

И.Г.Ким¹, С.Т.Абимульдина², Т.Н.Ким¹¹Медицинский центр репродукции человека «ЭКОЛАЙФ», Астана;²Павлодарский государственный университет им. С.Торайгырова
(E-mail: irina_kim_225@mail.ru)

Структура хромосомной патологии у пациентов с бесплодием перед применением вспомогательных репродуктивных технологий.

За период 2009–2015 гг. в генетической лаборатории Медицинского центра репродукции человека «ЭКОЛАЙФ» проведено цитогенетическое обследование 2976 пациентов в программах вспомогательных репродуктивных технологий, из них 1651 — женщина и 1325 — мужчин. Представленные результаты выявили значительный вклад (15,6 %) хромосомных аномалий при нарушениях репродуктивной функции, которые свидетельствуют об актуальности и целесообразности цитогенетического обследования супружеских пар в программе экстракорпорального оплодотворения.

Ключевые слова: бесплодие, нарушения репродуктивной функции, экстракорпоральное оплодотворение, хромосомная патология, кариотипирование, цитогенетическое обследование, хромосомные аномалии, хромосомный полиморфизм.

В настоящее время бесплодие считается одной из важнейших социальных и медицинских проблем. Частота бесплодного брака составляет 10–20 % от общего числа супружеских пар (по данным ВОЗ за 2009 г.). В Республике Казахстан реальная статистика частоты бесплодного брака отсутствует. По различным данным, его частота колеблется от 12 до 15,5 % [1].

Использование экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) позволяет реализовать функцию деторождения при различных заболеваниях, которые ранее считались абсолютно бесперспективными в лечении, однако при этом возникает повышенный риск передачи генетических нарушений потомству, в первую очередь нарушений репродуктивной функции.

Генетические исследования последних лет свидетельствуют, что значительная часть нарушений репродукции обусловлена генетическими факторами и, в частности, хромосомными аномалиями [2–4]. Хромосомная патология в популяции составляет в среднем 1 %, а среди пациентов с нарушениями репродуктивной функции частота хромосомных аномалий, по данным разных исследователей, достигает 20 % [5–8]. В связи с этим большое значение имеет цитогенетическое обследование пациентов с заболеваниями связанными с бесплодием, привычным невынашиванием, наличием в анамнезе ребёнка или плода хромосомной патологии или множественных пороков развития, врождённой аплазией и гипоплазией внутренних половых органов, аменореей, задержкой полового развития, нарушениями сперматогенеза.

В Астане Медицинский центр репродукции человека «ЭКОЛАЙФ» оказывает весь спектр услуг по диагностике и лечению всех форм мужского и женского бесплодия современными методами вспомогательных репродуктивных технологий. Нами проведен анализ цитогенетических исследований за период 2009–2015 гг.

Цель исследования: изучение структуры хромосомной патологии у пациентов, обследованных перед проведением программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

Материалы и методы исследования

Проведено цитогенетическое обследование 2976 пациентов в программах ВРТ, из них 1651 — женщина и 1325 — мужчин.

Исследование проводилось на препаратах, полученных путем культивирования лимфоцитов периферической крови в условиях *in vitro*. При культивировании использовалась стандартная методика с применением культуральной среды RPMI и эмбриональной телячьей сыворотки, в качестве стимулятора роста клеток добавлялся фитогемагглютинин. Культивированные клетки обрабатывали гипотоническим раствором (0,56 % KCl), а затем фиксировали в метанолуксусной смеси (3:1). Для дифференциального окрашивания хромосом использовалась методика GTG-banding с обработкой препаратов трипсином [9].

Анализ хромосом проводился на клетках в стадии метафазы, с помощью микроскопа Olympus BX61, оснащённого цифровой камерой и программой автоматического кариотипирования Cytovision 3.9. При проведении кариотипирования руководствовались правилами, рекомендованными для цитогенетических исследований в учреждениях медико-генетической службы [10].

Результаты исследования и обсуждение

Цитогенетические находки составили 15,6 % (462 случая) от общего количества обследований (рис. 1), 12,3 % на хромосомный полиморфизм и 3,3 % на иные хромосомные аномалии, что согласуется с данными литературы [5–7].

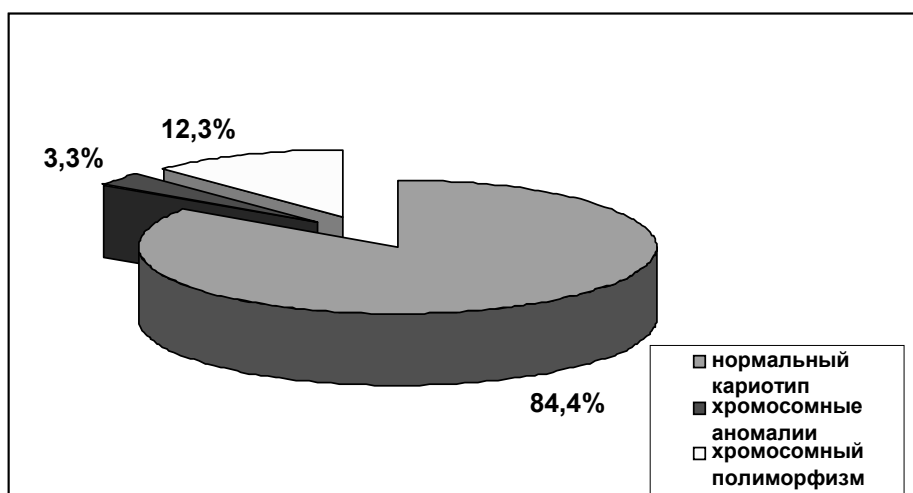


Рисунок 1. Цитогенетические находки 2009–2015 гг. (n=2976)

Общая структура выявленных хромосомных аномалий представлена на рисунке 2.

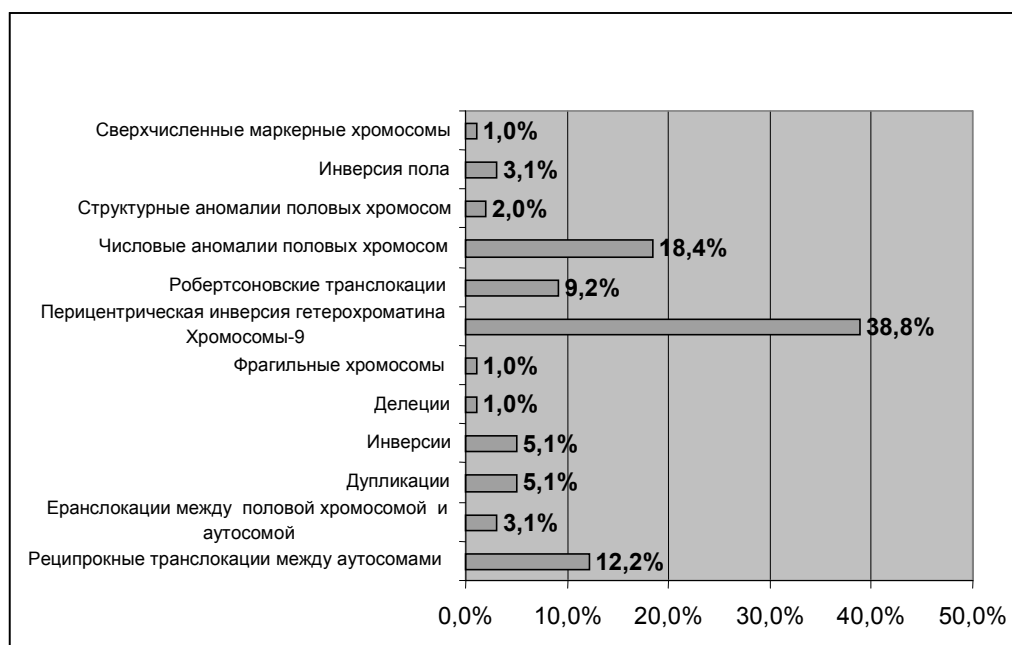


Рисунок 2. Структура хромосомных аномалий

Распределение цитогенетических находок у мужчин и женщин представлено в таблице 1.

Т а б л и ц а 1

Цитогенетические находки (n=462)

Хромосомные аномалии	Женщины	Мужчины
Реципрокные транслокации между ауто-сомами	46, XX, t (8; 15) 46, XX, t (10; 12) 46, XX, t (6; 7) 46, XX, t (4; 7) 46, XX, t (3; 11) 46, XX, t (6; 14)	46, XY, t (2; 15) 46, XY, t (10; 12) (2 случая) 46, XY, t (12; 14) 46, XY, t (8; 11) 46, XY, t (11; 12)
Реципрокные транслокации между поло-вой хромосомой и аутосомой	46, X, t (X; 5)	46, XY, t (Y; 8) 46, Y, t (X; 22)
Перицентрическая инверсия хромосомы 9	46, XX, inv (9) (22 случая)	46, XY, inv (9) (16 случаев)
Робертсоновские транслокации	45, XX, der (13; 14) (2 случая) 45, XX, der (14; 15) (2 случая) 45, XX, der (14; 21) 45, XX, der (14; 22)	45, XY, der (13; 14) (2 случая) 45, XY, der (14; 22)
Инверсии	46, XX, inv(7) (3 случая)	46, XY, inv (7) (2 случая)
Дубликации	46, XX, dup (6) (3 случая) 46, XX, dup (9) (6 случаев)	46, XY, dup (6) (2 случая) 46, XY, dup (9) (6 случаев)
Делеции		46, XY, del (15)
Фрагильные хромосомы		46, XY, fra (12)
Сверхчисленные маркерные хромосомы		46, XY, +mar
Числовые аномалии половых хромосом	45, X/46, XX (2 случая) 45, X/47, XXX/48, XXXX/46, XX	47, XXY (12 случаев) 47, XYY (3 случая)
Структурные аномалии половых хромо-сом	46, X, del (X)	46, X, inv (Y)
Инверсия пола		46, XX (3 случая)

Структура хромосомных аномалий в наших исследованиях представлена в таблице 2.

Т а б л и ц а 2

Структура хромосомных аномалий (n=462)

Хромосомные аномалии	Женщины (n=216)		Мужчины (n=246)		Всего (n=462)	
	абс.ч.	%	абс.ч.	%	абс.ч.	%
Сбалансированные структурные пе-рестройки						
- реципрокные транслокации между ау-тосомами	6	2,7	6	2,43	12	2,59
- реципрокные транслокации между по-ловой хромосомой и аутосомой	1	0,46	2	0,81	3	0,64
- робертсоновские транслокации	6	2,7	3	1,21	9	1,94
- инверсии	3	1,39	2	0,81	5	1,08
- перицентрическая инверсия хромосомы 9	22	10,18	16	6,5	38	8,32
Несбалансированные хромосомные аномалии						
- дубликации	9	4,16	8	3,25	17	3,68
- делеции			1	0,4	1	0,2
- сверхчисленные маркерные хромосомы			1	0,4	1	0,2
Фрагильные хромосомы			1	0,4	1	0,2
Числовые аномалии половых хромо-сом	3	1,39	15	6,1	18	3,9
Структурные аномалии половых хро-сом	1	0,46	1	0,4	2	0,43
Инверсия пола			3	1,2	3	0,65
Хромосомный полиморфизм	165	76,4	187	76	364	78,8

Согласно данным литературы, частота носителей сбалансированных структурных перестроек хромосом значительна и составляет в среднем 1:400–500 в популяции [4, 9, 11, 12].

В наших исследованиях сбалансированные структурные перестройки были выявлены у 68 пациентов и представлены реципрокными транслокациями (2,59 %), транслокациями между аутосомами и половыми хромосомами (0,64 %), робертсоновскими транслокациями (1,94 %), а также инверсиями хромосом 7, 9 и Y (1,08 %, 8,32 % и 0,4 % соответственно).

Наиболее часто (у 38 пациентов) встречалась перичентрическая инверсия 9-й хромосомы 46, XX/46, XY, inv (9) (рис.2, табл.2). Данная аномалия, по нашим данным, составила 8,32 % и согласуется с данными других авторов [12, 13]. Эта распространенная структурная сбалансированная хромосомная aberrация считается парафизиологическим вариантом нормального кариотипа, который не приводит к каким-либо фенотипическим проявлениям. Однако существует много сообщений относительно носителей перичентрической инверсии 9-й хромосомы, у которых выявляются различные нарушения репродуктивной функции. К ним относят повторяющиеся выкидыши в анамнезе, замершие беременности, рождения детей с МВПП, бесплодие, многократные неудачные попытки ЭКО [12].

Сбалансированные хромосомные перестройки (транслокации и инверсии) среди мужчин и женщин встречались с примерно одинаковой частотой (2,2 % и 2,3 % соответственно). Однако робертсоновские транслокации у женщин выявлялись в 2 раза чаще, чем у мужчин. Во всех случаях робертсоновских транслокаций в образовании дериватов участвовала хромосома 14, что коррелирует с данными других исследователей [12].

Таким образом, сбалансированные структурные перестройки в наших исследованиях составили 2,25 %, что значительно превышает общепопуляционную частоту и согласуется с данными других исследователей [11,12].

Несбалансированные хромосомные аномалии в исследуемой группе (n =2976) представлены дупликациями 6 и 9 хромосом (17 случаев), делециями 15 и X-хромосом, фрагильной 12 и сверхчисленной маркерной хромосомами (по 1 случаю), а также в 5 случаях был выявлен добавочный генетический материал неизвестного происхождения на хромосомах 15, 21, 22. Несбалансированные хромосомные перестройки в данной выборке составили 0,7 %. По литературным данным, этот показатель колеблется от 0,8 до 1,2 % [3; 8].

Аномалии половых хромосом у женщин представлены мозаичными вариантами синдрома Шерешевского-Тернера (45, X/46, XX) (4 случая) и структурной аномалией X-хромосомы — 46, X, del(X) и составили 0,3 %.

Обычно хромосомный мозаицизм выявляется случайно, как цитогенетическая находка. Как правило, клиническая картина при мозаицизме выражена не так ярко, как у лиц с полной формой болезни. Степень клинического проявления зависит от количества и величины присутствующих клонов клеток. Чем меньше в организме аномальных клеток по отношению к нормальным, тем слабее проявления. Этим можно объяснить стертые формы данных заболеваний. Пациенты с мозаичным кариотипом фенотипически нормальны, аномалий полового развития нет, репродуктивная функция не нарушена, 1/3 из них имеют здоровых детей. Однако часто у пациентов с минимальным (скрытым) мозаицизмом диагностируется первичное бесплодие, невынашивание (часто с аномальным кариотипом у абортуса), неудачные попытки ЭКО. Эти данные согласуются с данными литературы [14–16].

У мужчин числовые аномалии половых хромосом представлены мозаичными и полными вариантами синдрома Клайнфельтера и дисомии Y-хромосомы (12 и 3 случая соответственно).

Синдром Клайнфельтера, встречаясь в мужской популяции с частотой 0,2 %, является наиболее частой формой мужского гипогонадизма, обусловленного нарушением числа половых хромосом [7]. В исследуемой группе синдром Клайнфельтера встречался почти в пять раз чаще, чем в общей популяции и составил 0,9 %.

Синдром дисомии Y-хромосомы в популяции встречается с частотой 1 случай на 1000 мужчин (0,1 %). Обычно мужчины с дисомией Y-хромосомы фертильны, но из-за присутствия дополнительной половой хромосомы повышается риск возникновения в сперматозоидах анеуплоидии по половым хромосомам [7, 17, 18]. Среди мужчин исследованной группы синдром дисомии Y-хромосомы составил 0,23 %.

Таким образом, частота числовых аномалий половых хромосом у мужчин составила 1,1 %, что не противоречит данным других исследователей [5, 6, 15, 19].

В 3 случаях у пациентов при мужском фенотипе имел место женский кариотип 46, XX, что составило 0,1 % и согласуется с литературными данными [17, 19, 20]. В общей популяции инверсия пола — синдром де ля Шапелля встречается с частотой 1 на 20000 мужчин и характеризуется нарушением развития половых органов и отсутствием сперматогенеза.

Хромосомный полиморфизм характеризуется увеличением гетерохроматиновых районов 1, 9, 16 и Y-хромосом, а также спутников и спутничных нитей акроцентрических хромосом 13, 14, 15, 21 и 22.

Считается [13, 21, 22], что увеличенные гетерохроматические участки, являясь более тяжелыми, нарушают процесс расхождения хромосом во время деления клетки, что приводит к образованию несбалансированных гамет. Также установлено [23, 24], что особенности строения гетерохроматина могут оказывать существенное влияние на функционирование генов, расположенных рядом. Клинически это может проявляться хромосомными болезнями у потомства, бесплодием, привычным невынашиванием, замершими беременностями, многократными неудачными попытками ЭКО.

Хромосомный полиморфизм явился наиболее частой (364 случая) цитогенетической находкой в наших исследованиях и в структуре цитогенетических находок составил 78,8 %. Следует отметить, что в исследуемой группе хромосомный полиморфизм встречался чаще у мужчин, чем у женщин (14,1 % и 10 % соответственно) и составил 12,2 %, что не противоречит международным данным [13, 25].

Так, увеличение гетерохроматиновых участков аутосом 1, 9 и 16, спутников и спутничных нитей акроцентрических хромосом встречалось в 10,1 %.

У 40 мужчин отмечено значительное увеличение длинного плеча Y-хромосомы (46, X, Yqh+) и в 23 случаях уменьшение длинного плеча Y-хромосомы (46, X, Yqh-). Таким образом, у 4,7 % обследованных мужчин обнаружено изменение гетерохроматиновых районов Y-хромосомы, эти данные перекликаются с данными литературы [19, 24].

Представленные результаты наглядно показывают значительный вклад (15,6 %) хромосомных аномалий (у мужчин 18,5 %, у женщин 13 %) при нарушениях репродуктивной функции.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют об актуальности и целесообразности цитогенетического обследования супружеских пар в программе ЭКО. Установление генетических причин патологических состояний значительно меняет тактику ведения и принципы терапии таких пациентов, создаёт условия повышения эффективности лечения бесплодия методами ВРТ.

Список литературы

- 1 Локшин В.Н., Джусубалиева Т.М. Бесплодие и вспомогательные репродуктивные технологии — Алматы, 2005. — С. 275.
- 2 Черных В.Б., Курило Л.Ф., Адамян Л.В. Актуальность медико-генетического обследования и консультирования в репродуктивной медицине // Проблемы репродукции. — 2008. — Спец. вып. — С. 25,26.
- 3 Ворсанова С.Г., Берешева Л.З., Казанцева Л.З., Демидова И.А., Шаронин В.О., Соловьев И.В., Юров Ю.Б. Молекулярно-цитогенетическая диагностика хромосомных аномалий у супружеских пар с нарушением репродуктивной функции // Проблемы репродукции. — 1998. — № 4. — С. 41–46.
- 4 Stern C., Pertile M., Norris H., Hale L., Baker H.W.G. Chromosome translocations I couples with in-vitro fertilization implantation failure // Hum. Repr. — 1999. — Vol. 14. — No. 8. — P. 2097–2101.
- 5 Курило Л.Ф., Шилейко Л.В., Сорокина Т.М., Гришина Е.М. Структура наследственных нарушений репродуктивной системы // Вестн. РАМН. — 2000. — № 5. — С. 32–36.
- 6 Курило Л.Ф. Частота и структура хромосомных aberrаций у пациентов с репродуктивной недостаточностью // Мед. генетика. — 2007. — Т. 6. — № 10. — С. 41–44.
- 7 Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Чернышов В.Н. Хромосомные синдромы и аномалии. Классификация и номенклатура. — Ростов н/Д.: Изд-во Ростов. гос. мед. ун-та, 1999. — С. 107–112.
- 8 Тавокина Л.В. Молекулярно-цитогенетическая диагностика в лечении пациентов с нарушением репродукции // Медицинские аспекты здоровья женщин. — 2007. — № 3. — Вып. 6. — С. 20–25.
- 9 Кузнецова Т.В., Логинова Ю.А., Чиряева О.Г. и др. Цитогенетические методы // Медицинские лабораторные технологии. — Т.2. / Под ред. А.И.Карпищенко. — М., 1999. — С. 550–578.
- 10 Назаренко С.А. Тест-система внешнего контроля качества цитогенетических исследований в учреждениях медико-генетической службы / Назаренко С.А., Васильева Е.О. — Томск: Печатная мануфактура, 2003.
- 11 Политко А.Д., Лазюк Г.И. Цитогенетические особенности носителей сбалансированных конституциональных перестроек хромосом // Здоровоохранение. — 1998. — № 1. — С. 16–18.
- 12 Тавокина Л.В., Баронова Е.В., Сопко Н.И. Наиболее часто встречающиеся хромосомные аномалии в кариотипах пациентов с репродуктивными нарушениями // Клиника «Исида», Киев // Цитология и генетика. — 2007. — № 4.
- 13 Цветкова Т.Г. Полиморфизм хромосом в контингенте супружеских пар с отягощенным акушерским анамнезом: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1980.

- 14 Беспалова Н.О. Генетика невынашивания беременности // Журн. акуш. жен. болезн. — 2007. — Т. LVI. — Вып. 1. — С. 81–95.
- 15 Ворсанова С.Г., Шаронин В.О., Курило Л.Ф. Аномалии половых хромосом при нарушениях репродуктивной функции у мужчин // Проблемы репродукции / Под ред. С.Г.Ворсановой. — 1998. — Т.4. — № 2. — С. 12–21.
- 16 Курило Л.Ф. Хромосомные заболевания органов половой системы // Клини. и эксперим. морфология. — 2015. — № 1. — С. 48–59.
- 17 Черных В.В. Генетические факторы мужского бесплодия // Мед. генетика. — 2006. — С. 8–14.
- 18 Гоголевская И.К., Гоголевский П.А. Y-хромосома и мужское бесплодие // Проблемы репродукции / Под ред. И.К.Гоголевской. — 1999. — № 5. — С. 15–20.
- 19 Чистяков В. В., Ладыгина В. В., Безруков Р. В. Цитогенетическое исследование варибельности гетерохроматиновых районов хромосом у пациентов с проблемами репродукции // Репродуктивная медицина. — 2010. — № 3, 4. — С. 8, 9.
- 20 Фёдорова И.Д., Кузнецова Т.В. Генетические факторы мужского бесплодия // Журн. акуш. жен. болезн. — 2007. — Т. LVI. — Вып. 1. — С. 64–72.
- 21 Бочков Н.П. Клиническая генетика: учебник. — 3-е изд. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006.
- 22 Прокофьева-Бельговская А.А. Гетерохроматические районы хромосом. — М.: Наука, 1986. — 430 с.
- 23 Жимулёв И.Ф. Гетерохроматин и эффект положения гена. — Новосибирск: Наука, 1993. — С. 1–490.
- 24 Подугольникова О.А. и соавт. Гетерохроматические районы хромосом 1, 9, 16 и Y у человека и фенотип // Генетика. — 1984. — Т. 20. — № 3. — С. 496–500.
- 25 Барцева О.Б., Пулина Г.А. и др. Цитогенетическое обследование супружеских пар в программе ЭКО // Проблемы репродукции. — 1998. — № 4. — С. 37, 38.

И.Г.Ким, С.Т. Әбімүлдіна, Т.Н.Ким

Қосалқы репродуктивті технологиялар қолданар алдында бедеулік анықталған науқастарда хромосомдық ауытқу құрылымы

2009–2015 жж. аралығында «ЭКОЛАЙФ» Адам қалыптастыру медициналық орталығының генетикалық лабораториясы қосалқы репродуктивті технологиялар бағдарламасы аясында 2976 адамға цитогенетикалық зерттеу жасады, оның 1651-і – әйел адамдар, 1325-і – ерлер. Көрсетілген нәтиже бойынша репродуктивті функцияның бұзылуынан хромосомалық аномалияның елеулі үлесі (15,5 %) анықталды. Бұл өз кезегінде экстракорпоральды ұрықтандыру бағдарламасы кезінде ерлі-зайыптылардың цитогенетикалық зерттеуден өтудің өзектілігін және орынды екендігін куәландырады.

I.G.Kim, S.T.Abimuldina, T.N.Kim

The structure of chromosomal aberrations at patients with infertility before assisted reproductive technologies

During the period 2009–2015 in the genetic laboratory of human reproduction medical center « ECOLIFE» performed cytogenetic examination in 2976 patients in ART programs, including 1651 — woman, and 1325 — men. The presented results revealed a significant contribution (15,6 %) of chromosomal abnormalities in the reproductive disorders features that demonstrate the relevance and usefulness of cytogenetic survey of couples undergoing IVF.

References

- 1 Lokshin V.N., Dzhusubalieva T.M. *Infertility and Assisted Reproductive Technologies*, Almaty, 2005, p. 275.
- 2 Chernyh V.B., Kurilo L.F., Adamyan L.V. *Reproduction problems*, 2008, spec. ed., p. 25–26.
- 3 Vorsanova S.G., Beresheva L.Z., Kazantseva L.Z., Demidova I.A., Sharonin V.O., Soloviev I.V., Yurov Yu.B. *Reproduction problems*, 1998, 4, p. 41–46.
- 4 Stern C., Pertile M., Norris H., Hale L., Baker H.W.G. *Human Reproduction*, 1999, 14, 8, p. 2097–2101.
- 5 Kurilo L.F., Shileiko L.V., Sorokina T.M., Grishina E.M. *Annals of the Russian academy of medical sciences*, 2000, 5, p. 32–36.
- 6 Kurilo L.F. *Medical genetics*, 2007, 6, 10, p. 41–44.
- 7 Vorsanova S.G., Yurov Yu.B., Chernyshov V.N. Chromosomal anomalies and syndromes. Classification and nomenclature, Rostov-on-Don: Publ. Rostov State Medical University, 1999, p. 107–112.
- 8 Tavokina L.V. *Medical aspects of women's health*, 2007, 3, 6, p. 20–25.
- 9 Kuznetsova T.V., Loginova Yu.A., Chiryayeva O.G. et. al. *Medical laboratory technologies*, 2, edit. A.I.Karpishchenko, Moscow, 1999, p. 550–578.

- 10 Nazarenko S.A. *The test system of external quality control cytogenetic studies in institutions of medical and genetic services*, Tomsk: Print Manufactory, 2003.
- 11 Politko A.D., Lazyuk G.I. *Health service*, 1998, 1, p. 16–18.
- 12 Tavokina L.V., Baronova E.V., Sopko N.I. *Cytology and Genetics*, 2007, 4.
- 13 Tsvetkova T.G. *Polymorphism of chromosomes in contingent of couples with burdened obstetric anamnesis*: thesis abstract of candidate of medical sciences, Moscow, 1980.
- 14 Bepalova N.O. *Journal of obstetrics and woman disease*, 2007, LVI, 1, p. 81–95.
- 15 Vorsanova S.G., Sharonin V.O., Kurilo L.F. *Reproduction problems*, edit. S.G.Vorsanova, 1998, 4, 2, p. 12–21.
- 16 Kurilo L.F. *Clinical and experimental morphology*, 2015, 1, p. 48–59.
- 17 Chernykh V.B. *Journal of Medical Genetics*, 2006, 2, p. 8–14.
- 18 Gogolevskaya I.K., Gogolevsky P.A. *Reproduction problems*, 1999, 5, p. 15.
- 19 Chistyakov V.V., Ladygina V.V., Bezrukov R.V. *Reproductive medicine*, 2010, 3, 4, p. 8, 9.
- 20 Fedorova I.D., Kuznetsova T.V. *Journal of obstetrics and woman disease*, 2007, LVI, 1, 64–72.
- 21 Bochkov N.P. *Clinical genetics: textbook*, 3rd edit., Moscow: GEOTAR-Media, 2000.
- 22 Prokofieva-Belgovskaya A.A. *Heterochromatic regions of chromosomes*, Moscow: Nauka, 1986, p. 430.
- 23 Zhimuliev I.F. *Heterochromatin and gene position effect*, Novosibirsk: Nauka, 1993, p. 1–490.
- 24 Podugolnikova O.A. and coauthors. *Genetics*, 1984, 20, 3, p. 496–500.
- 25 Bartseva O.B., Pulina G.A. et. al. *Reproduction problems*, 1998, 4, p. 37, 38.