МУЗ «Первая городская клиническая больница скорой медицинской помощи»

СЕВЕРНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

КУРС КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Молекулярно-генетические методы диагностики

Руководитель курса

Проф. Воробьёва Н.А

Выполнила

врач-интерн КДЛ

Петрова Л.В

г. Архангельск 2009 г.

Оглавление

#

# Введение

# 1 Актуальность темы

# 2 Пренатальная диагностика наследственных болезней

# 3 Основные проблемы молекулярной ПГД

# 3.1 Характеристика ПЦР единственной клетки. Эффективность амплификации

# 3.2 Контаминация

# 3.3 Преимущественная амплификация одного аллеля

# 4 Стратегии ПЦР, применяемые в ПГД

# 4.1 ПЦР с вложенными призерами

# 4.2 ПЦР с использованием флюоресцентно-меченных праймеров

# 4.3 Полногеномная амплификация

# 5 Методы анализа мутаций, основанные на ПЦР

# 6 Анализ сцепления (косвенная ДНК-диагностика)

# Вывод

# Алгоритм пренатальной диагностики наследственных болезней (Приложение 1)

# Список использованных источников

# Введение

Врождённая наследственная патология вносит всё более возрастающий вклад в структуру младенческой смертности, детской заболеваемости и инвалидности. Глубокие изменения в деятельности ведущих органов и систем детского организма, возникающие вследствие генетически детерминированных состояний, способствуют формированию ранних повреждений у детей. В решении проблемы предупреждения врождённых и наследственных заболеваний у детей, и в первую очередь 2 основных групп заболеваний – врождённых пороков развития (ВПР) и хромосомных аномалий, большая роль принадлежит научно-практическим учреждениям медико-генетического профиля – медико-генетическим консультациям (МГК) местного и регионального масштаба, обеспечивающим практическую реализацию профилактических мероприятий.

Можно выделить несколько уровней профилактики врождённых и наследственных заболеваний:

1. Прегаметический
	* охрана репродуктивного здоровья;
	* охрана окружающей среды;
		+ 1. Презиготический
* МГК;
* искусственная инсеминация;
* периконцепционная профилактика;
	1. Пренатальный
* внедрение всех видов пренатальной диагностики;
1. Постнатальный
	* ранняя идентификация патологии;
	* лечение;
	* профилактика инвалидизирующих расстройств.

Расшифровка генома человека, первый этап которого завершился в 2000 году созданием «чернового» варианта первичной нуклеотидной последовательности гигантской молекулы ДНК, явилась предпосылкой возникновению нового научно-практического направления – молекулярной медицины, в которой проблемы диагностики, профилактики и лечения решаются на молекулярном уровне при помощи нуклеиновых кислот (ДНК, РНК) и продуктов их экспрессии (белков). Методологическую основу молекулярной медицины составляют современные представления о структуре генома человека, его генах, их функциональных взаимодействиях, о так называемых генных сетях – генных ансамблеях, обеспечивающих различные функции организма в норме и при патологии.

Характерными особенностями молекулярной медицины как медицины, основанной на расшифровке генома человека, является её индивидуальный характер. Она направлена на коррекцию патологического процесса у вполне конкретного человека с учётом уникальных особенностей вполне конкретного генома. Её другая важная особенность - выраженная профилактическая направленность. Полные сведения о геноме могут быть получены задолго до начала заболевания. Отсюда соответствующие коррективы и профилактические мероприятия могут полностью ликвидировать или в значительной мере предупредить развитие тяжёлого заболевания.

Внедрение молекулярной медицины в практическое здравоохранение требует овладения знаниями молекулярной биологии и генетики не только учёными всех разделов медицинской науки, но и врачами разных специальностей, в том числе акушерами и гинекологами.

# 1 Актуальность темы

В условиях улучшения медицинского обслуживания всё больше больных с наследственными заболеваниями достигают репродуктивного возраста и претендуют на возможность иметь здоровое потомство. Однако у женщин с наследственными заболеваниями течение беременности и родов нередко осложнено, т.к. в этот период меняются клинические проявления многих наследственных заболеваний, чаще в худшую сторону. В таких случаях нередко нарушается процесс вынашивания беременности и развития плода.

Значительную долю больных гинекологической клиники составляют пациентки с нарушениями менструальной и генеративной функций. Участие хромосомных и генных мутаций в генезе значительной части заболеваний несомненно. Выявление наследственного генеза нарушений репродуктивной системы позволяет оптимально проводить их коррекцию, а в ряде случаев прекратить безуспешную борьбу с бесплодием и сохранить здоровье женщины.

Вместе с тем появление в арсенале гинекологов средств, стимулирующих овуляцию, позволяет избавить от бесплодия таких больных. Однако стимуляция овуляции без учёта рекомендаций генетика может способствовать накоплению патологических мутаций в популяции, ухудшая генофонд и увеличивая частоту врожденной и наследственной патологии.

Перечисленные выше факторы требуют создания в ведущих клинических центрах акушерства и гинекологии медико-генетической службы. Основным направлением работы отделения клинической генетики является профилактика врожденной и наследственной патологии у плода и новорожденного.

Основными причинами обращения за медико-генетической консультацией послужили (в порядке убывающей частоты):

 - возраст беременной старше 35 лет;

- нарушения менструальной и генеративной функций, в том числе привычное невынашивание беременности;

- наличие в семье или в родословной ребенка с врожденным пороком развития, хромосомным и моногенным синдромом, антенатальная гибель плода, мертворождение;

- неблагоприятные воздействия на плод во время беременности (лекарственные препараты, вирусная и бактериальная инфекция, прием алкоголя, наркотиков, проф. вредности и пр.);

- сочетание беременности и экстрагенитальной патологии;

- уточнение диагноза наследственного заболевания;

- прочие сочетанные показания.

Современная пренатальная диагностика состоит как минимум из 3 этапов:

I этап - медико-генетическое консультирование, во время которого формируется группа высокого риска по врожденной и наследственной патологии плода;

II этап – скринирующий - предусматривает обследование всех или почти всех беременных с помощью неинвазивных методов: ультразвукового сканирования и анализа маркерных сывороточных белков α-фенопротеина (АФП), хорионического гонадотропина (ХГ) в крови в наиболее информативные сроки;

III этап - инвазивная пренатальная диагностика для точного определения хромосомных и ряда моногенных заболеваний плода.

Цель настоящего обзора: анализ как существующих методических подходов в пренатальной диагностике (ПД) хромосомопатий, так и ее принципиально новых направлении.

# 2 Пренатальная диагностика наследственных болезней

Предимплантационная генетическая диагностика (ПГД) представляет собой совокупность методов, позволяющих проводить анализ наследственных заболеваний у эмбриона до его имплантации. Благодаря такой диагностике супружеские пары, имеющие риск передачи по наследству генетической патологии, получают возможность родить здорового ребенка.

У делящегося эмбриона in vitro осуществляют биопсию одной или двух клеток (бластомеров), что не влияет на его жизнеспособность. На этом материале проводят диагностику различных наследственных заболеваний. Если исследованная клетка не содержит генетических аномалий, эмбрион считают здоровым и его можно имплантировать матери. Таким образом, в результате ПГД снижается риск развития определенных генетических заболеваний, что позволяет рассматривать этот вид исследования как альтернативу пренатальной диагностике при экстракорпоральном оплодотворении (ЭКО).

В настоящее время более чем в 50% случаев ПГД проводят с использованием молекулярно-цитогенетических методов с целью обнаружения анеуплоидии по хромосомам 13, 16, 18, 21, 22, X и V как наиболее частой генетической аномалии, выявляемой у эмбрионов. Использование метода FISH на интерфазном ядре позволяет выявить численную патологию хромосом у эмбриона.

Более сложной задачей является обнаружение патологии кариотипа, возникающей в результате сбалансированных структурных хромосомных аномалий (транслокаций, инверсий, инсерций) у родителей. Эта задача решается путем получения специфических ДНК-зондов практически на все хромосомные районы и проведения FISH-анализа. Возможно также использование таких методов молекулярной цитогенетики, как полное окрашивание флюорохромом аномальной хромосомы (chromosome painting), использование множественного флюоресцентного кариотипирования (M-F1SH), спектроскопического анализа кариотипа (SKY-FISH) и сравнительной геномной гибридизации. Однако проблема заключается в том, что указанные методы исследования трудоемки, дорогостоящи, требуют значительных временных затрат и позволяют выявить только хромосомную патологию. Кроме того, необходимо учитывать технические моменты хромосомного анализа:

1) потеря единственной клетки во время фиксации;

2) неполное удаление цитоплазмы, что может повлиять на эффективность гибридизации и интерпретацию результатов;

3) недостаточная распространенность хроматина, что может привести к наложению гибридизационных сигналов;

4) потеря микроядер, в результате чего возможно ложное заключение о наличии моносомии.

Одним из методов, позволяющих не только оценить кариотип эмбриона, но и провести ДНК-диагностику, является последовательный FISH- и ПЦР-анализ на единственной фиксированной клетке.

Биопсия материала для диагностики в сочетании с технологиями ПЦР проводится на 3-й день после оплодотворения, когда эмбрион содержит от 6 до 10 бластомеров. На этой стадии бластомеры являются полипотентными, и процедура биопсии не оказывает отрицательного влияния на жизнеспособность эмбриона. Оптимальным является анализ 1 - 2 бластомеров. В настоящее время биопсия бластомеров является современным подходом для ПГД и может использоваться в клинической практике.

# 3 Основные проблемы молекулярной ПГД

Возможности ПЦР в увеличении малого количества ДНК до уровня, на котором его можно визуализировать и осуществить генетический анализ, делает этот метод приоритетным для ДНК-диагностики. Применение ПЦР дли анализа единственной клетки является трудной, но реально осуществляемой задачей и остается методом выбора для определения специфических генных мутаций у эмбрионов человека перед имплантацией.

Основным ограничивающим фактором при проведении ПГД является малое количество ДНК, используемое в качестве матрицы для ПЦР - примерно 7 пг (7\*10-12), что соответствует количеству ДНК одной диплоидной клетки, тогда как предел чувствительности метода ПЦР равен примерно 10 нг ДНК (1\*10-9).

В связи с этим основными проблемами протокола ПЦР для анализа единственной клетки являются:

1) увеличение количества ДНК до величины, необходимой для анализа;

2) предупреждение и исключение контаминации;

3) преимущественная амплификация или выпадение одного аллеля в гетерозиготных образцах.

3.1 Характеристика ПЦР единственной клетки. Эффективность амплификации

Эффективность ПЦР единственной клетки значительно ниже, чем обычной ПЦР, в которой количество ДНК-матрицы может быть в несколько раз больше. Снижение эффективности метода может происходить в результате разнообразных причин, касающихся как образца, так и самой процедуры ПЦР. К операционным проблемам относят потерю материала во время переноса клетки в пробирку или внезапный лизис до помещения клетки в пробирку, что снижает эффективность амплификации или приводит к ее отсутствию. Внутренние факторы заключаются в отсутствии ядра, дегенерации клетки с потерей или деградацией ДНК. Эти факторы контролировать значительно сложнее. На эффективность ПЦР, кроме процедуры переноса высококачественной ядросодержащей клетки, также влияет качественный лизис клетки с целью получения ДНК-матрицы.

3.2 Контаминация

Одна молекула ДНК на гаплоидный геном (вторичное полярное тело, ооцит или спермий) или две молекулы на диплоидный геном (бластомер или первое полярное тело) при таком малом количестве исследуемого материала любая примесь, случайно попавшая в пробирку для анализа, приводит к ошибкам клинической ПГД. Большое количество циклов для усиления сигнала и наличие только одной молекулы ДНК в анализируемом образце делают эту проблему наиболее значимой в ПГД. К сожалению, не существует единой стратегии, эффективно гарантирующей полное исключение контаминации, но ее уровень можно снизить, осуществляя регулярное тестирование всех ПЦР-реагентов, растворов для промывки и лизиса клеток на загрязнение перед процедурами ПГД.

Во избежание контаминации ДНК из сперматозоидов и яйцеклеток, которые могут присутствовать в "zona pellucida" человеческого эмбриона, бластомеры должны быть тщательно отобраны под микроскопом и отмыты холодной стерильной средой перед переносом в пробирку для ПЦР-анализа.

3.3 Преимущественная амплификация одного аллеля

Другая проблема, характерная для ПЦР-анализа одной клетки - преимущественная амплификация одного из аллелей (ПАОА), при этом один из двух присутствующих в гетерозиготном состоянии аллелей амплифицируется более успешно, чем другой. Для аутосомно-рецессивных заболеваний, при которых оба родителя могут нести разные мутации одного гена, такое явление может приводить к ошибочной диагностике. Частота ПАОА может быть довольно высокой и составлять до 25% случаев клинической ПГД. Причины ПАОА остаются невыясненными, но экспериментальные данные свидетельствуют о том, что к ним могут относиться условия проведения ПЦР, неполный клеточный лизис, неполная денатурация ДНК, которая необходима для амплификации обоих аллелей и др. ПАОА может выявляться при анализе ПЦР-продукта в геле с использованием окраски бромидом этидия. В то же время применение флюоресцентно-меченных праймеров для выявления продукта ПЦР с использованием автоматического генетического анализатора значительно снижает опасность ПАОА.

Самым распространенным методом снижения ПАОА, применяемым в настоящее время, является использование связанных маркеров. Этот метод может служить также и контролем контаминации. Его суть состоит в использовании многолокусной ПЦР, при которой одна пара праймеров отжигается в исследуемом локусе, а другая - на соседнем фрагменте ДНК.

Еще одной важной проблемой ПГД, как цитогенетической, так и молекулярной, является обнаружение при некоторых заболеваниях значительного уровня хромосомного мозаицизма, даже в нормальных эмбрионах. В связи с этим один бластомер, взятый для анализа, может оказаться неинформативным в отношении всего эмбриона.

# 4 Стратегии ПЦР, применяемые в ПГД

4.1 ПЦР с вложенными призерами

Для того, чтобы четко выявить ПЦР-продукт в геле с помощью окраски бромидом этидия или нитратом серебра, необходимо примерно 50 - 60 циклов ПЦР с уникальной последовательностью, хотя Taq-полимераза может начать "ошибаться" примерно после 40 циклов, в результате чего появляется неспецифический продукт. Решить эту проблему можно при использовании ПЦР с вложенными праймерами для увеличения чувствительности и специфичности ПЦР с единственной молекулы ДНК. Первый раунд ПЦР увеличивает количество анализируемого фрагмента ДНК, содержащего возможную мутацию. ПЦР-продукт (полученный в первом раунде) используется как матрица для второго раунда амплификации с другим набором праймеров, расположенным внутри первого фрагмента. Таким образом, увеличивается специфичность ПЦР. Использование двух различных наборов праймеров значительно снижает риск контаминации.

4.2 ПЦР с использованием флюоресцентно-меченных праймеров

ПЦР с использованием флюоресцентно-меченных праймеров (ПЦР ФП) по многим причинам в последнее время стала методом выбора, который широко используют в лабораториях для анализа ДНК единственной клетки. Использование лазерных систем автоматического анализа фрагмента, меченного различными флюоресцентными молекулами, во много раз увеличивает чувствительность выявления ПЦР-продукта по сравнению с окраской бромидом этидия или нитратом серебра, а также снижает риск контаминации. Автоматическая система четко фиксирует изменения размера полученного продукта даже в один нуклеотид. Кроме того, отпадает необходимость в долговременном электрофорезе фрагментов ДНК в полиакриламидном геле, поэтому анализ может быть проведен в кратчайшее время.

4.3 Полногеномная амплификация

В последнее время основным методом увеличения количества ДНК при анализе единственной клетки в ПГД является полногеномная амплификация (ПА). Использование этого метода позволяет значительно увеличить количество ДНК-матрицы, необходимой для проведения ПЦР. Наиболее часто используемый метод полногеномной амплификации - добавочная предамплификация (ДПА). При использовании этого метода случайные последовательности 15-нуклеотидных праймеров инициируют синтез геномной ДНК.

Недостатком ПА является то, что амплифицируется большое количество повторяющейся ДНК (короткие тандемные повторы), что дает некий "фон", который может приводить к ошибкам специфической ПЦР. Эти ошибки возникают в результате скольжения цепи ДНК во время полимеризации продукта, особенно при низких температурах, необходимых для этого метода. В связи с этим не рекомендуется использование полногеномной амплификации при клинической диагностике заболеваний, связанных с экспансией тринуклеотидных повторов, или при диагностике, основанной на анализе сцепления с высокополиморфными микросаттелитными повторами.

5 Методы анализа мутаций, основанные на ПЦР

С того момента, когда стало возможным амплифииировать ДНК одной клетки в достаточном для анализа количестве, были использованы все основные методы определения мутаций.

ДНК-диагностику мутаций можно условно разделить на 3 категории:

1) анализ определенной специфической мутации;

2) скрининг неизвестных мутаций в определенном гене;

3) определение не собственно мутации, а ее наличие (косвенная ДНК-диагностика).

Методы первой категории обычно широко используют для определения единичных распространенных мутаций. Методы второй категории являются скрининговыми и обычно используются для поиска еще не охарактеризованных мутаций в определенных генах. Косвенная ДНК-диагностика основана на анализе сцепления заболевания с полиморфными ДНК-маркерами в семье, когда ген не охарактеризован, но известна его локализация на хромосоме, если проведение прямой ДНК-диагностики затруднено из-за наличия псевдогенов, повторяющихся последовательностей или большого по величине гена, когда скрининг мутации может занять несколько недель.

Среди методов прямой ДНК-диагностики можно выделить:

1. аллель-специфическую ПЦР, с помощью которой проводят анализ наиболее распространенных мутаций гена CFTR при муковисцидозе, спинальной мышечной атрофии и пигментном ретините;
2. анализ с использованием рестрикционных эндонуклеаз применяют для диагностики определенных точечных мутаций при спинальной мышечной атрофии, пигментном ретините и др.;
3. анализ гетеродуплексов был эффективно использован для диагностики болезни Тея-Сакса, семейного аденоматозного полипоза и муковисцидоза;
4. анализ однонитевого конформациопного полиморфизма был эффективен в диагностике мутаций при семейном аденоматозном полипозе, β-талассемии, дефиците средней цепи ацилкоэнзим α-дегидрогсназы;
5. с помощью денатурирующего градиентного гель-электрофореза определяли мутации при β-талассемии;
6. прямое секвенирование (определение нуклеотидного состава ДНК) позволяет выявить любую мутацию в определенном гене. Оно было эффективно использовано при диагностике многих заболеваний.

# 6 Анализ сцепления (косвенная ДНК-диагностика)

В ряде случаев бывает так, что ген заболевания еще не клонирован и поэтому прямая диагностика мутации невозможна. Однако известно, что предполагаемый ген расположен в определенном месте хромосомы. Этой информации уже достаточно для проведения ДНК-диагностики семейного случая заболевания с использованием высокополиморфных молекулярных маркеров, сцепленных заболеванием.

Для косвенной диагностики подходят маркеры, расположенные внутри или вблизи гена, но при условии, если они находятся в неравновесии по сцеплению, т.е. определенные аллели наследуются совместно друг с другом, образуя гаплотип, и не подвергаются рекомбинациям в мейозе. Чтобы провести анализ сцепления и определить патологический гаплотип, необходимо протестировать ДНК родственников в семье и проследить аллели маркеров, которые наследуются совместно с заболеванием. Информация об определенных аллелях и гаплотипах у супружеской пары перед ЭКО дает возможность суммировать все возможные генотипы у зиготы, что позволяет обнаружить контаминацию, а также определить гаплоидию или однородительскую дисомию (наследование обеих хромосом от одного из родителей).

Рождение здорового ребенка в результате ЭКО и ПГД зависит от благополучного исхода ряда процессов. Дело в том, что только около 70% яйцеклеток могут быть оплодотворены и еще 70% из них достигнут стадии 6-8 бластомеров. Учитывая эффективность ПГД (80-90%), примерно половина эмбрионов без идентифицированной патологии может быть успешно имплантирована. Таким образом, приблизительно 1/3 от всех циклов ЭКО может успешно закончиться рождением здорового ребенка. ПГД однозначно должна быть рекомендована супружеским парам, которые имеют не только наследственную патологию, но и репродуктивные проблемы или же имевшие место неблагоприятные исходы в результате ПД. Это позволит значительно повысить частоту успешной имплантации и развития нормальной беременности у женщин старше 35 лет, которые имеют высокий риск самопроизвольных выкидышей, а также при привычном невынашивании беременности.

Эффективность ПГД, особенно в случае моногенных заболеваний, во многом зависит от медико-генетического консультирования и проведенного ДНК-исследования супружеской пары, обратившейся за всмопогатсльными репродуктивными технологиями. Наличие в семейном анамнезе аутосомно-доминантных заболеваний, особенно с низкой пенетрантностью и неполной экспрессивностью, требуют молекулярно-генетического исследования конкретного гена для определения мутации еще у родителей. В случае если мутация определена, ПГД будет ориентирована на выявление именно этой мутации. Молекулярное исследование супружеской пары на наличие ряда распространенных моногенных аутосомно-рецессивных заболеваний необходимо. Среди заболеваний, гетерозиготное носительство которых нужно определить, следует выделить муковисцидоз, фенилкетонурию, гемохроматоз, адреногенитальный синдром и некоторые другие. Не всегда на практике имеется возможность осуществить полный скрининг мутаций в соответствующих генах, но мажорные мутации тестировать необходимо. В случае известных Х-сцепленных заболеваний определение мутаций в семье также необходимо, поскольку оно позволяет в случае ПГД ориентироваться именно на мутацию, а не на пол эмбриона.

Несмотря на более чем десятилетний опыт ПГД, внедрение новых методов и инструментов, она продолжает оставаться технически сложной и трудоемкой процедурой, требующей знаний и усилий ряда специалистов. Вот почему тенденция к повышению эффективности ПГД должна быть основана на разработке более эффективных и простых протоколов молекулярно генетического анализа и расширении спектра диагностируемой патологии.

# Вывод

Работа с таким уникальным материалом, как ткани плода человека на разных стадиях внутриутробного развития, позволяет не только решить проблему пренатальной диагностики наследственных болезней, но и открывает широкие возможности для изучения такой фундаментальной проблемы, как проблема реализации генетической информации в раннем развитии человека.

В результате комплексных исследовании был разработан оптимальный алгоритм диагностики наследственных болезней (Приложение 1).

К настоящему времени достигнуты серьезные успехи во всех основных разделах молекулярной медицины - диагностике, профилактике и лечении наследственных и мультифакторных заболеваний. Нет сомнения, что уже в недалеком будущем будет положительно решена и проблема создания индивидуальных, семейных и специализированных баз ДНК-данных - различных вариантов генетических паспортов. Важно, однако, напомнить, что внедрение уже существующих и особенно новых методов и технологий сопряжено с необходимостью приобретения новой прецизионной техники для молекулярных исследований, новых компьютерных программ, с затратами на обучение персонала и подготовку грамотных в вопросах молекулярной медицины врачей.

# Алгоритм пренатальной диагностики наследственных болезней

# (Приложение 1)

Риск хромосомных болезней у плода

Риск генных болезней
 у плода

Хорионбиопсия
(плацентобиопсия)

Цитогенетический анализ

Молекулярный
 анализ

Норма

Норма

Кордоцентез
Кариотипирование родителей

Повторная операция

?

Патология

Прерывание беременности
Верификация диагноза

Продолжение беременности УЗИ в динамике

# Список использованных источников

1. Н.М. Побединский, Е.А. Кириллова, Д.Г. Красников, О.К. Никифорова, Е.Н. Лукаш, Н.В. Зарецкая, Е.П. Гитель, А.Д. Липман, О.В. Паршинова – «Роль медико-генетического консультирования в акушерстве и перинатологии» - Акушерство и гинекология 2000 г. № 4 стр. 52 - 55;
2. В.С. Горин, В.Н. Серов, С.Г. Жабин, А.П. Шин, Р.В. Горин – «Пренатальная диагностика хромосомных заболеваний: новые направления и методы» - Акушерство и гинекология 2001 г. № 1 стр. 5 – 8;
3. Э.К. Айламазян, В.С. Баранов – «Молекулярная медицина – новые направления в акушерстве и гинекологии» - Акушерство и гинекология 2002 г. № 4 стр. 9 – 14;
4. М.В. Немцова, Д.В. Залетаев – «Молекулярные аспекты предымплантационной диагностики» - Акушерство и гинекология 2005 г. № 2 стр. 10 – 12;
5. П.В. Новиков – «Состояние пренатальной диагностики врождённых и наследственных заболеваний в Российской Федерации (по материалам деятельности медико-генетических учреждений)» - Акушерство и гинекология 2006 г. № 2 стр. 3 – 7;