



(51) МПК

A61M 5/32 (2006.01)

A61K 31/565 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

G09B 23/28 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61M 5/32 (2020.02); A61K 31/565 (2020.02); A61P 43/00 (2020.02); G09B 23/28 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2019137152, 19.11.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.11.2019Дата регистрации:
05.06.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 19.11.2019

(45) Опубликовано: 05.06.2020 Бюл. № 16

Адрес для переписки:

450008, г.Уфа, ул.Ленина, 3,
БАШГОСМЕДУНИВЕРСИТЕТ, Патентный
отдел

(72) Автор(ы):

Сулайманова Римма Тагировна (RU),
Мурзабаев Хасан Хамзович (RU),
Рахматуллина Ирина Робинзоновна (RU),
Хайруллин Радик Магзинурович (RU),
Сулайманова Луиза Изатулаевна (RU),
Шарафутдинова Кадрия Ильдаровна (RU),
Арсланбекова Регина Раилевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Башкирский государственный
медицинский университет" Министерства
здравоохранения Российской Федерации
(RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2676437 C1, 28.12.2018. RU
2470996 C2, 27.12.2012. GB 2359254 A, 22.08.2001.
CN 103525755 A, 22.01.2014. CN 103432166 A,
11.12.2013. ЛЕОНОВА Е.В. и др.
"Патологическая физиология внутриутробного
развития", Минск, БГМУ, 2003. КУЦЕНКО
С.А. "Основы токсикологии", СПб, 2002г.
Глава 6.4. "Токсические влияния на
репродуктивную функцию. Тератогенез" (см.
прод.)

(54) СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ ПРОКАНЦЕРОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ФУЛВЕСТРАНТА НА ЯИЧНИКИ ПОТОМСТВА ЖЕНСКОГО ПОЛА У ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к экспериментальной медицине, онкологии, онкогинекологии, и может быть использовано для моделирования проканцерогенного действия фулвестранта на ткани яичника у потомства женского пола лабораторных мышей. Для этого беременным лабораторным мышам на 11 сутки пренатального периода внутримышечно вводят фулвестрант в дозе 100 мкг/кг массы мыши в виде 0,4 мл 0,0005% масляного раствора. Способ

обеспечивает модель морфологического и иммуногистохимических изменений, обусловленных проканцерогенным действием повышенного уровня гормонов на яичники потомства женского пола за счёт введения в критический день закладки органов эффективной субтоксической дозы фулвестранта, не вызывающей необратимых изменений в яичниках. 1 з.п. ф-лы, 8 ил.

(56) (продолжение):

// "Биомедицинский журнал Medline.ru". том4, ст.119, март, 2003 г. // помещено на сайт в Интернет: <http://www.medline.ru/public/monografy/toxicology/p6-specialformsoftoxpro/p4.phtml> 16 августа 2007 года; дата размещения подтверждена по адресу web-архива: <https://web.archive.org/web/20070816031601/http://www.medline.ru/public/monografy/toxicology/p6-specialformsoftoxpro/p4.phtml>. "Fulvestrant (Фулвестрант)" // помещено на сайт в Интернет: <https://www.vidal.ru/drugs/molecule/1677> 04 октября 2018 года; дата размещения подтверждена по адресу web-архива: <https://web.archive.org/web/20181004185842/https://www.vidal.ru/drugs/molecule/1677>. БАБАЕВА Н.А. и др. "Роль гормональных нарушений в канцерогенезе опухолей женской репродуктивной системы" // "Акушерство и гинекология: новости, мнение, обучение", N1, 2017, стр.76-81. JOHNSON MD et al. "Cadmium mimics the in vitro effects of estrogen in the uterus and mammary gland". Nat Med. 2003 Aug; 9(8):1081-4. Epub 2003 Jul 13, реферат, найдено 18.03.2020 из PubMed PMID: 12858169. JIN M et al. "IGFBP1 involved in the decreased birth weight due to fetal high estrogen exposure in mice". Biol Reprod. 2016 Nov; 95(5):96. Epub 2016 Sep14, реферат, найдено 18.03.2020 из PubMed PMID: 27628217. IGNATIUK VM et al. "Disruption in the reproductive system of female rats after prenatal lipopolysaccharide-induced immunological stress: role of sex steroids". Stress. 2019 Jan; 22(1):133-141. Epub 2018 Oct 29, реферат, найдено 18.03.2020 из PubMed PMID: 30369279.

R U 2 7 2 2 9 8 8 C 1

R U 2 7 2 2 9 8 8 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61M 5/32 (2006.01)*A61K 31/565* (2006.01)*A61P 43/00* (2006.01)*G09B 23/28* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61M 5/32 (2020.02); *A61K 31/565* (2020.02); *A61P 43/00* (2020.02); *G09B 23/28* (2020.02)(21)(22) Application: **2019137152**, 19.11.2019(24) Effective date for property rights:
19.11.2019Registration date:
05.06.2020

Priority:

(22) Date of filing: 19.11.2019

(45) Date of publication: 05.06.2020 Bull. № 16

Mail address:

450008, g.Ufa, ul.Lenina, 3,
BASHGOSMEDUNIVERSITET, Patentnyj otdel

(72) Inventor(s):

Sulajmanova Rimma Tagirovna (RU),
Murzabaev Khasan Khamzovich (RU),
Rakhmatullina Irina Robinzonovna (RU),
Khajrullin Radik Magzinurovich (RU),
Sulajmanova Luiza Izatulaevna (RU),
Sharafutdinova Kadriya Ildarovna (RU),
Arslanbekova Regina Railevna (RU)

(73) Proprietor(s):

federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Bashkirskij gosudarstvennyj
meditsinskij universitet" Ministerstva
zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii (RU)(54) **METHOD FOR SIMULATING THE PROCARCINOGENIC ACTION OF FULVESTRANT ON FEMALE DESCENDANTS OVARY IN LABORATORY MICE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine, namely to experimental medicine, oncology, oncogynecology, and can be used to simulate a procarcinogenic action of fulvestrant on ovary tissue in female descendants of laboratory mice. That is ensured by intramuscularly injecting fulvestrant 100 mcg/kg of mice in form of 0.4 ml of 0.0005 % oily solution to pregnant laboratory mice on 11th day of the prenatal period.

EFFECT: method provides a model of morphological and immunohistochemical changes caused by a procarcinogenic action of a high hormone level on female ovary by introducing the effective sub-toxic dose of fulvestrant in the critical day of organ anlage, which does not cause irreversible changes in the ovaries.

1 cl, 8 dwg

Изобретение относится к экспериментальной медицине и онкологии и онкогинекологии, может быть использовано для контролируемого моделирования пренатального проканцерогенного воздействия на яичники потомства лабораторных животных.

Известно, что антиэстрогены блокируют эстроген рецепторы, образуя комплекс антиэстроген-рецептор, который не способен к транскрипции [Zhu X, Leav I, Leung YK, et al. Dynamic regulation of estrogen receptor-beta expression by DNA methylation during prostate cancer development and metastasis // American Journal of Pathology. 2001. №159. P. 94-97.].

С 1970 х годов нестероидное производное трифенилэтилена - тамоксифен со свойствами агониста рассматривали как один из лучших препаратов для лечения рака молочной железы (РМЖ). Однако, обладая эстрогеноподобными эффектами, он повышает риск развития рака эндометрия, гиперкоагуляционного синдрома, тромбоэмболических осложнений и т.п. [Heuderson I.C. A rose is no longer a rose. J Clin Oncol 2002;20:3365-68.; Howell A., Osborn C.K., Morris C. et al. Fazlodex:Development of a novel, «pure» antiestrogen. Cancer 2000;89:817-25.; Fisher B., Constantino J.P., Redmond C.K. et al. Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. J Natl Cancer Inst 1994;86:527-37.].

В отличие от тамоксифена, препарат ICI 182,78 фулвестрант, имеет стероидную структуру и обладает более высоким сродством к эстрогеновым рецепторам (ЭР), чем тамоксифен, полностью блокируя трофическое действие эстрадиола на матку [Howell A. Preliminary experience with pure antiestrogens. Clin Cancer Res 2001;7(Suppl 12):4369s-75s.]. Исследования у животных показали также, что фулвестрант блокирует активность тамоксифена в отношении эндометрия, не проникая через гематоэнцефалический барьер [Эндокринотерапия рака молочной железы: преодоление резистентности/ В.Ф.

Семиглазов, Г.А. Дашян, В.В. Семиглазов/ "Эффективная фармакотерапия. Онкология, гематология и радиология." №1 (10) | 2015].

Благодаря своему механизму действия и хорошей переносимости фулвестрант рекомендуется использовать для лечения в комбинации с другими препаратами [Зикирходжаев А.Д, Клинические преимущества новых антиэстрогенов, 2007]. По результатам исследования, риск прогрессирования РМЖ или смерти при использовании 500 мг фулвестранта оказался ниже на 20% по сравнению с дозой 250 мг [Di Leo A., Jerusalem G., Petruzella L. et al. Final overall survival: fulvestrant 500 mg vs 250 mg in the randomized CONFIRM trial // J. Natl. Cancer Inst. 2014. Vol. 106. №1].

В лечении рака молочной железы особое внимание уделяют фитотерапии после обнаружения селективного воздействия растительных препаратов (фитоэстрогенов) на ЭР. Такими препаратами являются индол-3-карбинол, секоизолариципезинол и др. За эффективностью индол-3-кабинода наблюдала группа ученых (Рожкова И.И., Меских Е.В., 2007), которая продемонстрировала, что применение индол-3-карбинола в дозе по 200 мг 2 раза в день на протяжении 6 мес.оказывало положительный

маммопротекторный эффект. Другая группа российских ученых исследовали влияние фитоэстрогена секоизолариципезинола на аденокарциному молочной железы СА755. В результате 10-дневного курса перорального введения СЕКО в разовой дозе 250-500 мг/кг было выявлено ингибирующее действие, при этом отрицательная динамика в состоянии мышей не наблюдалась, а также отсутствовали патологические изменения их желудочно-кишечного канала [Результаты скрининга фитоантиэстрогена секоизолариципезинола на эстрогензависимой аденокарциноме молочной железы СА755./ Юлия Александровна Борисова, Галина Борисовна Смирнова, Натан Танфелевич Райхлин, Елена Михайловна Трещалина, Зоя Сергеевна Шпрах / Вестник

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, т. 25. - 2014. - №1-2. - С. 26-30.].

На действие антиэстрогенов оказывают влияние следующие факторы: состояние репродуктивной системы, доза (концентрация) и способ введения (однократно, длительно) [Kitts W.D., Newsome F.E., Runeckles V.C. The estrogenic and antiestrogenic effects of coumestrol and zeranol on the immature rat uterus. Can. J. Anim. Sci. 1983; 63: 823-4].

Однако механизмы этого провоцирующего воздействия не представляется возможным изучить вследствие отсутствия однотипных по используемым дозам препаратов, воспроизводимых лабораторных моделей.

В доступной научно-медицинской и патентной литературе сведений об известности способа моделирования проканцерогенного действия фулвестранта на ткани яичника у потомства не обнаружено.

Задачей предлагаемого изобретения является разработка способа моделирования проканцерогенного (провоцирующего развитие злокачественных новообразований) действия повышенного уровня гормонов на яичники потомства женского пола у лабораторных животных путем введения в материнский организм эффективной субтоксической дозы фулвестранта в критический день закладки этих органов.

Технический результат при использовании изобретения - получение предельно допустимой дозы фулвестранта, оказывающей морфологически и иммуногистохимически контролируемый проканцерогенный эффект на ткани яичника у потомства женского пола лабораторных мышей.

Предлагаемый способ моделирования проканцерогенного действия пренатального уровня фулвестранта на ткани яичника потомства у лабораторных мышей в постнатальном периоде выполняется следующим образом. Беременным самкам лабораторных мышей внутримышечно вводят фулвестрант в дозе 100 мкг/кг массы животного в виде 0,4 мл 0,0005% масляного раствора на 11 сутки пренатального периода. В качестве растворителя используют касторовое масло.

Изобретение иллюстрируется следующими фигурами: на фиг. 1,5 представлены микрофото гистологического препарата яичника потомства беременных мышей контрольной группы, не получавших препарат; на фиг. 2,6 - микрофото гистологического препарата яичника потомства после введения фулвестранта в дозе 20 мкг/кг массы беременной мыши на 11 сутки пренатального периода; на фиг. 3,7 - микрофото гистологического препарата яичника потомства после введения фулвестранта в дозе 100 мкг/кг массы беременной мыши на 11 сутки пренатального периода; на фиг. 4,8 - микрофото гистологического препарата яичника потомства после введения фулвестранта в дозе 200 мкг/кг массы беременной мыши на 11 сутки пренатального периода.

Модель может быть рекомендована:

1) в фармакологии: для разработки и испытания новых и существующих лекарственных препаратов, предупреждающих развитие злокачественных новообразований яичников у потомства с неблагоприятным воздействием стероидных гормонов в период их внутриутробного развития;

2) в акушерстве: для разработки профилактических мер при вынужденном использовании антагонистов эстрогеновых рецепторов для поддержки беременности при привычном невынашивании с целью нивелирования их проканцерогенного воздействия на яичники потомства;

3) в гинекологии и онкогинекологии: для исследования молекулярно-клеточных механизмов пренатального программирования развития рака и других заболеваний репродуктивных органов и его гормональных факторов;

4) в персонализированной медицине: в исследованиях клеточной и молекулярно-генетической предрасположенности к раку и предраковым заболеваниям репродуктивных органов, измененных уровней гормоновотягающих это состояние.

Расчеты эффективности доз препарата производили в соответствии с коэффициентами для перерасчета доз веществ в мкг/кг для мышей [Арзамасцев Е.В. Методологические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ. // Москва. - 1997.; Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному изучению новых фармакологических веществ. // - 2005. - с. 49-51.; Гуськова Т.А. Доклиническое токсикологическое изучение лекарственных средств как гарантия безопасности проведения их клинических исследований. // -2010]. В качестве экспериментальных животных использовали белых лабораторных мышей, которые были получены и содержались в питомнике ГУП ДП ПСХ «Питомник лабораторных животных», расположенном по адресу Республика Башкортостан, Чишминский район, п. Горный. Условия вивария и содержания животных соответствует РД-АПК 3.10.07.02-09 «Методические рекомендации по содержанию лабораторных животных в вивариях научно-исследовательских институтов и учебных заведений», другим необходимым санитарным нормам и требованиям ветеринарного контроля и надзора работ с лабораторными и экспериментальными животными, лицензия №99-04-000097 от 25.01.2005 г. Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения и социального развития (Справка представлена от филиала ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Уфа «Иммунопрепарат» от 11.03.2014 г.).

Исследуемые мыши были разделены на 4 группы, в каждой по 5 животных:

Контрольная группа №1 - экспозиция 0,8 мл касторового масла на беременную мышью внутримышечно.

Опытная группа №2 - экспозиция фулвестранта 0,08 мл 0,0005% масляного раствора в дозировке 20 мкг/кг массы беременной мыши внутримышечно.

Опытная группа №3 - экспозиция фулвестранта 0,4 мл 0,0005% масляного раствора в дозировке 100 мкг/кг массы беременной мыши внутримышечно.

Опытная группа №4 - экспозиция фулвестранта 0,8 мл 0,0005% масляного раствора в дозировке 200 мкг/кг массы беременной мыши внутримышечно.

Животных выводили из опыта по окончании сроков на 90-е сутки и усыпляли в соответствии с Директивой 2010/63 / ЕС Европейского парламента и Совета 22 / о9 / 2010 о защите животных в научных целях и рекомендациями других международных российских и институциональных правил в области биоэтики. Для исследования извлекали яичник потомства лабораторной мыши. Органы фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине в течение 24 часов, подвергали стандартной гистологической обработке. Готовили срезы 5-6 мкм, после соответствующей гистологической проводки следующим этапом проводилось окрашивание срезов гематоксилин-эозином и иммуногистохимическим (ИГХ) методом. Парафиновые срезы толщиной 4 мкм окрашивали с помощью иммуногистостейнера Leica Microsystems Bond™ (Германия). В работе были использованы в качестве первых антител поликлональные антитела для мыши (Santa Cruz Biotechnology, США): к рецепторам ki-67 (клон MIB-1), bcl 2 (клон N-19), p 53 (клон fl-393-G). Все антитела были в разведении 1:300. Для демаскировки использовали непрямую стрептавидин-биотиную систему детекции Leica BOND (Novocastra™, Германия). Докраску проводили раствором гематоксилина. Оценку специфичности реакции проводили при окрашивании срезов без первых антител. Исследование и визуализацию препаратов проводили с использованием светового микроскопа Leica DMD 108 (Германия) со

специализированным программным обеспечением управления настройками и захвата изображения. Всего приготовлено 110 микропрепаратов.

На гистологической картине яичника потомства мыши контрольной группы видны следующие структуры: корковое вещество (1) яичника представлено фолликулами на разных стадиях развития: примордиальный фолликул (2), первичный (униламинарный) фолликул (3), вторичный (мультиламинарный) фолликул (4), третичный фолликул (5). Мозговое вещество (6) яичника невелико по сравнению с корковым. Оно хорошо васкуляризировано, сосуды в нем расширены и умеренно кровенаполнены. В строме - умеренный отек и полнокровные сосуды (Фиг. 1). Во вторичных фолликулах наблюдается примерно 1% ядерной экспрессии, в третичных фолликулах - 5-6% умеренной ядерной экспрессии. В строме наблюдается 1% ядерной экспрессии (Фиг. 5).

В результате внутримышечного введения фулвестранта в дозе 20 мкг/кг массы беременной мыши установлено, что гистологическая картина яичника потомства представлена корковым и мозговым веществом. В корковом веществе яичника наблюдается большое количество фолликулов на разных стадиях развития. Отмечается увеличение первичных фолликулов (3), внутренняя поверхность которых выстлана высоким цилиндрическим эпителием с зернистой цитоплазмой. Значительно преобладают вторичные (4), третичные фолликулы (5). Слой теки, окружающий фолликулы, утолщен. В строме коркового вещества определяется очаговая пролиферация (7). Определяется резко выраженное паретическое расширение сосудов и полнокровие, как сосудов коркового вещества, так и мозгового (6). Желтые тела (8) представлены гиперплазированным фолликулярным эпителием с признаками белковой зернистой дистрофии. (Фиг. 2). В фолликулах определяется экспрессия p53 до 2-3%. В строме наблюдается до 1-2% ядерной экспрессии p53 (Фиг. 6).

В результате внутримышечного введения фулвестранта в дозе 100 мкг/кг массы беременной мыши установлено, что гистологическая картина яичника потомства представлена следующими структурами. В корковом веществе наблюдаются фолликулы на разных стадиях развития: первичные (3), вторичные (4), третичные (5). Отмечается увеличение первичных фолликулов и смещение их вглубь органа к мозговому веществу. Так же определяется выраженное преобладание вторичных фолликулов, с признаками кистозного расширения, фолликулярный эпителий в них утолщен. Наблюдается единичное желтое тело (8) с признаками выраженной дистрофии и атрофии фолликулярного эпителия. Слой теки желтого тела уплощен. В строме отмечается очаговая лютеинизация - это фолликулярный эпителий без слоя теки с признаками секреторной активности. В мозговом слое отмечается обеднение кровотока сосудов (9) (Фиг. 3). В фолликулах экспрессия белка-онкосупрессора p53 составляет 0%. Уровень ядерной экспрессии p53 в строме до 1%. В желтом теле яркая экспрессия p53 составляет 3-4% (Фиг. 7).

В результате внутримышечного введения фулвестранта в дозе 200 мкг/кг массы беременной мыши установлено, что яичник значительно увеличен в размерах. Корковое и мозговое вещество плохо дифференцируются. Значительное уменьшение примордиальных фолликулов, сохраненные фолликулы с признаками атрофии и дистрофии. Присутствуют кистозные изменения во вторичных фолликулах (4). Структуры третичных фолликулов и желтых тел не определяются. Диффузная инфильтрация яичника, процесс распространяется на прилежащую жировую ткань (10). Площадь яичника представлена большим количеством полостей, выстланных однослойным, резко уплощенным эпителием с признаками выраженной белковой дистрофии (11) и фокальными некрозами клеток (12). Умеренное полнокровие сосудов

мозгового вещества с очаговым фибриноидным некрозом сосудов (13). Слой теки расширен за счет выраженного фиброза и отека (Фиг. 4).

В фолликулах определяется яркая экспрессия p53 до 40-50%. В желтых телах - ядерная экспрессия p53 до 6-7%). (Фиг. 8)

5 Полученные данные выявляют наличие положительной корреляции между повышенным уровнем антагонистов половых гормонов (антиэстрогенов) в период пренатального развития и структурно-функциональными изменениями в яичниках потомства женского пола в позднем постнатальном онтогенезе.

10 Таким образом, фулвестрант в дозировке 20 мкг/кг вызывает выраженный стимулирующий эффект за счет блокады эстрогеновых рецепторов и активации обратной связи в гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системе. Субтоксическая дозировка фулвестранта в дозе 100 мкг/кг массы мыши на 11 сутки пренатального периода занимает промежуточное положение, так как сочетаются признаки атрофии и умеренной активности.

15 При этом введение фулвестранта в дозе 200 мкг/кг массы мыши на 11 сутки пренатального периода является токсической дозировкой и помимо атрофических процессов вызывает некробиотические процессы (кистозное расширение фолликулов, очаговые некрозы в тканях яичников).

20 Таким образом, введение фулвестранта в дозе 100 мкг/кг массы мыши на 11 сутки пренатального периода оказывает проканцерогенный с точки зрения морфологических и иммуногистохимических изменений эффект на репродуктивную систему потомства лабораторных мышей, с одной стороны не вызывая необратимые изменения в тканях яичников, такие как большое количество желтых тел, расположенных по всему периметру яичника, уменьшение или отсутствие первичных, вторичных и третичных
25 фолликул, отсутствие которых приводит к бесплодию на основе патоморфологических критериев, определяемых на светооптическом уровне, как при введении в дозе 200 мкг/кг, но в то же время резко повышая иммуногистохимические показатели, свидетельствующие о проканцерогенных изменениях на молекулярно-генетическом уровне, наиболее отчетливо проявляющихся в выраженном повышении активности
30 белка-онкосупрессора P53.

(57) Формула изобретения

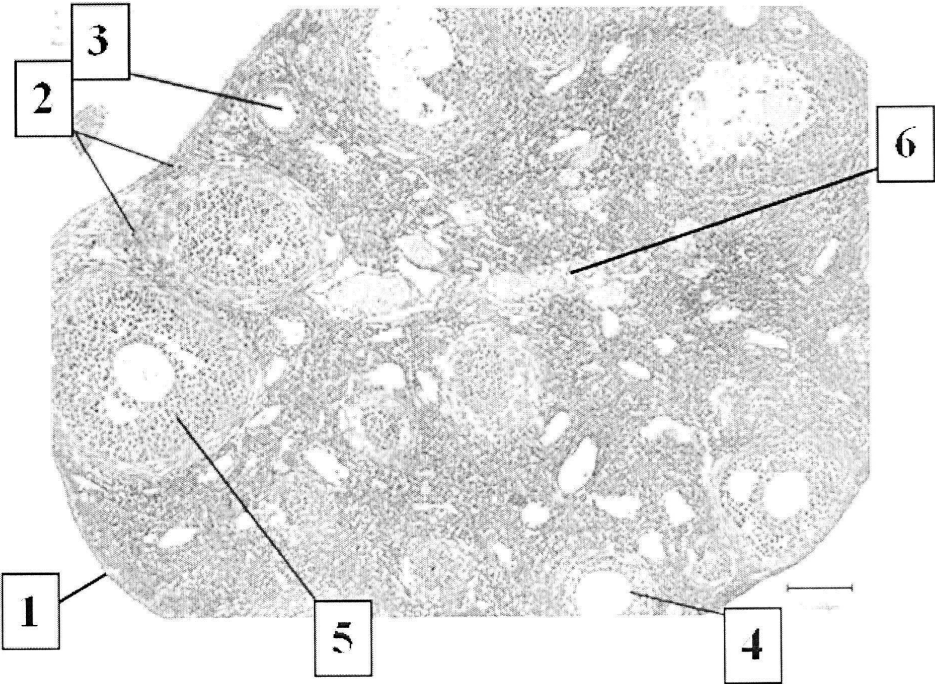
1. Способ моделирования проканцерогенного действия фулвестранта на ткани яичника у потомства женского пола, заключающийся в том, что лабораторным мышам
35 на 11 сутки пренатального периода внутримышечно вводят фулвестрант в дозе 100 мкг/кг массы мыши в виде 0,4 мл 0,0005% масляного раствора.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в качестве растворителя используют касторовое масло.

40

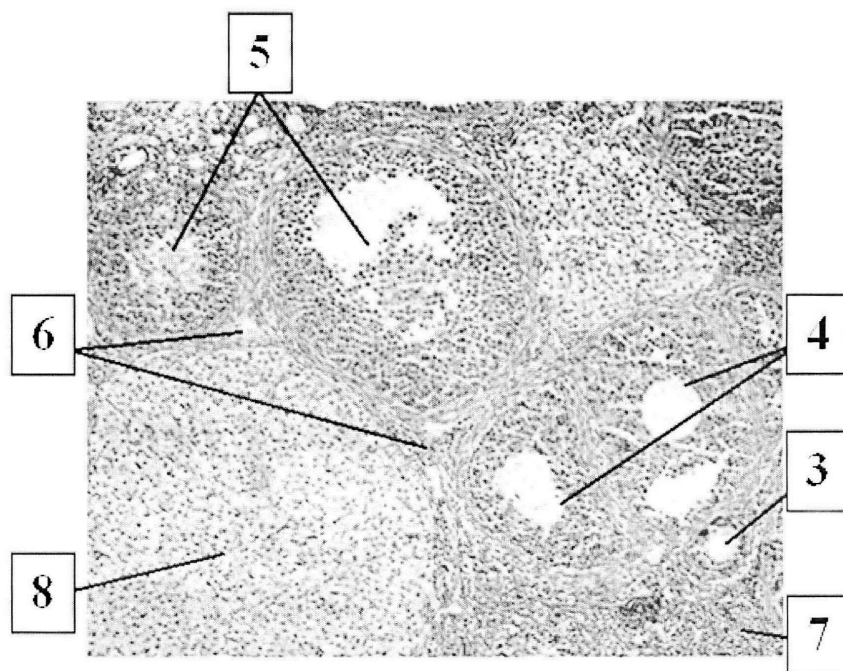
45

1

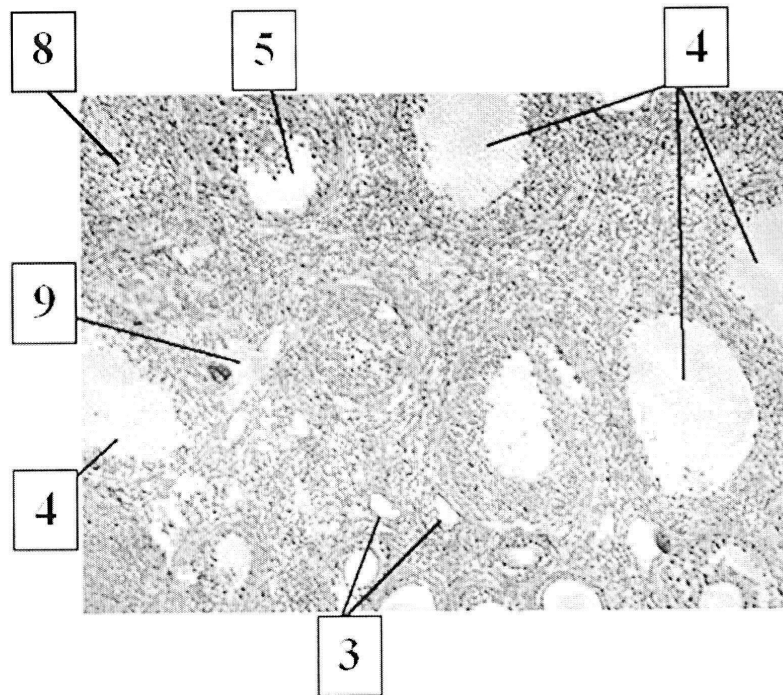


Фиг.1

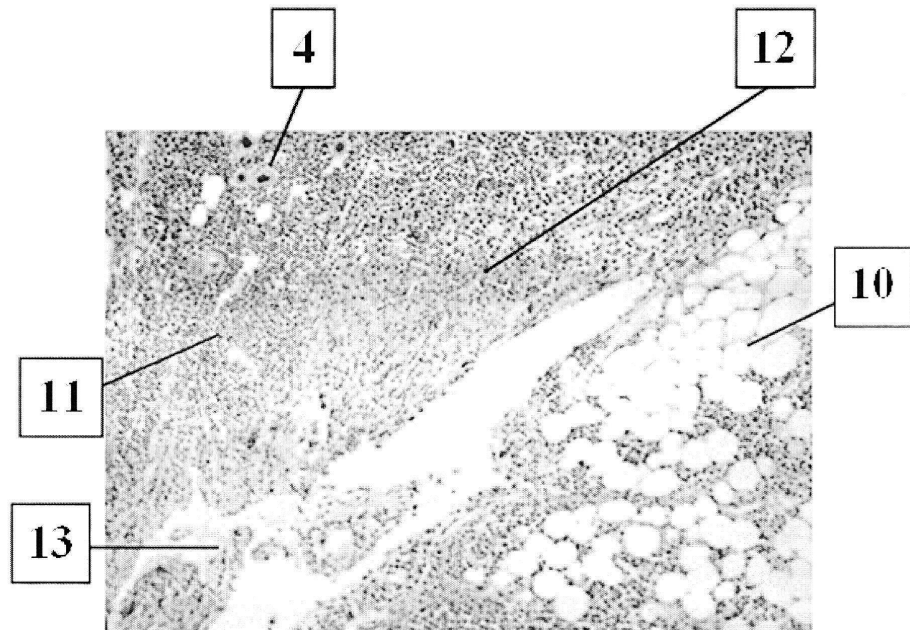
2



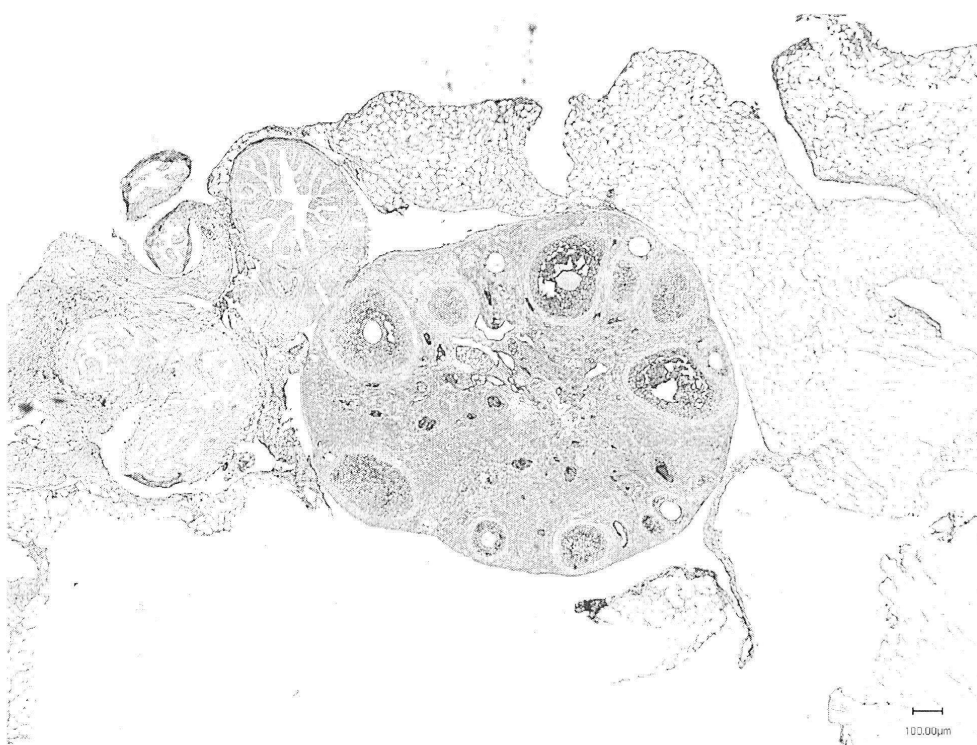
Фиг. 2



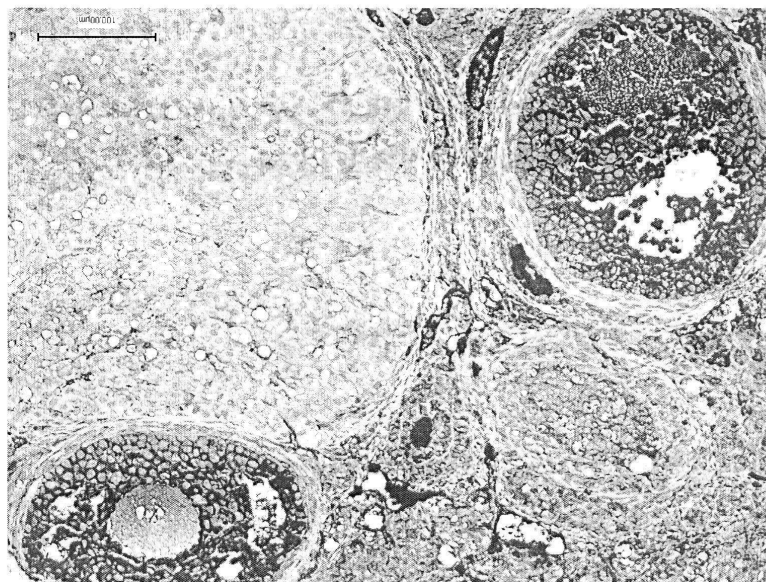
Фиг. 3



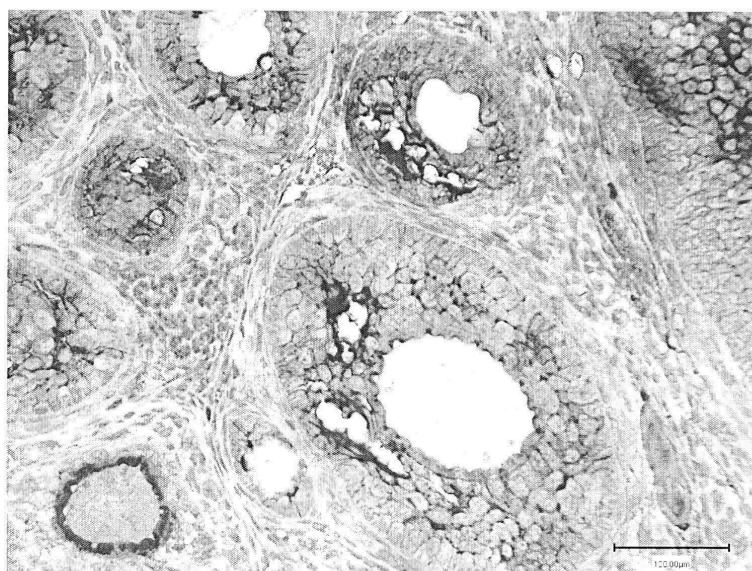
Фиг. 4



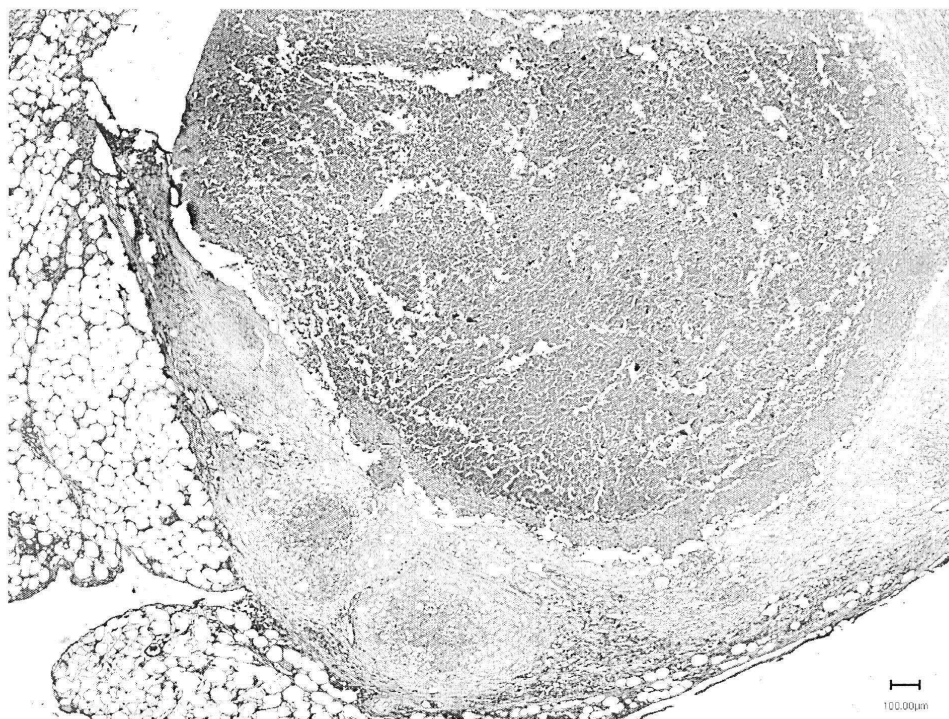
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8