

ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ БИОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ 1 И 2 ТРИМЕСТРОВ ПРИ БЕРЕМЕННОСТЯХ ПОСЛЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Областной специализированный центр медицинской генетики

и пренатальной диагностики (г. Донецк)

*Центр репродукции человека «САНА-МЕД» (г. Харьков)

Исследование выполнено в рамках научной темы «Исследование факторов женского и мужского бесплодия в отдаленный период после аварии на Чернобыльской АЭС», №гос. регистрации 0111U000755.

Вступление. Беременности, которые наступили в результате применения вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), требуют особой эффективной системы мониторинга, включающего преконцепционный, преимплантационный, пренатальный, пери- и постнатальный этапы. Благодаря разработке современных методов доимплантационной генетической диагностики ряд заболеваний можно диагностировать уже на самых ранних стадиях эмбриогенеза [13, 15]. Однако комплексная пренатальная диагностика в 1 и 2 триместрах также имеет очень важное значение при индуцированных беременностях. Это связано с повышенной частотой врожденных пороков развития (ВПР) плода и хромосомной патологии в этой группе, большой долей многоплодных беременностей, а также с чрезвычайной настороженностью женщин к проведению инвазивных процедур в силу независимого акушерского риска [7]. В связи с этим качество формирования групп высокого генетического и перинатального риска, снижение числа ложно положительных результатов пренатальных обследований при беременностях после ВРТ приобретают особую актуальность.

Анализ маркеров материнской сыворотки вместе с ультразвуковыми исследованиями (УЗИ) являются основными скрининговыми методами пренатальной диагностики (ПД), по данным которых рассчитывается индивидуальный генетический риск беременной женщины. Изменения уровней биохимических маркеров при беременностях после ВРТ изучались во многих зарубежных исследованиях, в которых описанная динамика показателей значительно варьировала [9, 11, 16, 17, 19]. В отдельных отечественных публикациях, где рассматривались похожие вопросы, анализировалось незначительное число случаев беременностей после ВРТ и не

учитывались популяционные данные для физиологической беременности [2, 5, 6].

В этой связи, **целью** настоящей работы стало исследование особенностей распределения уровней биохимических маркеров при беременностях после ВРТ для повышения эффективности пренатального скрининга у беременных женщин с отягощенным репродуктивным анамнезом.

Объект и методы исследования. Комплексная пренатальная диагностика для выявления врожденных пороков развития плода проводилась в I триместре (срок от 11 недель 0 дней до 13 недель 6 дней) и II триместре (срок 14-22 недели) беременности. Диагностические методы включали ультразвуковое исследование (УЗИ), анализ биохимических маркеров материнской сыворотки и инвазивные обследования (амниоцентез, плацентоцентез и биопсия ворсин хориона) в сформированных группах высокого риска.

Для каждой женщины заполнялась специальная анкета, которая включала следующие данные:

- возраст, соматический анамнез, показатели АД, курение, вес и рост;
- генетический анамнез (отягощение родословной по врожденной, наследственной и мультифакторной патологии);
- акушерско-гинекологический анамнез (порядковый номер беременности и родов; исход предыдущих беременностей; особенности наступления настоящей беременности (естественное зачатие или ВРТ); в случае ВРТ – детальная информация об особенностях метода;
- особенности протекания беременности (угроза прерывания, прием гормональных препаратов, наличие инфекционных процессов, обострение хронических заболеваний).

Анкета также включала раздел с катamnестической информацией. Сведения об исходе беременности были получены для каждой женщины из обследованной выборки.

УЗИ проводилось с помощью сканеров Toshiba Aplio XG и Aplio MX, Medison SONOASE X8 линейными и конвексными датчиками 5-2, 7-4 МГц и вагинальными

Таблиця 1

Медианы уровней биохимических маркеров при беременностях после ВРТ

Маркер (МоМ)	Контрольная группа (n=34860)	Беременности после ВРТ			
		ИО (n=223)	ВМИ (n=287)	ЭКО+ ICSI (n=456)	Среднее
св. β-ХГЧ:					
1 триместр	1,01	1,06	1,05	1,08	1,07
2 триместр	1,05	1,23*	1,19*	1,32*	1,28*
PAPP-A	1,04	0,87*	0,89*	0,82*	0,84*
АФП	1,02	0,99	1,05	1,02	1,03
НЭ	1,02	1,04	1,03	0,99	1,02

Примечание: * уровень значимости отличий по сравнению с контрольной группой $p < 0,05$.

датчиками 8-4 МГц. Протокол УЗИ в I триместре беременности помимо оценки анатомических структур плода обязательно включал измерение эхо-маркеров хромосомной и генетической патологии – воротникового пространства (ВП), кости носа (КН), трикуспидальной регургитации, кровотока в венозном протоке.

Биохимический скрининг маркеров материнской сыворотки проводили методом иммунофлуоресцентной TRACE-технологии на анализаторе «Kryptor» с помощью реагентов «BRAHMS» (Германия). В I триместре измеряли связанный с беременностью белок плазмы PAPP-A и свободную Я-субъединицу хорионического гонадотропина (св. Я-ХГЧ). Маркерами II

триместра были альфа-фетопротеин (АФП), св. Я-ХГЧ и неконъюгированный эстриол (НЭ). Для тех женщин, которые прошли комбинированный ультразвуковой и биохимический скрининг I триместра и не были включены в группу высокого генетического риска, во II триместре исследовали только уровень АФП как маркера открытых дефектов невральнoй трубки и передней брюшной стенки плода. Для расчета индивидуального риска женщины в I триместре использовали компьютерную программу «Astraia» (Германия). Во II триместре беременности риск рассчитывали с помощью программы «BRAHMS Fast Screen PreI Plus» (Германия).

Хромосомные препараты из биоптатов плаценты приготавливали «прямым» методом, амниотическую жидкость культивировали по стандартной методике [3]. Исследование кариотипа новорожденного проводили в лимфоцитах периферической крови стандартным методом [4].

Во всех случаях выявления ВПР плода диагноз верифицировался при патологоанатомическом исследовании.

Для проведения исследования была сформирована основная группа из 966 женщин, у которых беременность наступила после лечения в центре репродукции человека «САНА-МЕД» с применением вспомогательных репродуктивных технологий. Контрольную группу составили 34860 беременных женщин с физиологической беременностью, обследованных в Донецком областном специализированном центре медицинской генетики и пренатальной диагностики и центре «САНА-МЕД». Распределение возрастного состава основной и контрольной групп было равнозначным – медиана составила 32,7 и 31,9 лет соответственно.

Полученные результаты обрабатывали с помощью методов вариационной статистики, мета-анализа с использованием компьютерных программ «Statistica», версия 6.0 (StatSoft Inc., США) и Microsoft Excel, версия 7.0 (Microsoft, США).

Результаты исследований и их обсуждение. Для оценки динамики сывороточных маркеров при беременностях после ВРТ основная группа была разделена на три подгруппы, в зависимости от использованного метода: индукция овуляции с применением

кломифена цитрата или гонадотропинов (ИО) – 223 случая; внутриматочная инсеминация спермой мужа без ИО и с ИО (ВМИ) – 287 случаев; экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) с или без IntraCytoplasmic Sperm Injection (ICSI) – 456 случаев. Во всех случаях по данному комплексной пренатальной диагностики врожденная патология плода была исключена.

Медианы биохимических маркеров в обеих группах представлены в **таблице 1**.

В 1 триместре беременности статистически значимые отличия были установлены для уровня PAPP-A, который во всех трех подгруппах имел общую тенденцию к снижению по сравнению с контрольной группой и составил в среднем 0,84 МоМ ($p < 0,05$). Наиболее выраженным снижением этого маркера было в группе беременностей после ЭКО+ICSI (медиана 0,82 МоМ). Отмечена тенденция св. β-ХГЧ к незначительному повышению, но различия по сравнению с контролем не значимые. Во 2 триместре беременности уровни АФП и НЭ не отличались между основной и контрольной группами, однако, уровень св. β-ХГЧ был повышен (1,28 МоМ и 1,05 МоМ соответственно, $p < 0,001$).

Далее был проведен мета-анализ полученных результатов с данными других исследований по данной проблематике. Уровень св. β-ХГЧ в 1 триместре либо не имел значимых отличий от контрольной группы (аналогично нашим результатам), либо был повышенным. Что касается уровня PAPP-A, то в подавляющем числе крупных мультицентровых исследований (7/10) он также был сниженным по сравнению с физиологическими беременностями (**табл. 2**).

Точная причина снижения уровня PAPP-A при беременностях после ВРТ не установлена. Предполагается, что влияние могут оказывать персистирующие кисты желтого тела, множественные места имплантации нескольких эмбрионов; метаболические нарушения в организме женщины, обуславливающие в свою очередь и ее бесплодие; гормональная терапия, влияющая на гормональную функцию плаценты и др. [8, 10, 12]. Но независимо от причины, динамика к снижению уровня PAPP-A при беременностях после ВРТ, аналогичная таковой при хромосомной анеуплоидии у плода, может закономерно приводить к увеличению числа ложноположительных

Таблица 2
Изменения уровней PAPP-A и св. β-ХГЧ в 1 триместре при беременностях после ВРТ. Мета-анализ разных исследований

Исследование	Проанализировано случаев (n)		Медиана биохимических сывороточных маркеров	
	Беременность после ВРТ	Спонтанная беременность	PAPP-A	св. β-ХГЧ
Liao A. et al. (2001) [17]	220	1233	1,00*	1,21*
Maymon R., Shulman A. (2004) [19]	99	1781	0,78*	1,10
Ghisoni L. et al. (2003) [11]	142	426	0,99	1,16*
Hui et al. (2005) [14]	93	1369	0,83*	0,87*
Lambert-Messerlian G. et al. (2006) [16]	277	37070	0,94	1,13
Anckaert E. et al. (2008) [9]	784	18829	0,78*	0,90
Gjerris et al. (2009) [12]	992	2532	0,78*	0,96
Amor et al. (2009) [8]	1739	50253	0,87*	1,01
Bender et al. (2010) [10]	110	9358	0,86*	1,10*
Matilainen et al. (2011) [18]	282	24783	0,82*	1,00
Собственные данные	966	34860	0,84*	1,07

Примечание: * уровень значимости отличий по сравнению со спонтанной беременностью $p < 0,05$.

результатов пренатального скрининга и к необоснованному завышению числа рекомендуемых инвазивных процедур. Для оценки такого эффекта проведен сравнительный анализ количества женщин основной и контрольной групп, имевших значения индивидуального генетического риска больше порогового значения 1/250 и родивших здоровых детей (рис.).

Если бы индивидуальный риск рассчитывался только по возрасту и ультразвуковым маркерам (воротниковое пространство и кость носа), то в группу риска попало бы примерно 3,5% женщин основной

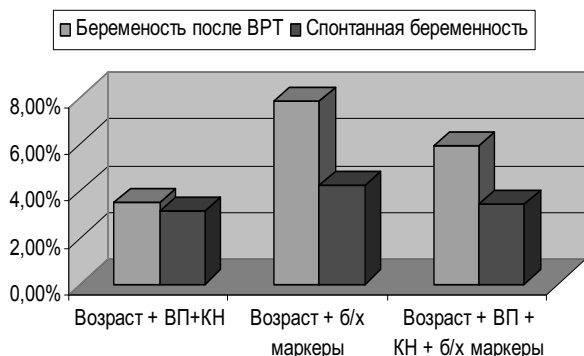


Рис. Число беременных с высоким индивидуальным риском в основной и контрольной группах.

группы и 3,2% – контрольной. Если бы учитывался возраст и уровни биохимических маркеров, то появлялась выраженная диспропорция между двумя группами – 7,8% и 4,2% соответственно ($p < 0,05$). При комбинированном расчете возраст+ВП+КН+уровни биохимических маркеров также сохраняется значимая разница (5,9% и 3,4%, $p < 0,05$), обусловленная снижением уровня PAPP-A при беременностях после ВРТ.

Полученные данные обуславливают необходимость введения коэффициентов коррекции уровня PAPP-A при беременностях после ВРТ для повышения точности оценки индивидуального генетического риска женщины. Исходя из полученных данных о распределении значений PAPP-A у женщин основной и контрольной групп, методом мультивариантного регрессионного анализа был рассчитан коэффициент коррекции уровня PAPP-A при индуцированной беременности (k), который равняется 0,41. Получено уравнение для коррекции уровня PAPP-A:

$$\text{Уровень PAPP-A} \\ \text{корректированный} = \\ \text{Измеренное значение PAPP-A} + \\ 0,036^k$$

Внесение в компьютерную программу для расчета индивидуального риска женщины скорректированного уровня PAPP-A позволяет снизить количество ложноположительных результатов скрининга 1 триместра в основной группе на 2,6%, что соответствует показателю при физиологической беременности.

Ретроспективный анализ распределения ложноположительных результатов был сделан и для биохимического скрининга 2 триместра. Установлено, что в группу высокого риска было включено 8,9% женщин основной группы – практически в 2 раза больше, чем в контрольной (4,6%, $p < 0,001$). Такая ситуация объясняется тем, что в ходе пренатального скрининга 2 триместра индивидуальный риск женщины по хромосомной патологии плода рассчитывается только с учетом возраста и уровней сывороточных маркеров, а по нашим данным при беременностях после ВРТ уровень св. β-ХГЧ во 2 триместре существенно выше, чем при физиологической беременности (табл. 1), аналогично изменениям этого маркера при трисомии 21 у плода. То есть, у женщин с индуцированной беременностью биохимический скрининг 2 триместра имеет низкую специфичность.

Выводы. Методом выбора для выявления хромосомной патологии плода при беременностях после ВРТ является комбинированный ультразвуковой и биохимический скрининг в 11-13 недель беременности, который также высокоинформативен для

раннего прогнозирования перинатального риска (преэклампсии, преждевременных родов, задержки развития плода) [1].

Установленные в данном исследовании особенности динамики биохимических маркеров (снижение уровня PAPP-A в 1-м триместре и повышение св. β -ХГЧ во 2-м триместре) позволили разработать принципы коррекции показателей, снизить число

ложноположительных результатов и повысить чувствительность комплексной пренатальной диагностики у женщин с отягощенным репродуктивным анамнезом.

Перспективы дальнейших исследований.

Проводится исследование информативности новых биохимических маркеров, позволяющих прогнозировать осложнения индуцированных беременностей.

Литература

1. Арбузова С. Б. Ранний пренатальный генетичний скринінг – діагностичні можливості та умови ефективності. Регіональний досвід / С. Б. Арбузова, М. І. Ніколенко // Міжнародний вісник медицини. – 2013. – Т. 6, № 1. – С. 8 – 13.
2. Банніков В. І. Клініко-імунологічні особливості перебігу вагітності у жінок після екстракорпорального запліднення методом донатації ооцитів : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.01.01 «Акушерство та гінекологія» / Володимир Іванович Банніков. – К, 2009. – 22 с.
3. Баранов В. С. Метод встряхивания-отпечатывания – простой и надежный способ приготовления прямых хромосомных препаратов из хоріона / В. С. Баранов // Цитология. – 1989. – Т. 31, № 2. – С. 251 – 253.
4. Баранов В. С. Цитогенетика эмбрионального развития человека / В. С. Баранов, Т. В. Кузнецова. – Санкт-Петербург : Н-Л, 2007. – 640 с.
5. Бутенко В. Л. Генетичний комбінований скринінг першого триместру вагітності як ранній метод пренатальної діагностики: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 03.00.15 «Генетика» / Володимир Людвігович Бутенко. – К, 2006. – 19 с.
6. Соловійов О. І. Ультразвукові та біохімічні маркери першого триместру в прогнозуванні акушерських ускладнень вагітності: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.01.01 «Акушерство та гінекологія» / Олександр Ігоревич Соловійов. – К, 2009. – 20 с.
7. Allen V. M. Pregnancy outcomes after assisted reproductive technology. Genetics Committee of the Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada (SOGC); Reproductive Endocrinology Infertility Committee of the Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada (SOGC) / V. M. Allen, R. D. Wilson, A. Cheung // J. Obstet. Gynaecol. Can. – 2006. – Vol. 28, № 3. – P. 220 – 250.
8. Amor D. J. Pregnancies conceived using assisted reproductive technologies (ART) have low levels of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) leading to a high rate of false-positive results in first trimester screening for Down syndrome / D. J. Amor, J. X. Xu, J. L. Halliday [et al.] // Hum. Reprod. – 2009. – Vol. 24, № 6. – P. 1330 – 1338.
9. Anckaert E. First trimester screening for Down's syndrome after assisted reproductive technology: non-male factor infertility is associated with elevated free beta-human levels at 10–14 weeks of gestation / E. Anckaert, J. Schiettecatte, E. Sleurs // Fertil. Steril. – 2008. – Vol. 90. – P. 1206–1210.
10. Bender F. Altered first-trimester screening markers after IVF/ICSI: no relationship with small-for-gestational-age and number of embryos transferred / F. Bender, J. Hecken, J. Reinsberg // Reprod. Biomed. Online. – 2010. – Vol. 29, № 4. – P. 516 – 522.
11. Ghisoni L. Prenatal diagnosis after ART success: the role of early combined screening tests in counseling pregnant patient / L. Ghisoni, E. Ferrazzi, C. Castagns // Placenta. – 2003. – Vol. 24. – P. 99 – 103.
12. Gjerris A. C. First trimester screening markers are altered in pregnancies conceived after IVF/ICSI // A. C. Gjerris, A. Loft, A. Pinborg // Ultrasound Obstet. Gynecol. – 2009. – Vol. 33, № 1. – P. 8 – 17.
13. Harper J. C. Preimplantation genetic diagnosis: state of the art 2011 / J. C. Harper, S. B. Sengupta // Human Genetic. – 2012. – Vol. 131, № 2. – P. 175 – 186.
14. Hui P. W. Maternal serum pregnancy-associated plasma protein-A and free beta-human chorionic gonadotrophin in pregnancies conceived with fresh and frozen-thawed embryos from in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection / P. W. Hui, Y. H. Lam, M. H. Tang [et al.] // Prenat. Diagn. – 2005. – Vol. 25, № 5. – P. 390 – 393.
15. Kuliev A. Place of preimplantation diagnosis in genetic practice / A. Kuliev, Y. Verlinsky // Am. J. Med. Genet. – 2005. – Vol. 134, № 1. – P. 105 – 110.
16. Lambert-Messerlian G. First- and second-trimester Down syndrome screening markers in pregnancies achieved through assisted reproductive technologies (ART): a FASTER trial study / G. Lambert-Messerlian, L. Dugoff, J. Vidaver // Prenat. Diagn. – 2006. – Vol. 26. – P. 672–678.
17. Liao A. W. First-trimester screening for trisomy 21 in singleton pregnancies achieved by assisted reproduction / A. W. Liao, V. Heath, N. Kametas // Human Reproduction. – 2001. – Vol. 16, № 7. – P. 1501–1504.
18. Matilainen M. In combined first-trimester Down syndrome screening, the false-positive rate is not higher in pregnancies conceived after assisted reproduction compared with spontaneous pregnancies / M. Matilainen, S. Peuhkurinen, P. Laitinen [et al.] // Fertil. Steril. – 2011. – Vol. 95, № 1. – P. 378–381.
19. Maymon R. Comparison of triple serum screening and pregnancy outcome in oocyte donation versus IVF pregnancies / R. Maymon, A. Shulman // Human Reproduction. – 2001. – Vol. 16. – P. 691 – 695.

УДК 575. 116:616-076. 4-053. 13

ОСОБЛИВОСТІ ДИНАМІКИ БІОХІМІЧНИХ МАРКЕРІВ 1 ТА 2 ТРИМЕСТРІВ ПРИ ВАГІТНОСТЯХ ПІСЛЯ ДОПОМІЖНИХ РЕПРОДУКТИВНИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Ніколенко М. І., Грабар В. В., Арбузова С. Б., Телитченко А. Г.

Резюме. Метою роботи стало дослідження особливостей розподілу рівнів біохімічних маркерів при вагітностях після допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) для підвищення ефективності пренатального скринінгу у вагітних жінок з обтяженим репродуктивним анамнезом. Нами порівнювався результат комплексної

пренатальної діагностики в 1 і 2 триместрах вагітності у 966 жінок з індукованою та у 34 860 жінок зі спонтанною фізіологічною вагітністю. У 1 триместрі вагітності статистично значущі відмінності були встановлені для рівня PAPP-A, який у жінок з індукованою вагітністю мав загальну тенденцію до зниження в порівнянні з контрольною групою. На підставі отриманих даних про розподіл значень PAPP-A у жінок з індукованою та спонтанною вагітністю методом мультиваріантного регресійного аналізу був розрахований коефіцієнт корекції рівня PAPP-A при індукованій вагітності.

Ключові слова: індукована вагітність, біохімічні маркери, ДРТ.

УДК 575. 116:616-076. 4-053. 13

ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ БИОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ 1 И 2 ТРИМЕСТРОВ ПРИ БЕРЕМЕННОСТЯХ ПОСЛЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Николенко М. И., Грабарь В. В., Арбузова С. Б., Телитченко А. Г.

Резюме. Целью работы стало исследование особенностей распределения уровней биохимических маркеров при беременностях после ВРТ для повышения эффективности пренатального скрининга у беременных женщин с отягощенным репродуктивным анамнезом. Нами сравнивался результат комплексной пренатальной диагностики в 1 и 2 триместрах беременности у 966 женщин с индуцированной и у 34 860 женщин со спонтанной физиологической беременностью. В 1 триместре беременности статистически значимые различия были установлены для уровня PAPP-A, который у женщин с индуцированной беременностью имел общую тенденцию к снижению по сравнению с контрольной группой. На основании полученных данных о распределении значений PAPP-A у женщин с индуцированной и спонтанной беременностью методом мультивариантного регрессионного анализа был рассчитан коэффициент уровня PAPP-A при индуцированной беременности.

Ключевые слова: индуцированная беременность, биохимические маркеры, ВРТ.

UDC 575. 116:616-076. 4-053. 13

Dynamics of the 1st and 2nd Trimesters Biochemical Markers in Pregnancies after Assisted Reproductive Technology

Nikolenko M. I., Grabar V. V., Arbusova S. B., Telitchenko A. G.

Abstract. The aim was to investigate the distribution of biochemical markers characteristics in pregnancies after assisted reproductive technology (ART) to improve prenatal screening in pregnant women with complicated reproductive history. We compared the outcome of complex prenatal diagnosis in the 1st and 2nd trimester of pregnancy in 966 women with induced pregnancy (ovulation induction (OI) in 223, intrauterine insemination (IUI) in 287, in vitro fertilization (IVF) in 456) and 34860 in women with spontaneous physiological pregnancy. In the 1st trimester in women with induced pregnancy (OI, IUI, IVF) statistically significant differences were established for the level of PAPP-A compared with the control group (0,84 MoM ($p < 0,05$)).

The lowest level of PAPP-A was registered in IVF-pregnancies (0,82 MoM). The tendency for elevation of free β human chorionic gonadotropin (free β -HCG) was noted but it was not statistically significant. Levels of alfafetoprotein and nongonjugated estriol in 2nd trimester were not different in spontaneous and induced pregnancies, but β -HCG level was higher (1,05 MoM and 1,28 MoM respectively, $p < 0,001$).

The dynamic of a lower level of PAPP-A in pregnancies after ART is similar to that in the chromosomal aneuploidy in the fetus and can naturally lead to an increase in the number of false-positive results prenatal screening and unreasonably high number of invasive procedures recommended. We assessed the such effect in a comparative analysis in women with induced pregnancy and control group that had values of individual genetic risk greater than 1/250 and gave birth to healthy children. Revealed that in the combined calculation of genetic risk based on age, nuchal translucency, the length of the nasal bone and biochemical markers there was a significant difference (5.9% and 3.4%, $p < 0.05$) due to a decrease in the level of PAPP-A in pregnancies after assisted reproduction. The obtained data necessitate the introduction of correction factors PAPP-A levels in pregnancies after assisted reproduction to increase the accuracy of individual genetic risk assessment.

Based on data of sharing values PAPP-A in women with induced and spontaneous pregnancy using method of multivariate regression analysis was calculated correction factor of PAPP-A in induced pregnancy, it was 0,41.

Adding to the computer program of calculation of an individual genetic risk correction factor of PAPP-A can reduce the number of false-positive screening results 1 trimester in the study group by 2.6%, which corresponds to the index in physiological pregnancy.

Keywords: induced pregnancy, biochemical markers, ART.

Рецензент – проф. Ліхачов В. К.

Стаття надійшла 10. 09. 2014 р.