

# 胸腰椎先天性畸形儿童解毒及 DNA 修复的基因分子遗传分析

## MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF GENES FOR DETOXIFICATION AND DNA REPAIR IN CHILDREN WITH CONGENITAL DEFORMITIES OF THE THORACIC AND LUMBAR SPINE

© M.V. Sogoyan, S.E. Khalchitsky, S.V. Vissarionov, D.N. Kokushin, A.N. Filippova

The Turner Scientific Research Institute for Children's Orthopedics, Saint Petersburg, Russia

Received: 08.06.2018

Accepted: 03.09.2018

**引言。**先天性脊柱弯曲起因于椎体发育异常，它在脊柱畸形组织结构中占 3.2%。一些青春期所出现的畸形可导致重度僵硬性脊柱弯曲，通常伴有不可逆的神经障碍。及时发现病情和早期手术治疗可预防儿童神经功能障碍的发展和脊柱的严重先天性畸形。然而，仅根据临床和放射检查难以预测婴幼儿的先天性脊柱弯曲病情。因此，先天畸形遗传标记研究成为当务之急。

**材料与amp;方法。**采用临床和放射诊断方法检查两百名 1.2-16 岁患有先天性胸腰椎畸形的儿童。通过分析在解毒和 DNA 修复第一和第二阶段的几个基因中的多态性区域进行分子遗传研究，其作为很多先天畸形的发病诱因具有临床意义。采用聚合酶链式反应 (PCR) 方法确定基因多态性。使用聚丙烯酰胺凝胶中的 DNA 凝胶电泳确定结果。

**结果与amp;讨论。**研究基因 CYP1A2, NAT2, GSTM1, GSTT1, GSTP1, XRCC1, XRCC3 的多态性以及它们在先天性脊柱畸形 (CSD) 患者中的频率分布。每个基因的结果反映在数字图中，其指标与对照组值进行比较。

**结论。**在多数 (83%) 脊髓先天性变形的患者中，存在同型结合状态的候选基因的突变。但是，同时携带多个突变等位基因的 CSD 患者是对照组的两倍多。有多个和合并脊柱发育缺陷的儿童存在更多的解毒和 DNA 修复基因突变。所取得的结果在一定程度上印证了患者早期的脊柱先天性畸形发病过程。然而，儿童脊柱先天性畸形病情恶化的分子遗传学标准的最终评估和识别还需要更多研究。

**关键词：**儿童；脊柱先天性缺陷；分子遗传分析；解毒与修复基因。

**Introduction.** Spine congenital curvatures, which form from anomalies in the development of vertebral bodies, comprise 3.2% of the general structure of vertebral column deformities. Several such anomalies present during adolescence lead to severe and rigid curvature of the spinal column and are often accompanied by irreversible neurological disorders. The timely detection of the progressive forms of curvature and early surgical treatment are measures that prevent against neurological deficit development and gross congenital deformities of the spine in children. However, it is extremely difficult to predict the course of congenital spinal column deformation in infants based on clinical and radiological investigations alone. Therefore, the study of congenital malformation genetic markers is an essential and immediate task.

**Materials and methods.** Two hundred 1.2-16-year-old children with congenital deformities of the thoracic and lumbar spine were examined using clinical and radiation diagnostic methods. Molecular genetic studies were performed by analyzing several polymorphic regions in the genes for the first and second stages of detoxification and DNA repair, which are of clinical importance as predisposing factors in several congenital malformations. Polymorphisms were determined using the polymerase chain reaction (PCR) method. The results were determined using gel electrophoresis of DNA in a polyacrylamide gel.

**Results and discussion.** The polymorphisms of the genes CYP1A2, NAT2, GSTM1, GSTT1, GSTP1, XRCC1, XRCC3 and their frequency distributions among patients with congenital spine deformities (CSD) were studied. The results for each gene are presented in the digital diagrams, and their indicators are compared with the values of the control group.

**Conclusion.** In most patients (83%) with spinal congenital deformations, there were mutations of candidate genes in the homozygous state; however, the simultaneous carriage of several mutant alleles in patients with CSD was more than twice that in the control group. Children with multiple and combined defects in spine development noted the presence of more mutations in the genes for detoxification and DNA repair. The obtained results already assume to a certain extent the course of the spine congenital deformity in patients at an early age. However, the final evaluation and identification of molecular genetic criteria for the progressive course of spine congenital deformities in children requires further study.

**Keywords:** children; congenital defects of the spine; molecular genetic analysis; genes of detoxification and reparation.

## 引言

由于椎体发育异常而引起的先天性脊柱弯曲在所有脊柱畸形中占 3.2%。大约 50% 的先天性脊柱弯曲病情出现恶化 [1]。在青春期出现的畸形可导致重度僵硬性脊柱弯曲，通常伴有不可逆的神经障碍。为了预防儿童神经功能障碍和脊柱的严重先天性畸形，及时发现病情和三岁之前进行早期手术治疗是非常必要的 [1-3]。然而，仅根据临床和放射检查数据难以预测婴幼儿的先天性脊柱弯曲病情。

针对先天畸形发病的遗传条件进行研究迫在眉睫。了解了该现象的生物学本质后，我们可以采取针对性的干预治疗，对一岁以内的婴幼儿的脊柱畸形病情恶化和椎体异常发育进行诊断。同时，也可对患者进行早期的手术干预治疗，矫正先天性脊柱弯曲，对脊柱活动节段的固定较小。

类似于任何多因素病理，先天性畸形与在孕期接触不利的致畸环境因素（缺氧、药品、饮酒、体温过高、胰岛素依赖型糖尿病，和孕期糖尿病） [4-9] 和遗传因素（染色体畸变、遗传素质引起的基因多态性、新生突变，和表观遗传变异） [10-13] 有关。这些因素各自或共同影响胚胎发育和脊椎的异常发育。近期的研究对伴随先天性脊柱畸形（CSD）的分子遗传标记进行了分析 [14-16]。这些研究详尽地考虑了 CSD 的病因学和发病机理可能因素。大量的研究证明，在脊柱先天性畸形与 *TBX6* 基因突变之间存在密切的关系 [17-19]。这些研究的主要目的是采用临床和放射检查数据，制定一套诊断方法，评估脊柱畸形儿童的先天性脊柱弯曲病情恶化速度，根据分子、遗传和生物化学标准建立诊断方法。

本研究旨在针对胸腰椎先天性畸形儿童的解毒及 DNA 切除修复第 1 和第 2 阶段基因进行分子遗传分析。

## 材料与方

我们对 200 名年龄在 1 岁两个月到 16 岁患有胸腰椎先天性畸形的儿童进行了观察，采用临床和放射诊断标准方法对其进行诊断。在先天性脊柱弯曲的结构中，我们发现了不同的脊椎发育异常，例如异常构造（外侧和后外侧半椎骨和后侧和外侧楔形椎骨）、脊柱融合不良（不对称蝴蝶形椎骨）、脊椎骨分节不良（椎体外侧表面和前表面阻塞），和肋骨骨性联接。32% 的儿童存在孤立的胸腰椎畸形，其余的 68% 的患者存在

多个和合并的胸和/或腰椎畸形。所有患者都存在临床脊柱侧凸和/或胸和/或胸腰椎脊柱后凸，表现为肩胛带不对称，腰三角形，骨盆变形。脊柱侧凸程度为 30°-72°，脊柱后凸程度为 26°-52°。多数儿童在生长发育过程中出现先天性脊柱弯曲的恶化。

38% 的儿童伴随其他器官和系统的先天性畸形，例如食管闭锁、气管食管痿、肾功能发育不全、肛门闭锁、先天性上唇完全裂、气管支气管树先天性畸形、肺发育不良，和先天性心脏病，通常是由于与其他基因有关的染色体畸变。对照组包括 96 名年龄在 2-16 岁未患有脊柱病变的健康儿童。

通过分析在解毒和 DNA 修复第一和第二阶段的几个基因中的多态性区域进行分子遗传研究，其作为很多先天畸形的发病诱因具有临床意义 [20, 21]。

研究基 *CYP1A2*、*NAT2*、*GSTM1*、*GSTT1*、*GSTP1*、*XRCC1*，和 *XRCC3*（表 1）的多态性，以及它们在 CSD 患者中的频率分布。

表 1 研究中的基因等位基因突变

基因	多态性	基因型
<i>CYP1A2</i>	164 A → c	A/A, A/c, c/c
<i>GSTM1</i>	+/0	+/00
<i>GSTT1</i>	+/0	+/00
<i>GSTP1</i>	Ile105Val	A/A, A/G, G/G
<i>GSTP1</i>	Ala(C)114Val(T)	c/c, c/T, T/T
<i>NAT2</i>	C481T (KpnI)	*5
<i>NAT2</i>	G590A (TaqI)	*6
<i>XRCC1</i>	Arg399Gln	G/G, G/A, A/A
<i>XRCC3</i>	Thr241Met	c/c, c/T, T/T

采用聚合酶链反应(PCR)方法对多态性进行确定。根据厂家的说明，使用由“Interlabservice”和“DNA-technology”生产的诊断工具将分析所需的 DNA 与全血进行分离。使用 Bio-Rad T100 工具进行 PCR 研究。PCR 混合物和放大方式独立开发。使用限制性片段长度多态性 (RFLP) 方法确定核苷酸替换。使用聚丙烯酰胺凝胶中的 DNA 凝胶电泳方法评估 PCR 和 RFLP 的多态性结果。

使用 Statistics 6.0 软件进行统计学分析。采用双尾分布非参数配对 t 检验和统计学置信度指标对观察组的差异显著性进行评估。在  $p < 0.05$  时，指标差异具有显著性。

### 结果与讨论

研究期间，对所研究的 CSD 患者的基因结构中的多态性发生频率进行了分析。我们还将他们的多态性严重程度与健康儿童进行了比较分析。研究结果如图 1-4 所示。

*CYP1A2* 是 p 450 细胞色素总科中的一科，其表达由某种多环芳烃 (PAHs) 诱发。内源性酶作用物可以将一些 PAHs 代谢为致癌中间体。各种环境接触、遗传差异和基因间相互作用可导致人体中 *CYP1A2* 活动的改变。

研究显示，[22] C-等位基因的特点为较慢的异生物质代谢。在我们的研究中，56.5% 的 CSD 患者存在慢代谢型等位基因，而在对照组中该指标占 48.1%。

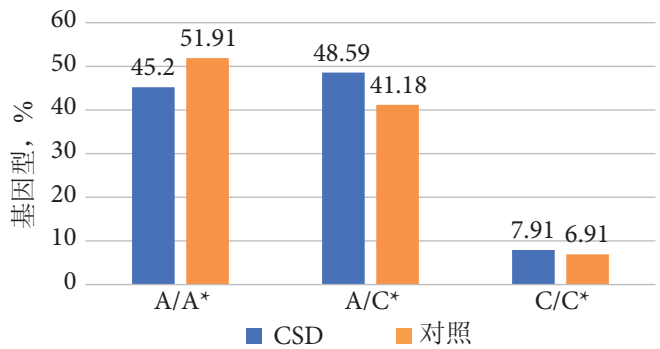


图 1. *CYP1A2* 基因型出现频率 164 A/c 基因, % (\* $p < 0.05$  与对照组比较): CSD - 先天性脊柱畸形

*GSTM1* 和 *GSTT1* 基因属于有害异物解毒第二阶段基因组，其产物将有害异物和致癌物转化为五毒的水溶性产物，防止 DNA 损伤。

*GSTM1* 基因缺失导致相应酶的缺失。因此，增加了对诱变剂和致癌物影响的敏感度。在有害异物和过敏原的影响下，携带 *GSTP1* 基因的 105Ile 变体和 *GSTM1* 基因缺失增

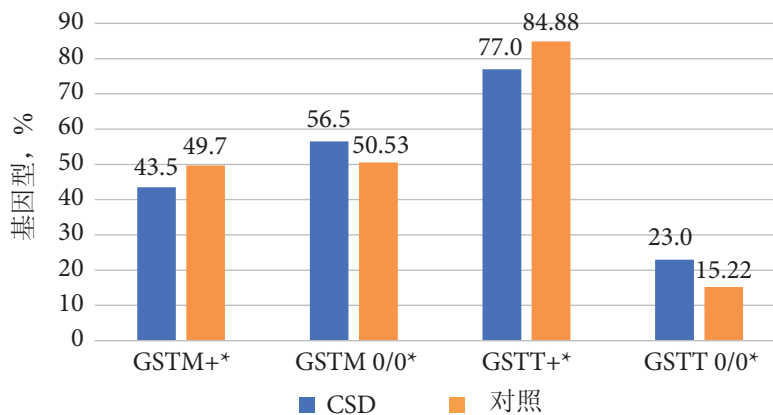


图 2. *GSTM1* 和 *GSTT1* 基因型出现频率, % (\* $p < 0.05$  与对照组比较): CSD - 先天性脊柱畸形

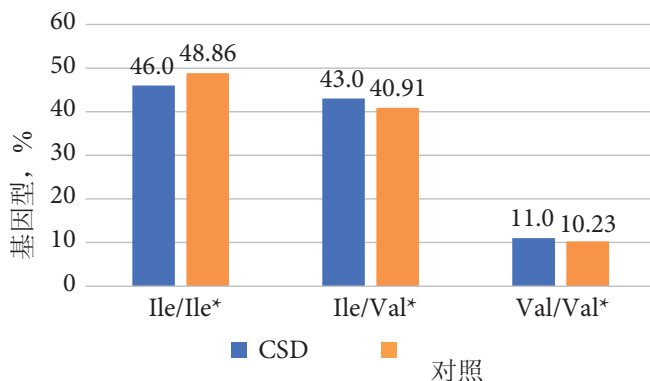


图 3. *GSTP1* 基因型出现频率 (Ile105Val), % (\* $p < 0.05$  与对照组比较): CSD - 先天性脊柱畸形

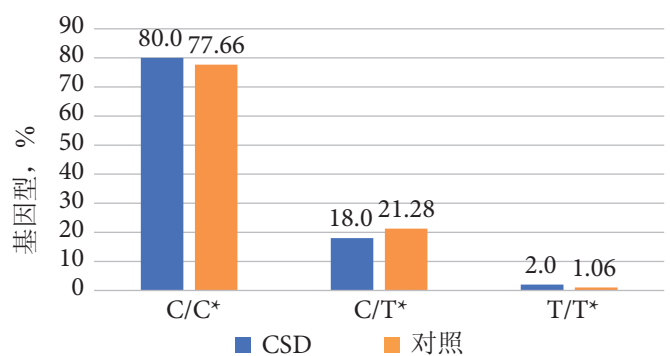


图 4. *GSTP1* (c114T) 基因型出现频率, % (\* $p < 0.05$  与对照组比较): CSD - 先天性脊柱畸形

表 2 CSD 患者和对照组患者中的 XRCC3 基因的基因型分布

基因	基因型	CSD, %	对照组, %
XRCC3	C399C	53.64*	78.13
	C399T	33.66*	13.54
	T399T	12.7*	8.33

注意。\*  $p < 0.05$  与对照组比较。

加了免疫球蛋白 E 水平和组胺。*GSTMI* 基因缺失增加了几种疾病的风险, 包括各种妊娠病理, 胚胎受损和先天性脊柱畸形。

当 *GSTPI* 缺失时, 酶也无法形成。因此, 身体代谢有害异物的能力降低。当同时缺失 *GSTMI* 和 *GSTTI* 时, 这种影响尤其显著。

在观察组患者中, 79.5% 的患者缺失 *GSTMI* 或 *GSTTI* 基因, 13.5% 的患者同时缺失两种基因。这在 CSD 病因学中是一个重要因素。在对照组中, 缺失一种或另一种基因的患者比例为 65.77%, 缺失两种基因的比例为 9.47% ( $p < 0.05$ )。

在 *GSTPI* 基因中存在两个多态性: 105Val 和 114Val, 产生活性下降的酶。因此, 增加了身体对诱变剂和致癌物影响的敏感性。同时携带这些多态性以及缺失 *GSTMI* 基因使这种敏感性增加。

我们的研究显示, CSD 患者与对照组患者的 *GSTPI* 基因型分布没有显著差异。但是, 8.5% 的 CSD 患者缺失 *GSTMI* 基因, 在次要等位基因同时存在同质接合体。而对照组未发现这种现象。这也可能是 CSD 的一个诱发因素。

*NAT2* 基因指解毒系统的第二阶段基因, 它决定负责控制诱变和致癌活动的杂环胺的 N-乙酰化作用和  $\alpha$ -乙酰化作用反应的 N-乙酰转氨酶 2。*NAT2* 基因携带“较慢的”等位基因可降低酶的活性, 降低身体对这种诱变剂和致癌物组的敏感度。

在 *NAT2* 基因的研究中, 与对照组相比较, CSD 患者的较慢等位基因乙酰化 \* 6/6 (G590A) 的同型结合基因型的频率增加了 35.46% (分别为 9.13% 和 6.74%)。

*XRCCI* 基因是一种 DNA 修复基因, 可有效地修复由电离辐射和烷化剂造成的单链断裂。*Arg399Gln* 多态性存在于基因的重要功能区。以甘氨酸取代精氨酸改变了蛋白质产物的构造, 降低其修复活性。

*XRCC3* 基因也属于 DNA 修复基因类别, 维护染色体稳定性, 修复受损 DNA。

*XRCCI* 基因的 *Arg399Gln* 多态性的等位基因研究显示与对照组没有显著差异。但是, 同形结合状态的突变等位基因的百分比高于 CSD 患者。

有关 *XRCC3* 基因, CSD 患者和对照组患者的 Thr241Met 多态性的等位基因变体粉笔差异更加显著 (表 2)。

同样值得注意的是, CSD 患者中突变等位基因的携带者占 46.36%, 而对照组中突变等位基因的携带者占 21.87%。

所有接受检查的 CSD 患者存在至少一个杂合状态的解毒和修复基因突变等位基因。但是, 我们认为, 所研究基因的同型结合突变等位基因的指标更为重要。在 CSD 患者中, 该指标为 83% (对照组为 62.2%)。

同型结合状态的多个突变等位基因更具意义。53% 的 CSD 患者中体现了该指标, 与对照组存在显著差异 (22.5%)。

在与临床数据及其解释进行比较时, 为了建立分子遗传疾病综合评估的运算法则 (对 CSD 易感性和病程预测), 我们还需要应用现代生物信息学方法。

## 结论

通过本次研究, 我们获取了大量有关胸腰椎先天性畸形儿童解毒及 DNA 修复的基因的突变等位基因的各种组合资料。我们对患者和对照组的所研究的基因多态性的组合的频率进行了比较分析, 将其与临床现象和放射诊断结果进行比较。多数先天性脊柱畸形患者 (83%) 存在同型结合状态的候选基因的突变, 携带多个突变等位基因的 CSD 患者的数量超过对照组患者两倍多。

当前结果显示, 不良基因可导致这种严重疾病的发病和恶化。我们得出结论, 有多个和合并脊柱畸形的儿童存在较高数量的解毒和 DNA 修复基

因的突变。通过这些结果，我们可以在一定程度上确定儿童先天性脊柱畸形病程的性质。但是，我们还需要进一步研究，以最终评估和确定儿童先天性脊柱畸形发病的分子和遗传标准。

### 其他信息

**科研经费。** 本次研究是美国“针对患有严重先天性畸形和脊柱损伤的儿童的手术治疗中采用原型技术建立新脊柱系统”研究项目的一部分。

**利益冲突。** 作者声明，这篇文章的发表不存在明显和潜在的利益冲突。

**伦理审查。** 患者（其代表）同意我们处理和发表个人资料。

### References

1. Виссарионов С.В., Картавенко К.А., Кокушин Д.Н., Ефремов А.М. Хирургическое лечение детей с врожденной деформацией грудного отдела позвоночника на фоне нарушения формирования позвонков // Хирургия позвоночника. – 2013. – № 2. – С. 32–37. [Vissarionov S.V., Kartavenko K.A., Kokushin D.N., Efremov A.M. Surgical treatment of children with congenital deformity of the thoracic spine with vertebral formation. *Spine Surgery*. 2013; (2): 32–37. (In Russ.)]
2. Виссарионов С.В., Кокушин Д.Н., Картавенко К.А., Ефремов А.М. Хирургическое лечение детей с врожденной деформацией поясничного и пояснично-крестцового отделов позвоночника // Хирургия позвоночника. – 2012. – № 3. – С. 33–37. [Vissarionov S.V., Kokushin D.N., Kartavenko K.A., Efremov A.M. Surgical treatment of children with congenital deformity of the lumbar and lumbosacral spine. *Spine Surgery*. 2012; (3): 33–37. (In Russ.)]
3. Виссарионов С.В., Кокушин Д.Н., Белянчиков С.М., Ефремов А.М. Хирургическое лечение детей с врожденной деформацией верхнегрудного отдела позвоночника // Хирургия позвоночника. – 2011. – № 2. – С. 35–40. [Vissarionov S.V., Kokushin D.N., Belianchikov S.M., Efremov A.M. Surgical treatment of children with congenital deformity of the upper thoracic spine. *Spine Surgery*. 2011; (2): 35–40. (In Russ.)]
4. Webster W.S., Abela D. The effect of hypoxia in development. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2007; 81(3): 215–228. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20102>.
5. Martínez-Frías M.L., Bermejo E., Rodríguez-Pinilla E., Frías J.L. Risk for congenital anomalies associated with different sporadic and daily doses of alcohol consumption during pregnancy: a case-control study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2004; 70(4): 194–200. <https://doi.org/10.1002/bdra.20017>.
6. Vertebral Anomalies: Hemivertebra. In: Holmes LB. Common Malformations. New York: Oxford University Press; 2012. P. 283–289.
7. Breen J.G., Claggett T.W., Kimmel G.L., et al. Heat shock during rat embryo development *in vitro* results in decreased mitosis and abundant cell death. *Reprod Toxicol*. 1999; 13(1): 31–39. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(98\)00056-2](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(98)00056-2).
8. Alexander P.G., Tuan R.S. Role of environmental factors in axial skeletal dysmorphogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2010; 90(2): 118–132. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20179>.
9. Aberg A., Westbom L., Kallen B. Congenital malformation among infants who mothers had gestational diabetes or preexisting diabetes. *Early Hum Dev*. 2001; 61(2): 85–95. [https://doi.org/10.1016/S0378-3782\(00\)00125-0](https://doi.org/10.1016/S0378-3782(00)00125-0).
10. Yashwanth R., Chandra N., Gopinath P.M. Chromosomal Abnormalities among Children with Congenital Malformations. *Int J Hum Genet*. 2010; 10(1-3): 57–63. <https://doi.org/10.1080/09723757.2010.11886085>.
11. Prescott K.R., Wilkie A. Genetic aspects of birth defects: new understandings of old problems *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2007; 92(4): F308–F314. <https://doi.org/10.1136/adc.2004.062968>.
12. Black H.A., Parry D., Atanur S.S., et al. *De novo* mutations in autosomal recessive congenital malformations. *Genet Med*. 2016; 18(12): 1325–1326. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.62>.
13. Lo C.L., Zhou F.C. Environmental alterations of epigenetics prior to the birth. *Int Rev Neurobiol*. 2014; 115: 1–49. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801311-3.00001-9>.
14. Sparrow D.B., Chapman G., Smith A.J., et al. A mechanism for gene-environment interaction in the etiology of congenital scoliosis. *Cell*. 2012; 149(2): 295–306. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.054>.
15. Giampietro P.F., Raggio C.L., Blank R.D., et al. Clinical, genetic and environmental factors associated with congenital vertebral malformations. *Mol Syndromol*. 2013; 4(1–2): 94–105. <https://doi.org/10.1159/000345329>.
16. Giampietro P.F. Genetic aspects of congenital and idiopathic scoliosis. *Scientifica (Cairo)*. 2012; 2012: 1–15. <https://doi.org/10.6064/2012/152365>.
17. Takeda K., Kou I., Kawakami N., et al. Compound Heterozygosity for Null Mutations and a Common Hypomorphic Risk Haplotype in TBX6 Causes Congenital Scoliosis. *Hum Mutat*. 2017; 38(3): 317–323. <https://doi.org/10.1002/humu.23168>.
18. Lefebvre M., Duffourd Y., Jouan T., et al. Autosomal recessive variations of TBX6, from congenital scoliosis to spondylocostal dysostosis. *Clin Genet*. 2017; 91(6): 908–912. <https://doi.org/10.1111/cge.12918>.
19. Chen W., Liu J., Yuan D., et al. Progress and perspective of TBX6 gene in congenital vertebral malformations. *Oncotarget*. 2016; 7(35): 57430–57441. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10619>.
20. Шабалдин А.В., Глушкова О.А., Макаренченко О.С., и др. Полиморфизм генов биотрансформации ксенобиотиков у женщин, родивших детей с врожденными пороками развития // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2007. – Т. 86. –

- № 1. – С. 7–14. [Shabaldin A.V., Glushkova O.A., Makarchenko O.S., et al. Polimorfizm genov biotransformatsii ksenobiotikov u zhenshchin, rodivshikh detey s vrozhdannymi porokami razvitiya. *Pediatriia*. 2007; 86(1): 7–14. (In Russ.)]
21. Olshan A.F., Shaw G.M., Millikan R.C., et al. Polymorphisms in DNA repair genes as risk factors for spina bifida and orofacial clefts. *Am J Med Genet A*. 2005; 135(3): 268–273. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30713>.
22. Sachse C., Brockmöller J., Bauer S., Roots I. Functional significance of a C → A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 *CYP1A2* gene tested with caffeine. *Br J Clin Pharmacol*. 1999; 47(4): 445–449. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.1999.00898.x>.

---

### Information about the authors

---

**Marina V. Sogoyan** – MD, Research Associate of the Genetic Laboratory of the Center for Rare and Hereditary Diseases in Children. The Turner Scientific Research Institute for Children's Orthopedics, Saint Petersburg, Russia. E-mail: [sogoyanmarina@mail.ru](mailto:sogoyanmarina@mail.ru).

**Sergey E. Khalchitsky** – MD, PhD, Research Associate of the Genetic Laboratory of the Center for Rare and Hereditary Diseases in Children. The Turner Scientific Research Institute for Children's Orthopedics, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0003-1467-8739>. E-mail: [s\\_khalchitski@mail.ru](mailto:s_khalchitski@mail.ru).

**Sergei V. Vissarionov** – MD, PhD, Professor, Deputy Director for Research and Academic Affairs, Head of the Department of Spinal Pathology and Neurosurgery. The Turner Scientific Research Institute for Children's Orthopedics. <https://orcid.org/0000-0003-4235-5048>. E-mail: [vissarionovs@gmail.com](mailto:vissarionovs@gmail.com).

**Dmitry N. Kokushin** – MD, PhD, Senior Research Associate of the Department of Pathology of the Spine and Neurosurgery. The Turner Scientific Research Institute for Children's Orthopedics, Saint Petersburg, Russia. E-mail: [partgerm@yandex.ru](mailto:partgerm@yandex.ru).

**Alexandra N. Filippova** – MD, PhD Student, Orthopedic and Trauma Surgeon of the Department of Spine Pathology and Neurosurgery. The Turner Scientific Research Institute for Children's Orthopedics, Saint Petersburg, Russia. E-mail: [alexandrjonok@mail.ru](mailto:alexandrjonok@mail.ru).