



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/582 (2020.08); C12Q 1/6876 (2020.08); G01N 2800/50 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2020126389, 07.08.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
07.08.2020Дата регистрации:  
15.12.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 07.08.2020

(45) Опубликовано: 15.12.2020 Бюл. № 35

Адрес для переписки:

308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул.  
Победы, 85, НИУ "БелГУ" ОИС, Токтаревой  
Т.М.

(72) Автор(ы):

Чурносов Михаил Иванович (RU),  
Головченко Олег Васильевич (RU),  
Абрамова Мария Юрьевна (RU),  
Пономаренко Ирина Васильевна (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 2646505 C1, 05.03.2018. RU  
2540928 C1, 10.02.2015. WO 2015169947 A1,  
12.11.2015.

(54) Способ прогнозирования риска развития синдрома задержки роста плода у женщин без отягощенного семейного анамнеза с использованием молекулярно-генетических данных

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и предназначено для прогнозирования риска развития синдрома задержки роста плода у женщин без отягощенного семейного анамнеза. Осуществляют выделение ДНК из периферической венозной крови, анализ полиморфизмов rs2234693 и rs9340799 гена рецептора эстрогенов ESR1, прогнозирование высокого риска развития синдрома задержки роста плода при выявлении гаплотипа TG

полиморфных локусов rs2234693-rs9340799 гена рецептора эстрогенов ESR1 у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья. Изобретение обеспечивает получение критериев оценки риска развития синдрома задержки роста плода у женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья, не имеющих отягощенного семейного анамнеза по задержке роста плода. 2 ил., 1 табл., 4 пр.

RU 2 738 680 C1

RU 2 738 680 C1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*G01N 33/50* (2006.01)  
*C12Q 1/6827* (2018.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*G01N 33/582 (2020.08); C12Q 1/6876 (2020.08); G01N 2800/50 (2020.08)*(21)(22) Application: **2020126389, 07.08.2020**(24) Effective date for property rights:  
**07.08.2020**Registration date:  
**15.12.2020**

Priority:

(22) Date of filing: **07.08.2020**(45) Date of publication: **15.12.2020 Bull. № 35**

Mail address:

**308015, Belgorodskaya obl., g. Belgorod, ul.  
Pobedy, 85, NIU "BelGU" OIS, Toktarevoj T.M.**

(72) Inventor(s):

**Churnosov Mikhail Ivanovich (RU),  
Golovchenko Oleg Vasilevich (RU),  
Abramova Mariya Yurevna (RU),  
Ponomarenko Irina Vasilevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe  
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego  
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj  
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU  
"BelGU") (RU)**(54) **METHOD FOR PREDICTION OF THE RISK OF DEVELOPING FETAL GROWTH RETARDATION SYNDROME IN WOMEN WITHOUT PRE-EXISTING FAMILY HISTORY USING MOLECULAR GENETIC DATA**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine and aims at prediction of the risk of fetal growth retardation syndrome in women without a burdened family history. DNA is recovered from peripheral venous blood, analyzed polymorphisms rs2234693 and rs9340799 of the estrogen receptor gene ESR1, prediction of a high risk of developing fetal growth retardation syndrome when observing a TG haplotype of polymorphous loci

rs2234693-rs9340799 of the ESR1 estrogen receptor gene in females of Russian nationality, native of the Central Black Earth Region.

EFFECT: invention provides the criteria for assessing the risk of developing fetal growth retardation syndrome in Russian women who are natives of the Central Black Earth Region, who have no burdened family history of intrauterine growth retardation.

1 cl, 2 dwg, 1 tbl, 4 ex

Изобретение относится к области медицинской диагностики, может быть использовано для прогнозирования риска развития синдрома задержки роста плода у женщин без отягощенного семейного анамнеза по задержке роста плода.

Одним из наиболее распространенных осложнений беременности, связанных с 5 метаболическими и гемодинамическими расстройствами в системе «мать-плацента-плод», является плацентарная недостаточность [Плацентарная недостаточность: Патогенез. Прогнозирование. Диагностика. Профилактика. Акушерская тактика [Текст]. Стрижаков А.М., Липатов И.С., Тезиков Ю.В., Самара: ООО «ОФОРТ». 2014. - 239 с.]. Плацентарная недостаточность, приводя к уменьшению поступления 10 питательных веществ и кислорода, нередко может обуславливать развитие задержки роста плода (ЗРП) [Intrauterine Growth Restriction – A Review Article [Text]. Heshmat S. H. Anatomy Physiol Biochem Int J. 2017;1(5):555-572.]. Под ЗРП понимается недостаточное достижение плодом показателей массы и роста в соответствии с гестационным сроком с учетом пола и этнической принадлежности [Intrauterine Growth Restriction: Antenatal 15 and Postnatal Aspects [Text]. Sharma D, Shastri S, Sharma P Clinical Medicine Insights: Pediatrics. 2016;10:67-83.]. ЗРП имеет высокую распространенность и может затрагивать до 10% беременностей [Intrauterine Growth Restriction: Hungry for an Answer [Text]. Devaskar SU, Chu A. Physiology (Bethesda). 2016;31(2):131–146.]. ЗРП является известным фактором высокого риска перинатальной заболеваемости и смертности. Литературные данные 20 свидетельствуют о важной роли ЗРП в развитии перинатальной асфиксии, респираторного дистресс-синдрома, мекониальной аспирации, некротизирующего энтероколита и др. [Neonatal Morbidities of Fetal Growth Restriction: Pathophysiology and Impact. [Text]. Malhotra A, Allison BJ, Castillo-Melendez M, Jenkin G, Polglase GR, Miller SL. Front Endocrinol (Lausanne). 2019; 10:55.]. Имеются убедительные доказательства связи 25 между задержкой роста плода и риском развития различных заболеваний (сердечно-сосудистых, ожирения, сахарного диабета 2 типа, дислипидемии, метаболического синдрома и др.) во взрослой жизни индивидуума [Молекулярно-генетические и эпигенетические аспекты нарушения рецептивности эндометрия у женщин с низкой массой тела при рождении [Текст]. Мелкозерова О.А., Башмакова Н.В., Третьякова 30 Т.Б., Щедрина И.Д. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2019; 18(4): 35–43.].

Согласно современным представлениям ЗРП имеет многофакторную природу, в ее 35 формирование вовлечены различные факторы: материнский (сосудистые заболевания, недостаток питания, токсические влияния, воздействие гипоксии и др.), плацентарный (морфо-функциональные нарушения, изменение метиллирования генов и профиля экспрессии микро-РНК в плаценте и др.), фетальный (генетические аномалии) [Материнские клиничко-анамнестические факторы формирования задержки роста плода [Текст]. Яворская С.Д., Долгова Н.С., Фадеева Н.И., Ананьина Л.П. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2019; 18(5): 83–87].

40 Важное значение в развитии ЗРП отводится генетическим факторам [Genetic markers for inherited thrombophilia are associated with fetal growth retardation in the population of Central Russia. [Text]. 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]. Считается, что формирование веса новорожденного на 40% определяется наследственностью, а 60% 45 связано с внешне-средовыми воздействиями [Intrauterine Growth Restriction: Hungry for an Answer [Text]. Devaskar SU, Chu A. Physiology (Bethesda). 2016;31(2):131–146.]. Следует отметить, что проведенные к настоящему времени молекулярно-генетические исследования ЗРП не дали однозначного ответа о роли рассматриваемых полиморфных

локусов различных групп генов-кандидатов в формировании ЗРП. Это диктует необходимость продолжения исследований молекулярно-генетических детерминант ЗРП.

Из области техники известен патент № 2626316 «Способ прогнозирования развития синдрома задержки развития плода на фоне табакокурения» по заявке № 2016117077 от. 28.04.2016. Способ включает проведение ультразвукового исследования в сроки беременности 11-14 недель и определение показателя кожной микроциркуляции а именно: параметр, характеризующий временную изменчивость перфузии, методом лазерной доплеровской флоуметрии. По формуле рассчитывают коэффициент прогноза развития синдрома задержки развития плода:  $R=1/(1+e^{-z})$ , где R - коэффициент прогноза развития синдрома задержки развития плода; e - константа, основание натурального логарифма, равная 2,72; z - степень обратного логарифма, рассчитывают по формуле  $z=b_1 \cdot x_1+a$ , где b1- коэффициент регрессии, расчет которого является задачей бинарной логистической регрессии, который при синдроме задержки развития плода равен 5,121; x1- значение независимой переменной, а именно параметра, характеризующего временную изменчивость перфузии; a - константа, равная при синдроме задержки развития плода -4,477; и при R больше 0,5 прогнозируют развитие синдром задержки развития плода. Однако данный способ не является достаточно информативным, так как не включает данные о генетических маркерах и применим только на клиническом этапе, что исключает раннюю диагностику и проведение профилактических мероприятий по предотвращению развития синдрома задержки развития плода.

За прототип взят патент № 2646505 «Способ выявления наследственной предрасположенности к развитию задержки роста плода у курящих женщин» по заявке № 2017115003 от 27.04. 2017. Способ представляет собой исследование периферической венозной крови, включающий выделение ДНК, проведение полимеразной цепной реакции и анализ полиморфизма генов женщин, отличающийся тем, что проводят анализ полиморфизма гена IL-10 G-1082A и при выявлении генотипов IL-10-1082A/A или IL-70-1082G/A делают вывод о наличии наследственной предрасположенности к задержке роста плода у курящих женщин. Недостатками указанного способа являются: 1. Использование в качестве маркера только одного генетического полиморфизма, что снижает статистическую мощность проведенного исследования; 2. Способа прогнозирования риска развития задержки роста плода может быть использован только у ограниченной группе, а именно, у курящих женщин.

В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе не было обнаружено способа прогнозирования риска развития синдрома задержки роста плода у женщин без отягощенного семейного анамнеза по задержке роста плода на основе данных о гаплотипе TG полиморфных локусов rs2234693-rs9340799 гена рецептора эстрогенов ESR1.

Задачей настоящего исследования является расширение арсенала способов диагностики, а именно создание способа прогнозирования риска развития синдрома задержки роста плода на основе данных о гаплотипе TG полиморфных локусов rs2234693-rs9340799 гена рецептора эстрогенов ESR1.

Ген ESR1 располагается на длинном плече 6 хромосомы (локус q24–27) и является белок-кодирующим геном. Он кодирует alpha-рецепторы эстрогенов, которые являются мощным регулятором транскрипционной активности различных генов (<http://www.genecards.org/>). Рецепторы эстрогенов (ESR1) определяют биологические эффекты эстрогенов в тканях-мишенях и в том числе потенцируют вовлеченность эстрогенов в преобразование эндометрия матки на ранних сроках гестации: управляют волнами

пролиферации, дифференцировки и ремоделирования клеток маточной ткани, чтобы подготовить ее к имплантации эмбриона и становлению беременности. Рецепторы эстрогенов находятся и в плаценте. ESR1 играет важную роль как в стимуляции терминальной дифференцировки мононуклеарных клеток трофобласта в синцитиотрофобласт, так и в стимулировании функции плаценты [Рецепторы эстрогенов (Обзор литературы). Часть 2 [Текст]. Довжикова И.В., Андриевская И.А. Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2018. № 73. С. 125-133.]. В работе Akram S.K. et al. [Placental IGF-I, estrogen receptor, and progesterone receptor expression, and maternal anthropometry in growth-restricted pregnancies in the Swedish population [Text]/Akram S.K., Sahlin L., Ostlund E., Hagenäs L., Fried G., Söder O. // Horm. Res. Paediatr. 2011. Vol.75, №2. P.131–137.] показаны значимые взаимосвязи между уровнем экспрессии ESR1, прогестерона, инсулиноподобного фактора роста 1 в плаценте и их связь со сроком гестации и задержкой внутриутробного роста плода. Но информация о роли гаплотипа TG полиморфных локусов rs2234693-rs9340799 гена ESR1 в развитии задержки роста плода в зарубежной и отечественной литературе отсутствует.

Задачей настоящего исследования является расширение арсенала способов диагностики, а именно создание способа прогнозирования оценки риска развития синдрома задержки роста плода у женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья, не имеющих отягощенного семейного анамнеза по задержке роста плода.

Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки риска развития синдрома задержки роста плода у женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья, не имеющих отягощенного семейного анамнеза по задержке роста плода, на основе данных о гаплотипе TG полиморфных локусов rs2234693-rs9340799 гена рецептора эстрогенов ESR1, включающий:

- выделение ДНК из периферической венозной крови;
- анализ полиморфных локусов rs2234693 и rs9340799 гена рецептора эстрогенов ESR1;
- прогнозирование высокого риска развития синдрома задержки роста плода у женщин без отягощенного семейного анамнеза по задержке роста плода при выявлении гаплотипа TG полиморфных локусов rs2234693-rs9340799 гена рецептора эстрогенов ESR1.

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза риска развития синдрома задержки роста плода у женщин без отягощенного семейного анамнеза по задержке роста плода при наличии гаплотипа TG полиморфных локусов rs2234693-rs9340799 гена рецептора эстрогенов ESR1.

Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществляют методом фенольно-хлороформной экстракции (Mathew, 1984) в два этапа. На первом этапе к 4 мл крови с ЭДТА добавляют 25 мл лизирующего буфера, содержащего 320мМ сахарозы, 1% тритон X-100, 5мМ MgCl<sub>2</sub>, 10мМ трис-HCl с 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 с pH=8,0 и 75 мМ NaCl, ресуспензируют. Затем прибавляют 0,4 мл 10% SDS, 35 мкл протеиназы K, 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 минут. 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 минус 200С. Выделенную ДНК используют для проведения полимеразной цепной реакции синтеза ДНК.

Анализ полиморфизма rs2234693 ESR1 проводят методом ПЦР-синтеза ДНК на амплификаторе CFX96 с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров и зондов с последующим анализом полиморфизма методом дискриминации аллелей. Реакционная смесь объемом 25 мкл включает: 67 мМ трис-НСl с рН=8,8, 2,5мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1 мкг геномной ДНК, по 10 пМ каждого праймера, по 5 пкмоль каждого зонда, по 200 мкМ dATP, dGTP, dCTP, dTTP и 1 единицу активной Taq-полимеразы. После денатурации в течение 5 мин. при 95°С выполняют 40 циклов амплификации по схеме: отжиг праймеров – 1 мин. при t=54°С; денатурация – 15 сек при t=95°С. При проведении ПЦР в амплификаторе CFX96 с флюоресцентной детекцией генотипирование осуществляют методом Tag Man зондов по данным величин ОЕФ (относительные единицы флуоресценции). Для rs2234693 ESR1 зонд с флуоресцентным красителем ROX соответствует аллелю G, зонд с красителем FAM – аллелю T (фиг.1).

Для исследования полиморфизма rs9340799 ESR1 методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК на амплификаторе IQ5 (Bio-Rad) использовались соответствующие олигонуклеотидные праймеры и зонды с последующим анализом полиморфизма методом дискриминации аллелей. Реакционная смесь объемом 25 мкл включает: 67 мМ трис-НСl с рН=8,8, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1 мкг геномной ДНК, по 10 пМ каждого праймера, по 5 пкмоль каждого зонда, по 200 мкМ dATP, dGTP, dCTP, dTTP и 1 единицу активной Taq-полимеразы. После денатурации, 5 мин. при 95°С, выполняли 40 циклов амплификации по схеме: отжиг праймеров - 1 мин при 52°С; денатурация - 15 сек при 95°С. При проведении ПЦР в амплификаторе IQ5 с флюоресцентной детекцией генотипирование осуществлялось методом Tag Man зондов по данным величин RFU (уровень относительной флуоресценции) каждого зонда, представлены: зонд с флуоресцентным красителем ROX соответствует аллелю G, зонд с красителем FAM - аллелю A.

Изобретение характеризуется фигурами.

Фиг. 1. Дискриминации аллелей методом детекции TaqMan зондов по данным величин ОЕФ (относительные единицы флуоресценции) каждого зонда на амплификаторе CFX96 с детектирующей системой в режиме реального времени полиморфизма ESR1 (rs2234693): -GG, -TT, -GT, •- отрицательный контроль

Фиг. 2. Дискриминации аллелей методом детекции TaqMan зондов по данным величин ОЕФ (относительные единицы флуоресценции) каждого зонда на амплификаторе CFX96 с детектирующей системой в режиме реального времени полиморфизма ESR1 (rs9340799): - AA, - GG, - AG, •- отрицательный контроль.

Для анализа ассоциаций гаплотипов изучаемых полиморфных локусов с риском развития синдрома задержки роста плода использовался логистический регрессионный анализ. Коррекция на множественные сравнения проводилась с использованием пермутационного теста (выполнялось 1000 пермутаций), за статистически значимый принимали уровень  $p_{perm} < 0,05$ . Расчеты выполнялись в программном обеспечении PLINK v. 2.050 (<http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/>).

Возможность использования предложенного способа для оценки риска развития

синдрома задержки роста плода подтверждает анализ результатов наблюдений 520 женщин русской национальности, родившихся в Центрально-Черноземном регионе РФ, не имеющих родственных связей между собой и без отягощенного семейного анамнеза по задержке роста плода: 196 беременных с задержкой роста плода (средний возраст  $26,63 \pm 4,41$  лет) и 324 с физиологическим течением беременности (средний возраст  $26,17 \pm 4,98$ ,  $p > 0,05$ ). Из исследуемой группы исключались женщины с заболеваниями матки (фибромиома матки, аномалии развития внутренних половых органов), другой патологией беременности (аномалии прикрепления и расположения плаценты, преэклампсия, резус-конфликт), патологией плода (ВПР), многоплодной беременностью. Все клинические и клинико-лабораторные исследования проводили на базе Перинатального центра областной клинической больницы Святителя Иоасафа г. Белгорода в 2008 - 2015 гг. Клиническое и клинико-лабораторное обследование беременных проводилось на сроке родоразрешения. Информированное согласие было получено от каждой женщины, включенной в исследование. Полученные материалы протоколировали по стандартам этического комитета Российской Федерации.

Выявлено, что гаплотип TG полиморфных локусов rs2234693-rs9340799 гена ESR1 среди беременных с задержкой роста плода (14,30%) встречается значительно чаще (в 1,78 раза), чем у женщин с физиологически протекающей беременностью (8,00%,  $p = 0,002$ ,  $p_{perm} = 0,008$ ) (Таблица).

Таблица. Частоты гаплотипов полиморфных локусов rs2234693 и rs9340799 гена ESR1 у беременных с ЗРП и в контрольной группе.

SNPs	Гаплотип	Частота гаплотипа		OR	P
		Беременные с ЗРП (n=196)	Контроль (n=324)		
rs2234693 rs9340799	TG	0,143	0,080	<b>1,86</b>	<b>0,002</b>
rs2234693 rs9340799	CG	0,267	0,308	0,80	0,156
rs2234693 rs9340799	TA	0,368	0,404	0,84	0,256
rs2234693 rs9340799	CA	0,223	0,208	1,09	0,564

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что наличие гаплотипа TG полиморфных локусов rs2234693-rs9340799 гена ESR1 является фактором риска ЗРП (OR=1,86).

Примеры конкретного выполнения.

1. У женщины В., русской национальности, уроженки Центрального Черноземья, не имеющей отягощенного семейного анамнеза, на ранних сроках беременности была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен гаплотип CG rs2234693-rs9340799 ESR1, что позволило отнести ее в группу беременных с пониженным риском развития СЗРП. Это подтвердило дальнейшее наблюдение: в течение беременности и после родов не было выявлено признаков СЗРП.

2. У женщины Л., при прегравидарной подготовке, не имеющей отягощенного семейного анамнеза, была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был определен гаплотип TG rs2234693-rs9340799 ESR1, что позволило отнести ее в группу беременных с повышенным риском развития СЗРП. Это подтвердило дальнейшее наблюдение. При возникновении беременности у нее на сроке 26 недель был диагностирован синдром задержки роста плода I степени.

3. У беременной Е., русской национальности, уроженки Центрального Черноземья, не имеющей отягощенного семейного анамнеза, на ранних сроках беременности была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен гаплотип ТА rs2234693-rs9340799 ESR1, что позволило отнести ее в группу беременных с пониженным  
5 риском развития СЗРП. Это подтвердило дальнейшее наблюдение: в течение беременности и после родов не было выявлено признаков СЗРП.

4. У женщины И., русской национальности, уроженки Центрального Черноземья, не имеющей отягощенного семейного анамнеза, при прегравидарной подготовке была  
10 взята венозная кровь. При генотипировании ДНК-маркеров был установлен гаплотип СА rs2234693-rs9340799 ESR1, что позволило отнести ее в группу беременных с пониженным риском развития СЗРП. Это подтвердило дальнейшее наблюдение: в течение беременности и после родов не было выявлено признаков СЗРП.

Применение данного способа позволит формировать среди женщин, не имеющих отягощенного семейного анамнеза по задержке роста плода, при прегравидарной  
15 подготовке и на ранних сроках беременности группы риска и своевременно реализовывать в этих группах необходимые лечебно-профилактические мероприятия по предупреждению развития задержки роста плода.

#### (57) Формула изобретения

20 Способ прогнозирования риска развития синдрома задержки роста плода у женщин без отягощенного семейного анамнеза с использованием молекулярно-генетических данных, включающий выделение ДНК из периферической венозной крови, анализ полиморфизмов rs2234693 и rs9340799 гена рецептора эстрогенов ESR1, прогнозирование высокого риска развития синдрома задержки роста плода при выявлении гаплотипа  
25 TG полиморфных локусов rs2234693-rs9340799 гена рецептора эстрогенов ESR1 у женщин русской национальности, уроженок Центрального Черноземья.

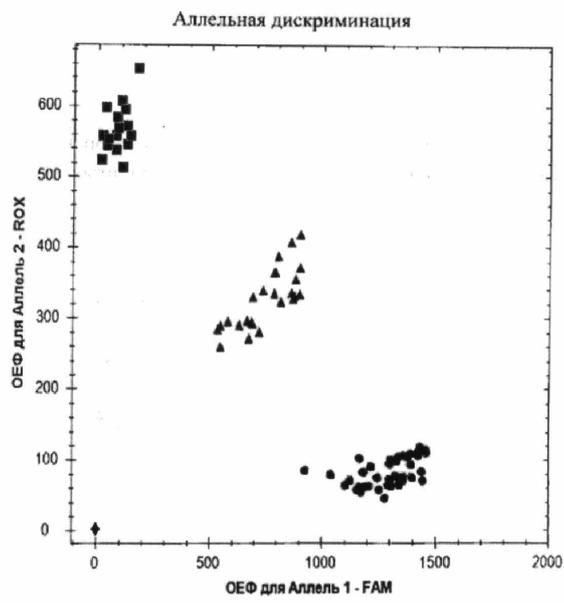
30

35

40

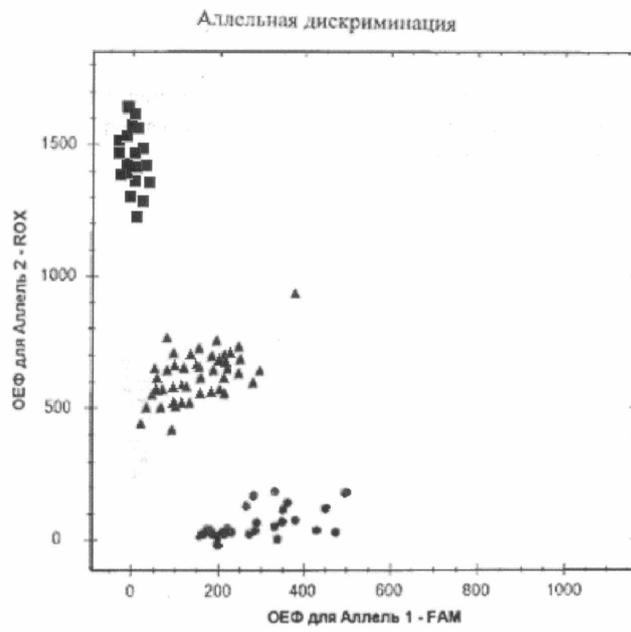
45

1



Фиг. 1

2



Фиг. 2