



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/50 (2024.01)

(21)(22) Заявка: 2023129329, 13.11.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.11.2023

Дата регистрации:
02.05.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 13.11.2023

(45) Опубликовано: 02.05.2024 Бюл. № 13

Адрес для переписки:
308015, г.Белгород, ул. Победы, 85, НИУ
"БелГУ", Шевцовой Ирине Владимировне

(72) Автор(ы):

Чурносов Михаил Иванович (RU),
Решетников Евгений Александрович (RU),
Елыкова Анна Владимировна (RU),
Пономаренко Ирина Васильевна (RU),
Чурносова Мария Михайловна (RU),
Пономаренко Марина Сергеевна (RU),
Чурносков Владимир Иванович (RU),
Решетникова Юлия Николаевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет" (НИУ "БелГУ") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2738685 C1, 15.12.2020. RU
2786313 C1, 20.12.2022. RU 2775436 C1,
30.06.2022. RU 2557952 C1, 27.07.2015. US
2009087845 A1, 02.04.2009. БАБУШКИНА Н.П.
и др., Генетическая подразделенность
бурятского населения, Генетика, 2014, т. 50, N
3, стр. 330-340.

(54) Способ прогнозирования веса новорожденного на основе генетических данных матерей

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к способу прогнозирования веса новорожденного. Указанный способ основан на генетических данных матерей русской национальности, являющихся уроженками Центрально-Черноземного региона РФ, и включает выделение ДНК из периферической венозной крови, анализ полиморфных локусов rs1805087 MTR - rs1979277

SHMT1 - rs11568818 - MMP7 - rs3025058 MMP3 и прогнозирование высокого риска рождения детей с низкой массой тела при выявлении комбинации генотипов у матери rs1805087 MTR AA - rs1979277 SHMT1 CC - rs11568818 - MMP7 TT - rs3025058 MMP3 6A6A. Настоящее изобретение обеспечивает прогнозирование веса новорожденного на основе генетических данных матерей. 4 ил., 4 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
G01N 33/50 (2024.01)

(21)(22) Application: **2023129329, 13.11.2023**

(24) Effective date for property rights:
13.11.2023

Registration date:
02.05.2024

Priority:

(22) Date of filing: **13.11.2023**

(45) Date of publication: **02.05.2024** Bull. № 13

Mail address:
**308015, g.Belgorod, ul. Pobedy, 85, NIU "BelGU",
Shevtsovoj Irine Vladimirovne**

(72) Inventor(s):

**Churnosov Mikhail Ivanovich (RU),
Reshetnikov Evgenii Aleksandrovich (RU),
Elykova Anna Vladimirovna (RU),
Ponomarenko Irina Vasilevna (RU),
Churnosova Mariia Mikhailovna (RU),
Ponomarenko Marina Sergeevna (RU),
Churnosov Vladimir Ivanovich (RU),
Reshetnikova Iuliia Nikolaevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia "Belgorodskii gosudarstvennyi
natsionalnyi issledovatel'skii universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**

(54) **METHOD FOR PREDICTION OF NEWBORN'S WEIGHT BASED ON GENETIC DATA OF MOTHERS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology, particularly to a method for prediction of newborn's weight. Said method is based on genetic data of mothers of Russian nationality, who are natives of the Central Black Earth Region of the Russian Federation, and includes DNA extraction from peripheral venous blood, analysis of polymorphic loci rs1805087 MTR – rs1979277 SHMT1 – rs11568818 – MMP7 – rs3025058

MMP3 and prediction of high risk of birth of children with low body weight when detecting a combination of genotypes in the mother rs1805087 MTR AA – rs1979277 SHMT1 CC – rs11568818 – MMP7 TT – rs3025058 MMP3 6A6A.

EFFECT: present invention provides prediction of newborn weight based on genetic data of mothers.

1 cl, 4 dwg, 4 ex

RU 2 818 358 C1

RU 2 818 358 C1

Изобретение относится к области медицины, а именно к акушерству и гинекологии, и может быть использовано для прогнозирования риска рождения детей с низкой массой тела на основе генетических данных матерей.

Начальный этап онтогенеза организма человека, включающий его внутриутробное развитие и имеющий ключевое значение в дальнейшей жизни организма, непосредственно зависит от тех условий, в которых развивается эмбрион и плод [Turco, M. Y. Development of the human placenta / M. Y. Turco, A. Moffett. - DOI: 10.1242/dev.163428 // Development. - 2019. - Vol. 146, № 22. - Art. dev163428. - URL: <https://dev.biologists.org/content/develop/146/22/dev163428.full.pdf>]. Возникновение различных нарушений гестации негативно сказывается на состоянии развивающегося организма (эмбриона, плода), обуславливая высокие показатели перинатальной заболеваемости и смертности новорожденных и приводя к неблагоприятным последствиям в дальнейшей их жизни (высокая заболеваемость в период детства и во взрослом возрасте и др.), [Ярыгина, Т. А. Задержка (замедление) роста плода: все, что необходимо знать практикующему врачу / Т. А. Ярыгина, А. И. Гус // Акушерство и гинекология. - 2020. - № 12. - С. 14-24].

В структуре новорожденных ежегодно регистрируется увеличение числа детей с низкой, очень низкой и экстремально низкой массой тела при рождении. Известно, что маловесные дети являются группой риска по перинатальной и младенческой смертности, а также развитию тяжелых инвалидизирующих состояний [Ancel PY. Epidemiology of preterm births. (In French). Rev Prat. 2012;62(3):362-365]. Кроме того, низкая масса тела при рождении сопряжена с трудностями диспансеризации и реабилитации таких пациентов в различные возрастные периоды жизни.

Поиск факторов, ассоциированных с рождением маловесных детей до 2500 г, необходим для фокусного формирования групп диспансерного наблюдения женщин, планирующих беременность [Soll R.F. Progress in the care of extremely preterm infants. JAMA. 2015; 314(10):1007-1008. doi: 10.1001/jama.2015.10911].

В настоящее время опубликовано достаточное количество исследований, посвященных анализу различных факторов риска преждевременных родов, которые показали связь рождения маловесного ребенка не только с биологическим анамнезом матери, но и с ее социальными характеристиками [Деев И.А., Куликова К.В., Куликов Е.С. и др. Анализ факторов риска рождения ребенка с очень низкой и экстремально низкой массой тела при рождении // Мать и дитя в Кузбассе. - 2016. - №2. - С. 10-15].

Согласно данным литературы важное значение в формировании антропометрических характеристик новорожденного (вес, рост) имеют материнские факторы (сосудистые и метаболические заболевания, тромбофилические состояния, нарушения питания, лекарственные препараты и др.), [Fetal growth restriction: current knowledge. Nardozza / L. M. M., Caetano, A. C. R., Zamarian, A. C. P., Mazzola, J. B., Silva, C. P., Marçal, V. M. G. et al. // Arch. Gynecol. Obstet. 2017. 295, 1061-1077] и в том числе генетические детерминанты материнского организма [Genetic markers for inherited thrombophilia are associated with fetal growth retardation in the population of Central Russia / Reshetnikov E, Zarudskaya O, Polonikov A, Bushueva O, Orlova V, Krikun E, Dvornyk V, Churnosov M. // J. Obstet. Gynaecol. Res. // 2017;43(7):1139-1144].

В исследованиях последних лет (в том числе выполненных на полногеномном уровне) показана связь полиморфизма ряда генов-кандидатов «материнского» генома с ростом и весом новорожденного [Genomewide associations for birth weight and correlations with adult disease / Horikoshi M. et al. // Nature. 2016. 538(7624): 248-252].

С практической точки зрения представляется крайне необходимым выделение

критериев индивидуального прогнозирования веса новорожденного на основе генетических данных матерей на основе исследованных полиморфных вариантов rs1805087 MTR - rs1979277 SHMT1 - rs11568818 - MMP7 - rs3025058 MMP3, а так же других возможных факторов риска с целью выявления низкого веса новорожденного.

5 В Российской Федерации исследования о вовлеченности генетических комбинаций генотипов, включающие следующие полиморфные варианты: rs1805087 MTR - rs1979277 SHMT1 - rs11568818 - MMP7 - rs3025058 MMP3 в формирование предрасположенности к риску рождения детей с низкой массой тела отсутствуют.

10 Для оценки сложившейся патентной ситуации был выполнен поиск по охраняемым документам за период с 1990 по 2023 гг. Анализ документов производился по направлению: способ прогнозирования веса новорожденного на основе генетических данных матерей в зависимости от полиморфных вариантов rs1805087 MTR - rs1979277 SHMT1 - rs11568818 - MMP7 - rs3025058 MMP3.

15 Источники информации: сайты Федерального института промышленной собственности <http://fips.ru>.

В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не было обнаружено способа прогнозирования веса новорожденного на основе генетических данных матерей на основе данных о полиморфных вариантах rs1805087 MTR - rs1979277 SHMT1 - rs11568818 - MMP7 - rs3025058 MMP3.

20 Из области техники известен патент RU № 2472446 (опубл. 20.01.2013), в котором описан способ прогнозирования массы тела новорожденного. Изобретение относится к области профилактической медицины, в частности к педиатрии, и может быть использовано для профилактики различных форм гипотрофии и гипертрофии новорожденных. Определяют медико-биологические факторы, алиментарный статус, профессиональный риск и качественные показатели образа жизни родителей в формировании физических показателей новорожденных. Массу тела новорожденного определяют по математической формуле. Способ позволяет повысить достоверность прогноза массы тела новорожденного за счет учета факторов риска, оказывающих влияние на родителей. Недостатками данного способа являются: учет большого количества критериев, что является сложным и дорогостоящим процессом; способ не включает генетические маркеры, что исключает раннюю диагностику и проведение профилактических мероприятий по предотвращению рождения детей с низкой массой тела.

35 Известен патент RU № 2557952 (опубл. 27.07.2015), в котором описан способ прогнозирования веса новорожденного с учетом полиморфных вариантов локуса 10976 G/A FVII. Способ включает выделение ДНК из периферической венозной крови и проведение анализа полиморфизма генов VII фактора коагуляции 10976G/A FVII. Вес тела новорожденного определяют при рождении на сроке 37 и более недель беременности. У женщин, рожаящих не в первый раз, вес тела новорожденного определяют по уравнению: $y=6123,431-25,579x_1+0,267x_2+205,739x_3$, где y - прогнозируемый вес новорожденного, x_1 - рост женщины в сантиметрах; x_2 - вес ребенка в предыдущих родах в граммах, x_3 - генетический вариант локуса 10976G/A FVII, при этом $x_3=1$ для генотипа 10976 GG FVII, $x_3=2$ для генотипов 10976 GA и 10976 AA FVII. У первородящих женщин вес тела новорожденного определяют по уравнению: $y=6278,037-21,739x_1+232,170x_2$, где x_1 - рост женщины в сантиметрах; x_2 - генетический вариант локуса 10976 G/A FVII, при этом $x_2=1$ для генотипа 10976 GG FVII, $x_2=2$ для генотипов 10976 GA и 10976 AA FVII. Недостатком способа является невозможность прогнозирования веса новорожденного на ранних сроках беременности у женщин,

которые относятся к группе высокого риска по рождению детей с низкой массой тела, не учитываются другие полиморфные локусы.

Известен патент RU №2741861 (опубл. 29.01.2021), в котором описан способ прогнозирования веса новорожденного у беременных с преэклампсией в сочетании с синдромом задержки роста плода. Способ включает выделение ДНК из периферической венозной крови, анализ полиморфизма rs5985 гена F13A1, прогнозирование нормального веса новорожденного при выявлении аллеля Т полиморфного локуса rs5985 гена F13A1, прогнозирование низкого веса новорожденного при выявлении аллеля G полиморфизма гена F13A1.

Задачей настоящего изобретения является расширение арсенала методов диагностики, а именно создание способа прогнозирования веса новорожденного на основе генетических данных матерей на основе данных о полиморфных вариантах rs1805087 MTR - rs1979277 SHMT1 - rs11568818 - MMP7 - rs3025058 MMP3.

Технический результат использования изобретения - получение критериев оценки веса новорожденного на основе генетических данных матерей, уроженок Центрально - Черноземного региона РФ, на основе данных о полиморфных вариантах rs1805087 MTR - rs1979277 SHMT1 - rs11568818 - MMP7 - rs3025058 MMP3, включающий:

- выделение ДНК из периферической венозной крови;

- анализ полиморфных локусов rs1805087 MTR - rs1979277 SHMT1 - rs11568818 -

MMP7 - rs3025058 MMP3;

- прогнозирование высокого риска рождения детей с низким весом на основе генетических данных матерей при выявлении комбинации генотипов у матери rs1805087 MTR AA - rs1979277 SHMT1 CC - rs11568818 - MMP7 TT - rs3025058 MMP3 6A6A.

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогнозирования высокого риска развития низкого веса новорожденного на основе данных о комбинации генотипов у матери rs1805087 MTR AA - rs1979277 SHMT1 CC - rs11568818 - MMP7 TT - rs3025058 MMP3 6A6A.

Способ осуществляют следующим образом:

Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществляют методом фенольно-хлороформной экстракции [Miller, S. A. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells/ S. A. Miller, D. D. Dykes, H. F. Polesky // Nucleic Acids. Res. - 1988. - Vol. 16, № 3. - P. 1215] в два этапа. На первом этапе к 4 мл крови с ЭДТА добавляют 25мл лизирующего буфера, содержащего 320мМсахарозы, 1% тритон X-100, 5мМ MgCl₂, 10мМ трис-HCl (pH=7,6). Полученную смесь перемешивают и центрифугируют при 4°C, 4000 об./мин. в течение 20 минут. После центрифугирования надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 4 мл раствора, содержащего 25 мМ ЭДТА (pH=8,0) и 75 мМ NaCl, ресуспензируют. Затем прибавляют 0,4 мл 10% SDS, 35 мкл протеиназы К (10мг/мл) и инкубируют образец при 37°C в течение 16 часов. На втором этапе из полученного лизата последовательно проводят экстракцию ДНК равными объемами фенола, фенол-хлороформа (1:1) и хлороформа с центрифугированием при 4000 об/мин в течение 10 мин. После каждого центрифугирования производят отбор водной фазы. ДНК осаждают из раствора двумя объемами охлажденного 96% этанола. После лиофилизации полученную ДНК растворяют в бидистиллированной, деионизованной воде и хранят при -200С.

Анализ полиморфных маркеров rs1805087 MTR - rs1979277 SHMT1 - rs11568818 - MMP7 - rs3025058 MMP3 осуществлялся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на термоциклере CFX-96 Real-Time System (Bio-Rad) с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров и зондов (синтезированы в ООО «Синтол» (Москва)).

Амплификация геномной ДНК производилась в реакционной смеси, суммарным объемом 10 мкл, включающей смесь для ПЦР rs1805087 MTR или rs1979277 SHMT1 или rs11568818 - MMP7 или rs3025058 MMP3 - 4 мкл, Taq-полимеразу - 2 мкл, исследуемый образец (~30 нг ДНК/мкл) - 1 мкл, деионизированная вода - 3 мкл.

5 Генотипирование исследуемых образцов осуществлялось с использованием программного обеспечения «CFX-Manager™» методом дискриминации аллелей по величинам относительных единиц флуоресценции (ОЕФ) (фиг. 1, фиг. 2, фиг. 3, фиг. 4).

Изобретение характеризуется фигурами:

10 фигура 1 - Визуализация дискриминации генотипов rs1805087 MTR 2756 A>G (● - GG, ■ - AA, ▲ - AG, ■ - отриц. контр.);

фигура 2 - Визуализация дискриминации генотипов rs1979277 SHMT1 1420 C>T (● - CC, ■ - TT, ▲ - CT, ■ - отриц. контр.);

фигура 3 - Визуализация дискриминации генотипов rs11568818 MMP-7 (● - CC, ■ - TT, ▲ - TC, ■ - отриц. контр.);

15 фигура 4 - Визуализация дискриминации генотипов rs3025058 MMP-3 (● - 5A/5A, ■ - 6A/6A, ▲ - 6A/5A, ■ - отриц. контр.).

Для изучения SNP×SNP взаимодействий, ассоциированных с весом и ростом новорожденного, использовалась модификация метода Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) - MB-MDR [Mbmdr: an R package for exploring gene-gene interactions associated with binary or quantitative traits / M. L. Calle, V. Urrea, N. Malats, K. van Steen // Bioinformatics. - 2010. - Vol. 26, № 17. - P. 2198-2199.]. Для кодирования генотипов SNPs применялась кодоминантная схема [Lower-order effects adjustment in quantitative traits model-based multifactor dimensionality reduction / J. J. Mahachie, T. Cattaert, F. Van Lishout [et al.]. - DOI: 20 journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0029594 // PLoS One. - 2012. - Vol. 7, № 1. - Art. e29594. - URL: https:// 25 journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0029594]. В работе рассматривались наиболее значимые (имеют максимальные статистики Вальда) модели SNP×SNP взаимодействий (в среднем по 2-3 модели 2-х, 3-х и 4-х локусных взаимодействий). Коррекция на множественные сравнения выполнялась пермутационными процедурами (проводилось не менее 1000 пермутаций). При $p_{perm} < 0,01$ результаты считались 30 статистически значимыми. Выполнение MB-MDR и пермутационного теста проводилось в одноименной программе (версия 2.6) в среде R.

SNPs, показавшие значимые ассоциации в изучаемыми фенотипами (самостоятельные эффекты, в составе SNP×SNP взаимодействий), визуализировались методом MDR (виде графа и дендрограммы), имплементированном в одноименной программе (версия 3.0.2), 35 (доступ-<http://www.multifactorialdimensionalityreduction.org/>).

Возможность использования предложенного способа для оценки прогнозирования веса новорожденного на основе генетических данных матерей подтверждает анализ результатов наблюдений 694 матерей и их новорожденных детей (использовались трансформированные значения веса и роста новорожденного).

40 При формировании выборки были определены критерии исключения: наличие патологии матки (аномалии развития внутренних половых органов, фибромиома матки), некоторые осложнения беременности (аномалии расположения и прикрепления плаценты, изосенсибилизация по резус-фактору), а также плодовые причины (генетические болезни, врожденные пороки развития), наличие многоплодной 45 беременности. Диагностика задержки роста плода (ЗРП) проводилась врачами акушерами-гинекологами Перинатального Центра Белгородской областной клинической больницы согласно общепринятым стандартам. Степень ЗРП была подтверждена результатами измерений роста и веса новорожденного. Также учитывались результаты

гистологического исследования последа после родоразрешения.

По каждой беременной, включенной в исследование, собирались медико-биологические, клинико-анамнестические, клинические данные, материалы клинико-лабораторного и клинико-инструментального обследования. Все беременные дали информированное согласие на включение в исследование. Работа выполнялась под контролем этической комиссии медицинского института НИУ «БелГУ» (протокол №39 от 22 мая 2014 года).

При расчете частот аллелей и анализе их ассоциаций у индивидуумов установлена связь с формированием низкого веса новорожденного, включающий полиморфные варианты rs1805087 MTR - rs1979277 SHMT1 - rs11568818 - MMP7 - rs3025058 MMP3. Комбинация генотипов rs1805087 MTR AA - rs1979277 SHMT1 CC - rs11568818 - MMP7 TT - rs3025058 MMP3 6A6A, ассоциирована с низким весом новорожденного ($\beta=-0,603$, $p_{perm}=0,024$).

В качестве примеров конкретного применения разработанного способа приведено обследование русских пациенток, уроженок Центрально-Черноземного региона РФ и не являющихся родственницами между собой: проведено генетическое исследование по полиморфным вариантам rs1805087 MTR - rs1979277 SHMT1 - rs11568818 - MMP7 - rs3025058 MMP3.

1. У женщины Э., русской национальности, уроженки Центрально-Черноземного региона РФ, на ранних сроках беременности была взята венозная кровь, при анализе вовлеченности полиморфных вариантов rs1805087 MTR - rs1979277 SHMT1 - rs11568818 - MMP7 - rs3025058 MMP3 была выявлена комбинации генотипов у беременной rs1805087 MTR AA - rs1979277 SHMT1 CC - rs11568818 - MMP7 TT - rs3025058 MMP3 6A6A, что позволило отнести ее в группу беременных с высоким риском рождения детей с низкой массой тела. Дальнейшее наблюдение за данной пациенткой показало, что вес новорожденного, родившегося на сроке 38 недель, составил 1820 г.

2. У женщины Ч., при прегравидарной подготовке, была взята венозная кровь, при анализе вовлеченности полиморфных вариантов rs1805087 MTR - rs1979277 SHMT1 - rs11568818 - MMP7 - rs3025058 MMP3 была выявлена комбинации генотипов у матери rs1805087 MTR GG - rs1979277 SHMT1 CT - rs11568818 - MMP7 TT - rs3025058 MMP3 5A6A, что позволило отнести ее в группу беременных с низким риском рождения детей с низкой массой тела. Дальнейшее наблюдение за данной пациенткой показало, что вес новорожденного, родившегося на сроке 39 недель, составил 2800 г.

3. У беременной Б., русской национальности, уроженки Центрально-Черноземного региона РФ, на ранних сроках беременности была взята венозная кровь, при анализе вовлеченности полиморфных вариантов rs1805087 MTR - rs1979277 SHMT1 - rs11568818 - MMP7 - rs3025058 MMP3 была выявлена комбинации генотипов у матери rs1805087 MTR AA - rs1979277 SHMT1 CC - rs11568818 - MMP7 TT - rs3025058 MMP3 6A6A, что позволило отнести ее в группу беременных с высоким риском рождения детей с низкой массой тела. Дальнейшее наблюдение за данной пациенткой показало, что вес новорожденного, родившегося на сроке 38 недель, составил 1900 г.

4. У женщины И., русской национальности, уроженки Центрально-Черноземного региона РФ, при прегравидарной подготовке была взята венозная кровь. При анализе вовлеченности полиморфных вариантов rs1805087 MTR - rs1979277 SHMT1 - rs11568818 - MMP7 - rs3025058 MMP3 была выявлена комбинации генотипов у матери rs1805087 MTR GG - rs1979277 SHMT1 CT - rs11568818 - MMP7 CC - rs3025058 MMP3 5A5A, что позволило отнести ее в группу беременных с низким риском рождения детей с низкой массой тела. Дальнейшее наблюдение за данной пациенткой показало, что вес

новорожденного, родившегося на сроке 40-41 неделя, составил 3250 г.

Прогнозирование рождения детей с низкой массой тела поможет улучшить комплекс мероприятий, направленных на профилактику и лечение осложнений беременности, что позволит улучшить перинатальные исходы.

5

(57) Формула изобретения

Способ прогнозирования веса новорожденного на основе генетических данных матерей русской национальности, являющихся уроженками Центрально-Черноземного региона РФ, включающий выделение ДНК из периферической венозной крови, анализ
10 полиморфных локусов rs1805087 MTR - rs1979277 SHMT1 - rs11568818 - MMP7 - rs3025058
MMP3, прогнозирование высокого риска рождения детей с низкой массой тела при
выявлении комбинации генотипов у матери rs1805087 MTR AA - rs1979277 SHMT1 CC
- rs11568818 - MMP7 TT - rs3025058 MMP3 6A6A.

15

20

25

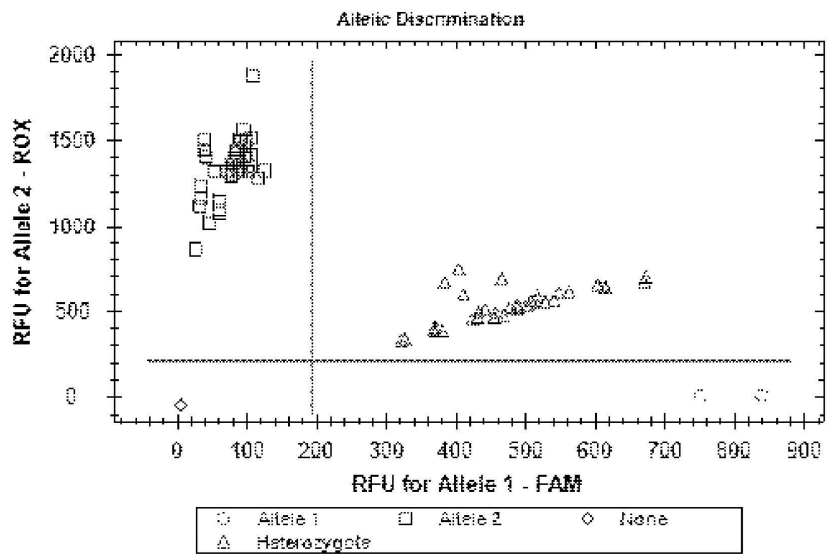
30

35

40

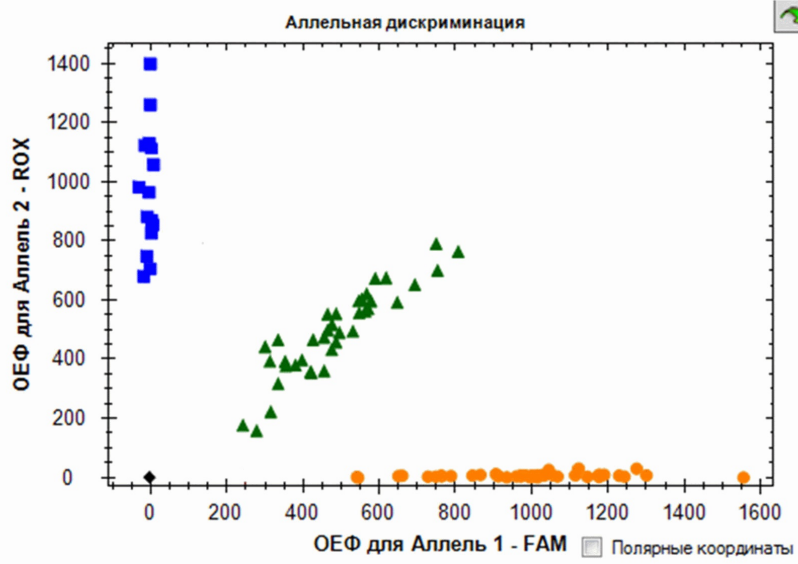
45

1

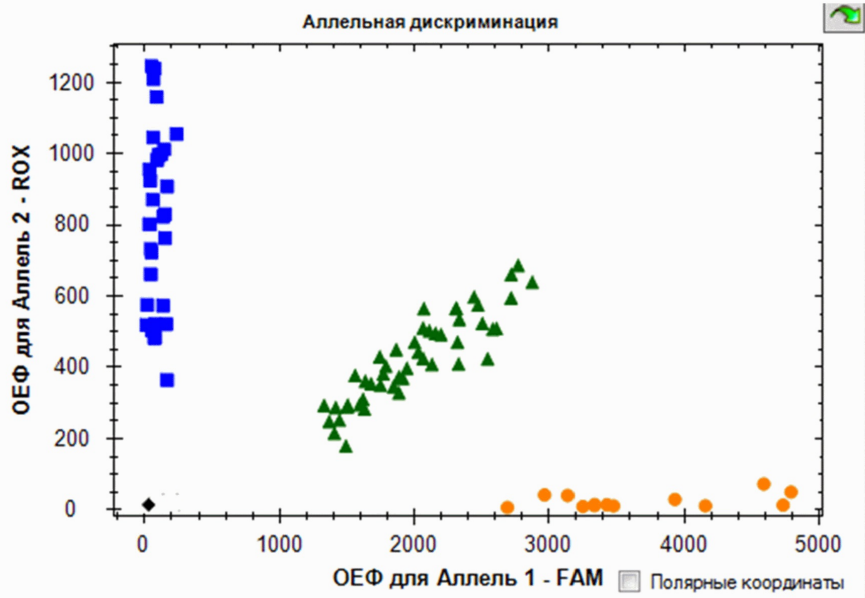


Фиг. 1

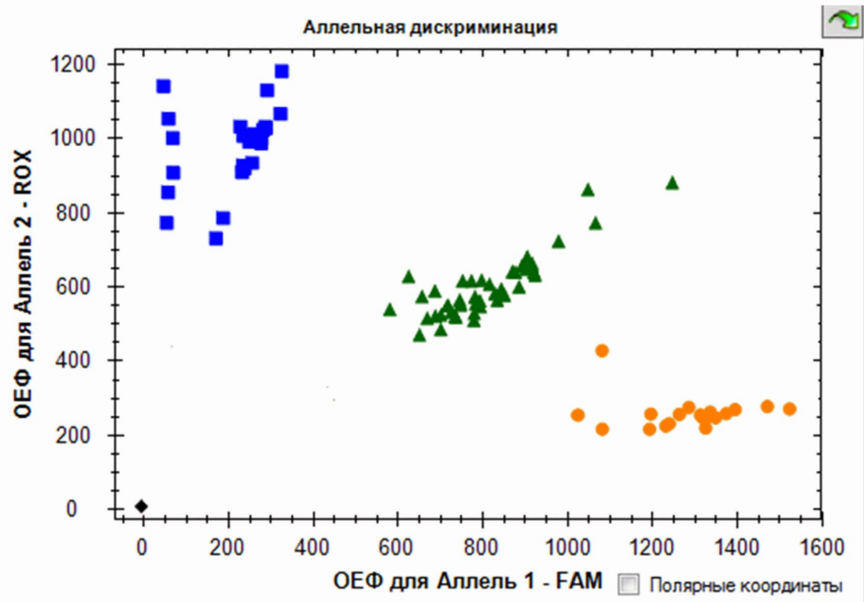
2



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4