

40200145

**TIANEPTIN ALKALMAZÁSA NEURO-
DEGENERATÍV BETEGSÉGEK KEZELÉSÉRE**
ALKALMAS GYÓGYSZERKÉSZÍTMÉNYEK
ELŐÁLLÍTÁSÁRA

Kivonat

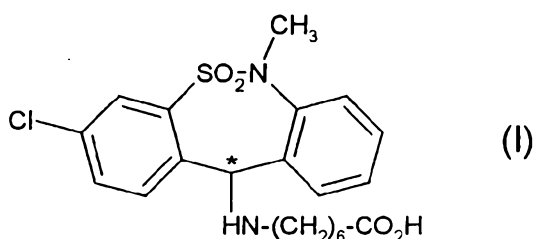
A találmány tárgya tianeptin valamint enantiomerjeinek és sóinak az alkalmazása neurodegeneratív betegségek kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállítására.

PK

**TIANEPTIN ALKALMAZÁSA NEURO-
DEGENERATÍV BETEGSÉGEK KEZELÉSÉRE**
ALKALMAS GYÓGYSZERKÉSZÍTMÉNYEK
ELŐÁLLÍTÁSÁRA

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A találmány tárgya tianeptin valamint izomerjeinek és sóinak az alkalmazása neurodegeneratív betegségek kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállítására.



Az (I) képletű tianeptint a 2 104 728 számú francia szabadalmi leírásban írták le, mint pszichoneurotikus rendellenességek, fájdalom és köhögés kezelésére alkalmas új gyógyszert.

Továbbá, a 2 635 461 számú francia szabadalmi leírás ismerteti a tianeptin és származékainak az alkalmazását stressz kezelésére.

Újabb tanulmányok kimutatták, hogy a tianeptinnek

szignifikáns hatása van az emlékezetre. Ezek a tanulmányok a következők:

- File, S.E. és mtsai. Drug Development Research 23, 47-56 (1991);
- Jaffard, R. és mtsai. Journal de Psychiatrie Biologique et Thérapeutique, March special edition, 37-39 (1989);
- Jaffard, R. és mtsai. Abstracts of the XVIth CINP Congress, Munich (Germany) 15-19 (August 1988); Psychopharmacology 96 (suppl), 31.02.32, 275 (1988);
- Jaffard, R. és mtsai. Behavioural Pharmacology 2, 37-46 (1991);
- Lebrun, C. és mtsai. European Psychiatry 8 (suppl. 2), 81s-88s (1993);
- Jaffard, R. és mtsai. Presse Médicale 20, 37, 1812-1816 (1991).

Továbbá, a 2 716 623 számú francia szabadalmi leírás ismerteti a tianeptin (+) izomerjének az alkalmazását az emlékezést és felismerést érintő betegségek kezelésére alkalmas gyógyszerek előállítására.

Arra a meglepő felismerésre jutottunk, hogy a tianeptin az AMPA/kainát típusú glutamát receptorok modulátora, és ezért neurodegeneratív betegségek kezelésére alkalmazható.

Az L-glutaminsav és az L-aszparaginsav képes a központi

idegrendszer neuronjait aktiválni, és számos tanulmányban kimutatták, hogy ezek az neuroaktív aminosavak (excitatory amino acid, rövidítés: EAA) megfelelnek a neurotranszmitterekre vonatkozó definíciónak; így az EAA-akkal összefüggő idegfolyamatok modulálása a neurológiai betegségek kezelésének fontos célpontja lehet.

Valóban kimutatták hogy az EAA-k túlzott mértékű kibocsátása és a receptoraik túlzott mértékű stimulálása lehet az egyik lehetséges oka a neuronok degenerációjának, amelyet az epilepszia, szenilis demencia vagy agyi érrendszeri katasztrófák esetén figyelhetünk meg. Az utóbbi időben folyamatosan nő azoknak a neurodegeneratív betegségeknek a száma, amelyekben az EAA-aknak jelentős szerepük van (Huntington kór, skizofrénia, amiotrófiás laterális szklerózis) [Mc Geer, E.G. és mtsai. *Nature* 263, 517-519 (1976); Simon, R. és mtsai. *Science* 226, 850-852 (1984)].

Továbbá, noha a EAA neurotranszmisszió hiperaktiválása biztosan neurotoxikus hatású, a normális mértékű aktiválásuk elősegíti az emlékezési és megismerési folyamatokat [Lynch, G. és Baudry, M. *Science* 224, 1057-1063 (1984); Rothman, S.M. és Olney, J.W. *Trends in Neuro Sci.* 10, 299-302 (1987)]. Farmakológiai és terápiás szempontból célszerű kizárólag a patológiás szintű ingerlést kezelni, miközben fenntartjuk a fiziológias

aktiválás szintjét.

A poszt- és preszinaptikus elhelyezkedésű EEA receptorokat a specifikus ligandumok elektrofiziológiai és/vagy neurokémiai effektusaival szemben mutatott affinitásuk szerint a következő négy csoportba osztjuk:

- NMDA (N-metil-D-aszpartát) receptor, amely egy egy- és kétvegyértékű kationokat (beleértve a kalciumiont) áteresztő ioncsatornával rendelkezik, de amelyet a magnéziumion blokkol. A neuron pusztulásának egyik lehetséges oka a kalcium és cink ionok felhalmozódása a sejtben. Az NMDA csatorna nyitását számos a receptorral kapcsolatban álló receptor szabályozza, amelyet különösen a glicin jelenléte mozdít elő, amely effektus sztrichnin-inszenzitív. A glicin receptor fontos célpontja a az NMDA receptoraktiváció modulálásának.

- AMPA (α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-izoxazol-propionsav) receptor, amely egyvegyértékű kationokat (beleértve a nátriumiont is) áteresztő ioncsatornával rendelkezik. Ennek a csatornának az aktiválása a membrán depolarizációját okozhatja.

- kainát receptor, amelynek az ionos karaktere hasonló az AMPA receptoréhoz, de attól a vezetőképesség és a deszenzitizáció szintjeiben különbözik. Számos tanulmány valószínűsíti, hogy az AMPA és a kainát receptoroknak

szerkezeti és funkcionális hasonlóságai vannak és közös receptorcsaládot alkotnak [Keinanen, K. és mtsai. Science 249, 556-560 (1990)].

- ACPD (transz-1-amino-ciklopentán-1,3-dikarboxilsav) receptor, amelyet metabotróp receptornak is neveznek, mivel nem kapcsolódik ioncsatornához.

Az ionotróp receptoroknak az EAA-k által történő aktiválása megnyitja az ioncsatornákat és elsősorban a nátriumot engedi be, amely depolarizálja a sejtet. Ez az AMPA receptort igénylő kezdeti fázis a gátlás feloldásához, majd az NMDA receptor hiperaktiválásához és a kalcium nagymértékű felhalmozódásához vezet [Blake, J.F. és mtsai. Neurosci. Letters 89, 182-186 (1988); Bashir, Z.I. és mtsai. Nature 349, 156-158 (1991)].

Kimutattuk, hogy a tianeptin egy újszerű módon modulálja az AMPA/kainát típusú glutamáterg receptorokat és ezért neurodegeneratív betegségek kezelésére alkalmazható.

Még közelebbről, a találmány tárgya a tianeptinnek, enantiomerjeinek és gyógyászatilag elfogadható sóinak az alkalmazása neurodegeneratív betegségek, például agyi iszkémia, agyi traumák, az agy öregedése, Alzheimer kór, szklerózis multiplex, amiotrófiás laterális szklerózis, demielinizációval járó betegségek, encefalopátiák, krónikus gyengeség szindróma, mialgiás encefalomyelitisz,

vírusfertőzést követő krónikus gyengeség szindróma, vírus- vagy bakteriális fertőzés utáni fáradtság és depresszió, valamint az AIDS betegséggel járó demenciás tünetegyüttes kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállítására.

A tianeptint és enantiomerjeit valamint adott esetben gyógyászatilag elfogadható sóit olyan gyógyszerkészítmények formájában szereljük ki, amelyek alkalmasak orális, parenterális, per- vagy transzkután, nazális, rektális, nyelven, szemüregen keresztüli vagy inhalálás útján történő adagolásra, előnyösen injektálható készítmények, aeroszolok, szem- vagy orrcseppek, nyelv alá helyezendő tabletták, lágy zselatin kapszulák, kemény zselatin kapszulák, nyalókák, kúpok, krémek, kenőcsök, bőrre kenhető gélek, stb. formájában, amelyek a hatóanyagot azonnal vagy elnyújtva szabályozható módon bocsátják ki.

A dózis nagysága a beteg életkorától és tömegétől, az adagolás módjától, a terápiás indikáció természetétől valamint az egyéb kezelésektől függ, és a 12,5 - 300 mg/dózis vagy mg/adag közötti tartományban van.

A tianeptint vagy enantiomerjeit a következőkben felsorolt bázisokkal alakíthatjuk sóikká anélkül, hogy az alkalmazható bázisokat ezekre korlátoznánk: nátrium-hidroxid, kálium-hidroxid, kalcium-hidroxid és alumínium-

-hidroxid, alkálifém- vagy alkáliföldfém-karbonátok vagy szerves bázisok, például trietil-amin, benzil-amin, dietanol-amin, terc-butil-amin, diciklohexil-amin, arginin, stb.

A tianeptint vagy az enantiomerjeit következőkben felsorolt savakkal alakíthatjuk sóikká anélkül, hogy az alkalmazható savakat ezekre korlátoznánk: sósav, kénsav, foszforsav, borkősav, almasav, maleinsav, fumársav, oxálsav, metánszulfonsav, etánszulfonsav, kámforsav, citromsav, stb.

Előnyös a tianeptin nátriumsója.

A. Tianeptin hatása az AMPA/kainát receptorokra

A kísérlet a 4, 10 és 25 μM koncentrációban jelenlevő tianeptin hatását demonstrálja a 250 μM kainát által primér kultúrában fenntartott telenkefalikus (telencephalic) sejtekben indukált áramerősségre.

Kísérleti módszer

16,5 napos Wistar patkánymagzatok telenkefalikus sejtjeit 12 napon át növesztettük. Ezután szobahőmérsékleten a "patch clamp" technika alkalmazásával kísérleteket végeztünk 5 mM KCl, 140 mM NaCl, 10 mM Hepes, 2 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 és 10 mM D-glükóz (pH = 7,3) összetételű táptalajokban, a mikropipettákat pedig 140 mM KCl, 4 mM NaCl, 10 mM

Hepes, 5 mM EGTA és 0,5 mM CaCl_2 (pH = 7,2) összetételű oldattal töltöttük meg. A tianeptint (nátriumsója formájában) 4, 10 és 25 μM koncentrációknál teszteltük.

Eredmények

Ebben a kísérletben a kainát, amely az AMPA/kainát típusú glutamáterg receptorok agonistája, telenkefalikus sejt kultúrában növeli a sejtbe lépő áramerősséget. Ezt az effektust mérjük a "patch clamp" technikával. E körülmények között a tianeptin önmagában (10 μM) hatástalan; tehát a tianeptin nem direkt agonista. Ugyanakkor a tianeptin 4, 10 és 25 μM koncentrációban növeli a kainát (250 μM) által indukált áramerősséget (lásd 1. ábra). Ebből következik, hogy a tianeptin az AMPA/kainát receptorok modulátora.

B. Tianeptin hatása az in vitro neurotoxicitásra két neurotoxicitást prediktáló modellben mérve.

Ezek a kísérletek a tianeptin neurotoxicitásra kifejtett hatását demonstrálják olyan neurotoxicitási modellekben, amelyek az iszkémiát, agyi traumát és neurodegenerációt kivédő hatóanyagok hatását prediktálják. Számos patológias állapotban a glutamát neurotoxicitása játsza a fő szerepet a neuronok pusztulásának patogenezisében [Choi, D.W. Trends Neurosci. 11, 465 (1988)].

B.1. Tianeptin hatása a hipoxia által okozott neurotoxicitásra

Kísérleti módszer

Sprague-Dawley patkánymagzatokból kortikális sejteket izolálunk, amelyeket 5 % lószérumot és 5% borjúmagzati szérumot tartalmazó minimális esszenciális tápoldatban (minimum essential medium, rövidítés: MEM) tartunk fenn. A tenyészeteket 37°C-on, 93 % levegő és 7 % szén-dioxid összetételű atmoszférában tartjuk. Közvetlenül a hipoxia beállta előtt a közeget 300 µl HEPES-szel puffertolt sóoldatra cseréljük ki. A sejteket e körülmények között 10 percen át szobahőmérsékleten inkubáljuk. Tianeptin (nátriumsó formájában) és MK-801 különböző koncentrációit adjuk a tenyészethez és a sejteket 10 percen át inkubáljuk. Ezután a tápoldatot 300 µl oxigénmentesített PIPES pufferra (pH = 7,4) cseréljük.

Ezután a sejteket 3 órán át, 37°C-on 95 % N₂ és 5 % O₂ összetételű hipoxiás atmoszférában inkubáljuk. Ezután a tápoldatot kicseréljük 200 µl szérumot nem tartalmazó minimális esszenciális tápoldatra majd 24 órán át, 37°C-on standard körülmények között tovább inkubáljuk. A sejtek morfológiai vizsgálata után a tenyészet felülúszóját elkülönítjük, és abban a laktát dehidrogenáz (LDH) aktivitást megmérjük.

Eredmények

1, 10 és 100 µM koncentrációkban a tianeptin

szignifikánsan csökkentette a hipoxia által okozott neurodegenerációt (2. ábra). A LDH aktivitás e koncentrációknál mért csökkenése 98,8, 91,7 és 91,4 % volt. Ugyanezek között a körülmények között a kontrollként alkalmazott MK-801 (20 μ M) neuroprotektív referencia hatóanyag csaknem 86,3 %-os védelmet nyújtott a hipoxia hatásai ellen.

Következtetés

Mikromoláris koncentrációban alkalmazva a tianeptin teljesen megvédi a sejtenyészetben a kortikális neuronokat a hipoxia által okozott károktól. E körülmények között ugyanolyan hatásos, mint a kontrollként alkalmazott MK-801 referencia antagonistá hatóanyag.

B.2. Tianeptin hatása a glutamát által okozott neurotoxicitásra

Kísérleti módszer

Sprague-Dawley patkánymagzatokból kortikális sejteket izolálunk, amelyeket 5 % lószérumot és 5% borjúmagzati szérumot tartalmazó minimális esszenciális tápoldatban tartunk fenn. A tenyészetet 37°C-on tartjuk 93 % levegő és 7 % szén-dioxid összetételű atmoszférában. Közvetlenül a glutamát hozzáadása előtt a közeget 300 μ l HEPES-szel pufferolt sóoldatra cseréljük ki. A sejteket e körülmények között 15 percen át 1 mM glutamáttal együtt inkubáljuk. Ezután a tápoldatot kicseréljük 200 μ l

minimális esszenciális tápoldattal, majd 24 órán át 37°C-on inkubáljuk. A sejtek morfológiai vizsgálata után a tenyészet felülúszóját elkülönítjük, és abban megmérjük az LDH aktivitást.

Eredmények

1, 10 és 100 nM és 1, 10, 100 μ M koncentrációkban a tianeptin szignifikánsan csökkentette a glutamát által okozott toxicitást (3. ábra). Az aktivitás csökkenésének mértéke 59 % és 94 % között volt. Azonos körülmények között a kontrollként alkalmazott MK-801 (20 μ M) referencia hatóanyag teljes védelmet nyújtott a hipoxia hatásai ellen.

Következtetés

A tianeptin nanomoláris szintű koncentrációi képesek megvédeni a kortikális neuronokat a glutamát degeneratív hatásaival szemben. Az eredmények arra utalnak, hogy a tianeptin valószínűleg közvetlenül a neuronokra hat és csökkenti a degeneratív betegségek által okozott károkra való érzékenységüket.

C. Tianeptin hatása a tenyészetben fenntartott asztrociták hipoxiájával összefüggő adenosin-trifoszfát (ATP) szintjeire.

Kísérleti módszer

Az asztrocita tenyészeteket újszülött patkányokból

nyerjük Booher, J. és Sensenbrenner, M. eljárásával [Neurobiology 2, 97-105 (1992)]. Az asztrocitákat három héttel a kultúrába helyezésük után használjuk. Különböző koncentrációjú tianeptint tartalmazó, oxigénmentesített DMEM tápoldatot adunk a rendszerhez, majd a hipoxia előidézése céljából 24 órára anaerob kamrába helyezzük azt. Az ATP koncentrációját lumineszcencia mérésével határozzuk meg, és pM ATP/mg celluláris protein dimenzióban fejezzük ki. Három párhuzamos kísérletet végzünk.

Eredmények

Tenyészetben a tianeptin (0,1 - 10 μ M) koncentrációfüggő módon megvédi az asztrocitákat. A védelem százalékos értéke 10 μ M dózisonál maximális és eléri a 68 %-ot.

Következtetés

A tianeptin mikromoláris szintű koncentrációi képesek megvédeni az asztrocitákat tenyészetben a hipoxia által előidézett degeneratív hatások ellen.

D. A tianeptin neuroprotektív hatása a növekedési faktorok távollétében bekövetkező motoneuronok pusztulása esetében

Kísérleti módszer

Terhes Sprague-Dawley patkányokat az embrióéletkor

14. napján megöljük. Az embriók motoneuronjait a következő irodalmi helyeken leírt módszerek alkalmazásával tisztítjuk: Henderson, C.E. ["Purified embryonic motoneurons" in "Nerve cell culture: a practical approach", szerk. Cohen, J. és Wilkin, G., 69-81 (1995); és Aree, V. (J. Neurosci. Res. 55, 119-126 (1999)).

A motoneuronokat mintegy 1000 sejt per 16 mm-es üreg koncentrációban iniciáljuk, majd B27-tel és lószérummal kiegészített Neurobasal közegben tenyésztjük. A motoneuronok megtapadása után a sejteket 2,5 napon át 37,2°C-on önmagukban inkubáljuk 1 ng/ml agyból kinyert neurotrofikus faktor (brain-derived neurotrophic factor, rövidítés: BDNF) vagy tianeptin jelenlétében. A túlélő motoneuronokat közvetlenül megszámoljuk.

Eredmények

A növekedési faktorok nélkülözhetetlenek a motoneuronok számára, mivel a BDNF hiánya esetén a sejtek elpusztulnak. A BDNF megvédi a motoneuronokat a sejthaláltól. A tianeptin koncentrációfüggő módon megakadályozta a motoneuronok pusztulását. Az 5. ábra a motoneuronok számát mutatja 2,5 napos tenyészetben, amelyet mind a négy üreg 2-2 helyén számoltunk (a területegységre eső abszolút számértéket, valamint a szórást adjuk meg a tianeptin koncentráció függvényében, ahol $n = 8$).

Következtetés

Hasonló kísérleti modellben Duong és munkatársai a Br. J. Pharmacol 128, 1385-1392 helyen kimutatták, hogy a neuroprotektív hatásáról ismert SR57746A kódjelű anyag hatékony volt. A szerzők arra következtettek, hogy "a SR57746A az egyetlen szintetikus vegyület, amelyről ismert, hogy hatása van a motoneuronok in vitro körülmények közötti túlélésére, és perspektívikus vegyület az amiotrófiás laterális szklerózis kezelésére".

Ebben a kísérletben demonstráltuk, hogy a tianeptinnek teljesen váratlan neuroprotektív hatása van, amely arra utal, hogy a tianeptin potenciálisan az amiotrófiás laterális szklerózis kezelésére is alkalmazható.

E. Tianeptin in vivo hatása az oxidatív stressz körülményei között történő génexpresszióra

Egy korszerű molekuláris biológiai technika, a reverz transzkripció alkalmazásával végzett differenciálanalízis valamint a reverz transzkripció-polimeráz láncreakció (reverse transcription polymerase chain reaction, rövidítés: RT-PCR) segítségével lehetővé vált az in vivo körülmények között tianeptinnel végzett kezelések eredményeinek a tanulmányozása az amigdalában, krónikus kísérletekben, a központi genetikai szabályzás szintjén, patkányban.

Készülékek és módszerek

Két patkánycsoportot (n = 6) 21 napon keresztül 15

mg/kg dózisú tianeptin nátriumsóval vagy fiziológiás szérummal kezeltünk intraperitoneálisan. Ezután az állatokat megöltük, az agyukat eltávolítottuk, az amigdala régió teljes RNS tartalmát extraháltuk, majd RT-PCR technikával vizsgáltuk. Összefoglalva, elvégeztük az extrahált RNS reverz traszkripcióját, a transzkripció termékeket polimeráz láncreakcióval (PCR) megsokszoroztuk, majd magasfelbontású polikarilamid gélelektorforézisnek vetettük alá. A kiválasztott sávokat eltávolítottuk a gélből, ismét megsokszoroztuk majd analizáltuk.

Eredmények

Az eredmények arra utalnak, hogy a tianeptin elsődleges célpontja a mitokondriális genom, amely egy cirkuláris 16 kilobázis méretű DNS molekulából áll, amely a légzési lánc enzimkomplexének a 13 alegységét, valamint a teljes riboszómális RNS és transzfer RNS készletet kódolja. Azt tapasztaltuk, hogy a tianeptin krónikus adagolása a NADH ubikinon reduktáz (2. és 5. alegységek) mitokondriális génjeinek, valamint a 16S rRNS-at, leu-tRNS-at és a val-tRNS-at kódoló gének túlzott expresszióját okozza.

Az NADH ubikinon reduktáz első a mitokondriális légzési lánc három enzimatiszus energiaátvivő komplexei közül, és a belépő hely a láncon áthaladó elektronok többsége számára. Továbbá, a mitokondriális DNS-ban fellépő

mutációkat összefüggésbe hozták több, általános néven mitokondriális enkefalomiopátia elnevezésű neurodegeneratív betegséggel [Chandrasekaran, K. és mtsai. Mol. Brain Res. 24, 336-340 (1994); Kish, S.J. és mtsai. Neurochem. 59, 776-779 (1992); Mutisaya, E.M. és mtsai. J. Neurochem. 63, 2179-2184 (1994)].

Továbbá, fibroblaszt tenyészetek alkalmazásával kimutatták, hogy a stressz az NADH és a citokróm b 4. alegységének valamint az rRNS 165S alegységének génjeit kódoló transzkriptek szintjének az alulszabályzását okozza [Crawford, D.R. és mtsai. Free Radic. Biol. Med. 22(3), 551-559 (1997)].

Következtetés

Az amigdala mitokondriális génjeinek a tianeptin krónikus adagolása miatt bekövetkező túlzott expressziója arra utal, hogy ez a vegyület fokozza a sejtlégzést és a központi oxidatív anyagcsere mértékét. Egy ilyen központi hatás a tianeptin in vivo neuroprotektív aktivitására utal.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Tianeptin és enantiomerjeinek valamint adott esetben ezek gyógyászatilag elfogadható savakkal vagy bázisokkal alkotott addíciós sóinak az alkalmazása a neurodegeneratív betegségek kezelésénél az AMPA/kainát típusú glutamát receptorok modulálására alkalmas gyógyszerkészítmények előállítására.
2. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy a gyógyszerkészítmények agyi iszkémia, agyi trauma, az agy öregedése, Alzheimer kór, szklerózis multiplex, amiotrofiás laterális szklerózis, demielinizációval járó betegségek, enkefalopátiák, krónikus gyengeség szindróma, mialgiás enkefalomyelitisz, vírusfertőzést követő krónikus gyengeség szindróma, bakteriális- vagy vírusfertőzés utáni fáradtság és depresszió, valamint az AIDS betegséggel járó demenciás tünetegyüttes kezelésére alkalmasak.
3. Az 2. igénypont szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy a gyógyszerkészítmények amiotrofiás laterális szklerózis kezelésére alkalmasak.
4. Az 1- 3. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy a tianeptin nátriumsója formájában van.

5. Gyógyszerkészítmény, amely hatóanyagként tianeptint vagy annak enantiomerjeit, adott esetben ezek gyógyászatilag elfogadható savakkal vagy bázisokkal alkotott addíciós sóit, valamint egy vagy több gyógyászatilag elfogadható kötőanyagot tartalmaz az 1. - 4. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazásra.

6. Az 5. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény azzal jellemezve, hogy a hatóanyag a tianeptin nátrium sója formájában.

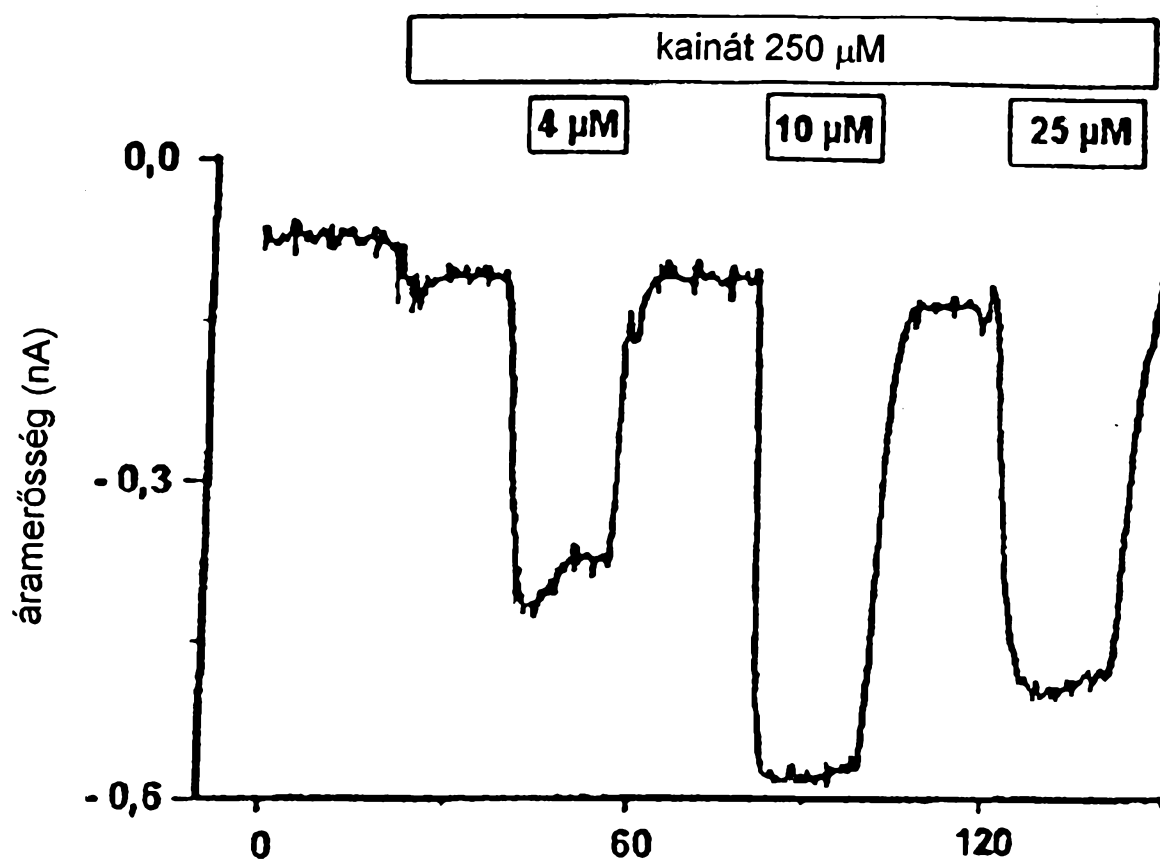
3 oldal rajzzal

2002.02.14
TK

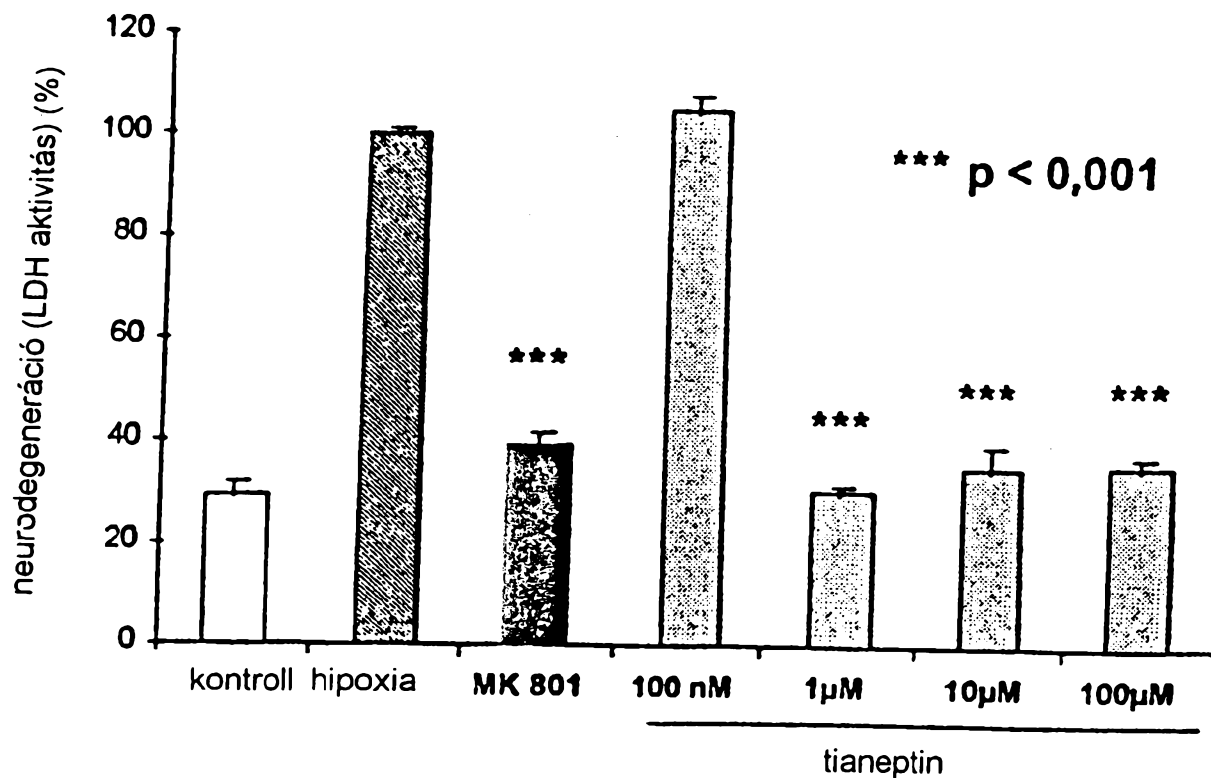
A bejelentő helyett
a meghatalmazott

DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

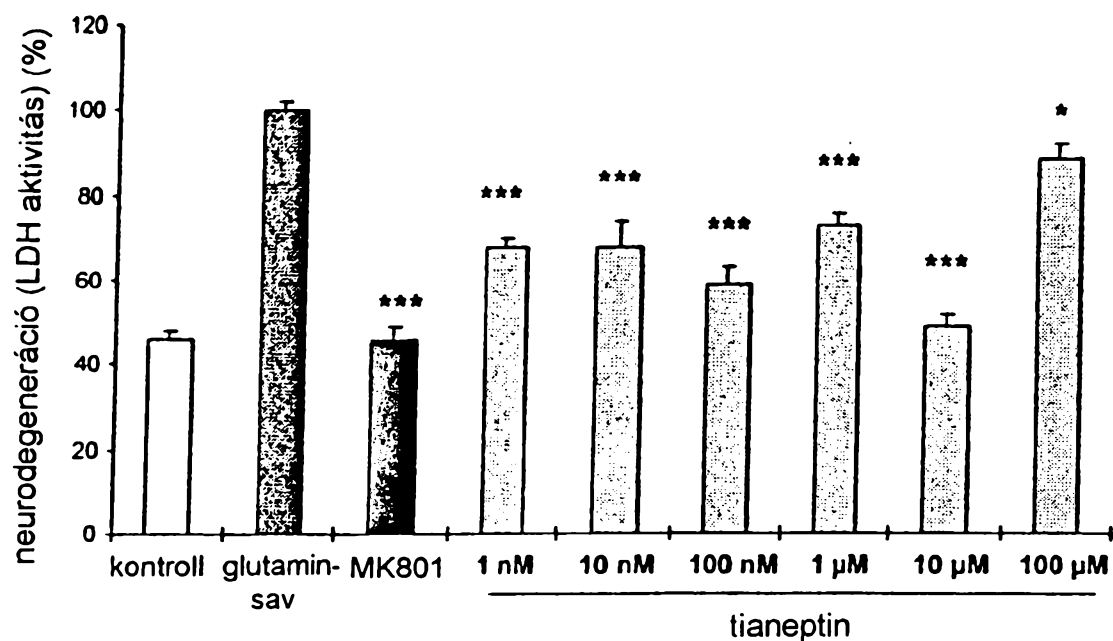
Baranyi Éva
szabadalmi ügyvivő



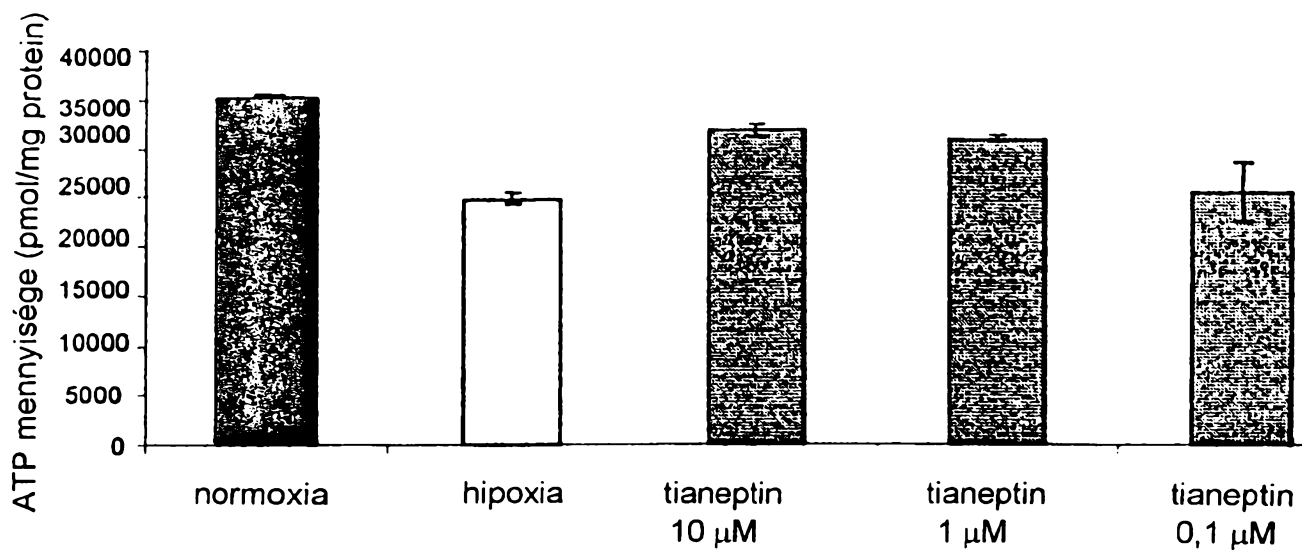
1. ábra



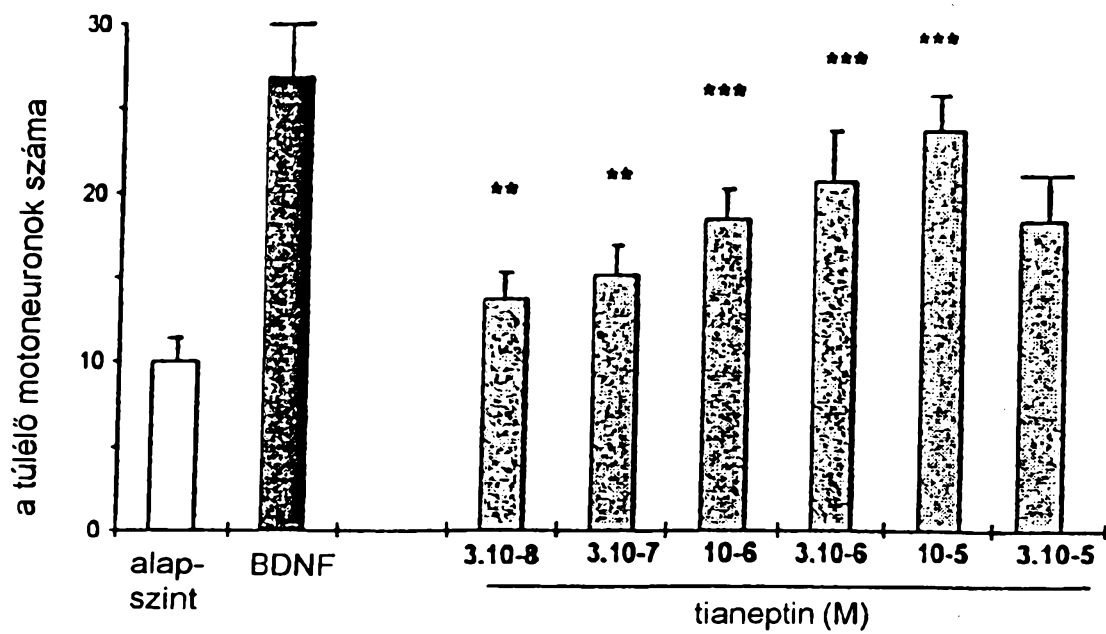
2. ábra



3. ábra



4. ábra



5. ábra