KCl и ДТТ, без инкубации фермента в отсутствие субстратов и стабилизаторов.

В таблицах и на рисунках представлены средние значения параметров, полученные с использованием 3–10 препаратов. Во всех случаях стандартное отклонение ( $\pm SD$ ) не превышало 10% от величины параметра.

## Результаты и их обсуждение

**Получение нативного препарата ГЛК из растворимой фракции печени крысы.** В полученной нами растворимой фракции печени активность ГЛК при концентрации Glc 100 мМ и суммарная активность

**Очистка ГЛК печени крысы**

Фракция	Объем, мл	Белок, мг	Общая активность, ед		Соотношение активностей ГЛК/ГК
			ГЛК	ГК	
Растворимая фракция	20	115,00	2,12 (100%)	1,40 (100%)	1,51
Адсорбат на ДЭАЭ-целлюлозе	—	—	2,12 (100%)	1,40 (100%)	1,51
Элюат (150 мМ KCl)	20	29,20	0,06 (3%)	0,96 (69%)	0,06
Элюат (400 мМ KCl)	20	8,20	1,60 (75%)	0,18 (13%)	8,89
Осадок после высаливания (65% насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )	4	4,48	1,22 (58%)	0,04 (3%)	30,50

изоформ ГК с высоким сродством к Glc составили  $1,23 \pm 0,2$  и  $0,28 \pm 0,05$  мкмоль/мин на 1 г ткани при  $25^\circ\text{C}$  ( $n = 10$ ) соответственно, что согласуется с данными литературы, согласно которым на долю активности ГЛК приходится 70–85% от общей гексокиназной активности [19, 20]. Однако присутствие изозимов ГК с высоким сродством к Glc усложняет исследование кооперативности ГЛК, поскольку в диапазоне концентраций Glc 1–6 мМ активность ГЛК сопоставима с суммарной активностью изозимов ГК с высоким сродством к Glc [14]. В связи с этим очевидна необходимость получения препаратов ГЛК, свободных от примеси других изозимов ГК.

В настоящей работе предложен быстрый метод получения высокоочищенного активного и стабильного препарата ГЛК с сохранением нативных кооперативных свойств фермента, практически свободного от примеси других изозимов ГК (табл. 1). Метод основан на ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе со ступенчатой элюцией и последующим высаливанием белка. Подобраны условия адсорбции белка (значение pH, низкая ионная сила, количество ионообменника), которые обеспечивали практически полное связывание ГЛК с ДЭАЭ-целлюлозой. Двукратная элюция 150 мМ KCl сопровождалась низкими потерями ГЛК ( $3,1 \pm 1,1\%$ ,  $n = 8$ ) и удалением ~70% изозимов ГК с высоким сродством к Glc. Двукратная элюция 400 мМ KCl обеспечивала высокий выход ГЛК ( $80 \pm 6\%$ ,  $n = 7$ ) (табл. 1). Дополнительную очистку обеспечивало высаливание ГЛК из элюата сульфатом аммония. Выход фермента при этом составил  $60 \pm 3\%$  ( $n = 5$ ) от исходной активности ГЛК в растворимой фракции.

Полученные препараты ГЛК практически не содержали примеси ГК (около 3% по активности) и могли храниться при  $2^\circ\text{C}$  в течение одной недели.

**Стабильность и кинетические свойства ГЛК печени крысы.** Известно, что ГЛК нестабильна при низких концентрациях, и разведение ГЛК из печени кролика до  $5 \times 10^{-3}$  ед. на 1 мл (при измерении актив-

Таблица 1

ности фермента) в отсутствие субстратов приводит к полной потере активности в течение 5 мин [19]. Инактивация предотвращается ионаами  $\text{K}^+$ , которые не влияют на кинетические параметры ГЛК. В отличие от  $\text{K}^+$  восстановленный глутатион вызывает двукратное увеличение максимальной активности фермента, но не защищает ГЛК от инактивации при разведении [17]. В гомогенатах печени крысы ГЛК дольше сохраняет активность в присутствии ДТТ [19].

Нами показано, что в присутствии насыщающих концентраций субстратов разведение ГЛК до  $5 \times 10^{-3}$  ед. в 1 мл не приводило

к инактивации фермента по меньшей мере в течение 10 мин. Инкубация ГЛК в отсутствие субстратов сопровождалась ее инактивацией с  $k_i = 0,71 \pm 0,044 \text{ мин}^{-1}$ . Введение в среду инкубации насыщающих концентраций одного из субстратов (Glc или MgATP) лишь частично защищало фермент от инактивации при разведении. Защитным действием обладали также ионы  $\text{K}^+$  и в меньшей степени  $\text{Na}^+$ , а также ДТТ (табл. 2).

Таблица 2  
Влияние субстратов и эффекторов на стабильность ГЛК печени крысы при разведении

Среда инкубации: ГЛК $5 \times 10^{-3}$ ед/мл, $25^\circ\text{C}$ , pH 7,8	Активность, %
+ 100 мМ Glc, 5 мМ MgATP	100
+ 100 мМ Glc	30
+ 5 мМ MgATP	5
+ 2 мМ ДТТ	90
+ 100 мМ KCl	85
+ 100 мМ NaCl	30

Более того, ДТТ обладал и активирующим действием в отношении ГЛК: его введение в среду для определения активности почти в 3 раза увеличивало максимальную активность фермента (табл. 3). Таким образом, восстановленное состояние SH-групп необходимо для поддержания нативной конформации ГЛК и сохранении ее активности. Известно, что из 12 SH-групп в ГЛК печени крысы ни одна не локализована в консервативных последовательностях субстрат-связывающего центра фермента [21]. Это говорит о том, что поддержание нативного состояния ГЛК обеспечивается определенной конформацией всей молекулы фермента, а не только участков, формирующих активный центр.

Таблица 3

**Влияние ДТТ на активность и значение  $V_{max}$  ГЛК при разведении в отсутствие субстратов и KCl**

ДТТ, мМ	Активность ГЛК при разведении, %	$V_{max}$ , %
0	6,0	100
0,1	6,0	100
0,2	6,0	100
0,5	49,5	170
1,0	89,0	220
2,0	100	280
3,0	100	280

**Зависимость скорости глюкокиназной реакции от концентрации глюкозы.** Как видно из рис. 1, зависимость начальной скорости реакции от концентрации субстрата описывается типичной сигмоидой, что хорошо согласуется с данными литературы [6, 7, 10–12]. При обработке этого графика методом Силоновой—Курганова [22] коэффициент  $q$ , характеризующий меру отклонения сигмоиды от гиперболы, составил  $2,0 \pm 0,1$  ( $n = 10$ ). Значение коэффициента Хилла ( $h$ ), характеризующее кооперативное взаимодействие ГЛК с Glc, составило  $1,76 \pm 0,14$  ( $n = 10$ , рис. 2). При расчетах за  $V_{max}$  принимали скорость реакции при насыщении субстратом (в диапазоне концентраций Glc 80–250 мМ). Значение  $S_{0,5}^{Glc}$ , характеризующее сродство ГЛК к субстрату, составило  $6,90 \pm 0,01$  мМ ( $n = 10$ , рис. 2). Ионы калия увеличивали сродство ГЛК к Glc (в отсутствие KCl  $S_{0,5}^{Glc}$  составило  $9,9 \pm 0,8$  мМ ( $n = 3$ ) и не влияли на кооперативность фермента ( $h = 1,70 \pm 0,06$ ,  $n = 3$ , рис. 2).

При температуре 2°C (рис. 2) по сравнению с температурой 25°C степень кооперативности ГЛК снижалась ( $h = 1,35 \pm 0,02$ ,  $n = 3$ ). Кроме того, почти в три раза снижалось сродство фермента к субстрату —  $S_{0,5}^{Glc} = 20,0 \pm 1,8$  мМ ( $n = 3$ ).

Таким образом, можно заключить, что именно кооперативность ГЛК обеспечивает физиологически необходимый уровень активации фермента в условиях гипергликемии. Гипотетическая ГЛК, лишенная кооперативности по субстрату и обладающая низким сродством к нему, не могла бы эффективно утилизировать Glc даже при очень высокой степени гипергликемии. Кооперативность проявляется и в экспериментах с культурой гепатоцитов, когда при инкубации

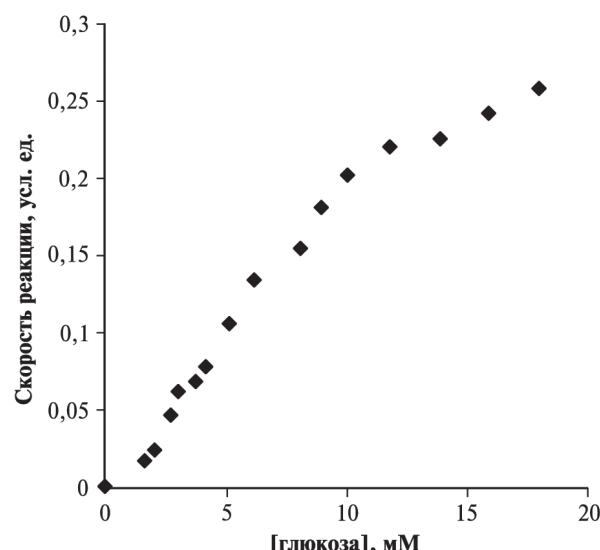


Рис. 1. Зависимость скорости глюкокиназной реакции от концентрации Glc в присутствии стабилизаторов фермента

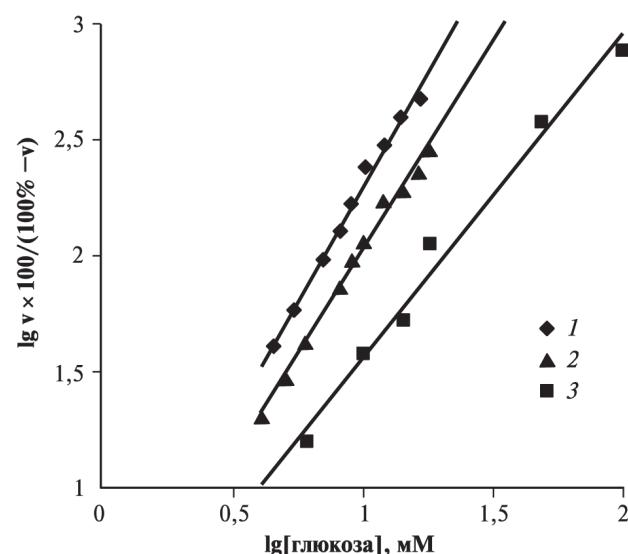


Рис. 2. Зависимость скорости глюкокиназной реакции от концентрации Glc в разных условиях в координатах Хилла: 1 — 25°C, в присутствии 100 мМ KCl; 2 — 25°C, в отсутствие 100 мМ KCl; 3 — 2°C, в присутствии 100 мМ KCl

клеток в среде с возрастающими концентрациями Glc наблюдается S-образное увеличение значений параметров, прямо зависящих от активности ГЛК: скорости фосфорилирования Glc, концентрации Г6Ф и уровня гликогена [8].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Massa M.L., Gagliardino J.J., Francini F. Liver glucokinase: An overview on the regulatory mechanisms of its activity // IUBMB Life. 2011. Vol. 63. N 1. P. 1–6.
- Postic C., Shiota M., Magnuson M.A. Cell-specific roles of glucokinase in glucose homeostasis // Recent Prog. Horm. Res. 2001. Vol. 56. P. 195–217.
- Nordlie R.C., Foster J.D., Lange A.J. Regulation of glucose production by the liver // Annu. Rev. Nutr. 1999. Vol. 19. P. 379–406.
- Аврамова Л.В. Влияние участников гексокиназной реакции на взаимодействие гексокиназы с митохондриями: Дис. ... канд. биол. наук. М., 1994. 149 с.

5. *Seoane J., Gomez-Foix A.M., O'Doherty R.M., Gomez-Ara K., Newgard C.B., Guinovart L.L.* Glucose 6-phosphate produced by glucokinase, but not hexokinase I, promotes the activation of hepatic glycogen synthase // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. N 39. P. 23756–23760.
6. *Cardenas M.L.* Glucokinase: its regulation and role in liver metabolism. Austin: Landes Company, 1995. 210 p.
7. *Cardenas M.L.* Comparative biochemistry of glucokinase // Basics to novel therapeutics / Eds. F.M. Matschinsky, M.A. Magnuson. Basle: Karger, 2004. P. 31–41.
8. *Hérndahl L., Schmoll D., Herling A.W., Agius L.* The role of glucose 6-phosphate in mediating the effects of glucokinase overexpression on hepatic glucose metabolism // *FEBS J.* 2006. Vol. 273. N 2. P. 336–346.
9. *Storer A.C., Cornish-Bowden A.* Kinetics of rat liver glucokinase. Co-operative interactions with glucose at physiologically significant concentrations // *Biochem. J.* 1976. Vol. 159. N 1. P. 7–14.
10. *Moore M.C., Coate K.C., Winnick J.J., An Z., Cherrington A.D.* Regulation of hepatic glucose uptake and storage in vivo // *Adv. Nutr.* 2012. Vol. 3. N 3. P. 286–294.
11. *Larion M., Miller B.G.* Homotropic allosteric regulation in monomeric mammalian glucokinase // *Arch. Biochem. Biophys.* 2012. Vol. 519. N 2. P. 103–111.
12. *Heredia V.V., Thomson J., Nettleton D., San S.* Glucose-induced conformational changes in glucokinase mediate allosteric regulation: transient kinetic analysis // *Biochemistry.* 2006. Vol. 45. N 24. P. 7553–7568.
13. Гончарова Н.Ю. Особенности кинетического поведения глюкокиназы в регуляции активности фермента в печени крысы // Мат-лы съезда Биохимического общества Российской академии наук. Москва 19–23 мая 1997. Тезисы стендовых сообщений. Часть I. Пущино, 1997. С. 183.
14. *Schimke R.T., Grossbard L.* Studies on isozymes of hexokinase in animal tissues // *Ann. N.Y.: Acad. Sci.* 1968. Vol. 151. N 1. P. 332–350.
15. *Cardenas M.L., Rabajille E., Niemeyer H.* Maintenance of the monomeric structure of glucokinase under reacting conditions // *Arch. Biochem. Biophys.* 1978. Vol. 190. N 1. P. 142–148.
16. *Lin S.X., Neet K.E.* Demonstration of a slow conformational change in liver glucokinase by fluorescence spectroscopy // *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265. N 17. P. 9670–9675.
17. *Salas J., Salas M., Vinuela E., Sols A.* Glucokinase of rabbit liver // *J. Biol. Chem.* 1965. Vol. 240. P. 1014–1018.
18. *Holroyde M.L., Allen M.B., Storer A.C., Warsy A.S., Chesher J.M., Traver I.P., Cornish-Bowden A., Walker D.G.* The purification in high yield and characterization of rat hepatic glucokinase // *Biochem. J.* 1976. Vol. 153. N 2. P. 363–373.
19. *Davidson A.L., Arion W.J.* Factors underlying significant underestimations of glucokinase activity in crude liver extracts: physiological implications of higher cellular activity // *Arch. Biochem. Biophys.* 1987. Vol. 253. N 1. P. 156–167.
20. *Reyes A., Cardenas M.L.* All hexokinase isoenzymes coexist in rat hepatocytes // *Biochem. J.* 1984. Vol. 221. N 2. P. 303–309.
21. *Andreone T.L., Printz R.L., Pilks S.L., Magnusson M.A., Granner D.K.* The amino acid sequence of rat liver glucokinase deduced from cloned cDNA // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264. N 1. P. 363–369.
22. Курганов Б.И. Аллостерические ферменты. М.: Наука, 1978. 248 с.

Поступила в редакцию  
06.02.14

## CHARACTERISTICS OF REGULATION OF THE ACTIVITY OF GLUCOKINASE FROM RAT LIVER

**L.Ya. Khu, N.Yu. Goncharova, A.M. Rubtsov**

A simple method for purification of glucokinase from soluble fraction of rat liver has been developed which allows to obtain enzyme preparation with high specific activity and native cooperative characteristics practically lacking of contamination of other molecular forms of hexokinase. The dependence of enzyme activity upon glucose concentration shows pronounced sigmoid behavior: at 25°C and 2°C the Hill's coefficients on whole range of substrate concentration are equal to 1,76 and 1,35, and S<sub>0,5</sub> values for glucose are equal 6,9 mM and 20 mM, respectively. The role of kinetic mechanism of the reaction in the regulation of glucokinase activity in liver is discussed.

**Key words:** glucokinase, hexokinase, cooperative properties.

### Сведения об авторах

Ху Ли Янь — магистрант кафедры биохимии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-29-25.  
 Гончарова Наталья Юрьевна — канд. биол. наук, доцент кафедры биохимии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-29-25; e-mail: nyugoncharova@mail.ru  
 Рубцов Александр Михайлович — докт. биол. наук, проф. кафедры биохимии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-44-34; e-mail: am\_rubtsov@mail.ru