

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201991395** (13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2019.12.30

(22) Дата подачи заявки  
2018.01.26

(51) Int. Cl. *A61K 36/23* (2006.01)  
*A61K 36/28* (2006.01)  
*A61K 9/00* (2006.01)  
*A61P 19/02* (2006.01)

**(54) НОВЫЕ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СУСТАВНЫХ НАРУШЕНИЙ**

(31) 102017000008696

(32) 2017.01.26

(33) IT

(86) PCT/IB2018/050480

(87) WO 2018/138678 2018.08.02

(71) Заявитель:

**АБОКА С.П.А. СОСИЕТА'  
АГРИКОЛА (IT)**

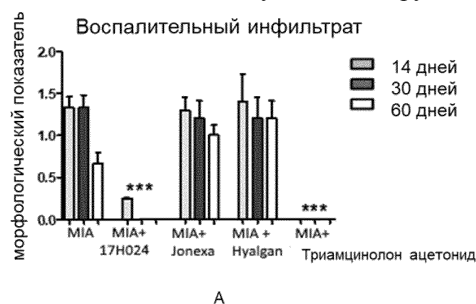
(72) Изобретатель:

**Меркати Валентино, Геральдини  
Карла, Ди Чесаре Маннелли Лоренцо  
(IT)**

(74) Представитель:

**Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,  
Глухарёва А.О. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к новым композициям, подходящим для применения при лечении суставных нарушений (или состояний), способам приготовления указанных композиций и применению указанных композиций в терапевтических способах лечения суставных нарушений.



**A1**

**201991395**

**201991395**

**A1**

## **НОВЫЕ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СУСТАВНЫХ НАРУШЕНИЙ**

### **ОПИСАНИЕ**

Настоящее изобретение относится к новым композициям, подходящим для применения при лечении суставных нарушений, способам приготовления указанных композиций и к применению указанных композиций в терапевтических способах лечения суставных нарушений.

### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Суставной хрящ играет ключевую роль в движении суставов человека и животных. Он обеспечивает гладкую наружную поверхность между соседними костями, обеспечивая движение суставов почти без трения. Синовиальная жидкость внутри суставной полости действует как смазка. В суставах суставной хрящ распределяет сжимающие напряжения на поверхностях суставных пластин сустава, тем самым защищая несущие кости от истирания и износа. Суставной хрящ состоит из хондроцитов, встроенных во внеклеточный матрикс, содержащий протеогликаны, коллаген, гликозаминогликаны и гликопротеины с низкой молекулярной массой (MW). Хондроциты представляют собой хрящевые клетки, встроенные в лакуны внутри хрящевого матрикса. Протеогликаны необходимы для сохранения прочности хрящевой ткани, чтобы она могла противостоять сжатию. Коллаген придает ткани прочность на растяжение и устойчивость к сдвиговым нагрузкам. В здоровом суставе внеклеточный матрикс поддерживается равновесием между синтезом и секрецией данных макромолекул хондроцитами и их последующей деградацией протеолитическими ферментами. Повреждения хряща суставной поверхности могут нарушать данный баланс, так что деградация не будет в достаточной степени компенсироваться способностью хондроцитов синтезировать макромолекулы, необходимые для восстановления хрящевой ткани. Хронический дисбаланс равновесия между синтезом и деградацией макромолекул хрящевого матрикса связан с развитием остеоартрита.

Остеоартрит (ОА) является дегенеративным заболеванием, затрагивающим суставы. В ветеринарной медицине оно также известно как дегенеративное заболевание суставов (Degenerative Joint Disease (DJD)). Остеоартрит представляет собой самую распространенную форму артрита и является результатом прогрессирующей дегенерации хряща, которая сопровождается старением. Как правило, ОА проявляется после травм или хронических поражений суставов, вызванных другими типами артрита, такими как ревматоидный артрит. Кроме того, ОА может возникнуть в результате

чрезмерной нагрузки на конкретный сустав. ОА может быть классифицирован как: первичный, при котором первопричина не очевидна; вторичный, когда с ним связан предрасполагающий фактор, такой как травма, повторяющийся стресс (род занятий, спорт), врожденные аномалии, метаболические заболевания (нарушения) или другое заболевание (нарушение) костей/суставов; и эрозивный, который характеризуется периодами острого воспаления и прогрессирующего разрушения суставов, встречающийся чаще у женщин среднего возраста. ОА чаще встречается в суставах пальца, бедра, колена, позвоночника, большого пальца и основания галлюкса. Клинически, ОА характеризуется болью в суставах, ограничением движений, крепитацией (потрескиванием) и неумолимой прогрессирующей инвалидностью. Он может затрагивать только один из данных суставов или все суставы. Хотя большинство тканей организма способно восстанавливаться после аварии, самовосстановлению хряща препятствует ограниченное кровоснабжение и отсутствие эффективного механизма замены хряща.

Исторически, лечение остеоартрита и поражений суставного хряща ограничивалось симптоматической обезболивающей терапией, снижением суставной нагрузки, физиотерапией и ортопедической хирургией. Большинство из данных способов лечения направлены на облегчение симптомов, а не на лечение основного патологического состояния. В последнее время исследования были сосредоточены на разработке хондропротективных способов. Такие способы предусматривают длительное терапевтическое лечение, направленное на сохранение или стимуляцию формирования хряща. Современное лечение артрита включает препараты первой линии для борьбы с болью и воспалением, классифицируемые как нестероидные противовоспалительные препараты (non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID)), такие как, например, аспирин, ибупрофен и напроксен. Вторичное лечение включает кортикостероиды, которые действуют как антиревматические препараты медленного действия (slow-acting anti-rheumatic drugs (SAARD)) или модифицирующие заболевание антиревматические препараты (disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARD)), например, пеницилламин, циклофосфамид, соли золота, азатиоприн и левамизол при ревматоидном артрите.

Несмотря на то, что NSAID являются одной из основных групп препаратов, используемых при лечении ОА, их побочные эффекты часто считаются неблагоприятными с точки зрения соотношения риск/польза, особенно, у пожилых людей. В зависимости от индивидуальных обстоятельств, NSAID могут вызывать

желудочно-кишечные (ЖКТ) кровотечения, язвы или перфорацию слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, в то время как некоторые из них являются причиной угнетения костного мозга или задержки жидкости и, следовательно, могут способствовать почечной недостаточности. Значимость данных эффектов обусловлена тем, что такое лечение часто носит долгосрочный характер. Кроме того, известно использование лекарственных растений для лечения различных расстройств (или состояний) у млекопитающих.

Другой подход, который используется в лечение остеоартрита и различных форм артроза, представляет собой введение в сустав препаратов, улучшающих скольжение суставных поверхностей. Указанное лечение выполняется инфильтрацией в сустав терапевтического раствора, обычно содержащего гиалуроновую кислоту.

Хотя вышеуказанные лекарства и способы лечения достигли определенной степени успеха в профилактическом лечении остеоартрита, постоянно ищутся новые терапевтические решения, которые могут эффективно уменьшать прогрессирование поражения и дегенерацию хряща у млекопитающего, страдающего от остеоартрита. Следовательно, целью настоящего изобретения является обеспечение способа для эффективного лечения артрита, дегенеративных заболеваний (нарушений) межпозвонковых дисков, ревматоидного артрита и заболеваний хрящей.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что некоторые вещества, в определенных концентрациях, или их смеси, оказывают эффективное терапевтическое воздействие в лечении нарушений (или состояний), влияющих на суставной хрящ у млекопитающих. Фигуры, приложенные к настоящему описанию, и эксперименты, выполненные авторами и описанные ниже, показывают эффективность заявленных веществ и комбинаций.

Следовательно, целью настоящего изобретения является парентеральная композиция, содержащая

экстракт или одну или более фракций *Centella asiatica* и/или экстракт или одну или более фракций *Echinacea purpurea*, и

хотя бы один фармацевтически приемлемый носитель, терапевтическое применение указанной композиции и способы приготовления того же самого.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фигуре 1 показано, на различных панелях, гистологическое состояние крысиных суставов, обработанных моноиодацетатом (monoiodine acetate (MIA)) и затем только одним носителем (переносчиком) (обозначен как только MIA), экстрактом *Centella*, фракция, растворимая в 70%-ном водно-спиртовом растворе (MIA + *Centella* 14G1862), экстрактом *Echinacea purpurea*, фракция, растворимая в от 40 до 50%-ном водно-спиртовом растворе, (MIA + *Echinacea* 13C1608), и бычьей синовиальной жидкостью (MIA + синовиальная жидкость) в период времени 14, 30 и 60 дней.

На панели а изображен количественный морфологический показатель, относящийся к воспалительному инфильтрату (высокий балл соответствует заметному воспалительному инфильтрату), на панели б изображен количественный морфологический показатель, относящийся к синовиальной гиперплазии, на панели с изображен количественный морфологический показатель, относящийся к отложению фибрина, на панели d изображен количественный морфологический показатель, относящийся к синовиальной васкулярности, на панели е изображен количественный морфологический показатель, относящийся к эрозии хряща, на панели f изображен количественный морфологический показатель, относящийся к эрозии кости, и на панели g изображен количественный морфологический показатель, относящийся к уменьшению пространства (щели) между двумя концами сустава (в данном последнем случае высокий показатель соответствует уменьшенной суставной щели). MIA-обработанные животные демонстрируют, на суставном уровне, наличие воспалительного инфильтрата (MIA; панель а) и морфологическое повреждение, выражающееся в развитии синовиальной гиперплазии (MIA; панель б) и увеличении васкулярности (MIA; панель d), достигая максимального уровня на 14-й день и проявляя тенденцию к постепенному снижению в течение нескольких дней. Эрозия хряща и кости (MIA; панели е-f), отложение фибрина (MIA; панель с) и уменьшение суставной щели (MIA; панель g) показывают, вместо этого, зависимое от времени увеличение до 30-го дня. Лечение экстрактом (вышеописанная фракция) из *Centella* и *Echinacea* эффективно противостоит вызванному MIA морфологическому повреждению, сохраняя низкими показатели большинства оцениваемых параметров (панели а-g), тогда как синовиальная жидкость не доказывает свою эффективность в защите MIA-поврежденного сустава (панели а-g).

На фигуре 2 показана общая гистологическая картина: А Контроль; В MIA; D MIA + *Centella* 14G1862; Е MIA + *Echinacea* 13C1608; F MIA + бычья синовиальная жидкость. На изображении, полученном для обработанных животных, можно выделить отложение

фибрина в суставной щели (черные стрелки), эрозию хряща (черные стрелки) и эрозию костей (звездочки). Калибровочная шкала: 100 мкм.

На фигуре 3 показано, на различных панелях, гистологическое состояние крысиных суставов, обработанных моноиодацетатом (MIA), и впоследствии только одним носителем (обозначен как только MIA), экстрактом *Centella*, фракция, растворимая в EtOH 70% (MIA + *Centella* 14G1862), экстрактом *Centella*, нерастворимая фракция, солюбилизированная в EtOH 13% (MIA + ABO-AR-2016-391), экстрактом *Centella*, фильтрованная фракция -391, пермеат (MIA + ABO-AR-2016-392), экстрактом *Centella*, фильтрованная фракция -391, ретентат (MIA + ABO-AR-2016-393) и ацетонидом триамцинолона (MIA + Triam) через 14, 30 и 60 дней.

На панели а представлен количественный морфологический показатель, относящийся к воспалительному инфильтрату (высокий балл соответствует заметному воспалительному инфильтрату), на панели b представлен количественный морфологический показатель, относящийся к синовиальной гиперплазии, на панели c представлен количественный морфологический показатель, относящийся к отложению фибрина, на панели d представлен количественный морфологический показатель, относящийся к синовиальной васкуляризации, на панели e представлен количественный морфологический показатель, относящийся к эрозии хряща, на панели f представлен количественный морфологический показатель, относящийся к эрозии кости, и на панели g представлен количественный морфологический показатель, относящийся к уменьшению пространства (щели) между двумя концами сустава (в данном последнем случае высокий показатель соответствует уменьшенной суставной щели). MIA-обработанные животные демонстрируют, на суставном уровне, наличие воспалительного инфильтрата (MIA; панель a) и морфологическое повреждение, выражающееся в развитии синовиальной гиперплазии (MIA; панель b) и увеличении васкуляризации (MIA; панель d), достигая максимального уровня на 14-й день и проявляя тенденцию к постепенному снижению в течение нескольких дней. Эрозия хряща и кости (MIA; панели e-f), отложение фибрина (MIA; панель c) и уменьшение суставной щели (MIA; панель g) показывают, вместо этого, зависящее от времени увеличение вплоть до 30-го дня (MIA; панель c,g) или вплоть до 60-го дня (MIA; панели e-f). Из фигуры видно, как фракции из *Centella* 14G1862, ABO-AR-2016-391 и ABO-AR-2016-392 могут защитить сустав от повреждения, вызванного MIA, по многим оцененным параметрам. Вместо этого, фракция ABO-AR-2016-393 не является особенно эффективной (MIA +

ABO-AR-2016-392; панели a-g), в то время как препарат триамцинолон только частично уменьшает повреждающее действие MIA (MIA + Триам; панели a,b,c,e,f).

На фигуре 4 показана общая гистологическая картина: A: MIA; B: MIA + *Centella* 14G1862; C: MIA + ABO-AR-2016-391; D: MIA + ABO-AR-2016-392; E: MIA + ABO-AR-2016-393; F: MIA + триамцинолон. На изображениях обработанных животных можно выделить отложение фибрина в суставной щели (звездочка), эрозию хряща (черные стрелки). Калибровочная шкала: 100 мкм.

На фигурах от 5 до 13 графически изображены данные, изображенные в таблицах от 1 до 9. На фигурах и в тексте MIX (совместный экстракт) серия 17H0246 соответствует смеси экстракта *Echinacea*, фракция, растворимая в водно-спиртовом растворе в соответствии с настоящим описанием, лиофилизированная, и экстракта *Centella asiatica*, фракция, растворимая в водно-спиртовом растворе в соответствии с настоящим описанием, которую повторно суспендировали с NaCl в воде, инкубировали при от 40 до 55°C в течение от 4 до 8 часов, фильтровали и лиофилизировали.

Фигуры от 14 до 17: смесь по изобретению был проанализирована в отдельных экспериментах в отношении отдельных фракций *Centella* и *Echinacea*.

Данные поведенческих тестов были поэтому выражены как % улучшения по сравнению с их положительным контролем (MIA-обработанное животное + носитель), чтобы получить числовое значение, свидетельствующее об улучшении состояния животных после обработки. Таким образом, можно сравнить эффект различных обработок: указанное значение в % позволяет количественно оценить повышенную или пониженную эффективность образца по сравнению с другим образцом. На фигурах от 14 до 17 графически представлены результаты указанных сравнений.

На фигуре 18 показано, на различных панелях, гистологическое состояние крысиных суставов, обработанных моноиодацетатом (MIA), и затем только одним носителем (обозначен как только MIA), MIX (совместный экстракт) *Centella+Echinacea* серия 17H0246, Hyalgan, Joneха и ацетонидом триамцинолона через 14, 30 и 60 дней.

На панели a представлен количественный морфологический показатель, относящийся к воспалительному инфильтрату (высокий балл соответствует заметному воспалительному инфильтрату), на панели b представлен количественный морфологический показатель, относящийся к синовиальной гиперплазии, на панели c представлен количественный морфологический показатель, относящийся к отложению фибрина, на панели d представлен количественный морфологический показатель, относящийся к синовиальной васкуляризации, на панели e представлен количественный

морфологический показатель, относящийся к эрозии хряща, на панели f представлен количественный морфологический показатель, относящийся к эрозии кости, и на панели g представлен количественный морфологический показатель, относящийся к уменьшению пространства (щели) между двумя концами сустава (в данном последнем случае высокий показатель соответствует уменьшенной суставной щели). На фигуре 19 показана общая гистологическая картина: изображения, типичные для гистологической картины, обнаруживаемой через 30 дней: A: контроль; B: MIA; C: MIA + MIX (совместный экстракт) *Centella+Echinacea* лот 17H0246; D: MIA + Jonexa; E: MIA + Hyalgan; F: MIA + триамцинолона ацетонид. На изображениях обработанных животных можно выделить отложение фибрина в суставной щели (черные стрелки), эрозию хряща покрытия и субхондральной кости (звездочки). Калибровочная шкала: 100 мкм.

Термин совместный экстракт серия 17H0246 в подписи к фигурам и в таблицах относится к тому факту, что экстракт *Centella* и экстракт из *Echinacea* смешаны и подвергаются дополнительной стадии экстракции в водном растворе перед использованием в конечной композиции, как описано ниже в настоящем описании.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к парентеральной композиции, содержащей экстракт *Centella asiatica*, экстракт *Echinacea purpurea* и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

В целях настоящего изобретения «парентеральная композиция» означает композицию, которая может быть введена в тело прокалыванием покрывающих тканей иглой, так чтобы можно было проникнуть в различные полости, органы или ткани. В целях настоящего изобретения композиция, в частности, будет представлять собой внутрисуставную композицию, то есть композицию, подходящую для инъекции непосредственно в сустав.

В целях настоящего изобретения термин «экстракт» означает препарат в жидком, твердом или мягком виде из частей свежих или высушенных растений, который можно получить с помощью подходящих способов экстракции, например, с соответствующими растворителями и/или путем замачивания, перколяции, фильтрования, а также другими подходящими способами.

Как известно, способы экстракции из растительных лекарственных препаратов могут содержать многочисленные стадии, и, следовательно, в конце или во время проведения экстракции могут быть получены многочисленные различные фракции, таким образом, термин «экстракт» в соответствии с изобретением, также предназначен для обозначения отдельных фракций, которые можно получить во время проведения экстракции, или их смесей. В любом пункте настоящего описания и формулы изобретения, следовательно, термин экстракт может быть заменен термином фракция экстракта или смесь фракций экстракта.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения, экстракт *Centella asiatica* может быть, например, получен из измельченных листьев *Centella*, которые подвергаются пропитыванию в спирте (от 65% до 75%) на уровне около 65%, около 70%, около 75% (неограничивающий пример: этанол: вода 70:30 об./об.). В одном служащем примером варианте осуществления экстракт из *Centella* получают в соотношении 1:8 между *Centella* и 70%-ным спиртом при подходящей температуре экстракции, составляющей от 40 до 60°C. Экстракция обычно продолжается в течение от 6 до 8 часов, затем отработанный остаток отделяют от раствора декантированием и последующим фильтрованием (например, на бумажном фильтре).

В одном варианте осуществления экстракт (более точно, полученная водно-спиртовая фракция) подвергается концентрированию и сушке путем лиофилизации, в соответствии с методиками, известными специалисту в данной области техники.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, следовательно, термин «экстракт» соответствует фракции, растворимой в водно-спиртовом растворе как описано выше на примере.

В некоторых примерах, изображенных в настоящем описании, представляющих варианты осуществления настоящего изобретения, экстракт *Centella*, обозначенный в фигурах и таблицах как *Centella* 14G1862, представляет собой фракцию надземных частей растения, растворимых в водно-спиртовом растворе, полученную, как сообщалось выше.

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения, фракции *Centella asiatica*, растворимые в водно-спиртовом растворе, также могут представлять собой фракции, полученные подверганием интересующей части растения первичной экстракции подходящим спиртом с концентрацией около 96% (например, этанол: вода 96:4 об./об.) в соотношении между лекарственным средством и 96%-ным спиртом,

составляющим около 1:8, при подходящей температуре в интервале от 30 до 50°C в течение периода времени от 6 до 8 часов.

После указанного периода времени надосадочную жидкость удаляют, и остаток лекарственного средства подвергается дальнейшей экстракции подходящим спиртом с концентрацией около 13% (например, этанол: вода 13:87 об./об.) в соотношении между лекарственным средством и 13%-ным спиртом, равным 1:8, при подходящей температуре в интервале от 30 до 50°C в течение периода времени от 6 до 8 часов. После этого твердый остаток отбрасывают декантированием и фильтрованием на бумаге, в результате чего собирают 13%-ную спиртовую фракцию.

В одном варианте осуществления экстракт представлен указанной 13%-ной спиртовой фракцией, которая подвергается испарению спирта и впоследствии фильтрованию на бумаге, с получением прозрачного водного концентрата, который высушивается лиофилизацией, в соответствии со способом, известным специалисту в данной области техники (например, фракция ABO-AR-2016-391 в соответствии с настоящим описанием). Кроме того, часть водного концентрата, приготовленного, как указано выше, может быть подвергнута фильтрованию через мембрану с определенным молекулярным размером пор, чтобы получить фракцию пермеата и фракцию ретентата. В одном варианте осуществления указанные фракции подвергаются концентрированию и сушке путем лиофилизации, в соответствии с методиками, известными специалисту в данной области техники. Примерами фракций согласно данному варианту осуществления являются фракция пермеата ABO-AR-2016-392 и фракция ретентата ABO-AR-2016-393, как сообщается в настоящем описании.

Согласно настоящему описанию, могут быть использованы следующие мембраны: мембрана для фильтрования с определенным молекулярным размером пор, которая характеризуется MWCO (molecular weight cutoff (отсечение по молекулярной массе)) от 150 до 300 Да, или альтернативно 700 Да, или альтернативно 1000 Да, или альтернативно 2500 Да, или альтернативно 5000 Да, или альтернативно 10000 Да, или альтернативно 20000 Да, или альтернативно 50000 Да. Указанные мембраны могут быть спиралевидными, изготовленными из полиамидного, полисульфонового, полиэфирсульфонового материала или керамики.

В одном варианте осуществления изобретения экстракт *Echinacea purpurea* может быть получен экстракцией в водно-спиртовом растворе из измельченных листьев надземных частей *Echinacea*, например, в подходящем водно-спиртовом растворе с концентрацией

спирта от 40 до 55%, например, около 40%, около 45%, около 50%, около 55% (например, неограничивающим образом, этанол: вода 45:55 об./об.).

В одном служащем примером варианте осуществления, не намереваясь каким-либо образом ограничивать настоящее изобретение, экстракт *Echinacea* получают с соотношением от 1: 8 до 1:10 между *Echinacea* и 45%-ным этанолом, при подходящей температуре экстракции, составляющей от 40 до 60°C. Обычно экстракция может продолжаться в течение от 6 до 8 часов, затем отработанный остаток отделяют от раствора декантированием и последующим фильтрованием (например, на бумажном фильтре). В одном варианте осуществления полученная водно-спиртовая фракция подвергается концентрированию и сушке лиофилизацией, в соответствии с методиками, известными специалисту в данной области.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, таким образом, термин «экстракт» соответствует фракции, растворимой в водно-спиртовом растворе, как описано в примере выше.

В примерах, изображенных в настоящем описании, экстракт *Echinacea*, обозначенный в фигурах и таблицах как *Echinacea* 13C1608, представляет собой фракцию, растворимую в водно-спиртовой фракции, полученной из надземных частей растения (листьев, цветов), приготовленной, как сказано выше.

То, что было изложено выше в отношении экстракта, означающего растворимую в водно-спиртовом растворе фракцию из *Echinacea*, применяется, с учетом соответствующих изменений, к растворимой в водно-спиртовом растворе фракции из *Centella* по изобретению.

В одном из вариантов осуществления изобретения, указанные выше компоненты находятся в лиофилизированной форме и повторно растворяются, с добавлением NaCl или другой подходящей соли, в подходящей концентрации, в воде; полученная смесь нагревается до температуры в интервале от 30 до 70°C, предпочтительно от 40 до 50°C, в течение определенного периода времени, составляющем от 4 до 8 часов. Смесь, обработанная таким образом, декантируется и/или отфильтровывается, как было уже указано выше, и надосадочная жидкость или фильтрат (в зависимости от того, была ли проведена декантация или фильтрация) затем лиофилизуется и солубилизуется, необязательно непосредственно перед использованием, в фармацевтически приемлемом носителе.

В качестве примера, отдельные экстракты (также означают одну или более фракций экстракта, как уже упоминалось выше) из *Centella* и *Echinacea*, как описано выше,

смешаны в соотношении от 7:3 до 9,5: 0,5 частей по массе указанных экстрактов в лиофилизированной форме.

В одном предпочтительном варианте осуществления используется соотношение, составляющее около 8:2 или 9:1, например, следовательно, добавляется 9 массовых частей лиофилизированного экстракта *Centella asiatica* и 1 массовая часть лиофилизированного экстракта *Echinacea*, NaCl (сколько необходимо для получения 0,9% об./об. раствора), и все ресуспендируется в воде и обрабатывается, как указано выше.

Смесь, которая подвергается инкубации при температуре в интервале от 30 до 70°C, предпочтительно от 40 до 50°C, в течение определенного периода времени, составляющем от 4 до 8 часов, поэтому может представлять собой смесь, содержащую от 1 до 3% по массе экстракта, лиофилизированного, как описано выше, из *Centella asiatica*,

от 0,001 до 0,5% по массе лиофилизированного, как описано выше, экстракта из *Echinacea purpurea*,

от 0,5 до 9% NaCl,

воду (предпочтительно обессоленную или деионизированную) до достижения конечного объема 100 мл.

Поэтому после фильтрования и лиофилизации получается экстракт, или, точнее, совместный экстракт, который может быть смешан с одним или несколькими подходящими фармацевтически приемлемыми носителями для приготовления композиции по настоящему изобретению.

Такой совместный экстракт имеет вид порошка, хорошо растворимого в воде.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения экстракт *Centella asiatica* в лиофилизированной форме, полученный экстракцией в 70%-ном водно-спиртовом растворе, как описано выше, и экстракт *Centella asiatica* в лиофилизированной форме, полученный экстракцией в 45%-ном водно-спиртовом растворе, как описано выше, смешаны в соотношении *Centella:Echinacea*, составляющем около 9:1, и суспендируются в воде, в которой растворен NaCl в концентрации в интервале от 0,8 до 4%, предпочтительно от 1,5 до 2,5%, например 1,5%, 1,6%, 1,7%, 1,8%, 1,9%, 2,0%, 2,1%, 2,2%, 2,3%, 2,4% или 2,5%.

Указанная смесь затем инкубируется при температуре от 30 до 70°C, предпочтительно от 40 до 50°C, в течение определенного периода времени от 4 до 8 часов, а затем фильтруется для удаления взвешенных частиц (нерастворенные частицы), и фильтрат,

полученный таким образом, лиофилизируется, чтобы получить совместный экстракт в виде порошка, легко растворимого в воде.

Указанный совместный экстракт затем растворяют в одном или нескольких фармацевтически приемлемых носителях и для того, чтобы приготовить парентеральную композицию по настоящему изобретению.

Пример такого совместного экстракта представляет собой тот, который обозначен в настоящем описании и на фигурах как серия 17H0246.

Термин терапевтически активное начало или терапевтический активный компонент означает тот компонент или тот набор компонентов, который ответственен за улучшение патологии или патологического состояния, которое лечат.

В соответствии с другим вариантом осуществления, в парентеральной композиции по изобретению терапевтически активное начало содержится в экстракте (или одной или более фракции экстракта) из *Centella asiatica*, как определено выше, в сочетании с экстрактом (или одной или более фракцией экстракта) из *Echinacea purpurea*, как определено выше.

Композиция по изобретению также может быть определена на основе содержания в ней определенных классов веществ; ниже обеспечиваются массовые концентрации некоторых веществ относительно массы композиции в лиофилизированной форме.

В одном предпочтительном варианте осуществления парентеральная композиция по изобретению, как определено выше, также характеризуется тем, что данная указанная композиция, в лиофилизированной форме, включает:

Кроме того, парентеральную композицию по изобретению также можно охарактеризовать тем, что она включает, в лиофилизированной форме:

суммарные фенолы: от 0,08 до 2% мас./мас., предпочтительно от 0,1 до 0,7%.

Опять же, парентеральную композицию по изобретению также можно охарактеризовать тем, что она включает, в лиофилизированной форме:

полисахариды с молекулярной массой  $MW > 20000$  Дальтон: от 1 до 2% мас./мас., предпочтительно от 1,3 до 1,8%.

И, наконец, парентеральную композицию по изобретению также можно охарактеризовать тем, что она включает, в лиофилизированной форме:

суммарные танины: от 0,002 до 1% мас./мас.

Следовательно, задачей изобретения является парентеральная композиция, включающая, будучи в лиофилизированной форме, от 0,08 до 2% мас./мас. суммарных фенолов, от 0,002 до 1% мас./мас. общего количества танинов, от 1 до 2% мас./мас.

полисахаридов с молекулярной массой выше 20000 Да, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, причем указанные фенолы, танины; полисахариды, получены из *Centella asiatica* и *Echinacea purpurea*.

Для целей настоящего описания, «полученный из» означает непосредственно полученный, следовательно, «экстракты (или одна или более фракций) из» или «содержится в экстрактах (или одной или более фракций) из».

В соответствии с настоящим описанием, «фармацевтически приемлемый носитель» означает носитель, который обычно используется в фармацевтике для приготовления инъекционных растворов.

В любом варианте осуществления изобретения используемые экстракты могут представлять собой указанные выше экстракты или переработки того же (например, совместные экстракты, как описано выше).

В одном варианте осуществления изобретения композиция по изобретению может состоять из экстракта (или одной или более фракций экстракта, как, например, любой из описанных здесь) из *Centella asiatica*, экстракта (или одной или более фракций экстракта такой, как, например, любая из описанных здесь) из *Echinacea purpurea*, и по меньшей мере одного фармацевтически приемлемого носителя, причем вышеуказанные экстракты находятся в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанным выше. В формулировке композиции по изобретению терапевтически активное начало, как определено в настоящем документе, может быть обеспечено в лиофилизированной форме, с отдельно обеспеченным носителем, для ресуспендирования перед применением, или может быть обеспечено уже растворенным в подходящем носителе.

Все применения, сообщенные в настоящем описании, также применяются к варианту осуществления, определенному по классам веществ, определенных выше.

В формулировке композиции в любом из вариантов осуществления согласно настоящему описанию специалист в данной области техники может удобно выбрать носители и/или вспомогательные вещества среди таковых, общеизвестных в уровне техники.

В рамках настоящего описания и при выполнении настоящего изобретения термин «фармацевтически приемлемые носители» понимается в широком смысле и включает в себя растворители, эмульгаторы, буферные средства, корректоры pH, антиоксиданты, консерванты, осмотические средства.

Помимо воды, для инъекционных препаратов можно использовать буферы, выбранные, например, из лимонной, фосфорной и уксусной кислоты и их натриевых солей;

корректоры pH, такие как соляная кислота и гидроксид натрия, изотонические средства, такие как хлорид натрия, сахара, такие как, например, глюкоза, маннит, декстроза; и, в определенном случае, антиоксиданты, которые могут быть выбраны, например, из бисульфита натрия, метабисульфита натрия или натриевых солей этилендиаминтетрауксусной кислоты.

Можно прибегнуть к использованию консервантов, таких как бензалкония хлорид, бензетония хлорид, метил-п-гидроксibenзоат, бензиловый спирт.

Могут быть использованы эмульгаторы, такие как, например, лецитины или этоксилированные производные жирных кислот.

Для целей иллюстрации, не подразумевается как ограничение изобретения, в реализации композиции согласно настоящему описанию, растворители можно выбрать из одного или более из: воды, поливинилпирролидона, забуференных и незабуференных изотонических растворов; эмульгаторы можно выбрать из лецитинов, этоксилированных производных жирных кислот; буферные средства можно выбрать из лимонной кислоты и ее натриевых солей, фосфорной кислоты и ее натриевых солей, уксусной кислоты и ее натриевых солей; корректоры pH можно выбрать из соляной кислоты и гидроксида натрия; антиоксиданты можно выбрать из бисульфита натрия, метабисульфита натрия, этилендиаминтетрауксусной кислоты и ее натриевых солей; консерванты можно выбрать из бензилового спирта, метил-п-гидроксibenзоата, бензалкония хлорида, бензетония хлорида, и осмотические средства можно выбрать из хлорида натрия, сахаров, маннита, декстрозы, глюкозы.

Способы получения данных стерильных препаратов представляют собой те, которые обычно используются в уровне техники. После приготовления раствора экстрактов и вспомогательных веществ, прибегая к использованию температуры для ускорения солюбилизации, раствор, полученный таким образом, можно стерилизовать стерилизующей фильтрацией или прибегнуть к помощи паровой стерилизации. В некоторых случаях, можно прибегнуть к использованию гамма-лучей для конечной стерилизации.

Как описано в настоящем документе и как продемонстрировано примерами, парентеральная композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления, изложенным в настоящем описании и в формуле изобретения, подходит для применения как лекарственное средство.

В частности, парентеральная композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления, изложенным в настоящем описании и в формуле изобретения, особенно

подходит для применения в лечении расстройств, которые влияют на суставной хрящ у млекопитающих.

В иллюстративной и неограничивающей форме, указанные расстройства, влияющие на суставной хрящ, выбраны из артрита, остеоартрита, воспаления суставов, повреждения хряща, вызванного травмой, дегенерации спинальных дисков, ревматоидного артрита.

Парентеральная композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления, изложенным в настоящем описании и в формуле изобретения, может применяться для лечения млекопитающих в целом, и, следовательно, она будет представлять собой ветеринарную композицию, или может применяться для лечения пациентов-людей, и поэтому она будет представлять собой фармацевтическую композицию или медицинское устройство в соответствии с действующим законодательством.

Целью настоящего изобретения также является терапевтический способ для лечения расстройств, влияющих на суставной хрящ как описано выше, в котором композицию вводят пациенту инфильтрацией/инъекцией в представляющую интерес зону, и, следовательно, инфильтрацией/инъекцией в сустав. Пациентом, который, как уже определено выше, проявляет расстройства, влияющие на суставной хрящ, может быть человек или даже животное, например млекопитающее.

Любой вариант осуществления, описанный выше, относится к терапевтическому лечению по настоящему изобретению.

Целью настоящего изобретения является также способ приготовления композиции по любому из описанных вариантов осуществления, в котором терапевтически активные вещества, как определено выше, в сухом виде, предпочтительно в лиофилизированной форме, смешивают и подвергают последующей стадии экстракции с NaCl и водой, затем декантируют или фильтруют, лиофилизируют и ресуспендируют в носителе, как определено выше.

Любой способ, общеизвестный специалисту в данной области техники, может быть использован для приготовления композиции в соответствии с изобретением. Согласно варианту осуществления, который следует понимать как просто служащий примером и неограничивающий, способ приготовления композиции по изобретению может быть осуществлен следующим образом.

1. Экстракты, полученные из водно-спиртовой экстракции, лиофилизированные, растворяют в воде с от 0,8 до 4% NaCl, нагревая смесь при температуре от 30 до 80°C, предпочтительно от 30 до 70°C, от 40 до 50°C в течение периода времени в интервале от 4 до 8 часов для ускорения растворения экстракта,

2. Смеси, полученные на предыдущей стадии, после охлаждения, фильтруют, чтобы устранить любые нерастворенные частицы экстракта, а затем сушат, предпочтительно, путем лиофилизации, и повторно суспендируют в подходящем фармацевтически приемлемом носителе.
3. На данной стадии, при необходимости, могут быть добавлены маслянистые вещества и эмульгаторы, если должны быть получены поверхностно-активированные системы.
4. К смеси экстрактов (или фракций экстрактов, как, например, любой из описанных в настоящем документе) добавляются другие вспомогательные вещества, растворимые в воде, такие как буферы, изотонические средства.
5. Измеряют и надлежащим образом исправляют в случае необходимости pH приготовленного раствора.
6. Раствор, полученный таким образом, может быть стерилизован стерилизующей фильтрацией или влажным теплом (паром) в автоклаве.

Следовательно, целью изобретения также является способ получения парентеральной композиции, как определено выше и как определено в формуле изобретения, в котором

a) листья *Centella asiatica* подвергаются одной или более стадиям экстракции с водно-спиртовыми смесями, и экстракт (или фракцию(фракции)/экстракта, такую как, например, любая из описанных в настоящем документе) полученный таким образом, подвергается лиофилизации;

b) надземные части *Echinacea purpurea* подвергаются одной или более стадиям экстракции с водно-спиртовыми смесями, и экстракт (или фракцию(фракции)/экстракта, такую как, например, любая из описанных в настоящем документе), полученный таким образом, подвергается лиофилизации;

c) лиофилизированные экстракты, полученные в a) и b), в любом порядке смешаны в соотношении экстракт (или фракция(фракции)/экстракта, такая как, например, любая из описанных в настоящем документе) из *Centella asiatica*: экстракт (или фракция(фракции)/экстракта, такая как, например, любая из описанных в настоящем документе) из *Echinacea purpurea*, составляющем от 7:3 до 0,5:9,5;

d) экстракты (или фракции экстракта, такие как, например, любая из описанных в настоящем документе), смешанные таким образом, ресуспендируются в воде с добавлением от 0,8 до 4% хлорида натрия;

е) смесь, полученная таким образом, доводится до температуры в интервале от 30 до 70°C в течение периода времени, составляющем от 4 до 8 часов, а затем подвергается фильтрованию или декантации;

е) фильтрат или супернатант, полученный в е), лиофилизируется;

г) лиофилизат, полученный на стадии f), ресуспендируется в одном или нескольких фармацевтически приемлемых носителях.

В соответствии с изобретением, указанный экстракт на стадии а) может представлять собой часть экстракта, растворимую в водно-спиртовом растворе, где концентрация спирта составляет от 65% до 75% об./об., фракцию экстракта, не растворимую в EtOH в концентрации от 90 до 96% об./об. и растворимую в EtOH в концентрации от 10 до 20% об./об., или их смесь, как описано выше.

Кроме того, указанный экстракт на стадии b) может представлять собой фракцию, растворимую в водно-спиртовом растворе, где концентрация указанного спирта составляет от 40 до 50% об./об.

Целью изобретения также является композиция, получаемая описанным выше способом, для всех применений и во всех формах, обеспеченных в настоящем описании для парентеральной композиции по изобретению.

Отдельные экстракты (или фракции, подобные, например, любой из описанных в настоящем документе) на стадиях а) и b) могут быть получены в соответствии с любым из вариантов осуществления, изображенных в качестве примеров в настоящем описании, и любым другим подходящим обычным способом, известным специалисту в данной области техники.

Способ, как описано выше, позволяет приготовить парентеральную композицию, содержащую от 0,08 до 2,0% мас./мас. суммарных фенолов, от 0,002 до 1 мас./мас. суммарных танинов, от 1% до 2% мас./мас. полисахаридов с молекулярной массой выше 20000 Да; и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, причем указанные фенолы, танины, полисахариды получены из *Centella asiatica* и *Echinacea purpurea*, согласно настоящему описанию.

Иллюстративные примеры некоторых вариантов осуществления данного изобретения следуют.

Указанные примеры никоим образом не следует понимать как ограничение вариантов осуществления данного изобретения, а имея целью только проиллюстрировать возможные композиции, осуществимые согласно указаниям, приведенным в настоящем документе, и имеющие описанные терапевтические признаки.

## ПРИМЕРЫ КОМПОЗИЦИЙ:

## Композиция 1

Лиофилизированный совместный экстракт *Centella-Echinacea* (9:1) - NaCl\* 10 мг

Вода для препаратов для инъекций (for injectable preparations (f.i.p.)) в количестве, достаточном для получения (*q.s.*) 1 мл

## Композиция 2

Лиофилизированный совместный экстракт *Centella-Echinacea* (8:2) - NaCl\* 10 мг

Вода f.i.p. *q.s.* до 1 мл

## Композиция 3

Лиофилизированный совместный экстракт *Centella-Echinacea* (9: 1) -NaCl\* 30 мг

Тетранатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты 1 мг

Гидроксид натрия 0,1 мг

Бензалконий хлорид 0,2 мг

## Композиция 4

Лиофилизированный совместный экстракт *Centella-Echinacea* (8: 2) -NaCl\* 30 мг

Тетранатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты 1 мг

Гидроксид натрия 0,1 мг

Бензалконий хлорид 0,2 мг

## Композиция 5

Лиофилизированный совместный экстракт *Centella-Echinacea* (9: 1) -NaCl\* 50 мг

Уксусная кислота 1 мг

Ацетат натрия 2 мг

Вода f.i.p. *q.s.* до 1 мл

## Композиция 6

Лиофилизированный совместный экстракт *Centella-Echinacea* (8: 2) -NaCl\* 50 мг

Уксусная кислота 1 мг

Ацетат натрия 2 мг

Вода f.i.p. *q.s.* до 1 мл

## Композиция 7

Лиофилизированный совместный экстракт *Centella-Echinacea* (9: 1) - NaCl\* 7 мг

Одноосновный фосфат натрия 1 мг

Двухосновный фосфат натрия 2 мг

Вода f.i.p. q.s. до 1 мл

## Композиция 8

Лиофилизированный совместный экстракт *Centella-Echinacea* (8: 2) -NaCl\* 7 мг

Одноосновный фосфат натрия 1 мг

Двухосновный фосфат натрия 2 мг

Вода f.i.p. q.s. до 1 мл

## Композиция 9

Лиофилизированный совместный экстракт *Centella-Echinacea* (9: 1) -NaCl\* 70 мг

Бензалконий хлорид 1 мг

Вода f.i.p. q.s. до 1 мл

## Композиция 10

Лиофилизированный совместный экстракт *Centella-Echinacea* (8: 2) -NaCl\* 70 мг

Бензалконий хлорид 1 мг

Вода f.i.p. q.s. до 1 мл

\*NaCl q.s. для приготовления изотонического раствора.

## Композиция 11

Лиофилизированный экстракт *Centella* 1 мг

Лиофилизированный экстракт *Echinacea* 0,1 мг

NaCl 0,009 мг

Вода f.i.p. q.s. до 1 мл

## Композиция 12

Лиофилизированный экстракт *Centella* 25 мг

Лиофилизированный экстракт *Echinacea* 3 мг

NaCl 0,018 мг

Вода f.i.p. q.s. до 1 мл

### Композиция 13

Лиофилизированный экстракт *Centella* 50 мг

Лиофилизированный экстракт *Echinacea* 7 мг

NaCl 0,009 мг

Вода f.i.p. q.s. до 1 мл

Совместный экстракт в соответствии с изображенными выше примерами получают из экстракта *Centella asiatica* в лиофилизированной форме, полученного экстракцией в 70%-ном водно-спиртовом растворе, как описано выше, и экстракта *Centella asiatica* в лиофилизированной форме, полученного экстракцией в 45%-ном водно-спиртовом растворе, как описано выше, которые смешивают в соотношении *Centella: Echinacea*, составляющем около 8:2 или 9:1, и суспендируют в воде, причем NaCl растворяют в концентрации, составляющей от 0,8 до 4%, предпочтительно от 1,5 до 2,5%, например, 1,5%, 1,6%, 1,7%, 1,8%, 1,9%, 2,0%, 2,1%, 2,2%, 2,3%, 2,4% или 2,5%.

Указанную смесь затем инкубируют при температуре в интервале от 30 до 70°C, предпочтительно от 40 до 50°C, в течение периода времени, составляющем от 4 до 8 часов, а затем фильтруют, чтобы удалить взвешенные частицы (нерастворенные частицы), и таким образом полученный фильтрат лиофилизируют, чтобы получить совместный экстракт в виде порошка, легко растворимого в воде.

Указанный совместный экстракт затем растворяют в одном или более фармацевтический приемлемых носителях и для того, чтобы приготовить парентеральную композицию по настоящему изобретению.

Экстракт *Centella* согласно изображенным выше примерам может представлять собой экстракт, полученный водно-спиртовой экстракцией. Экстракт может быть, например, приготовлен из измельченных листьев *Centella*, которые подвергаются вымачиванию в спирте (от 65% до 75%) на уровне около 65%, около 70%, около 75% (неограничивающий пример: этанол:вода 70:30 об./об.). В одном служащем примером варианте осуществления экстракт *Centella* может быть получен с 1: 8 соотношением *Centella* и 70%-ного спирта, при подходящей температуре экстракции, составляющей от 40 до 60°C. Обычно экстракция может продолжаться в течение от 6 до 8 часов, затем

отработанный остаток отделяется от раствора декантацией и последующей фильтрацией. Затем фильтрат лиофилизуется и готов к применению.

Экстракт из *Echinacea purpurea* согласно изображенным выше примерам может представлять собой экстракт, полученный водно-спиртовой экстракцией. Экстракт может быть, например, получен экстракцией в водно-спиртовом растворе из измельченных надземных частей *Echinacea*, например, в подходящем водно-спиртовом растворе с концентрацией спирта, составляющей от 40 до 55%, например, на уровне около 40%, около 45%, около 50%, около 55% (например, без ограничения, этанол: вода 45:55 об./об.).

В одном служащем примером варианте осуществления, он может быть получен в соотношении 1:10 *Echinacea* и 45%-ного этанола, при подходящей температуре экстракции, составляющей от 40 до 60°C. Обычно экстракция может продолжаться в течение от 6 до 8 часов, затем отработанный остаток отделяется от раствора декантацией и последующей фильтрацией. Затем фильтрат лиофилизуется и готов к применению.

В каждой из вышеуказанных композиций растворимые фракции в водно-спиртовом растворе, обеспеченные в настоящем описании, например, в соотношениях, указанных в примерах, в описании и в формуле изобретения, могут быть с успехом использованы в качестве экстрактов.

Следующие данные были получены авторами настоящего изобретения и демонстрируют эффективность различных вариантов осуществления композиции по настоящему изобретению.

## ВЫПОЛНЕННЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ АНАЛИЗЫ

### **Животные**

Самцы крыс Sprague-Dawley массой около 200 граммов были предоставлены от Harlan Company, Italy. Четыре животных на клетку помещали в клетки следующих размеров: 26x41 см, в Centre for Stabulation of Laboratory Animals (Ce.S.A.L. - *Centro per la Stabulazione Animali da Laboratorio*) в Университете Флоренции в условиях 12-часового цикла свет/темнота, с водой и едой по желанию. Крыс кормили стандартным рационом и содержали при температуре  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ . Экспериментальный протокол был одобрен местным Комитетом для контроля за экспериментированием на лабораторных животных (Committee for the control of experimenting on laboratory animals). Все эксперименты

проводились в соответствии с директивами Совета Европейского Сообщества (European Communities Council Directives) от 22 сентября 2010 (директива 2010/63/EC) по обращению с животными, используемыми для экспериментальных целей, и с Руководством Национального Института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных (National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals), переняв руководящие принципы Международной ассоциации по изучению боли, (International Association for the Study of Pain) и в соответствии с руководящими принципами ARRIVE. Все необходимые меры были предприняты, чтобы минимизировать страдания и уменьшить количество используемых животных.

### **Индукцированная моноиодацетатом модель боли при остеоартрите**

Повреждение сустава вызвали индивидуальным внутрисуставным введением, в лапу предварительной анестезированной крысы, 2 мг натрия моноацетата (MIA) (объем: 25 мкл) согласно тому, что описано Guingamp et al., *Arthritis Rheum.*, 40:1670-1679, 1997.

Применение указанной дозировки дополнительно основано на экспериментах, проведенных в лаборатории изобретателей, из которых стало известно, что дозы в 0,5 и 1 мг вызывают гиперплазию, которая исчезает в течение 2-х недель, в то время как дозы в 4 мг вызывают воспалительное состояние, которое длится дольше первой недели. Как сообщается у Janusz et al., *Osteoarthritis Cartilage*, 9: 751-760, 2002 and Fernihough et al., *Pain* 112:83-93, 2004, доза в 2 мг вызывает гибель хондроцитов и выраженную гипералгезию и аллодинию. MIA вводится в сустав после сгибания лапы под углом 90°, с помощью иглы 26Gx3/8. Контрольные крысы получали внутрисуставную инъекцию физиологического раствора (25 мкл).

### **Приготовление и введение веществ**

Эксперименты, описанные ниже, были выполнены путем инъекции в сустав 20 мкл -контроля (физиологический раствор);

-экстракта лиофилизированной *Echinacea purpurea*, фракция, растворимая в водно-спиртовом растворе с концентрацией от 40 до 50%, обозначена на фигурах как 13C1608: 2-10-20 мг/мл в PBS (фосфатно-солевой буферный раствор);

-экстракта лиофилизированной *Centella asiatica*, фракция, растворимая в водно-спиртовом растворе с концентрацией от 65 до 75%, обозначена на фигурах как 14G1862: 0,2-1-2 мг/мл в PBS;

-бычьей синовиальной жидкости: как есть;

-Hyalgan (низкомолекулярная натриевая соль гиалуроновой кислоты (MW ~ от 500 до 730 кДа)): как есть;

-Жопеха (смесь, состоящая из геля хиластана, то есть гиалуроновой кислоты, сшитой с дивинилсульфоном, и жидкого гиалуроната натрия в соотношении гель-жидкость, равном 80:20): как есть;

-экстракта *Centella asiatica*, фракция, растворимая в водно-спиртовом растворе с концентрацией от 65 до 75%, обозначена на фигурах как 14G1862: 2 мг/мл в PBS

-экстракта лиофилизированной *Centella asiatica*, фракция, растворимая в водно-спиртовом растворе, обозначена на фигурах как ABO-AR-2016-391: 2 мг/мл в PBS;

-экстракта лиофилизированной *Centella asiatica*, фракция, растворимая в водно-спиртовом растворе, соответствующая пермеату фракции ABO-AR-2016-391 после фильтрования, обозначена на фигурах как ABO-AR-2016-392: 2 мг/мл в PBS;

-экстракта лиофилизированной *Centella asiatica*, фракция, растворимая в водно-спиртовом растворе, соответствующая ретентату фракции ABO-AR-2016-391 после фильтрования, обозначена на фигурах как ABO-AR-2016-393: 2 мг/мл в PBS;

- Триамцинолона ацетонид: 100 мкг/20 мл

- MIX (совместный экстракт) *Centella+Echinacea* серия 17H0246, как описано выше: 11 мг/мл в воде f.p.i.

Экстракты, также подразумеваемые как конкретные фракции, получаемые способом экстракции, из *Echinacea* и *Centella*, были получены водно-спиртовой экстракцией, как описано выше в подробной части настоящего изобретения и в изображенных ниже примерах.

Введенный материал: 20 мкл каждого образца, подлежащего анализу, вводили в большеберцово-предплюсневый сустав крысы (с использованием иглы 26Gx3/8) на 7-й день от индукции повреждения посредством MIA.

Поведенческие оценки с помощью тестов давления на лапу, Von Frey (фон Фрея), инвалидности, баланса на бруссе, Rotarod и ANIMEX, и гистологические анализы суставной и околосуставной ткани были выполнены на день 14, 30 и 60 с самого начала эксперимента.

### **Солюбилизация и введение веществ**

Смесь растительных экстрактов солюбилизировали в соответствии со следующим протоколом: 5,5 г лиофилизированной смеси вносили в Беккер (Becker), содержащий 450 г в воде и оставляли при перемешивании в течение 15 мин; после этого массу жидкости доводили до 500 г. Для каждой инъекции 30 г из раствора собирали и фильтровали последовательно с фильтрами с размером пор 0,45 мкм и 0,22 мкм. Во время каждого фильтрования первые от 3 до 4 г раствора отбрасывали. 20 мкл смеси вводили инъекцией

в большеберцово-предплюсневый сустав крысы (с использованием иглы 26Gx3/8) после сгибания лапы под углом 90°, на 8-й день от индукции суставного повреждения (сустава) посредством МІА. Другие вещества также ввели инъекцией 20 мкл раствора (Hyalgan 10 мг/мл; триамцинолона ацетонид 100 мкг/20 мл).

#### **Тест на давление лапы**

Использовали анальгезиометр (Ugo Basile, Varese, Italy). Давление, повышаемое с постоянной скоростью (32 г/с) прикладывали к задней лапе животного с помощью тупого конического элемента. Ноцицептивный порог крысы выражался как та сила, на которую животное реагирует, отдергивая лапу или издавая звуки (Leighton и др., 1988).

#### **Тест фон Фрея**

Животных помещали в клетку из оргстекла размером 20 x 20 x 15 см, пол которой образован металлической сеткой, и давали привыкать к обстановке в течение 15 минут. Электронный аппарат фон Фрея (Von Frey) (Ugo Basile, Italy), с вмонтированным гибким металлическим зондом, с помощью которого стимулировалась плоская поверхность передней лапы крысы, был помещен под металлическую сетку. Оказываемое давление увеличивалось постепенно до максимума в 50 г, с точностью до 0,2 г. Порог чувствительности лапы был определен как минимальное давление, необходимое для получения четкого и немедленного рефлекса отдергивания лапы. Связанные с передвижением добровольные движения не рассматривались как ответ. Стимул был применен пять раз на каждую переднюю лапу, и каждое значение, сообщенное как порог чувствительности, представляет собой среднее из 10 последовательных измерений (Sakurai et al. Pain 147: 165-174, 2009).

#### **Тест на инвалидность**

Тест основан на оценке давления, оказываемого крысой в условиях нормальной позы, на каждую из задних лап (Hau et al. Neurosci. 78: 843-850, 1997). Крыс помещали в небольшую коробку из плексигласа, их задние лапы располагались на двух датчиках, регистрирующих массу, которая крыса распределяла на каждую из двух лап. В случае, если на одной лапе возникла невропатия или воспаление, крыса будет опираться меньшей массой на указанную лапу по сравнению с другой.

#### **Балансный тест на брус**

1-метровый деревянный брус, имеющий квадратное сечение размером 1 см, был помещен на высоту около 40 см. Черную пластмассовую коробку размером 15 см × 15 см × 8 см закрепляли к концевой части бруса. Животное помещали на брус, и его двигательные способности оценивали, назначая больший балл, от 0 до 4, в зависимости

от значимости двигательных дефицитов (0, правильная походка; 1, цепляется четырьмя лапами; 2 скользит одной лапой; 3 скользит двумя лапами; 4, падает за время < 60 с) (Song et al., 2006).

### **Animex**

Прибор позволяет регистрировать спонтанную активность животных за счет использования электромагнитных полей и резонансных контуров. Содержащая животных клетка находится над инструментом; животные, перемещаясь с одной стороны клетки на другую, модифицируют магнитные поля, создаваемые устройством на его поверхности. Вариации записываются числовым счетчиком.

### **Гистология**

Образцы тканей фиксировали в 4%-ном формалине в фосфатном буфере в течение 24 часов.

Впоследствии, образцы декальцинировались в течение 28 дней в подходящем декальцинирующем растворе (1,6М муравьиная кислота, 0,76М формиата натрия). В конце декальцинации образцы обезживались пассажами в спирте с повышением титра, а затем заключались в парафин. Из образцов, таким образом обработанных, были получены срезы толщиной 7 мкм, которые окрашивались гематоксилин-эозином.

Образцы наблюдали под оптическим микроскопом в проходящем свете для оценки морфологических параметров объекта анализа:

- Воспалительный инфильтрат
- Синовиальная гиперплазия
- Отложение фибрина в суставной щели
- Синовиальная васкуляризация
- Эрозия хряща
- Эрозия костей
- Ширина суставной щели

Каждый морфологический параметр оценивался специально проставленным количественным показателем (0: отсутствует, 1: мало, 2: умеренно, 3: серьезно). Оценка выполнялась тремя отдельными операторами, не знающими происхождения предметных стекол. Четвертый оператор собирал данные и получил окончательные средние значения. Для каждого сустава оценивали по меньшей мере три предметных стекла, а для каждой группы оценивали по меньшей мере 6 животных. Результаты выражены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка.

### **Статистический анализ**

Все экспериментальные результаты выражены как среднее  $\pm$  SEM. Был проведен односторонний дисперсионный анализ (ANOVA), а затем тест Бонферрони для проверки значимости между двумя средними значениями. Дисперсионный анализ и тест Бонферрони были выполнены с помощью статистической программы Origin Pro 9.1. Рассматривались статистически значимые значения  $P < 0,05$  или  $P < 0,01$ .

## Результаты

### Оценка эффективности образцов совместного экстракта *Centella+Echinacea* (серия 17H0246), и Hyalgan, Jonexa, триамцинолона ацетонида

Цель настоящего исследования заключалась в оценке антигипералгезической и антиаллодинической эффективности смеси, состоящей из вышеуказанных экстрактов в виде совместного экстракта в соответствии с настоящим описанием (серия 17H0246) в одной и той же модели боли. Кроме того, было проведено сравнение эффективности вышеуказанной смеси и эталонных веществ, которые обычно используются внутрисуставно в клинической практике для лечения боли в суставах, а именно, препаратов гиалуроновой кислоты Jonexa и Hyalgan и кортикостероида триамцинолона ацетонида. Гистологические оценки следовали за поведенческими оценками, выполненными на 14-й, 30-й и 60-й день.

Группы лечения:

- носитель + носитель
- MIA + носитель
- MIA + смесь *Centella/Echinacea* серия 17H0246 (20 мкл)
- MIA + Hyalgan (20 мкл)
- MIA + Jonexa (20 мкл)
- MIA + триамцинолона ацетонид (100 мкг/20 мкл)

Модель остеоартрита (ОА), используемая в данном исследовании, была сделана однократным i.a. (внутрисуставным) введением MIA (2 мг/25 мкл). На +8 дни с момента повреждения аллогенным средством, когда ОА патология уже начала проявляться, 20 мкл каждого образца (MIX (совместный экстракт) серия 17H0246; Hyalgan, 10 мг/мл; Jonexa; триамцинолон ацетонид) были введены внутрисуставно. Поведенческие оценки были выполнены через + 14 + 30 и + 60 дней от начала эксперимента, то есть от момента инъекции MIA, также как и гистологические оценки на суставе крысы. Проведенные испытания позволили оценить антигипералгезическое действие (тест давления на лапу) образцов, эффект, который они оказывают на позу животных и на массу, отягощающую контралатеральную лапу относительно ипсилатеральной лапы (тест на инвалидность),

координацию и моторесурсы (тест баланса на брус) и спонтанную активность (тест Animex).

В таблице 1 представлены данные по антигипералгезическому эффекту веществ, измеренному через болезненный механический стимул через + 14 + 30 и + 60 дней после индукции повреждения. Внутрисуставная инъекция МПА уменьшает статистически значимым образом алгический порог ипсилатеральной лапы крысы по отношению к контрольной группе (носитель + носитель) до 60-го дня; пик болевой реакции отмечен через 2 недели после повреждения (таблица 1). Однократная внутрисуставная инъекция смеси растительных экстрактов (серия 17Н0246) оказывается эффективной в снижении суставных болей, начиная с 7-го дня от его введения (14-й день от повреждения с МПА). Указанный эффект усиливается, достигая кульминации на 30-й день с обращением альгических состояний, поскольку значения, записанные на ипсилатеральной лапе, сопоставимы с значениями, зарегистрированными в контрольной группе. Эффект сохраняется даже на 60-й день. Нуалган оказывается активным на 14-й и 30-й день, хотя показывает эффективность ниже, чем растительная смесь, и без кульминации с изменением болезненного состояния. Лопеха оказывается активным только на 30-й день, тогда как ацетонид триамцинолона значительно уменьшает болевую реакцию в суставах в любое время, однако, проявляет меньшую антигипералгезическую эффективность по сравнению со смесью растений (таблица 1).

Таблица 1

Оценка обезболивающих эффектов, обусловленных внутрисуставной инъекцией образцов

| Таблица 1. Тест на давление лапы<br><i>Масса (г)</i>                                |                               |                   |                               |                   |                               |                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|
|                                                                                     | День 14                       |                   | День 30                       |                   | День 60                       |                   |
| Обработка                                                                           | ипсилатеральная               | контралатеральная | ипсилатеральная               | контралатеральная | ипсилатеральная               | контралатеральная |
| носитель +<br>носитель                                                              | $66,7 \pm 1,7$                | $68,3 \pm 1,7$    | $67,3 \pm 0,9$                | $66,4 \pm 1,5$    | $65,3 \pm 0,8$                | $66,2 \pm 0,8$    |
| MIA + носитель                                                                      | $41,7 \pm 1,7^{**}$           | $61,7 \pm 1,7$    | $49,3 \pm 1,7^{**}$           | $69,2 \pm 0,8$    | $55,5 \pm 1,4^*$              | $66,7 \pm 1,7$    |
| MIA + MIX<br>(совместный<br>экстракт)<br><i>Centella+Echinacea</i><br>серия 17H0246 | $57,2 \pm 1,1^{\wedge\wedge}$ | $65,6 \pm 1,0$    | $65,0 \pm 1,5^{\wedge\wedge}$ | $70,0 \pm 1,4$    | $65,0 \pm 1,4^{\wedge\wedge}$ | $67,5 \pm 0,8$    |
| MIA + Hyalgan                                                                       | $52,6 \pm 0,9^{\wedge\wedge}$ | $62,8 \pm 1,7$    | $58,3 \pm 0,8^{\wedge}$       | $68,4 \pm 1,4$    | $59,2 \pm 1,6$                | $63,7 \pm 1,6$    |
| MIA + Jonexa                                                                        | $46,7 \pm 1,5$                | $66,7 \pm 0,8$    | $56,1 \pm 0,5^{\wedge}$       | $66,7 \pm 0,8$    | $58,4 \pm 2,0$                | $66,8 \pm 0,9$    |
| MIA +<br>триамцинолона<br>ацетонид                                                  | $51,9 \pm 1,3^{\wedge\wedge}$ | $64,5 \pm 0,9$    | $57,4 \pm 0,4^{\wedge}$       | $68,4 \pm 1,6$    | $63,0 \pm 1,5^{\wedge}$       | $64,9 \pm 2,1$    |

Моноартрит индуцировали инъекцией 2 мг/25 мкл моноиодоацетата (MIA, Sigma-Aldrich) в большеберцово-предплюсневый сустав. На 8-й день после введения MIA 20 мкл смеси экстрактов *Centella* и *Echinacea*, Hyalgan, Joneха (как есть) и триамцинолона ацетонида (100 мкг) вводили в большеберцово-предплюсневый сустав крысы.

\*\*P<0,01 против носитель + носитель; ^P<0,05 и ^^P<0,01 против MIA + носитель

Тест на инвалидность показывает большую эффективность лечения со смесью, по сравнению с другими веществами, в снижении постурального изменения, вызванного введением MIA, что приводит к перенесению животным массы в большей степени на контралатеральную лапу относительно ипсилатеральной лапы (таблица 2). MIX (совместный экстракт) *Centella+Echinacea* партия 17H0246 фактически возвращает к норме вышеуказанное изменение во все рассмотренные периоды времени (14, 30 и 60 дней), достигая контрольных значений за два месяца от начала эксперимента. Триамцинолона ацетонид снижает, и также статистически значимым образом, изменения, вызванные MIA, во все рассмотренные периоды времени, хотя и с меньшей эффективностью по сравнению с MIX (совместный экстракт) *Centella+Echinacea* партия 17H0246. Как показано в тесте давления на лапу, Hyalgan активен в дни 14 и 30, затем теряя эффективность, тогда как Joneха достигает статистической значимости только в день 30 (таблица 2).

Таблица 2

| <p><b>Таблица 2. Тест на инвалидность</b></p> <p><b><math>\Delta</math> Масса (г)</b></p> <p><b>Разница в баллах</b></p> <p><b>(контралатерально - ипсилатеральная лапа)</b></p> |                |                |                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>Обработки</b>                                                                                                                                                                 | <b>День 14</b> | <b>День 30</b> | <b>День 60</b> |
| носитель +<br>носитель                                                                                                                                                           | -0,8 ± 1,2     | 6,7 ± 4,9      | 3,6 ± 7,8      |
| MIA + носитель                                                                                                                                                                   | 73,0 ± 13,0**  | 49,8 ± 2,8**   | 36,2 ± 3,2**   |
| MIA + MIX<br>(совместный<br>экстракт)<br><i>Centella+Echinacea</i><br>партия 17H0246                                                                                             | 30,4 ± 1,9^^   | 16,7 ± 6,4^^   | 3,4 ± 2,1^^    |

|                                    |                          |                          |                         |
|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| MIA + Hyalgan                      | 42,8 ± 7,5 <sup>^^</sup> | 23,8 ± 2,5 <sup>^^</sup> | 28,9 ± 5,8              |
| MIA + Jonexa                       | 56,9 ± 18,1              | 32,0 ± 6,3               | 32,4 ± 6,1              |
| MIA +<br>триамцинолона<br>ацетонид | 45,7 ± 3,9 <sup>^^</sup> | 25,4 ± 4,3 <sup>^^</sup> | 20,9 ± 5,4 <sup>^</sup> |

Моноартрит вызывали инъекцией 2 мг/25 мкл моноиодацетата (MIA, Sigma-Aldrich) в большеберцово-предплюсневый сустав. На 8-й день после инъекции MIA вводили 20 мкл смеси *Centella + Echinacea*, Hyalgan, Jonexa и триамцинолона ацетонида (100 мкг) в большеберцово-предплюсневый сустав крысы.

\*\*P<0,01 против носитель + носитель; ^P<0,05 и ^^P<0,01 против MIA + носитель

Балансный тест на брус (таблица 3) проводили с целью оценки двигательных способностей животного при размещении на деревянном брус, поднятом над землей. Оценка, присваиваемая каждой группе, составляет от 0 до 4 (0 для правильной походки, 1, если цепляется четырьмя лапами, 2, если скользит одной лапой, 3, если скользит двумя лапами, 4, если падает за время <60 с). Животные, обработанные MIA (MIA + носитель), с большим трудом размещают ипсилатеральную лапу на брус и по этой причине скользят при ходьбе по ней. Повторение данного эксперимента в разное время от введения MIA показывает, как эффект указанного средства вызывает двигательное нарушение, которое является максимальным в первые 14 дней, позже эффект имеет тенденцию к самопроизвольному уменьшению с течением времени. Однократное введение MIX (совместного экстракта) *Centella+Echinacea* партия 17H0246 приводит к тому, что оценка, присвоенная данным животным, уменьшается вдвое по отношению к группе MIA + носитель во всех рассматриваемых случаях, даже если статистическая значимость достигается только на 14-й день, также как для Hyalgan и триамцинолона ацетонида. Jonexa оказывается неэффективной (таблица 3).

Таблица 3

| <p><b>Таблица 3. Балансный тест на бруссе</b><br/> <b>Предел: от нормального (0) до патологического (4)</b><br/> <b>значения</b></p> |                              |                 |                 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-----------------|-----------------|
| Обработки                                                                                                                            | День 14                      | День 30         | День 60         |
| носитель +<br>носитель                                                                                                               | $0,3 \pm 0,2$                | $0,2 \pm 0,3$   | $0,2 \pm 0,3$   |
| MIA + носитель                                                                                                                       | $3,2 \pm 0,4^{**}$           | $1,5 \pm 0,2^*$ | $1,3 \pm 0,2^*$ |
| MIA + MIX<br>(совместный<br>экстракт)<br><i>Centella+Echinacea</i><br>партия 17H0246                                                 | $1,3 \pm 0,2^{\wedge\wedge}$ | $0,5 \pm 0,2$   | $0,7 \pm 0,2$   |
| MIA + Hyalgan                                                                                                                        | $1,5 \pm 0,3^{\wedge\wedge}$ | $1,0 \pm 0,1$   | $1,0 \pm 0,2$   |
| MIA + Jonexa                                                                                                                         | $2,3 \pm 0,4$                | $1,0 \pm 0,2$   | $1,0 \pm 0,2$   |
| MIA +<br>триамцинолона<br>ацетонид                                                                                                   | $1,8 \pm 0,2^{\wedge}$       | $1,3 \pm 0,2$   | $0,8 \pm 0,2$   |

Моноартрит вызывали инъекцией 2 мг/25 мкл моноиодацетата (MIA, Sigma-Aldrich) в большеберцово-предплюсневый сустав. На 8-й день после инъекции MIA вводили 20 мкл смеси *Centella + Echinacea*, Hyalgan, Jonexa и триамцинолона ацетонида (100 мкг) в большеберцово-предплюсневый сустав крысы.

$**P < 0,01$  против носитель + носитель;  $^*P < 0,05$  и  $^{\wedge\wedge}P < 0,01$  против MIA + носитель

Наконец, с помощью теста Animex оценивали спонтанную подвижность животного (таблица 4). В данном случае было зафиксировано количество спонтанных движений крысы, однажды помещенной в клетку из оргстекла. Полученные результаты аналогичны тем, которые зафиксированы в предыдущих тестах, уменьшение спонтанных движений животного, которое записывается в группе MIA + носитель, значительно снижается путем обработки MIX (совместным экстрактом) *Centella+Echinacea* партия 17H0246 во всех рассматриваемых периодах времени. Хотя это также происходит с триамцинолона ацетонидом, его эффективность ниже, чем у растительной смеси. Hyalgan достигает статистической значимости в дни 14 и 30, в то

время как Jonexa только на 30-й день (таблица 4). Вкратце, внутрисуставная обработка смесью растительных экстрактов (MIX (совместные экстракты) *Centella+Echinacea* партия 17H0246) оказывается более эффективной в снижении суставных болей после введения MIA в экспериментальное животное, по сравнению с инъекцией препаратов Hyalgan, Jonexa и триамцинолона ацетонида. Помимо большей эффективности, антигипералгезический профиль данного лечения удлиняется со временем до полного изменения альгической патологии.

Таблица 4

| Таблица 4. Тест Animex<br>Количество движений                                        |                |                |               |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------|---------------|
| Обработки                                                                            | День 14        | День 30        | День 60       |
| носитель + носитель                                                                  | 736,4 ± 45,9   | 698,3 ± 35,9   | 720,6 ± 52,3  |
| MIA + носитель                                                                       | 298,7 ± 60,4** | 455,0 ± 26,7** | 510,7 ± 42,0* |
| MIA + MIX<br>(СОВМЕСТНЫЙ<br>ЭКСТРАКТ)<br><i>Centella+Echinacea</i><br>партия 17H0246 | 547,3 ± 50,8^^ | 664,3 ± 39,8^^ | 704,9 ± 53,1^ |
| MIA + Hyalgan                                                                        | 517,0 ± 35,6^^ | 549,6 ± 45,1^  | 599,9 ± 54,3  |
| MIA + Jonexa                                                                         | 358,1 ± 42,8   | 568,1 ± 38,7^  | 604,3 ± 39,7  |
| MIA + триамцинолона<br>ацетонид                                                      | 487,3 ± 57,3^  | 583,3 ± 45,2^  | 688,9 ± 54,2^ |

Моноартрит вызывали инъекцией 2 мг/25 мкл моноиодацетата (MIA, Sigma-Aldrich) в большеберцово-предплюсневый сустав. На 8-й день после инъекции MIA вводили 20 мкл смеси *Centella + Echinacea*, Hyalgan, Jonexa и триамцинолона ацетонида (100 мкг) в большеберцово-предплюсневый сустав крысы.

\*\*P<0,01 против носитель + носитель; ^P<0,05 и ^^P<0,01 против MIA + носитель

**Гистологические оценки большеберцово-предплюсневой сустава животных, обработанного совместным экстрактом *Centella+Echinacea* (партия 17H0246), Hyalgan, Joneха, ацетонидом триамцинолона**

**МІА:** в целом, у анализируемых животных наблюдается уменьшение суставной щели, не зависящее от времени наблюдения, и отложение фибриновых филаментов в суставной щели, увеличивающееся через 30 и 60 дней после обработки. Имеется зависимость от времени тенденция к ухудшению явлений эрозии на хряще покрытия и субхондральной кости. Обнаруживаются явления синовиальной гиперплазии и васкуляризации. Более того, отчетливо наблюдается наличие воспалительного инфильтрата, показывая снижение после 60 дней с момента инокуляции (фигуры 18 А-Г и 19).

**МІА + МІХ (совместный экстракт) *Centella+Echinacea* партия 17H0246:** обработка с МІХ (совместный экстракт) *Centella+ Echinacea* партия 17H0246 изменяет анализируемые морфологические параметры. В отношении воспалительного инфильтрата, указанная обработка значительно уменьшает его через 30 и 60 дней. На синовиальном уровне это устраняет ущерб, вызванный обработкой с помощью МІА. Эрозия хряща покрытия и субхондральной костной ткани у животных, получавших МІХ (совместный экстракт) *Centella+Echinacea* партия 17H0246, исчезает через 30 и 60 дней. Отложение фибрина в суставной щели отсутствует через 30 и 60 дней; аналогично, размеры суставной щели возвращаются к значениям, совместимым с обнаруженными у контрольных животных (фигуры 18 А-Г и 19).

**МІА + Joneха:** обработка Joneха не дает значительного улучшения анализируемых морфологических параметров по сравнению с группой животных, получавших только МІА. Отчетливо наблюдается небольшое улучшение в отношении ширины суставной щели (фигуры 18 А-Г и 19).

**МІА + Hyalgan:** после обработки с Hyalgan не отмечено значительного улучшения. Отчетливо наблюдается небольшое улучшение в отношении ширины суставной щели (фигуры 18 А-Г и 19).

**МІА + ацетонид триамцинолона:** обработка ацетонидом триамцинолона способна устранить наличие воспалительного инфильтрата во всех анализируемых временных интервалах. Аналогичный результат отмечен в отношении явлений эрозии, затрагивающих суставной хрящ и субхондральную кость. Очевидные эффекты могут отчетливо наблюдаться в отношении суставной щели через 30 и 60 дней. Более умеренные эффекты могут отчетливо наблюдаться при гиперпластических и сосудистых

явлениях на синовии и в отношении осаждения фибрина в суставной щели (фигуры 18 A-G и 19).

**Оценка эффективности экстрактов *Echinacea* (13C1608) и *Centella* (14G1862) (фракции, растворимые в водно-спиртовом растворе) по сравнению с бычьей синовиальной жидкостью**

20 мкл каждого вещества вводили в крысиный большеберцово-предплюсневый сустав при уже начавшейся патологии остеоартрита (через 8 дней после индукции или суставного повреждения, вызванного внутрисуставным введением MIA). Поведенческие оценки проводились на 14-й, 30-й и 60-й день после индукции повреждения. Эффективность экстрактов *Centella* (фракция 14G1862) и *Echinacea* (фракция 13C1608) и антигипералгезическое действие бычьей синовиальной жидкости оценивали с помощью теста давления на лапу (измерение болевого порога животного с помощью болевого механического раздражителя) и теста фон Фрея (измерение болевого порога животного с помощью безболезненного механического стимула). Разницу в массе нагрузки на задние лапы животного оценивали с помощью теста на инвалидность (животное с монолатеральными болями, как правило, нагружает больше контралатеральную лапу по сравнению с ипсилатеральной лапой).

В таблице 5 показано влияние различных веществ на порог болевого восприятия, оцениваемый на ипсилатеральной лапе (тест давления на лапу). В группе животных, которым вводили MIA (MIA + носитель), наблюдается снижение болевого порога по сравнению с группой контрольных животных (носитель + носитель), которое является максимальным на 14-й день от индукции повреждения ( $43,7 \pm 1,7$  и  $64,2 \pm 1,5$ , соответственно). Данное различие в двух экспериментальных группах остается значительным даже на 30-й и 60-й день, хотя самопроизвольное уменьшение болевой патологии отмечается в течение нескольких дней.

Однократная внутрисуставная инъекция фракции, растворимой в 45%-ном водно-спиртовом растворе *Echinacea* (20 мг/мл), оказывается эффективной в снижении суставной боли, начиная с 6-го дня от ее введения (14-й день от повреждения, вызванного MIA). Эффект полного обращения патологии остеоартрита достигается на 60-й день, так как значения, зарегистрированные на ипсилатеральной лапе в контрольной группе и в группе животных, получавших MIA, + фракция *Echinacea* (20 мг/мл), сравнимы. Меньшая доза фракции *Echinacea* (2 мг/мл), которую анализировали, не является активной, в то время как доза 10 мг/мл показывает значительный эффект только на 14-й день.

Фракция *Centella*, растворимая в 70%-ном водно-спиртовом растворе, является эффективной только при максимальной анализируемой дозе (2 мг/мл). Антигипералгезический эффект обнаруживается уже на 14-й день от повреждения, вызванного МІА, и остается значительным, достигая полного восстановления после повреждения на 30-й и 60-й день.

Однократное внутрисуставное введение бычьей синовиальной жидкости индуцирует эффект уменьшения остеоартритной симптоматики, что является статистически значимым на 14-й день; последующие оценки не достигают указанного значения.

В таблице 6 показан антиаллодинический эффект, достигаемый в разные периоды времени после однократного большеберцово-предплюсневоего введения различных продуктов у животных, подвергнутых неболезненному механическому стимулированию (тест фон Фрея). Животные, обработанные МІА, вдвое меньше нагружают ипсилатеральную лапу по сравнению с контрольной группой. Аллодинический эффект, вызванный инъекцией МІА, сохраняется в течение всего эксперимента (60 дней), однако, через 14 дней после его введения проявляется более сильный эффект. Фракции *Echinacea* и *Centella* демонстрируют сопоставимую картину на протяжении всего эксперимента. Для обоих препаратов антиаллодинический эффект регистрируется уже на 14 день; указанный эффект постепенно увеличивается в течение нескольких дней и завершается изменением болевой симптоматики на 60-й день после повреждения суставов. Что касается синовиальной жидкости, полученные данные сопоставимы с данными, полученными при тесте давления на лапу.

Тест на инвалидность показывает более высокую эффективность фракций *Centella* (2 мг/мл) и *Echinacea* (20 мг/мл) по сравнению с введением синовиальной жидкости.

Инъекция двух растительных фракций влечет за собой уменьшение вдвое разницы в массе нагрузки, приходящейся на контралатеральную лапу животного, по сравнению с ипсилатеральной лапой (таблица 7).

Данный эффект оказывается статистически значимым во всех выполненных измерениях (14, 30 и 60 дней). Обе фракции, однажды проанализированные в более низких дозах, не оказались эффективными.

Тесты для определения двигательных способностей, двигательных координационных способностей (баланс на бруске и Rotarod тест, соответственно) и спонтанной двигательной активности (тест Animex) позволили продемонстрировать, что животные, которые были повреждены МІА и впоследствии обрабатывались фракциями *Echinacea* и

*Centella*, сохраняли хорошие способности к движению и координации движений (данные не показаны).

Вкратце, фракции *Echinacea* (20 мг/мл) и *Centella* (2 мг/мл) оказываются более активными в снижении суставной боли после введения МІА у экспериментальных животных, по сравнению с инъекцией синовиальной жидкости. В частности, два экстракта проявляют антигипералгезический профиль, который остается постоянным во времени после их однократного внутрисуставного введения.

| Таблица 5. Тест на давление лапы<br>Масса (г)              |                 |                   |                 |                   |                 |                   |
|------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-------------------|
|                                                            | День 14         |                   | День 30         |                   | День 60         |                   |
| Обработки                                                  | ипсилатеральная | контралатеральная | ипсилатеральная | контралатеральная | ипсилатеральная | контралатеральная |
| носитель + носитель                                        | 64,2 ± 1,5      | 62,1 ± 0,9        | 65,8 ± 1,1      | 62,7 ± 1,2        | 63,4 ± 0,8      | 63,7 ± 1,5        |
| МІА + носитель                                             | 43,3 ± 1,7**    | 65,0 ± 0,3        | 51,3 ± 1,2**    | 62,5 ± 1,4        | 57,5 ± 1,4*     | 65,8 ± 0,8        |
| МІА + Экстракт <i>Echinacea</i> , фракция 13С1608 2 мг/мл  | 46,8 ± 1,6      | 60,5 ± 1,2        | 50,6 ± 2,5      | 63,4 ± 0,7        | 61,4 ± 2,5      | 63,7 ± 1,4        |
| МІА + Экстракт <i>Echinacea</i> , фракция 13С1608 10 мг/мл | 52,1 ± 0,4^     | 64,4 ± 0,9        | 49,7 ± 0,9      | 62,9 ± 0,5        | 59,8 ± 2,6      | 60,7 ± 2,8        |
| МІА + Экстракт <i>Echinacea</i> , фракция 20 мг/мл         | 54,2 ± 2,2^^    | 63,3 ± 0,8        | 58,3 ± 0,8^     | 61,7 ± 0,8        | 63,3 ± 1,7      | 65,8 ± 0,8        |
| МІА + Экстракт <i>Centella</i> , фракция 14G1862 0,2 мг/мл | 44,7 ± 1,6      | 66,1 ± 2,3        | 52,7 ± 0,8      | 61,6 ± 1,4        | 61,6 ± 0,7      | 64,3 ± 1,5        |
| МІА + Экстракт <i>Centella</i> ,                           | 47,6 ± 2,1      | 62,9 ± 0,9        | 52,9 ± 1,3      | 64,8 ± 2,3        | 63,4 ± 1,1      | 61,9 ± 2,5        |

|                                                                         |                             |            |                          |            |            |            |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|------------|--------------------------|------------|------------|------------|
| фракция<br>14G1862<br>1 мг/мл                                           |                             |            |                          |            |            |            |
| МІА +<br>Экстракт<br><i>Centella</i> ,<br>фракция<br>14G1862<br>2 мг/мл | 59,2 ±<br>3,0 <sup>^^</sup> | 64,2 ± 0,8 | 60,0 ± 1,4 <sup>^^</sup> | 63,3 ± 0,8 | 63,3 ± 1,7 | 64,2 ± 0,8 |
| МІА +<br>Синовиальн<br>ая жидкость                                      | 53,3 ±<br>1,7 <sup>^^</sup> | 62,5 ± 1,4 | 55,8 ± 0,8               | 61,7 ± 1,7 | 59,2 ± 3,0 | 63,3 ± 0,8 |

Моноартрит индуцировали инъекцией 2 мг/25 мкл моноиодоацетата (МІА, Sigma-Aldrich) в большеберцово-предплюсневый сустав. На 8-й день после введения 20 мкл каждой растительной фракции или соединения вводили в большеберцово-предплюсневый сустав крысы. Фракции *Echinacea* и *Centella* были растворены в PBS.

\*P<0,05 и \*\*P<0,01 против носитель + носитель; ^P<0,05 и ^^P<0,01 против МІА + носитель

| Таблица 6. Тест фон Фрея<br>Порог отвода (г)                              |                          |                   |                 |                   |                          |                   |
|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------|-----------------|-------------------|--------------------------|-------------------|
|                                                                           | День 14                  |                   | День 30         |                   | День 60                  |                   |
| Обработки                                                                 | ипсилатеральная          | контралатеральная | ипсилатеральная | контралатеральная | ипсилатеральная          | контралатеральная |
| носитель + носитель                                                       | 23,7 ± 0,7               | 22,5 ± 1,4        | 25,6 ± 1,4      | 23,7 ± 2,8        | 24,5 ± 1,3               | 24,6 ± 2,1        |
| МІА + носитель                                                            | 11,0 ± 0,3**             | 22,7 ± 0,4        | 14,1 ± 1,2**    | 23,8 ± 0,8        | 16,5 ± 1,0**             | 23,4 ± 1,7        |
| МІА +<br>Экстракт<br><i>Echinacea</i> ,<br>фракция<br>13C1608<br>2 мг/мл  | 12,3 ± 1,5               | 23,4 ± 0,8        | 14,9 ± 2,0      | 20,1 ± 2,3        | 18,7 ± 1,1               | 22,9 ± 0,7        |
| МІА +<br>Экстракт<br><i>Echinacea</i> ,<br>фракция<br>13C1608<br>10 мг/мл | 13,6 ± 2,1               | 21,6 ± 2,4        | 15,7 ± 0,8      | 25,0 ± 1,1        | 21,3 ± 0,4 <sup>^</sup>  | 23,0 ± 2,3        |
| МІА +                                                                     | 16,0 ± 0,8 <sup>^^</sup> | 24,0 ± 0,6        | 19,5 ± 1,7      | 25,2 ± 0,8        | 22,4 ± 0,8 <sup>^^</sup> | 24,7 ± 0,5        |

|                                                                           |                 |            |             |            |                 |            |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------------|------------|-------------|------------|-----------------|------------|
| Экстракт<br><i>Echinacea</i> ,<br>фракция<br>13C1608<br>20 мг/мл          |                 |            |             |            |                 |            |
| MIA +<br>Экстракт<br><i>Centella</i> ,<br>фракция<br>14G1862 0,2<br>мг/мл | 11,9 ±<br>0,8   | 23,7 ± 1,6 | 16,4 ± 1,5  | 23,7 ± 1,6 | 19,6 ± 2,1      | 22,6 ± 1,3 |
| MIA +<br>Экстракт<br><i>Centella</i> ,<br>фракция<br>14G1862<br>1 мг/мл   | 12,6 ±<br>1,6   | 20,8 ± 0,9 | 16,7 ± 0,6  | 20,8 ± 0,9 | 18,4 ± 1,9      | 21,8 ± 0,9 |
| MIA +<br>Экстракт<br><i>Centella</i> ,<br>фракция<br>14G1862<br>2 мг/мл   | 15,9 ±<br>0,5^^ | 22,8 ± 0,6 | 18,7 ± 0,9^ | 25,1 ± 0,8 | 22,3 ±<br>1,4^^ | 24,7 ± 1,7 |
| MIA +<br>Синовиальн<br>ая жидкость                                        | 14,9 ±<br>1,0^^ | 23,4 ± 0,3 | 18,2 ± 0,8^ | 24,1 ± 0,3 | 19,9 ± 1,1      | 24,5 ± 0,5 |

Моноартрит индуцировали инъекцией 2 мг/25 мкл моноиодоацетата (MIA, Sigma-Aldrich) в большеберцово-предплюсневый сустав. На 8-й день после введения 20 мкл каждой растительной фракции или соединения вводили инъекцией в большеберцово-предплюсневый сустав крысы. Фракции *Echinacea* и *Centella* были растворены в PBS.

\*\*P<0,01 против носитель + носитель; ^P<0,05 и ^^P<0,01 против MIA + носитель

| Таблица 7. Тест на инвалидность<br>$\Delta$ Массы (г)<br>(контралатеральная - ипсилатеральная лапа) |                               |                               |                              |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Обработки                                                                                           | День 14                       | День 30                       | День 60                      |
| носитель +<br>носитель                                                                              | $2,7 \pm 3,8$                 | $10,5 \pm 6,7$                | $-5,9 \pm 4,2$               |
| МІА +<br>носитель                                                                                   | $55,4 \pm 1,9^{**}$           | $38,9 \pm 1,5^{**}$           | $17,3 \pm 1,4^{**}$          |
| МІА +<br>экстракт<br><i>Echinacea</i> ,<br>фракция<br>13С1608<br>2 мг/мл                            | $44,9 \pm 3,7$                | $42,5 \pm 4,6$                | $13,1 \pm 3,6$               |
| МІА +<br>экстракт<br><i>Echinacea</i> ,<br>фракция<br>13С1608<br>10 мг/мл                           | $39,6 \pm 10,9$               | $31,4 \pm 5,8$                | $11,8 \pm 3,9$               |
| МІА +<br>экстракт<br><i>Echinacea</i> ,<br>фракция<br>13С1608<br>20 мг/мл                           | $29,7 \pm 2,7^{\wedge\wedge}$ | $28,0 \pm 0,9^{\wedge\wedge}$ | $7,3 \pm 0,2^{\wedge\wedge}$ |
| МІА +<br>Экстракт<br><i>Centella</i> ,<br>фракция<br>14G1862<br>0,2 мг/мл                           | $48,6 \pm 9,4$                | $33,6 \pm 1,9$                | $14,8 \pm 2,4$               |
| МІА +<br>Экстракт<br><i>Centella</i> ,<br>фракция<br>14G1862<br>1 мг/мл                             | $39,3 \pm 9,8$                | $35,0 \pm 5,6$                | $12,3 \pm 3,5$               |
| МІА +<br>Экстракт<br><i>Centella</i> ,<br>фракция<br>14G1862<br>2 мг/мл                             | $19,8 \pm 7,4^{\wedge\wedge}$ | $12,8 \pm 4,1^{\wedge\wedge}$ | $8,1 \pm 1,2^{\wedge}$       |
| МІА +<br>Синовиальная<br>жидкость                                                                   | $34,7 \pm 2,0^{\wedge\wedge}$ | $29,4 \pm 0,9^{\wedge\wedge}$ | $10,8 \pm 0,9^{\wedge}$      |

Моноартрит индуцировали инъекцией 2 мг/25 мкл моноиодоацетата (MIA, Sigma-Aldrich) в большеберцово-предплюсневый сустав. На 8-й день после введения 20 мкл каждой растительной фракции или соединения вводили инъекцией в большеберцово-предплюсневый сустав крысы. Фракции *Echinacea* и *Centella* были растворены в PBS.

**\*\*P<0,01** против носитель + носитель; **^P<0,05** и **^^P<0,01** против MIA + носитель

### **Гистологические оценки большеберцово-предплюсневого сустава животных, обработанных экстрактами *Echinacea* (фракция 13C1608) и *Centella* (фракция 14G1862), бычьей синовиальной жидкостью**

**MIA:** в целом, у анализируемых животных наблюдается уменьшение суставной щели, не зависящее от времени наблюдения, и отложение фибриновых филаментов в суставной щели, увеличивающееся через 30 и 60 дней после обработки. В целом, эрозия хряща и костной ткани показывает увеличение во времени. Синовиальная гиперплазия и васкуляризация присутствуют и со временем уменьшаются от лечения. Более того, отчетливо наблюдается наличие умеренного воспалительного инфильтрата, характер которого не зависит от времени (фигуры 1 и 2).

**MIA + *Centella* (14G1862) (2 мг/мл):** обработка *Centella* 14G1862, в целом, снижает статистически значимым образом все выделенные морфологические изменения, прежде всего, в периоды 30 и 60 дней. Незначительные отложения фибрина или мелкие очаги эрозии кости остаются (фигуры 1 и 2).

**MIA + *Echinacea purpurea* (13C1608) (20 мг/мл):** обработка *Echinacea* 13C1608, в целом, снижает статистически значимым образом все выделенные морфологические изменения, прежде всего, в периоды 30 и 60 дней. Незначительные отложения фибрина или мелкие очаги эрозии кости остаются (фигуры 1 и 2).

**MIA + Бычья синовиальная жидкость:** обработка бычьей синовиальной жидкостью, по-видимому, не меняет морфологические параметры по отношению к изменениям, описанным для MIA-обработанных животных (фигуры 1 и 2).

### **Оценка эффективности различных фракций из *Centella asiatica*, растворимых в водно-спиртовом растворе**

На той же животной модели MIA-индуцированного остеоартрита была оценена эффективность внутрисуставного введения трех фракций *Centella* (ABO-AR-2016-391, ABO-AR-2016-392 и ABO-AR-2016-393) и, в заключение, эффекта, генерируемого внутрисуставной обработкой с ацетонидом триамцинолона. Поведенческие оценки были выполнены через 14, 30 и 60 дней после индукции повреждения, тогда как

внутрисуставное введение веществ было выполнено на 8-е дни от введения МІА (когда патология остеоартрита уже началась).

В таблице 8 показано влияние различных способов лечения на порог болевого восприятия болевым механическим стимулом (тест на давление лапы). Группа животных, которым вводили МІА (МІА + носитель), показывает статистически значимое снижение болевого порога по отношению к контрольной группе, которое максимально на 14-й день от индукции повреждения ( $41,5 \pm 1,9$  г, и  $65,0 \pm 1,6$  г, соответственно). Данное различие между двумя экспериментальными группами остается значительным даже на 30-й день, а затем уменьшается через 60 дней, когда происходит спонтанное восстановление после остеоартритной патологии (Таблица 8). Однократная внутрисуставная инъекция фракции, растворимой в 70% EtOH, из *Centella* (14G1862) уменьшает суставную боль, начиная с 6-го дня от ее введения (день 14 от повреждения, индуцированного МІА). Почти полное возвращение к исходному уровню суставного болевого состояния достигается на 30-й день, когда значения, зарегистрированные на ипсилатеральной лапе в контрольной группе и в группе животных, получавших МІА + экстракт *Centella*, фракция 14G1862, становятся сравнимыми ( $65,2 \pm 0,9$  г и  $60,0 \pm 1,4$  г, соответственно). Фракции *Centella* ABO-AR-2016-391 и ABO-AR-2016-392, приготовленные, как описано в примере 4 приготовления, ниже, становятся значительно активнее через 14 и 30 дней, демонстрируя на 14-й день более низкую эффективность по сравнению с обработкам экстрактом *Centella*, фракция 14G1862, так как они только частично уменьшают МІА-индуцированную гипералгезию. Экстракт *Centella*, фракция ABO-AR-2016-393, достигает статистической значимости только на 30-й день ( $58,3 \pm 1,7$  г), причем он также показывает эффективность, сравнимую с таковой экстракта *Centella*, фракции (14G1862). Эффективность фракций ABO-AR-2016-391 и ABO-AR-2016-392 сравнима с таковой, индуцированной внутрисуставной обработкой с ацетонидом триамцинолона ( $52,8 \pm 1,1$  г и  $56,7 \pm 2,5$  г, в дни 14 и 30, соответственно) (таблица 8).

**Таблица 8. Тест давления на лапу**  
**Масса (г)**

|                                                                          | День 14                       |                          | День 30                       |                          | День 60                |                          |
|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|
| <b>Обработки</b>                                                         | <i>ипсилатеральная</i>        | <i>контралатеральная</i> | <i>ипсилатеральная</i>        | <i>контралатеральная</i> | <i>ипсилатеральная</i> | <i>контралатеральная</i> |
| носитель +<br>носитель                                                   | $65,0 \pm 1,6$                | $65,0 \pm 2,5$           | $65,2 \pm 0,9$                | $66,3 \pm 1,3$           | $62,5 \pm 2,5$         | $65,0 \pm 0,6$           |
| МІА +<br>носитель                                                        | $41,5 \pm 1,9^{**}$           | $65,0 \pm 2,9$           | $48,0 \pm 1,8^{**}$           | $65,8 \pm 3,0$           | $59,2 \pm 0,8$         | $63,3 \pm 1,7$           |
| МІА +<br>Экстракт<br><i>Centella</i> ,<br>фракция<br>14G1862             | $59,2 \pm 3,0^{\wedge\wedge}$ | $64,2 \pm 0,8$           | $60,0 \pm 1,4^{\wedge\wedge}$ | $63,3 \pm 0,8$           | $63,3 \pm 1,7$         | $64,2 \pm 0,8$           |
| МІА +<br>Экстракт<br><i>Centella</i> ,<br>фракция<br>АВО-AR-<br>2016-391 | $50,4 \pm 2,2^{\wedge}$       | $64,4 \pm 0,9$           | $57,5 \pm 1,4^{\wedge}$       | $65,8 \pm 0,8$           | $56,7 \pm 0,8$         | $70,0 \pm 2,9$           |
| МІА +<br>Экстракт<br><i>Centella</i> ,<br>фракция                        | $51,2 \pm 1,3^{\wedge\wedge}$ | $63,3 \pm 0,8$           | $56,7 \pm 3,3$                | $63,4 \pm 1,4$           | $61,3 \pm 1,3$         | $65,8 \pm 0,8$           |

|                                                                          |                |                |                               |                |                   |                |
|--------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------|-------------------------------|----------------|-------------------|----------------|
| ABO-AR-<br>2016-392                                                      |                |                |                               |                |                   |                |
| МІА +<br>Экстракт<br><i>Centella</i> ,<br>фракция<br>ABO-AR-<br>2016-393 | $48,8 \pm 2,2$ | $66,1 \pm 2,3$ | $58,3 \pm 1,7^{\wedge\wedge}$ | $64,2 \pm 2,2$ | $63,3 \pm 1\ 0,7$ | $72,5 \pm 1,4$ |
| МІА +<br>Ацетонид<br>триамцино<br>лон                                    | $52,8 \pm 1,1$ | $65,3 \pm 1,0$ | $56,7 \pm 2,5^{\wedge\wedge}$ | $65,8 \pm 0,5$ | $61,3 \pm 1\ 0,6$ | $66,4 \pm 0,7$ |

Моноартрит индуцировали инъекцией 2 мг/25 мкл моноиодоацетата (MIA, Sigma-Aldrich) в большеберцово-предплюсневый сустав. На 8-й день после введения 20 мкл каждой растительной фракции (2 мг/мл) или триамцинолона ацетонида (100 мкг) вводили инъекцией в большеберцово-предплюсневый сустав крысы. Фракции *Centella* растворяли в PBS.

\*\*P<0,01 против носитель + носитель; ^P<0,05 и ^^P<0,01 против MIA + носитель

Тест на инвалидность показывает эффективность выше, чем таковая фракций *Centella* 14G1862, ABO-AR-2016-392 относительно введения фракций ABO-AR-2016-391, ABO-AR-2016-393 и по отношению к медикаментозному лечению на основе препарата кортизона. Инъекция фракций 14G1862, ABO-AR-2016-392 влечет за собой уменьшение вдвое массы, которую животные несут на контралатеральной лапе по отношению к ипсилатеральной лапе (таблица 9). Данный эффект оказывается статистически значимым при измерениях, проводимых как через 14, так и через 30 дней. ABO-AR-2016-391 индуцирует значительный эффект через 14 дней ( $30,9 \pm 5,0$  г) от повреждения, вызванного MIA, в то время как фракция ABO-AR-2016-393 достигает статистической значимости в день 30 ( $10,6 \pm 0,8$  г). Обработка ацетонидом триамцинолона действует как на 14-й, так и на 30-й день, но, как уже упоминалось выше, с меньшей эффективностью по сравнению с фракциями *Centella* 14G1862 и ABO-AR-2016-392 (таблица 9).

| Таблица 9. Тест на инвалидность<br><i>Δ</i> Масса (г)<br>(лапа контралатеральная - ипсилатеральная) |                               |                               |                |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------|
| Обработки                                                                                           | День 14                       | День 30                       | День 60        |
| носитель + носитель                                                                                 | $-9,8 \pm 2,5$                | $3,5 \pm 5,2$                 | $9,7 \pm 5,2$  |
| MIA + носитель                                                                                      | $56,8 \pm 7,1^{**}$           | $31,5 \pm 1,5^{*}$            | $10,4 \pm 2,7$ |
| MIA + Экстракт<br><i>Centella</i> , фракция<br>14G1862                                              | $19,8 \pm 7,4^{\wedge\wedge}$ | $12,8 \pm 4,1^{\wedge\wedge}$ | $8,1 \pm 1,2$  |
| MIA + Экстракт<br><i>Centella</i> , фракция<br>ABO-AR-2016-391                                      | $30,9 \pm 5,0^{\wedge}$       | $24,1 \pm 3,8$                | $6,3 \pm 4,5$  |

|                                                                |                               |                               |                |
|----------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------|
| MIA + Экстракт<br><i>Centella</i> , фракция AR-<br>2016-392    | $20,5 \pm 3,1^{\wedge\wedge}$ | $6,3 \pm 3,4^{\wedge\wedge}$  | $-2,6 \pm 8,8$ |
| MIA + Экстракт<br><i>Centella</i> , фракция<br>ABO-AR-2016-393 | $41,6 \pm 2,8$                | $10,6 \pm 0,8^{\wedge\wedge}$ | $5,6 \pm 4,4$  |
| MIA +<br>Ацетонид<br>триамцинолон                              | $28,7 \pm 3,2^{\wedge}$       | $15,6 \pm 5,4^{\wedge}$       | $5,6 \pm 4,4$  |

Моноартрит индуцировали инъекцией 2 мг/25 мкл моноиодоацетата (MIA, Sigma-Aldrich) в большеберцово-предплюсневый сустав. На 8-й день после введения 20 мкл каждой растительной фракции (2 мг/мл) или триамцинолона ацетонида (100 мкг) вводили инъекцией в большеберцово-предплюсневый сустав крысы. Фракции *Centella* растворяли в PBS.

\*\*P<0,01 против носитель + носитель;  $^{\wedge}$ P<0,05 и  $^{\wedge\wedge}$ P<0,01 против MIA + носитель

Тест оценки активности спонтанного движения (тест Animex) позволил продемонстрировать, что животные, обработанные экстрактом *Centella*, сохраняли хорошие способности к движению (данные не показаны). В данном тесте наиболее эффективными экстрактами являются экстракты из *Centella*, фракции 14G1862 и ABO-AR-2016-392, как увеличивающие статистически значимым образом числа самопроизвольных движений животного, как через 14 дней, так и через 30 дней после повреждения (данные не показаны). Вкратце, экстракты *Centella*, которые показали большую эффективность в снижении гипералгезии и нарушении моторики после введения MIA, представляют собой фракция *Centella* 14G1862 и фракция ABO-AR-2016-392. В частности, они проявляли анальгетический профиль, который остается постоянным в течение долгого времени после их индивидуального внутрисуставного введения.

**Связь с гистологическими оценками большеберцово-предплюсневого сустава животных, получавших различные фракции *Centella* и ацетонид триамцинолона**

**MIA:** В целом, у анализируемых животных наблюдается уменьшение суставной щели, не зависящее от времени наблюдения, и отложение фибриновых филаментов в суставной щели, увеличивающееся через 30 и 60 дней после лечения. В целом, эрозия хряща и костной ткани увеличивается во времени. Синовиальная гиперплазия и васкуляризация присутствуют и уменьшаются со временем после обработки. Кроме того, явно видно

наличие умеренного воспалительного инфильтрата, характер которого не зависит от времени (фигуры 3 и 4).

**MIA + Centella 14G1862:** обработка с *Centella* 14G1862, в целом, статистически значимым образом уменьшает все выделенные морфологические изменения, прежде всего через 30 и 60 дней. Незначительные отложения фибрина или мелкие очаги эрозии кости остаются (фигуры 3 и 4).

**MIA + ABO-AR-2016-391:** обработка с ABO-AR-2016-391 улучшает статистически значимым образом некоторые рассматриваемые параметры (эрозия кости и хряща и уменьшение суставной щели). Фракция показывает эффективность в отношении других параметров через 30 и 60 дней обработки (фигуры 5 и 6).

**MIA + ABO-AR-2016-392:** обработка с ABO-AR-2016-392 показывает эффективность через 30 и 60 дней по всем проанализированным параметрам, за исключением того, что при наличии воспалительного инфильтрата фракция показывает активность только через 60 дней. Что касается эрозии хряща и костной ткани и уменьшения суставной щели, фракция оказывается в значительной степени эффективным при всех трех экспериментальных временных периодах (фигуры 3 и 4).

**MIA + ABO-AR-2016-393:** обработка с ABO-AR-2016-393 показывает воздействие на все анализируемые морфологические параметры, за исключением того, что при наличии воспалительного инфильтрата фракция не оказывает никакого эффекта. Улучшение морфологических параметров, индуцированное ABO-AR-2016-393, однако ниже, чем зафиксированное с двумя другими фракциями (фигуры 3 и 4).

**MIA + Триамцинолон:** обработка с триамцинолоном показывает значительную эффективность в снижении воспалительного инфильтрата и эрозии, как хряща, так и костной ткани. Что касается синовиальной гиперплазии, отложения фибрина, синовиальной васкуляризации и уменьшения суставной щели, он демонстрирует пониженную эффективность после 15 и 30 дней обработки и более заметную эффективность после 60 дней обработки (фигуры 3 и 4).

## ПРИМЕРЫ

Примеры получения терапевтически активных веществ по изобретению изображены далее. Специалист в данной области техники может использовать другие аналогичные процедуры или проводить модификации процедур, представленных ниже, получение экстрактов или фракций, подходящих для осуществления изобретения на основе общеизвестных в данной области техники знаний.

### **1. Пример приготовления экстракта фракции 14G1862 из *Centella asiatica***

Высушенные и измельченные листья *Centella asiatica* подвергают экстракции 70%-ным этанолом (этанол: вода 70:30 об./об.), в статическом экстракторе способом перколяции, причем растение погружено в растворитель и растворитель повторно подается снизу вверх механическим насосом.

Соотношение лекарственное средство-растворитель (drug-solvent ratio (DSR)) равно 1:8, температура экстракции составляет 50°C, продолжительность экстракции составляет от 6 до 8 часов. Из полученной смеси нерастворимый остаток отделяют от растворимой фракции статической декантацией и впоследствии фильтрацией на бумажном фильтре. Полученный раствор концентрируют выпариванием этанола, используя вакуумную систему для концентрирования. При достижении степени концентрирования 10:1 концентрирование прекращается, и сушка завершается лиофилизацией. Лиофилизированный материал составляет интересующую фракцию (DER 4-10:1).

Протокол, описанный в данном документе, применим, с соответствующими изменениями, к составам с иным содержанием спирта, о которых сообщается в подробной части описания.

### **2. Пример приготовления экстракта фракции 13C1608 из *Echinacea purpurea***

Высушенные и измельченные листья *Echinacea purpurea* подвергают экстракции 45%-ным этанолом (этанол: вода 45:55 об./об.), в статическом экстракторе способом перколяции, причем растение погружено в растворитель и растворитель рециркулируется снизу вверх механическим насосом.

Соотношение лекарственное средство-растворитель (DSR) равно 1:8, температура экстракции составляет 50°C, продолжительность экстракции составляет от 6 до 8 часов. Из полученной смеси нерастворимый остаток отделяют от растворимой фракции статической декантацией и впоследствии фильтрацией на бумажном фильтре. Полученный раствор концентрируют выпариванием этанола, используя вакуумную систему для концентрирования. При достижении степени концентрирования 10:1 концентрирование прекращается, и сушка завершается лиофилизацией. Лиофилизированный материал составляет интересующую фракцию (DER 4-10:1).

Протокол, описанный в данном документе, применяется, с соответствующими изменениями, к другим содержаниям спирта, о которых сообщается в подробной части описания.

### **3. Пример приготовления фракций *Centella asiatica* ABO-AR-2016-391, ABO-AR-2016-392, ABO-AR-2016-393**

Листья *Centella* фрагментировали и подвергали двум стадиям экстракции в этаноле при уменьшении концентрации; выполняя первый шаг с 96%-ным этанолом, части растений, обработанные 96%-ным EtOH, затем подвергали второй стадии с 13%-ным этанолом. Экстракционные условия каждой стадии экстракции характеризовались продолжительностью времени 8 часов, соотношением лекарственное средство-растворитель (DSR), равным 1: 8, температурой экстракции 40°C.

Первую алкогольную фракцию, полученную на стадии с 96%-ным этанолом, отбрасывали. Вторую алкогольную фракцию, полученную на стадии с этанолом 13%, подвергали концентрированию путем испарения этанола, с использованием вакуумной системы дистилляции согласно стандартному протоколу, в результате чего получая, после удаления этанола, концентрированный водный экстракт.

Полученный концентрированный водный экстракт фильтровали на пластинчатом фильтре, с бумажным фильтром, имеющим отсечение по размеру пор 25 микрометров. Часть данного концентрата подвергали сушке путем лиофилизации, обеспечивая соответствующую лиофилизированную фракцию (ABO-AR-2016-391) (DER 5-10:1).

Отфильтрованный концентрированный водный экстракт, полученный, как описано выше, подвергали стадии фильтрации на мембране с отсечением по размеру пор от 150 до 300 Да, в соответствии со стандартными методиками, обеспечивая фракцию пермеата и фракцию ретентата. Указанные фракции подвергались сушке лиофилизацией, обеспечивая соответствующие лиофилизированные фракции: пермеат (DER 10-30:1) (ABO-AR-2016-392) и ретентат (DER 5-20:1) (ABO-AR-2016-393).

Протокол, описанный в данном документе, применяется, с соответствующими изменениями, к другим мембранам, обеспеченным в подробной части описания.

#### **4. Пример приготовления композиции по изобретению**

1. Лيوфилизированные экстракты солубилизовали в воде с NaCl, нагревая смесь при температуре в интервале от 30 до 80°C, предпочтительно от 30 до 70°C, 40 до 50°C в течение периода времени, составляющего от 4 до 8 часов для того, чтобы способствовать солубилизации экстракта.
2. Смесь, полученную на предыдущей стадии, после охлаждения, фильтровали, чтобы устранить любые нерастворенные частицы экстракта, а затем сушили, предпочтительно, лиофилизацией и повторно суспендировали в подходящем фармацевтически приемлемом носителе.

3. На данной стадии, при необходимости, могут быть добавлены маслянистые вещества и эмульгаторы, если должны быть получены поверхностно-активированные системы.
4. К смеси экстрактов добавляли другие растворимые в воде вспомогательные вещества, такие как буферы, изотонические средства.
5. pH приготовленного раствора измеряется и при необходимости корректируется.
6. Полученный таким образом раствор стерилизовали стерилизующей фильтрацией или влажным теплом (паром) в автоклаве.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Парентеральная композиция, содержащая:  
экстракт *Centella asiatica* и экстракт *Echinacea purpurea*, и  
по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.
2. Парентеральная композиция по пункту 1, в котором указанный экстракт *Centella asiatica* представляет собой экстракт из листьев указанного растения.
3. Парентеральная композиция по пункту 1 или 2, в котором указанный экстракт *Echinacea purpurea* представляет собой экстракт из надземных частей указанного растения.
4. Парентеральная композиция по любому из п.п. 1-3, в котором указанный экстракт *Centella asiatica* и/или указанный экстракт *Echinacea purpurea* представляет собой лиофилизированный экстракт в водно-спиртовом растворе.
5. Парентеральная композиция по пункту 4, в котором указанные экстракты смешаны в соотношении от 7:3 и 9,5:0,5 *Centella:Echinacea* и соэкстрагированы и лиофилизированы после инкубации в воде и от 0,8 до 4% NaCl при от 30 до 70°C в течение от 4 до 8 часов и фильтрации.
6. Парентеральная композиция по любому из п.п. 1-5, отличающаяся тем, что она включает, в лиофилизированной форме:  
Суммарные фенолы: от 0,08 до 2% мас./мас.
7. Парентеральная композиция по любому из п.п. 1-6, отличающаяся тем, что она включает, в лиофилизированной форме:  
Полисахариды с молекулярной массой > 20000 Дальтон: от 1 до 2% мас./мас.
8. Парентеральная композиция по любому из п.п. 1-7, отличающаяся тем, что она включает, в лиофилизированной форме,  
Суммарные танины: от 0,002 до 1% мас./мас.
9. Парентеральная композиция, содержащая от 0,08 до 2% мас./мас. суммарных фенолов, от 0,002 до 1% мас./мас. суммарных танинов, от 1 до 2% мас./мас. полисахаридов с молекулярной массой выше 20000 Да, будучи в лиофилизированной форме, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, причем указанные фенолы, танины, полисахариды получены из *Centella asiatica* и *Echinacea purpurea*.

10. Парентеральная композиция по любому из п.п. 1-9, где терапевтически активное начало образовано указанным экстрактом *Centella* в сочетании с указанным экстрактом *Echinacea purpurea*.

11. Парентеральная композиция по любому из п.п. 1-10 в виде набора частей, в котором указанное терапевтически активное начало обеспечено в аликвотах в лиофилизированной форме и указанный по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель обеспечен в отдельных аликвотах.

12. Парентеральная композиция по любому из предыдущих пунктов 1-11, в котором терапевтически активное начало соответствующим образом растворено в указанном фармацевтически приемлемом носителе.

13. Композиция по любому из предыдущих пунктов 1-12, в котором фармацевтически приемлемый носитель выбран из растворителей, эмульгаторов, буферных средств, регуляторов pH, антиоксидантов, консервантов, осмотических средств.

14. Парентеральная композиция по пункту 13, в котором указанный растворитель выбран из одного или более из: воды, поливинилпирролидона, изотонических солевых растворов; и/или

указанные эмульгаторы выбраны из одного или более из: лецитинов, этоксилированных производных жирных кислот; и/или

указанные буферные средства выбраны из одного или более из: лимонной кислоты и ее натриевых солей, фосфорной кислоты и ее натриевых солей, уксусной кислоты и ее натриевых солей; и/или

указанные корректоры pH выбраны из одного или более из: соляной кислоты и гидроксида натрия; и/или

указанные антиоксиданты выбраны из одного или более из: бисульфита натрия, метабисульфита натрия, этилендиаминтетрауксусной кислоты и ее натриевых солей; и/или

указанные консерванты выбраны из одного или более из: бензилового спирта, метил-п-гидроксибензоата, хлорида бензалкония, хлорида бензетония; и/или

указанные осмотические средства выбраны из одного или более из: хлорида натрия, сахаров, маннита, декстрозы, глюкозы.

15. Парентеральная композиция по любому из предыдущих пунктов 1-14 для применения в качестве лекарственного средства.

16. Парентеральная композиция по любому из предыдущих пунктов 1-15 для применения в лечении нарушений, влияющих на суставной хрящ у позвоночных животных, включая человека.

17. Парентеральная композиция для применения по пункту 16, в котором нарушения, влияющие на суставной хрящ, выбраны из артрита, остеоартрита, воспаления суставов, повреждения хряща, вызванного травмой, дегенерации спинных дисков, ревматоидного артрита.

18. Композиция для применения по пункту 16 или 17, в котором композиция вводится указанному животному путем инфильтрования/суставной инъекции.

19. Способ приготовления парентеральной композиции, содержащей экстракт *Centella asiatica*, экстракт *Echinacea purpurea* и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, в котором

a) листья *Centella asiatica* подвергаются одной или более стадиям экстракции водно-спиртовыми смесями, и полученный таким образом экстракт подвергается лиофилизации;

b) надземные части *Echinacea purpurea* подвергаются одной или более стадиям экстракции водно-спиртовыми смесями, и полученный таким образом экстракт подвергается лиофилизации;

c) лиофилизированные экстракты, полученные на стадии a) и b), в любом порядке смешаны в соотношении экстракт *Centella asiatica*:экстракт *Echinacea purpurea* в интервале значений от 8:2 до 0,5:9,5

d) смешанные таким образом экстракты ресуспендируются в воде с добавлением от 0,8 до 4% хлорида натрия

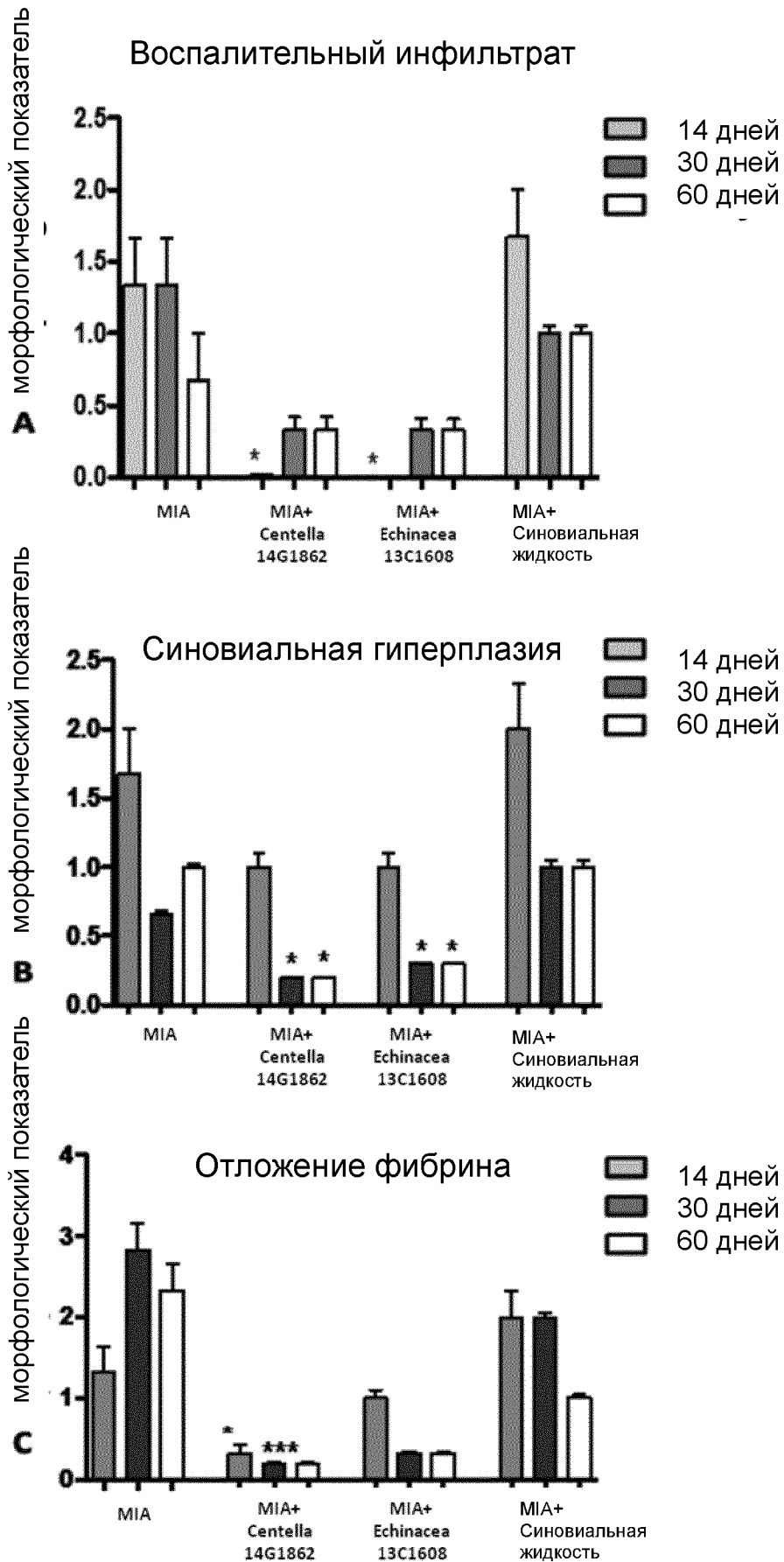
e) полученная таким образом смесь доводится до температуры в интервале от 30 до 70°C в течение периода времени в интервале от 4 до 8 часов, и затем подвергается фильтрованию или декантации,

f) фильтрат или супернатант, полученный на стадии e), лиофилизуется

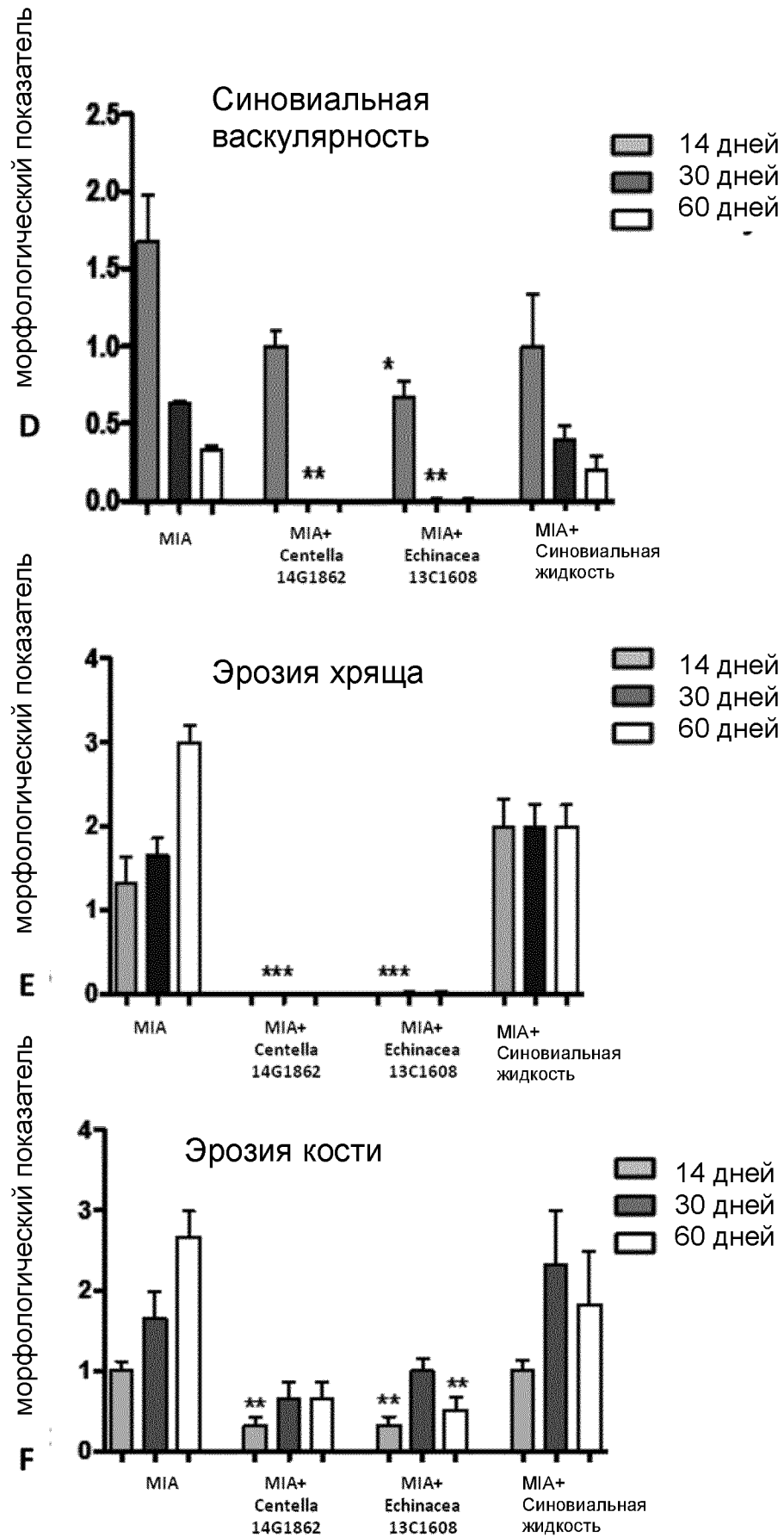
g) лиофилизированный совместный экстракт, полученный на стадии f), ресуспендируется в одном или более фармацевтически приемлемых носителях.

20. Способ по пункту 19, в котором указанный экстракт на стадии a) представляет собой фракцию экстракта, растворимую в водно-спиртовом растворе, в котором спирт составляет от 65% до 75% об./об., фракцию экстракта, не растворимую в от 90 до 96% об./об. EtOH и растворимую в от 10 до 20% об./об. EtOH, или их смеси.

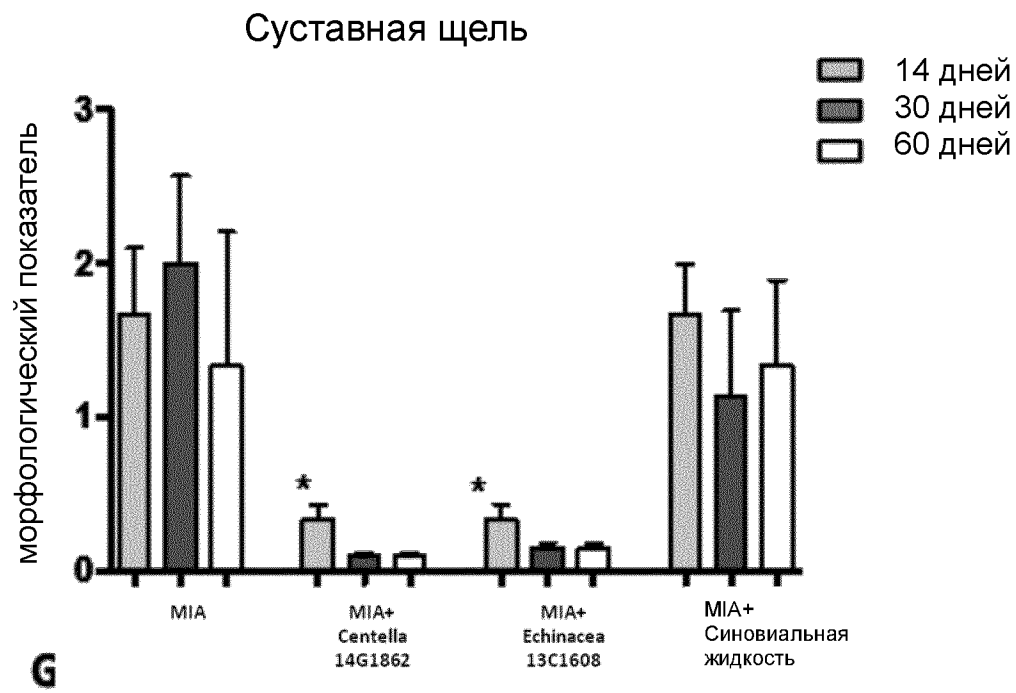
21. Способ по любому из п.п. 19 или 20, в котором указанный экстракт на стадии b) представляет собой фракцию экстракта, растворимую в водно-спиртовом растворе, в котором указанный спирт составляет от 40% до 50% об./об.
22. Парентеральная композиция, получаемая способом по любому из п.п. 19-21.
23. Парентеральная композиция по пункту 22 для применения в качестве лекарственного средства.
24. Парентеральная композиция по пункту 22 для применения в лечении нарушений, влияющих на суставной хрящ у позвоночных животных, включая человека.
25. Парентеральная композиция для применения по любому из п.п. 23 или 24, в котором нарушения, влияющие на суставной хрящ, выбраны из артрита, остеоартрита, воспаления суставов, повреждения хряща, вызванного травмой, дегенерации спинных дисков, ревматоидного артрита.
26. Композиция для применения по любому из п.п. 24 или 25, в котором указанная композиция вводится указанному животному путем инфильтрации/суставной инъекции.



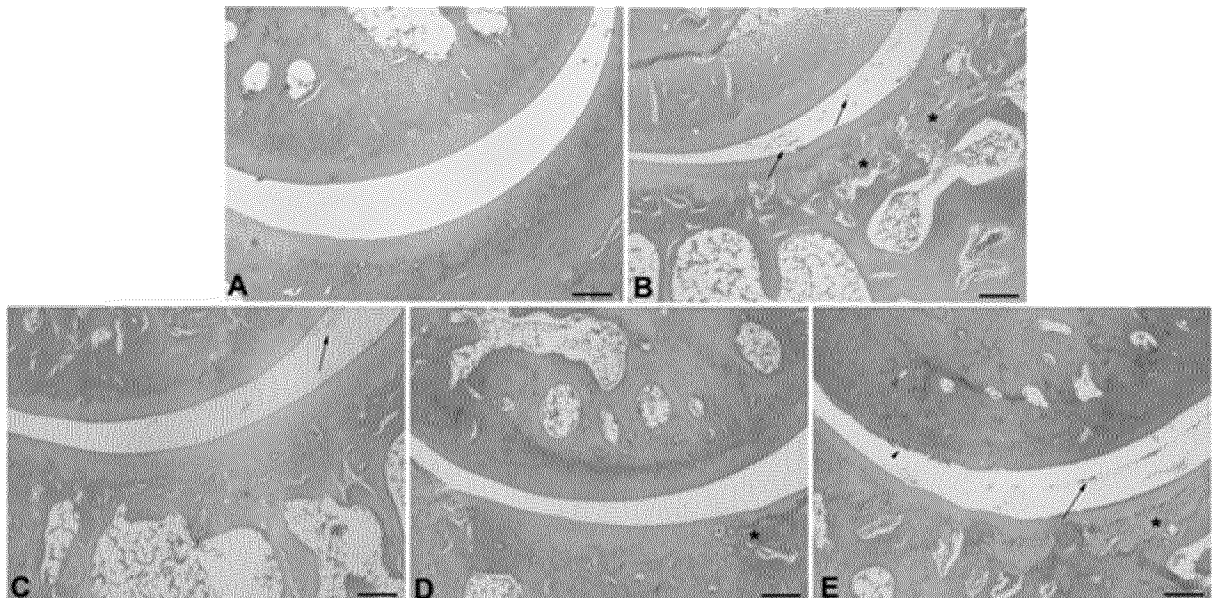
Фиг. 1 А-С



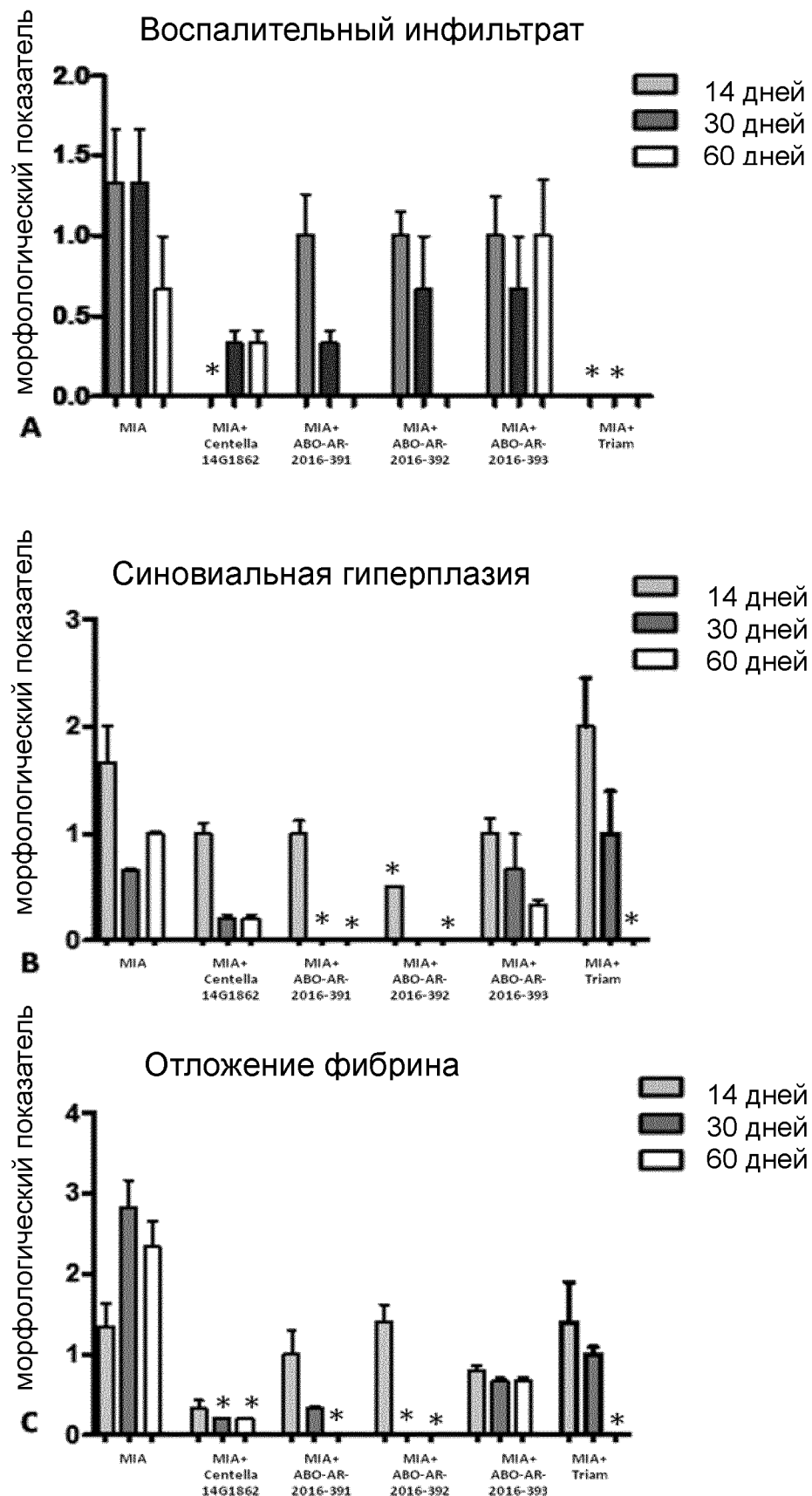
Фиг. 1 D-F



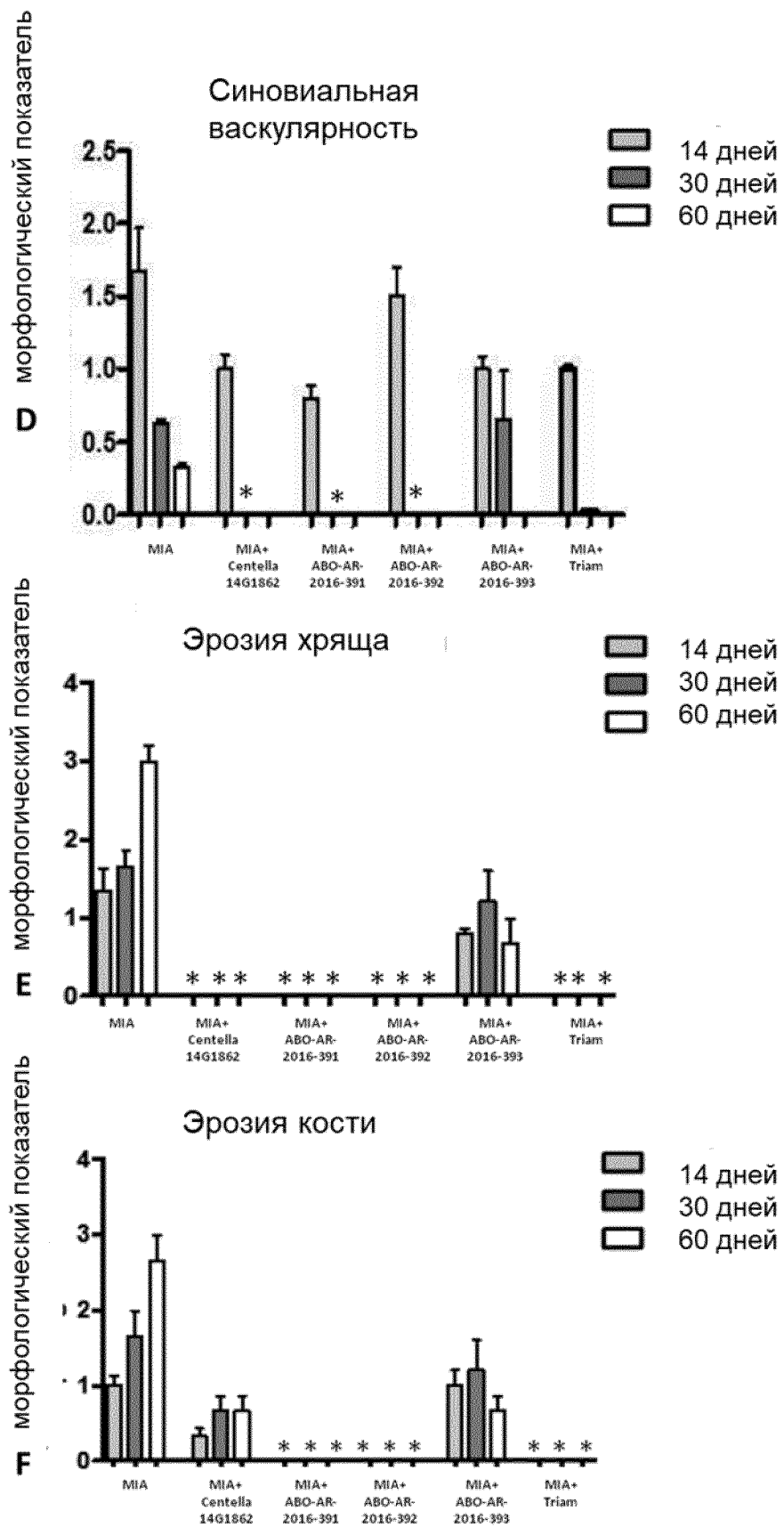
Фиг. 1 G



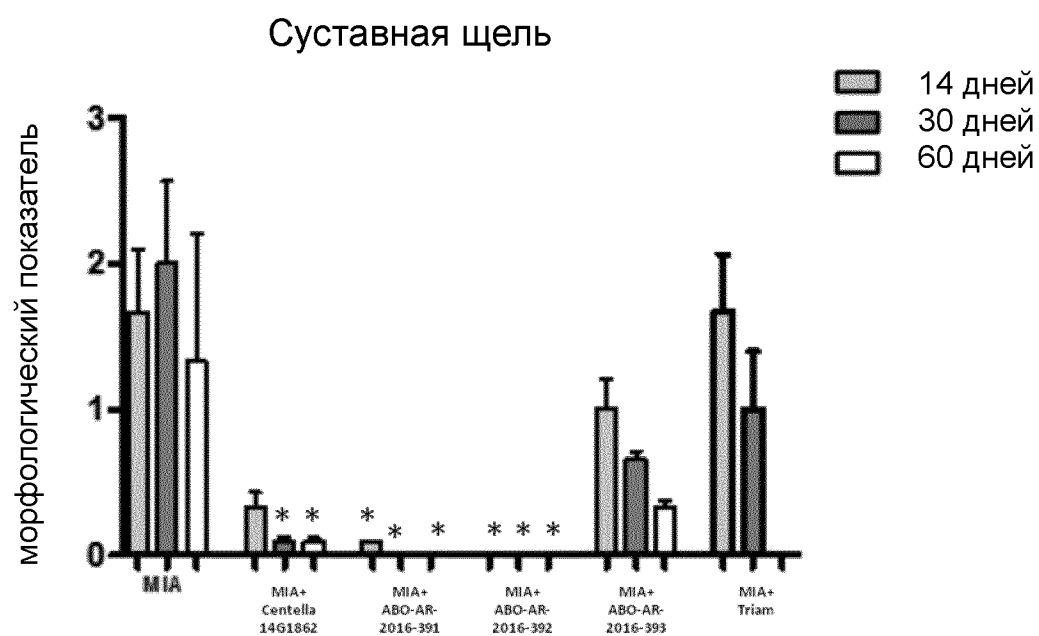
Фиг. 2



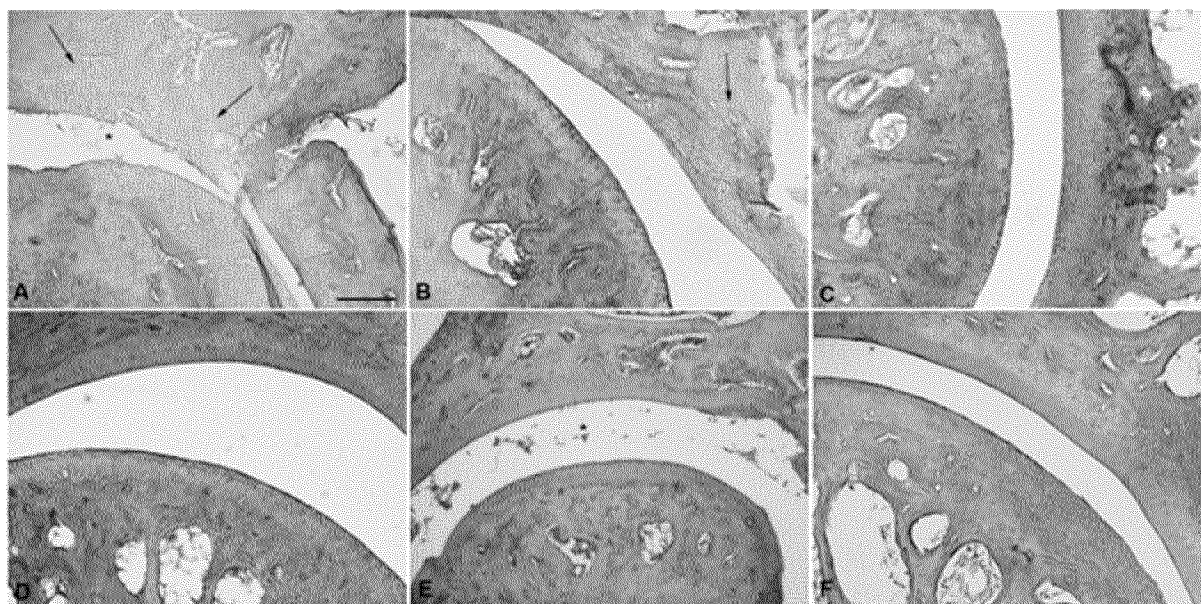
Фиг. 3 А-С



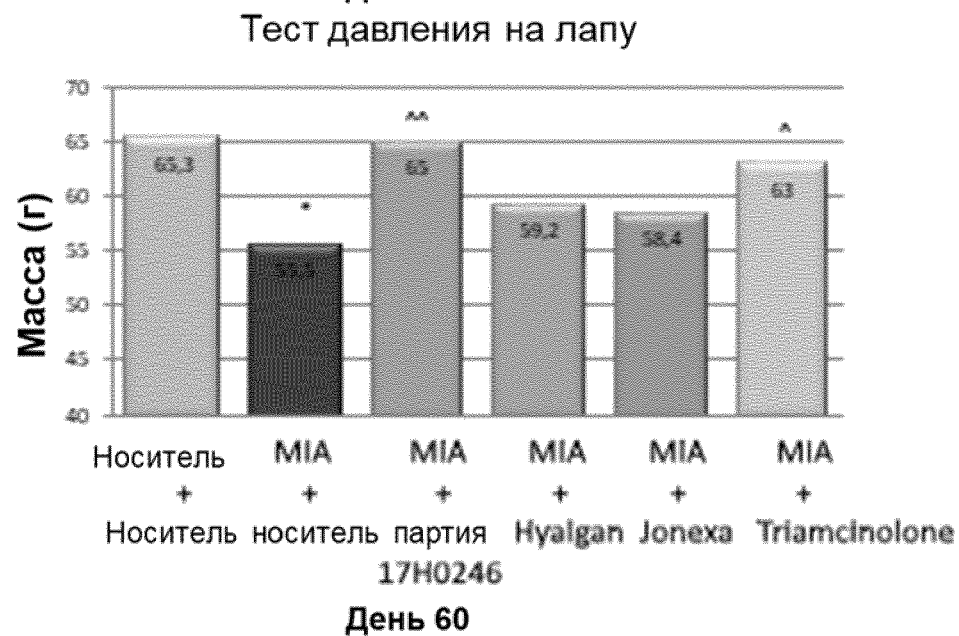
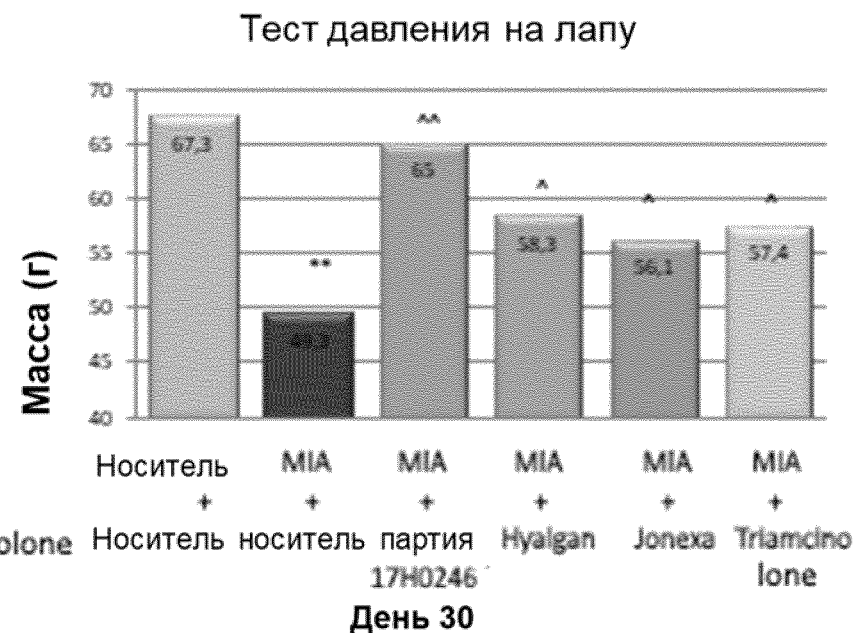
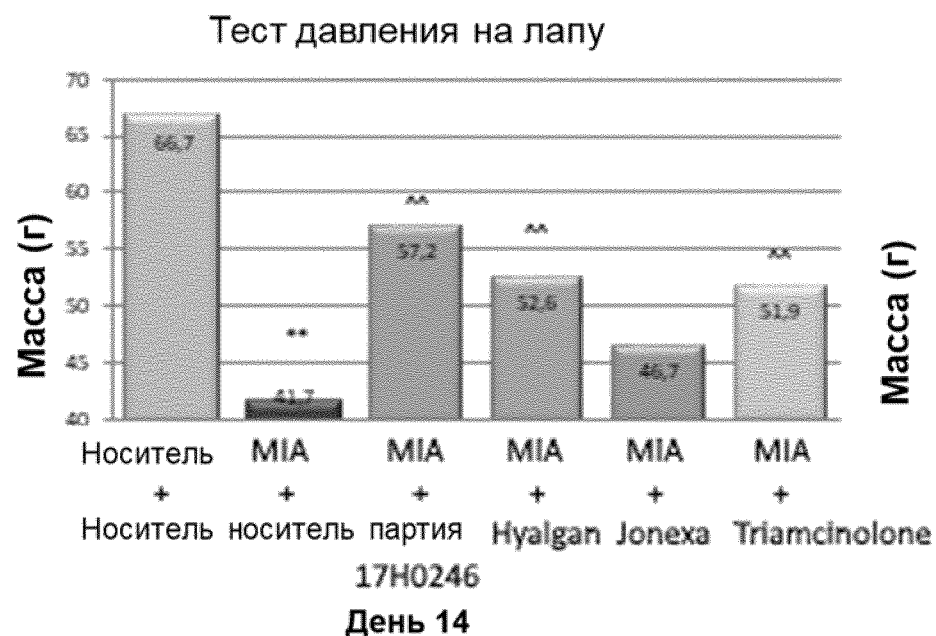
Фиг. 3 D-E

**G**

Фиг. 3G



Фиг. 4

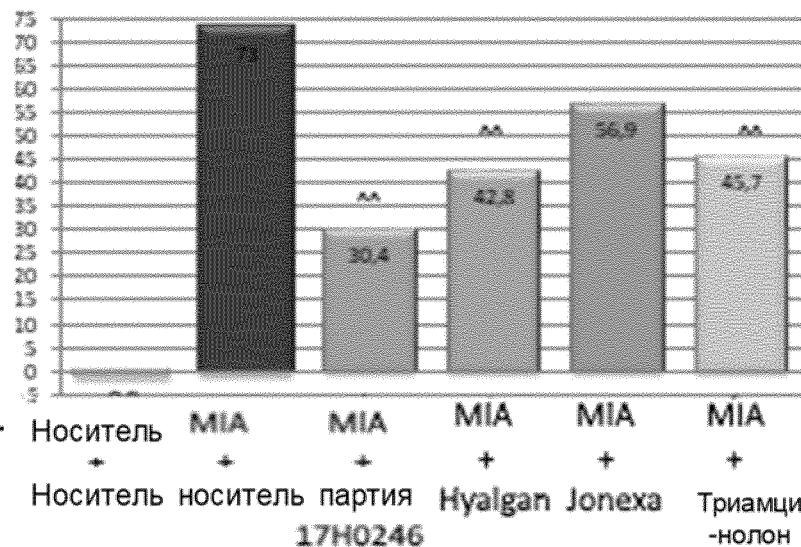


\*  $p < 0,05$  vs носитель носитель  
 \*\*  $p < 0,01$  vs носитель носитель  
 ^  $p < 0,05$  vs MIA+ носитель  
 ^^  $p < 0,01$  vs MIA+ носитель

ДАННЫЕ ИЗ ТАБЛИЦЫ 1

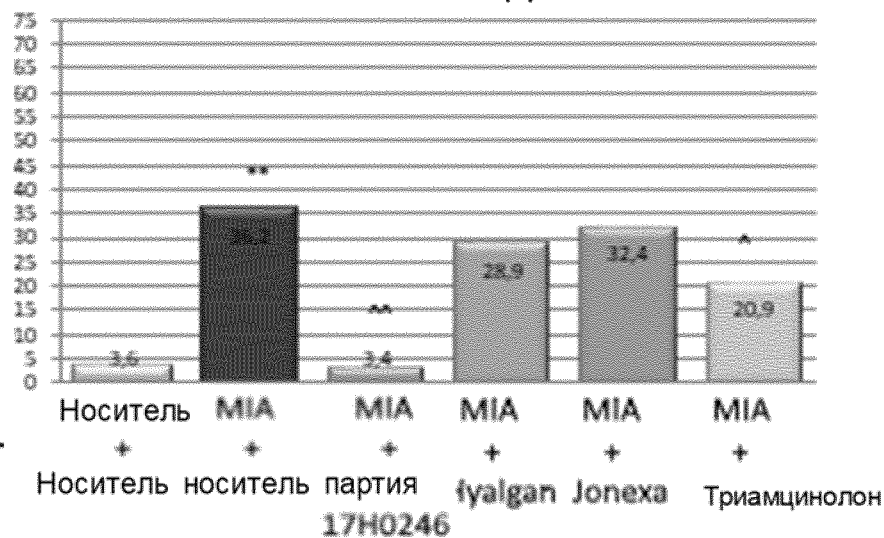
Разница в массе между контралатеральной и ипсилатеральной лапой

### Тест на инвалидность



День 14

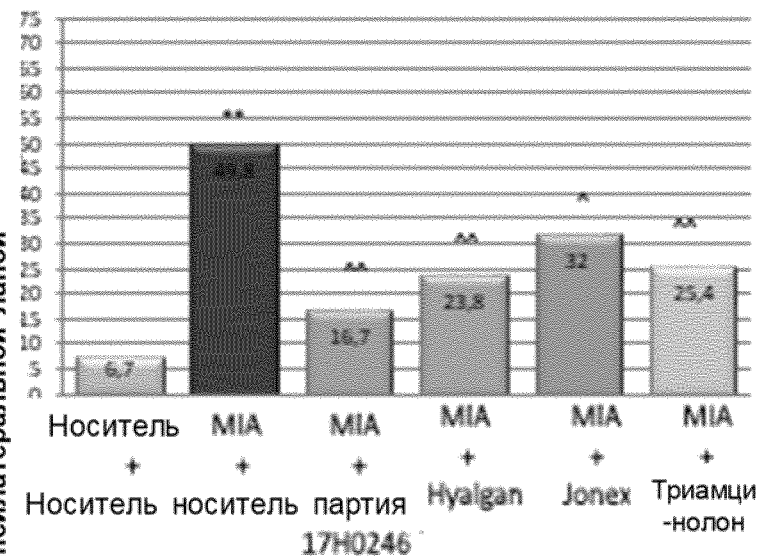
### Тест на инвалидность



День 60

Разница в массе между контралатеральной и ипсилатеральной лапой

### Тест на инвалидность



День 30

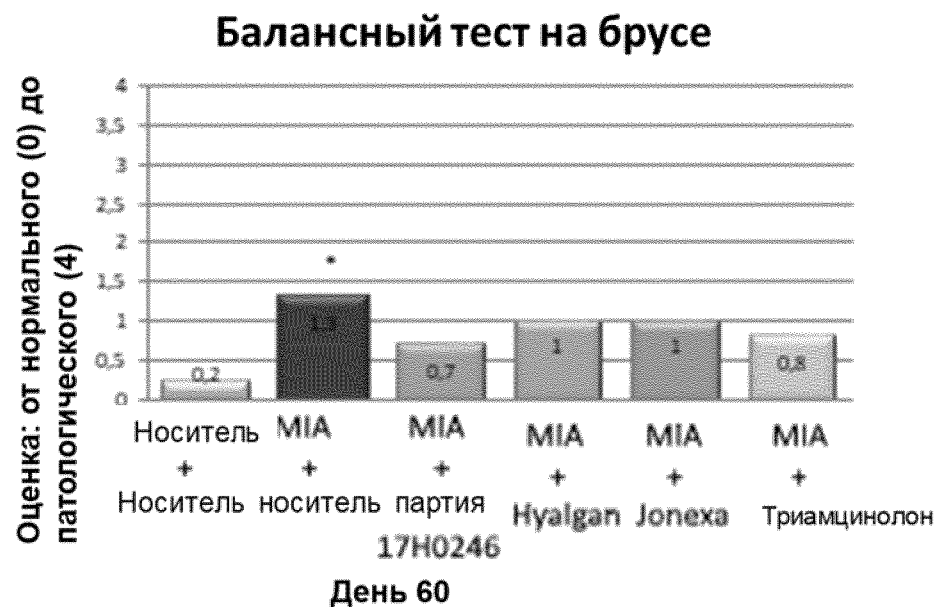
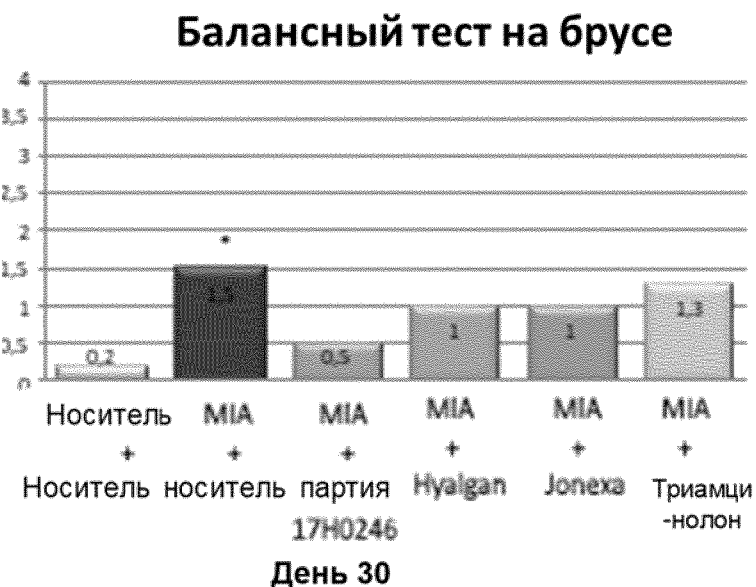
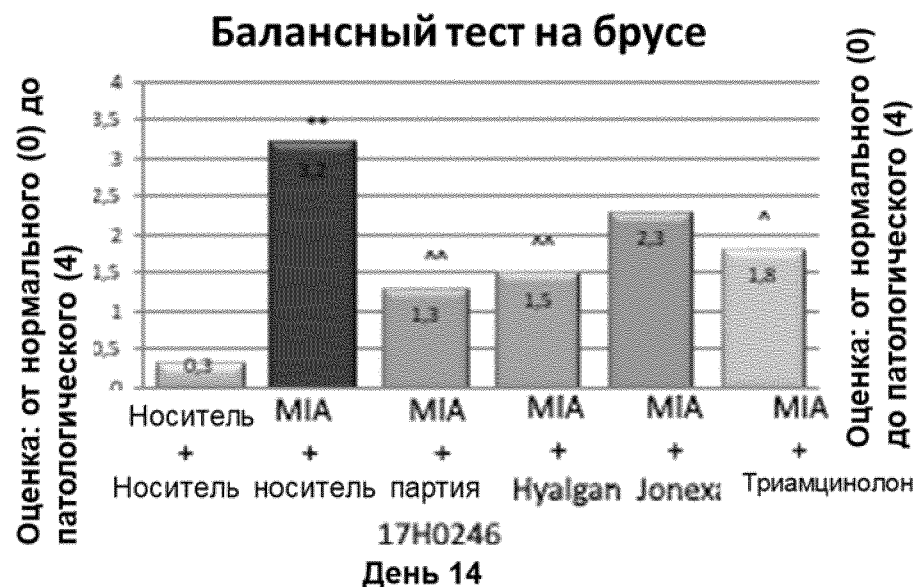
\*  $p < 0,05$  vs носитель носитель

\*\*  $p < 0,01$  vs носитель носитель

^  $p < 0,05$  vs MIA+ носитель

^^  $p < 0,01$  vs MIA+ носитель

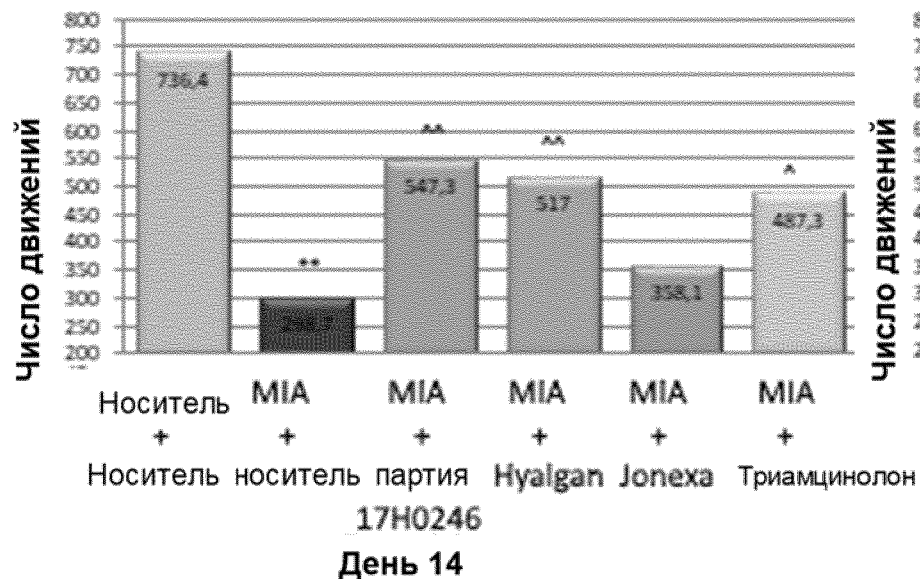
ДАННЫЕ ИЗ ТАБЛИЦЫ 2



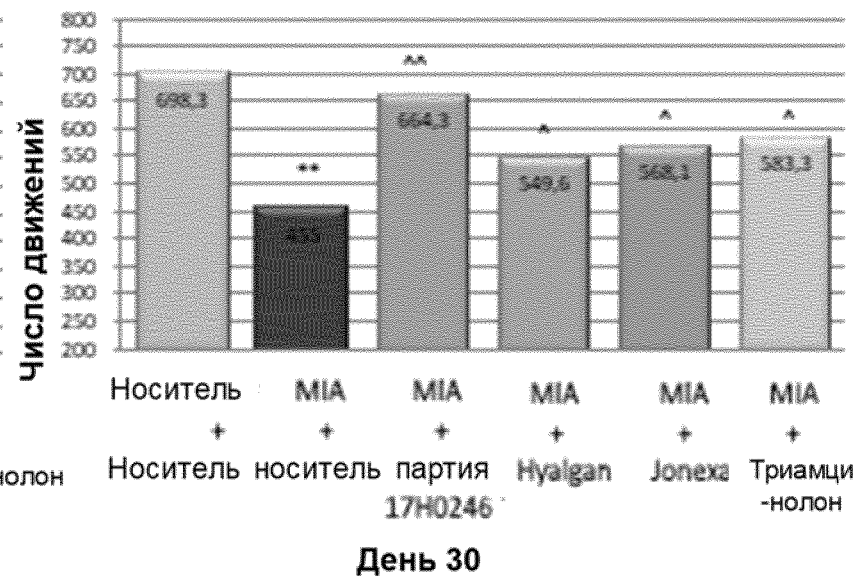
\*  $p < 0,05$  vs носитель носитель  
 \*\*  $p < 0,01$  vs носитель носитель  
 ^  $p < 0,05$  vs MIA+ носитель  
 ^^  $p < 0,01$  vs MIA+ носитель

ДАННЫЕ ИЗ ТАБЛИЦЫ 3

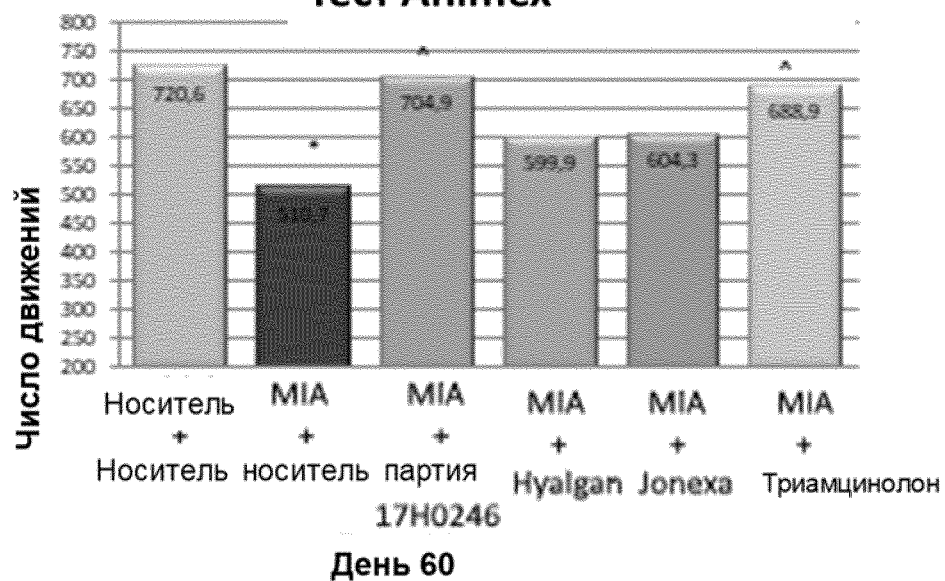
### Тест Animex



### Тест Animex



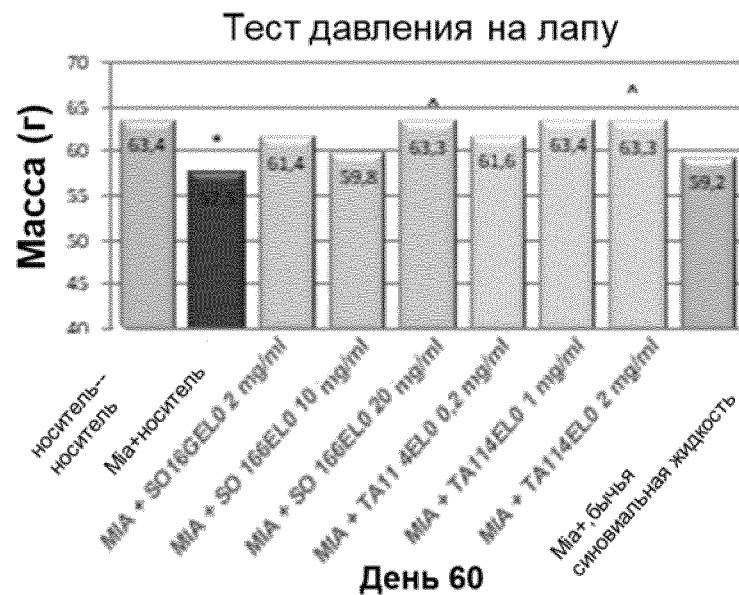
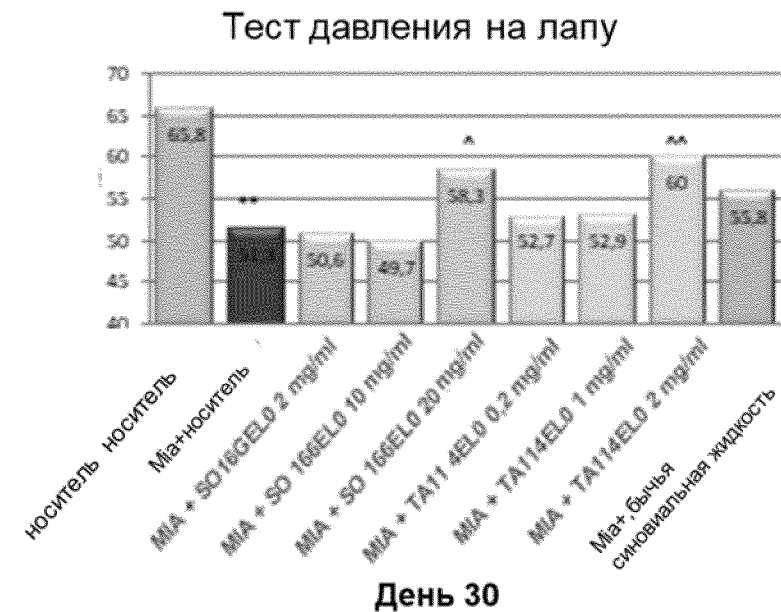
### Тест Animex



\*  $p < 0,05$  vs носитель носитель  
 \*\*  $p < 0,01$  vs носитель носитель  
 ^  $p < 0,05$  vs MIA+ носитель  
 ^^  $p < 0,01$  vs MIA+ носитель

ДАННЫЕ ИЗ ТАБЛИЦЫ 4

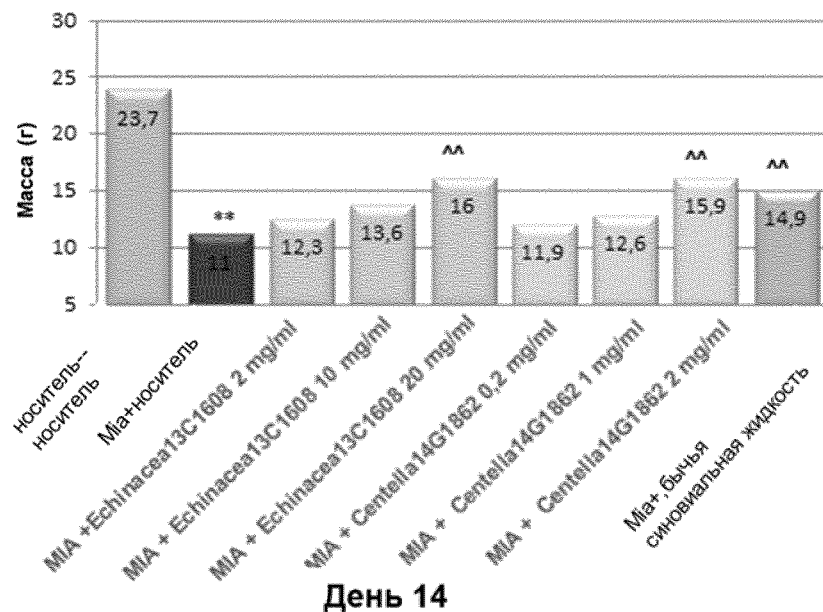
Фиг. 9



\*  $p < 0,05$  vs носитель носитель  
 \*\*  $p < 0,01$  vs носитель носитель  
 ^  $p < 0,05$  vs MIA+ носитель  
 ^^  $p < 0,01$  vs MIA+ носитель

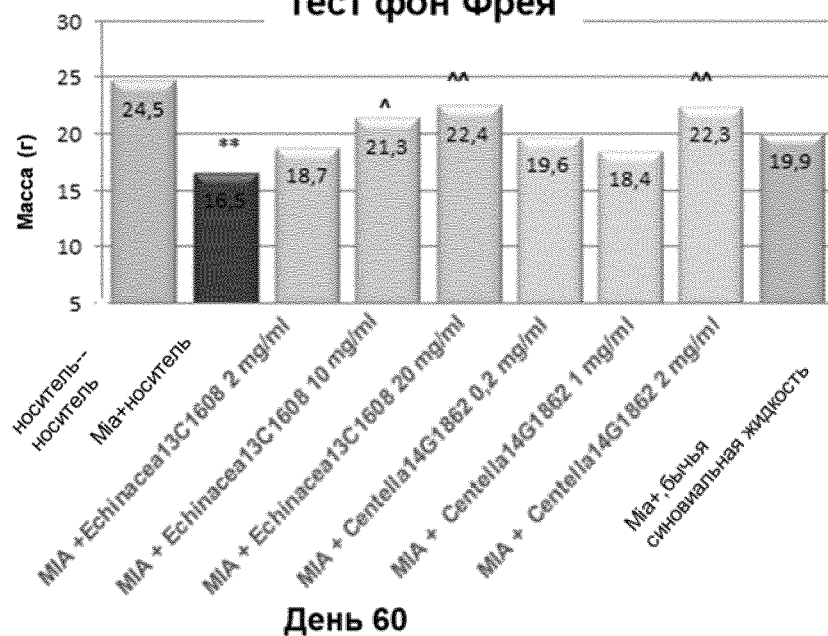
ДАННЫЕ ИЗ ТАБЛИЦЫ 5

## Тест фон Фрея



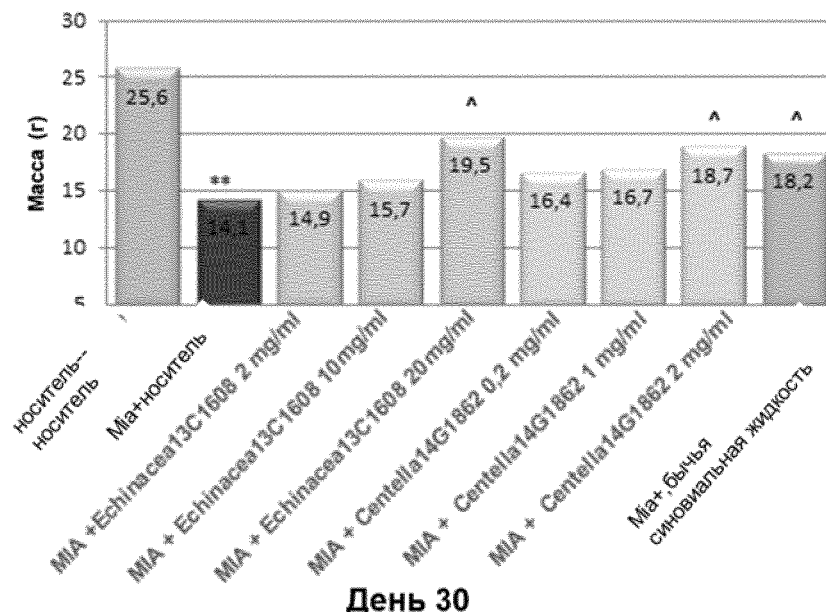
День 14

## Тест фон Фрея



День 60

## Тест фон Фрея

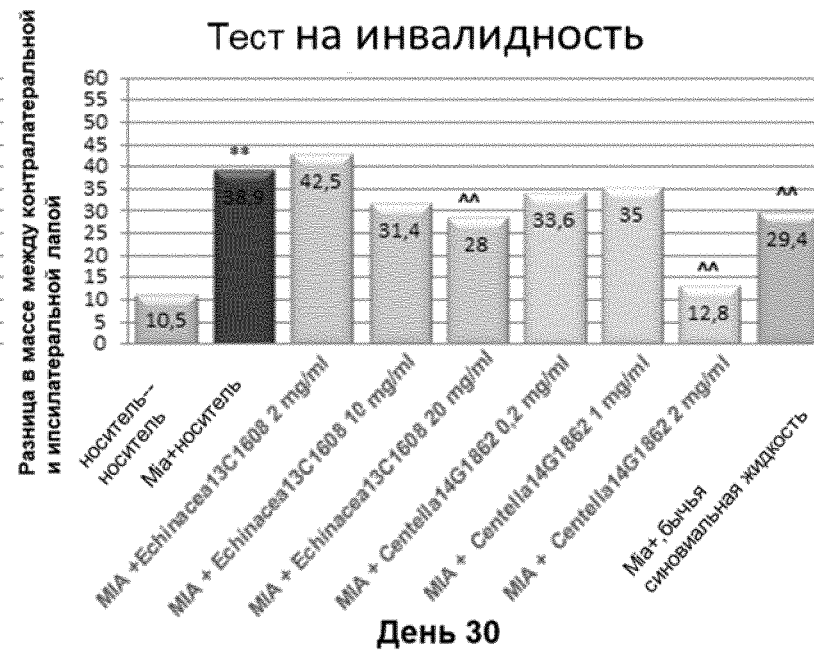
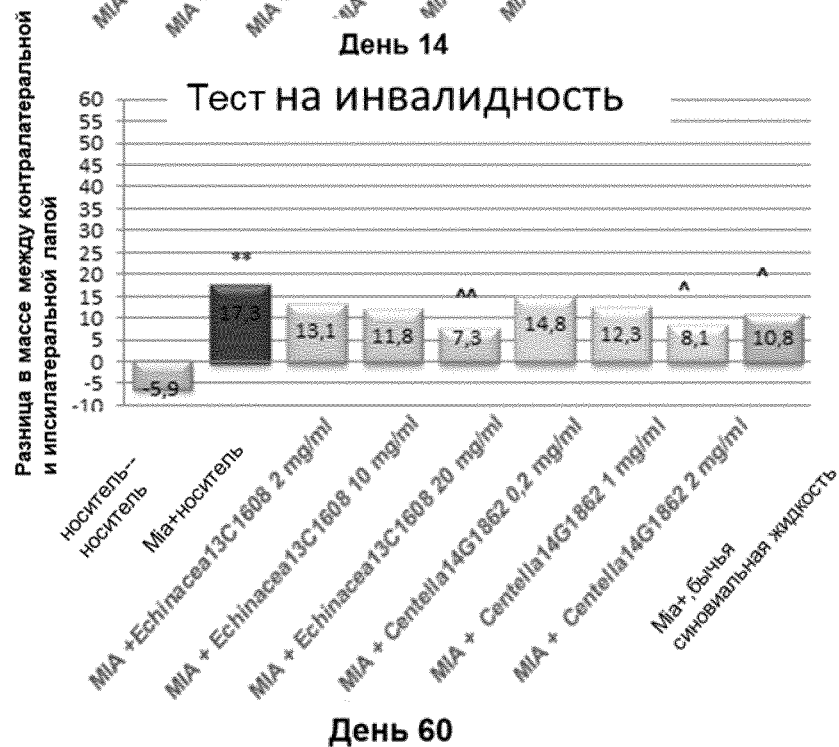
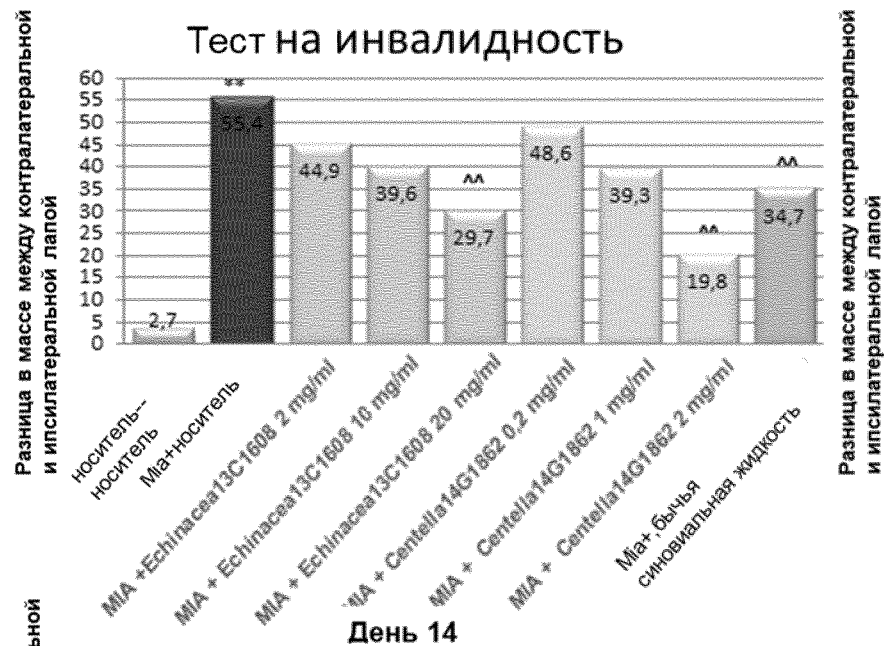


День 30

\*P<0,05 против носитель + носитель  
 \*\*P<0,01 против носитель + носитель  
 ^P<0,05 против MIA + носитель  
 ^^P<0,01 против MIA + носитель

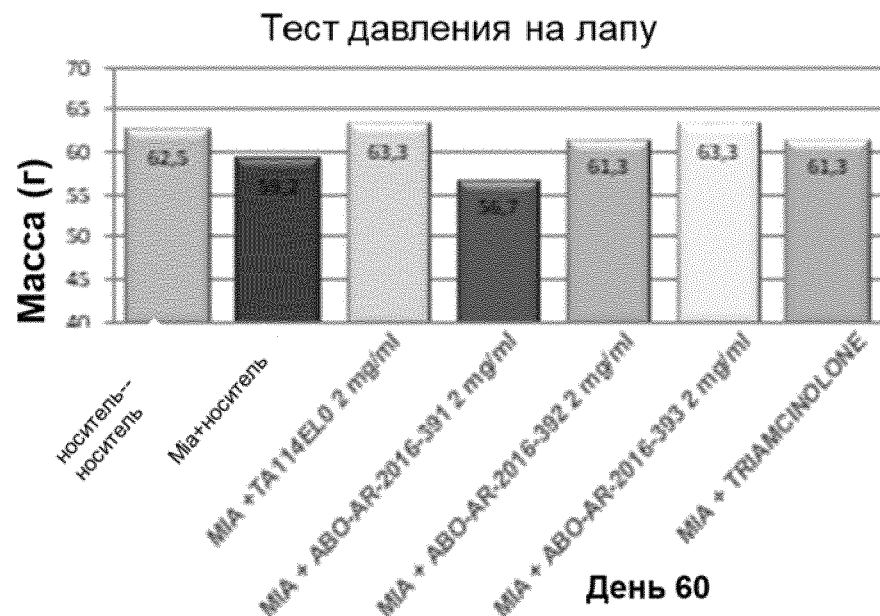
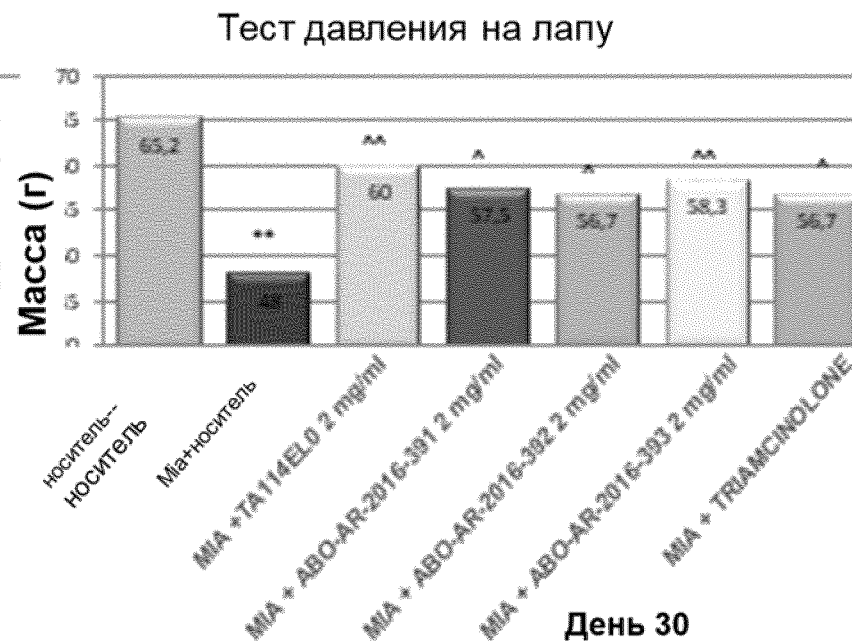
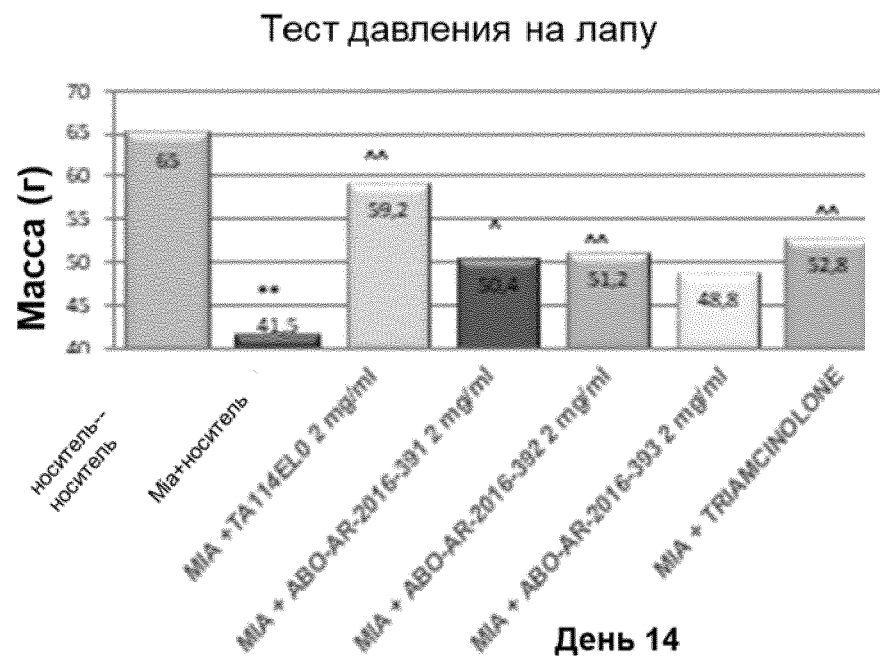
ДАННЫЕ ИЗ ТАБЛИЦЫ 6

Фиг. 11



\*P<0,05 против носитель + носитель  
 \*\*P<0,01 против носитель + носитель  
 ^P<0,05 против MIA + носитель  
 ^^P<0,01 против MIA + носитель

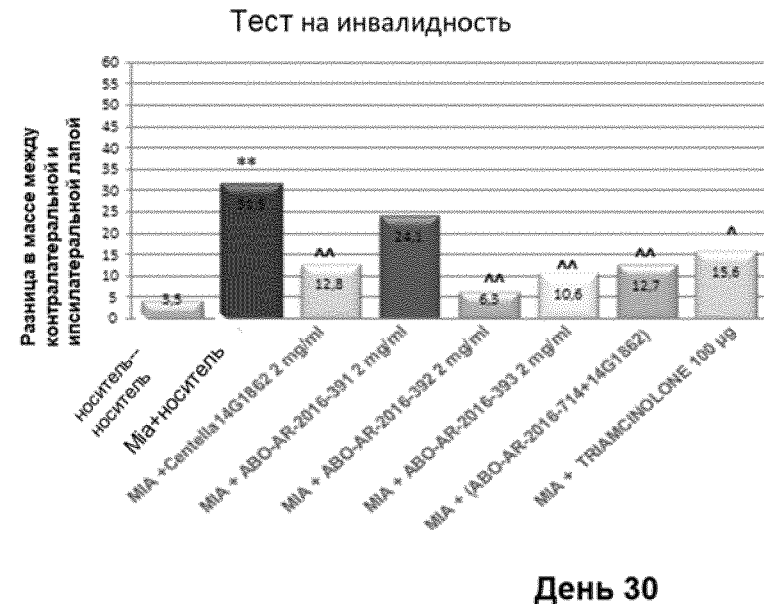
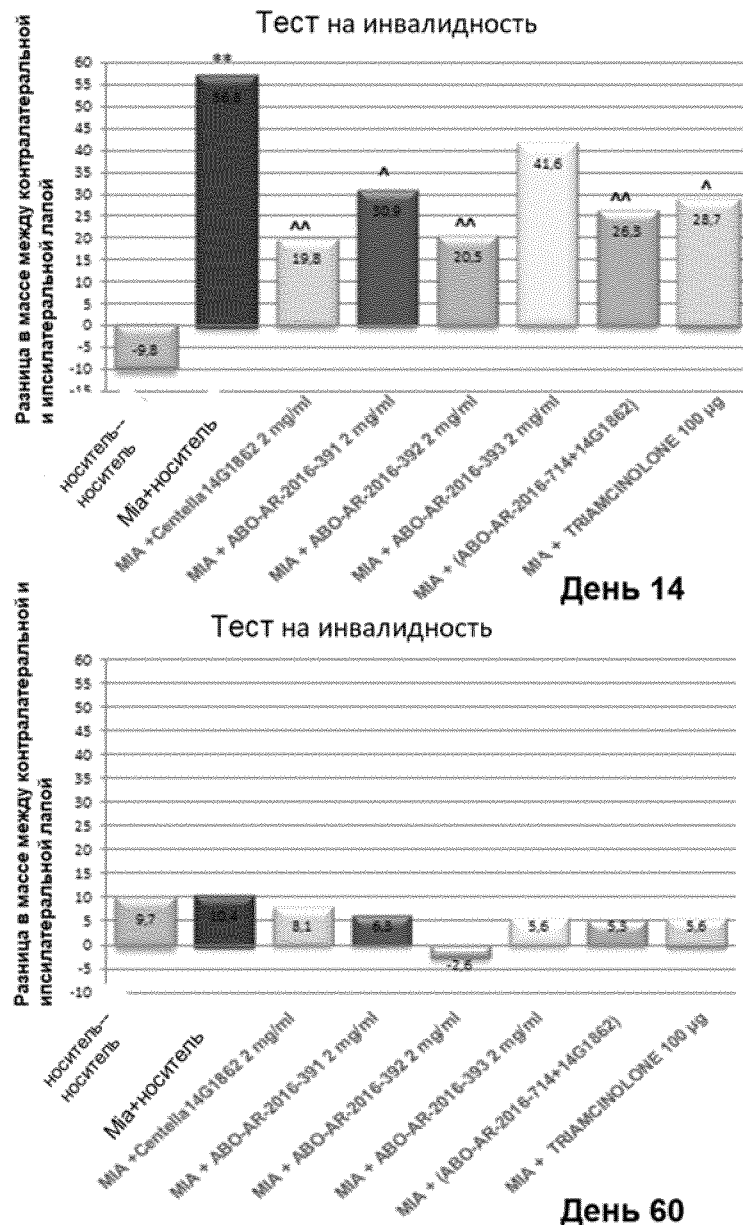
ДАнные ИЗ ТАБЛИЦЫ 7



\*P<0,05 против носитель + носитель  
 \*\*P<0,01 против носитель + носитель  
 ^P<0,05 против MIA + носитель  
 ^^P<0,01 против MIA + носитель

ДАННЫЕ ИЗ ТАБЛИЦЫ 8

Фиг. 13

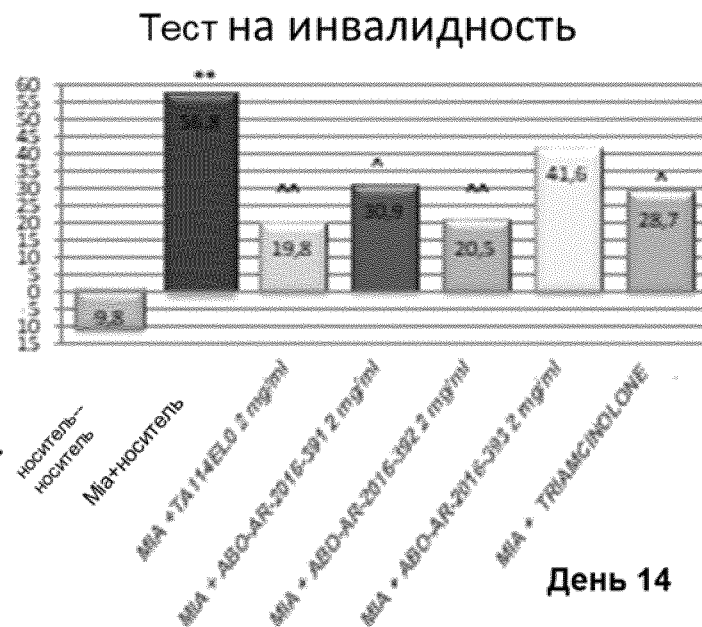


\*P<0,05 против носитель + носитель  
 \*\*P<0,01 против носитель + носитель  
 ^P<0,05 против MIA + носитель  
 ^^P<0,01 против MIA + носитель

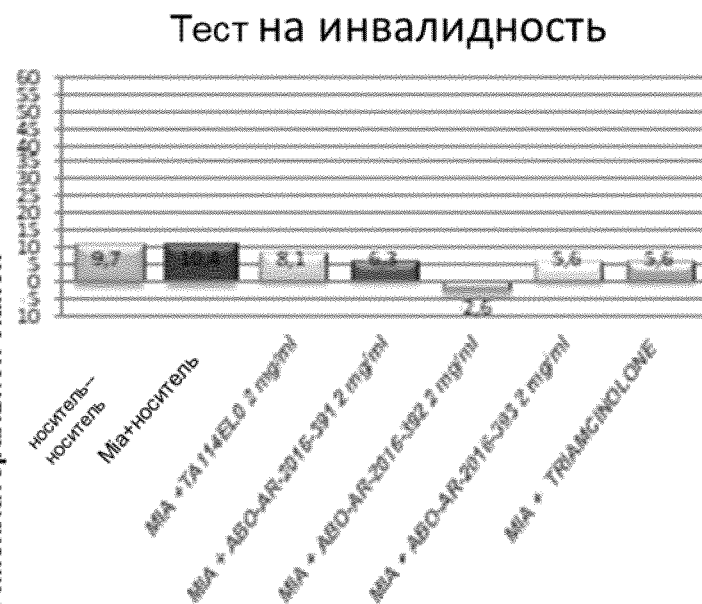
ДАННЫЕ ИЗ ТАБЛИЦЫ 9

Фиг. 14

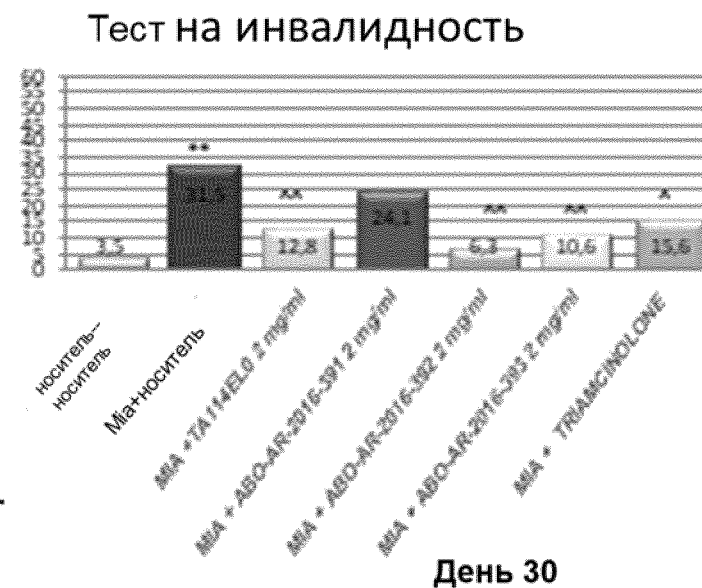
Разница в массе между контралатеральной и ипсилатеральной лапой



Разница в массе между контралатеральной и ипсилатеральной лапой



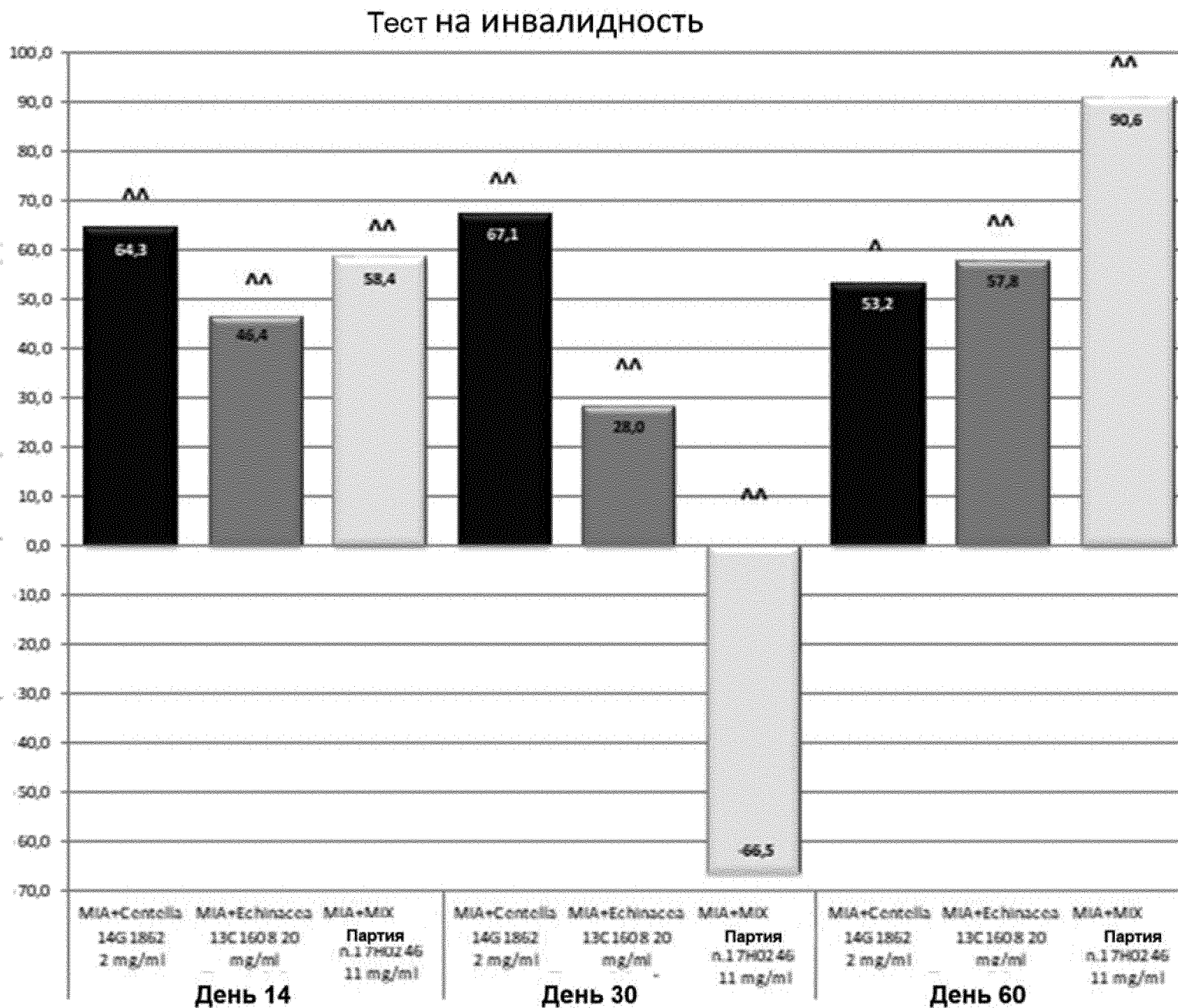
Разница в массе между контралатеральной и ипсилатеральной лапой



\*P<0,05 против носитель + носитель  
 \*\*P<0,01 против носитель + носитель  
 ^P<0,05 против МИА + носитель  
 ^^P<0,01 против МИА + носитель

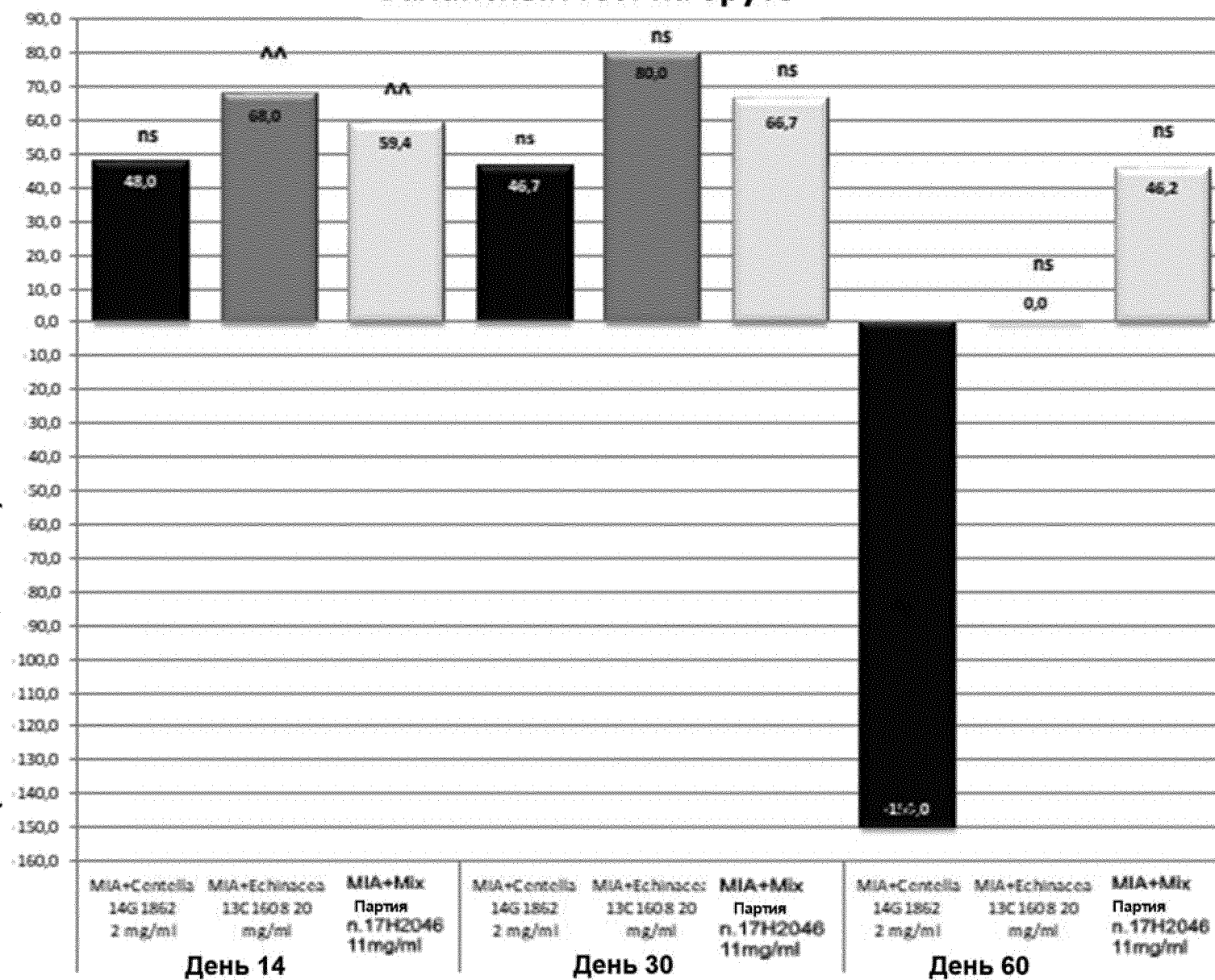
ДАННЫЕ ИЗ ТАБЛИЦЫ 9

% улучшения по сравнению с необработанным  
уменьшения дисбаланса масса на лапах)

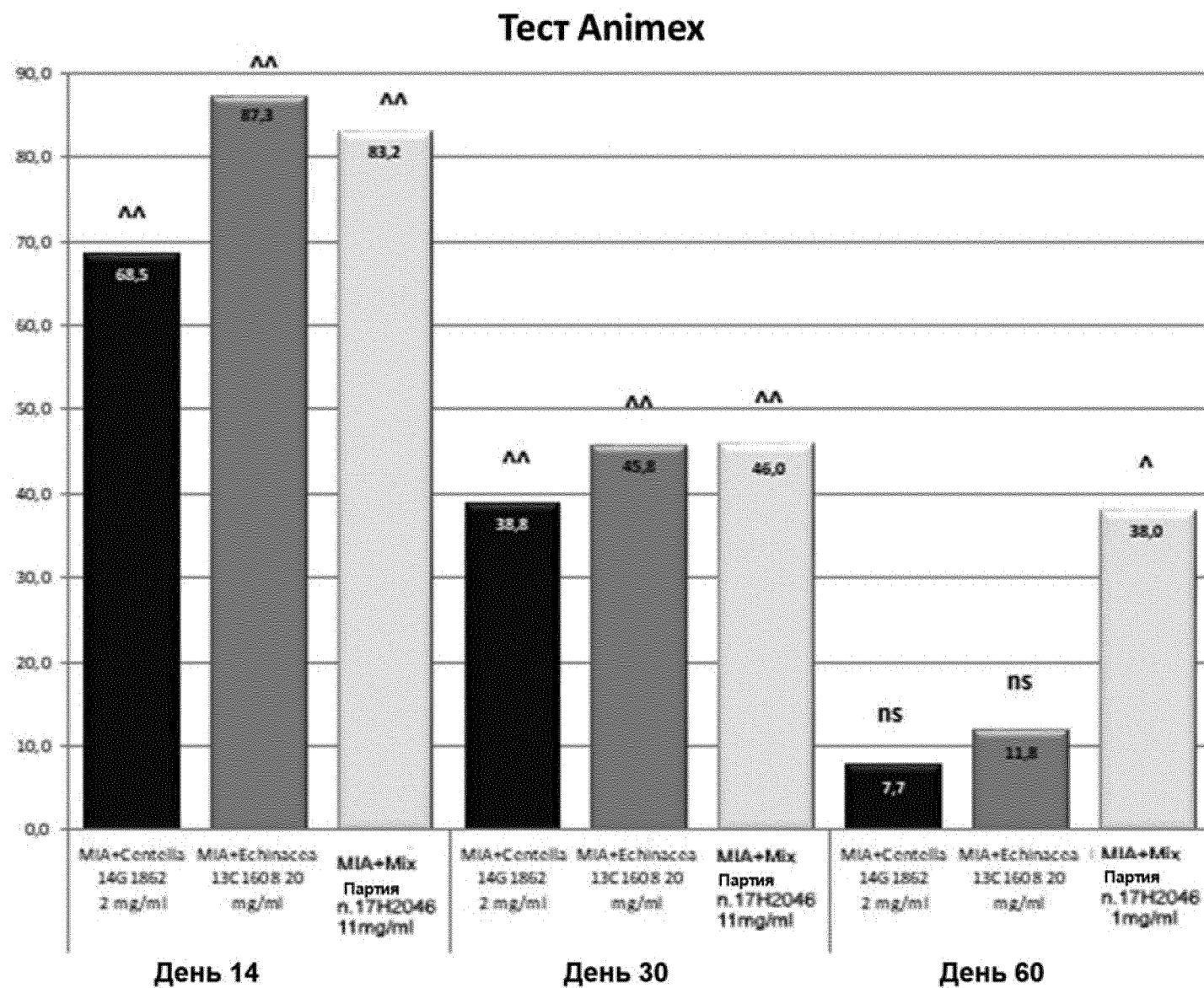


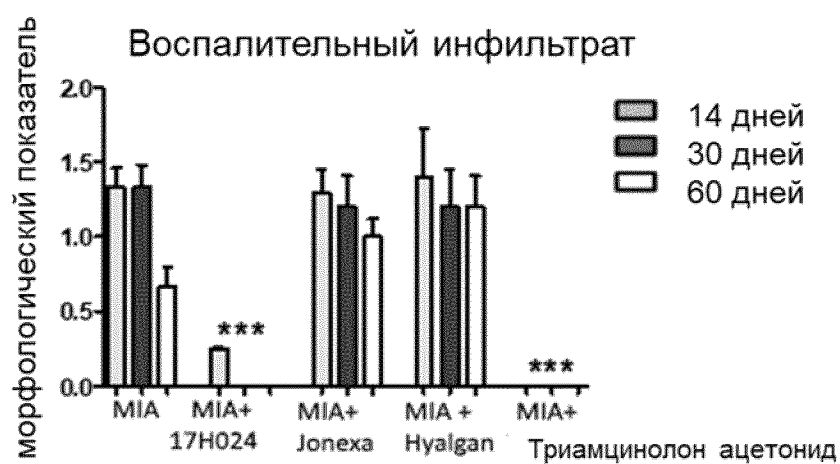
улучшения по сравнению с необработанным  
% (числа падений)

# Балансный тест на брус

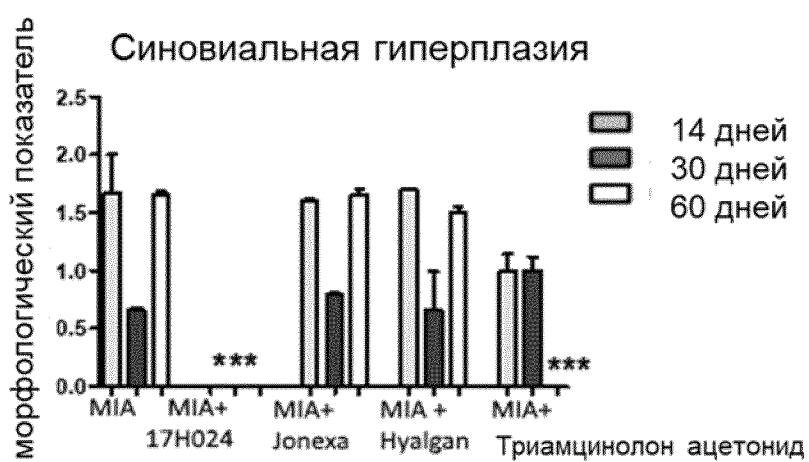


% улучшения по сравнению с необработанным  
(%увеличения в числе движений)

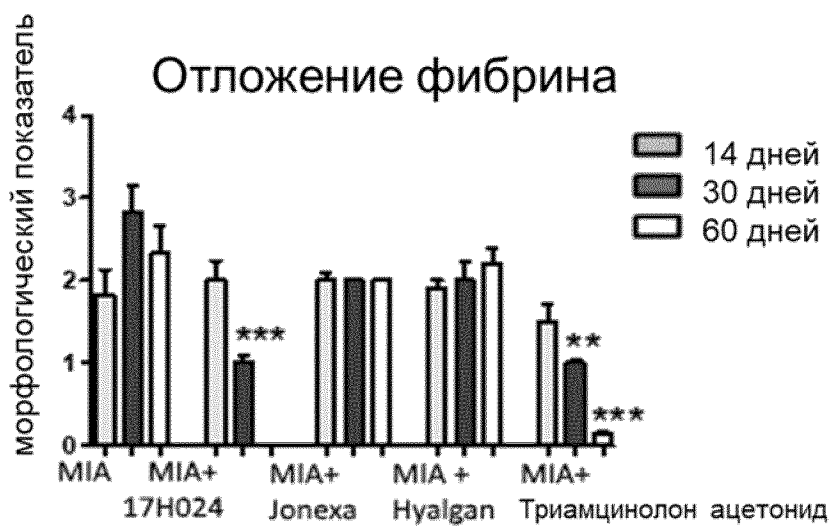




A



B

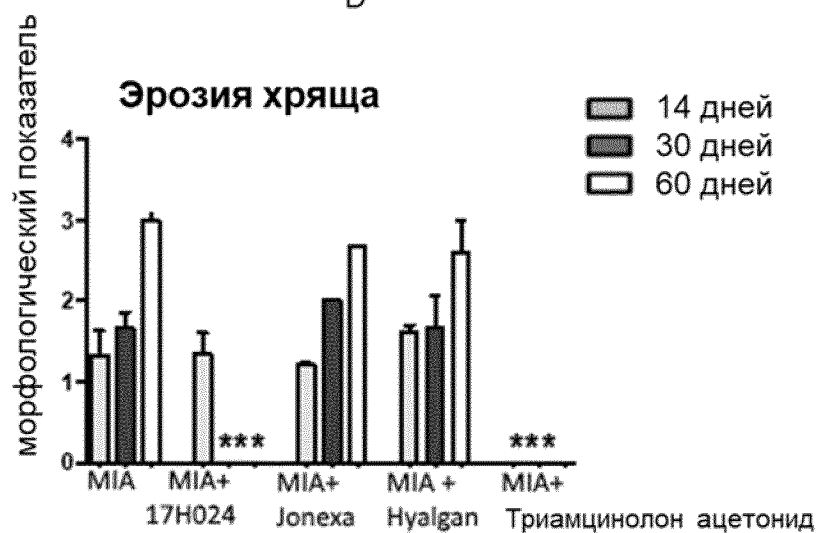


C

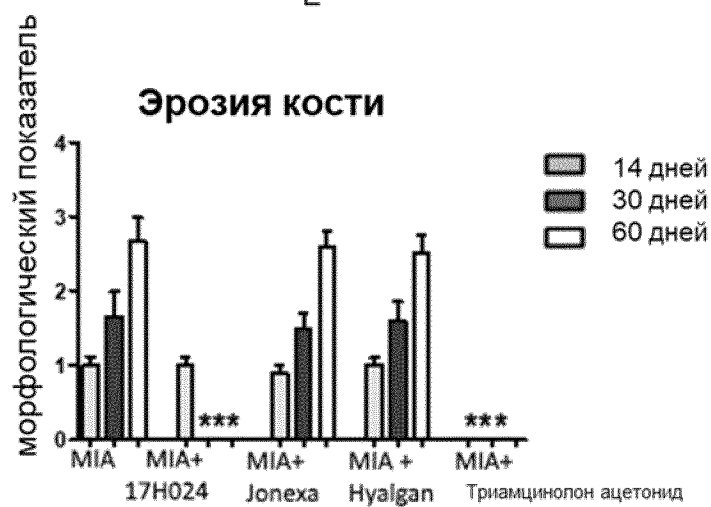
Фиг. 18 А-С



D

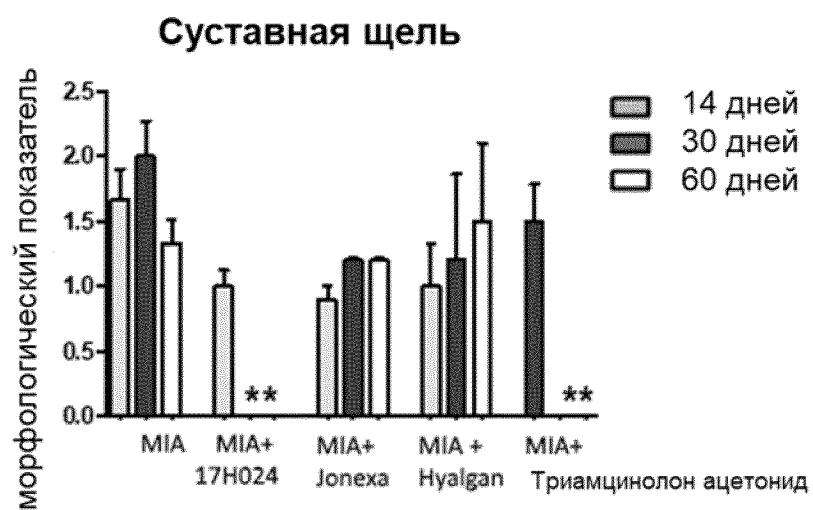


E

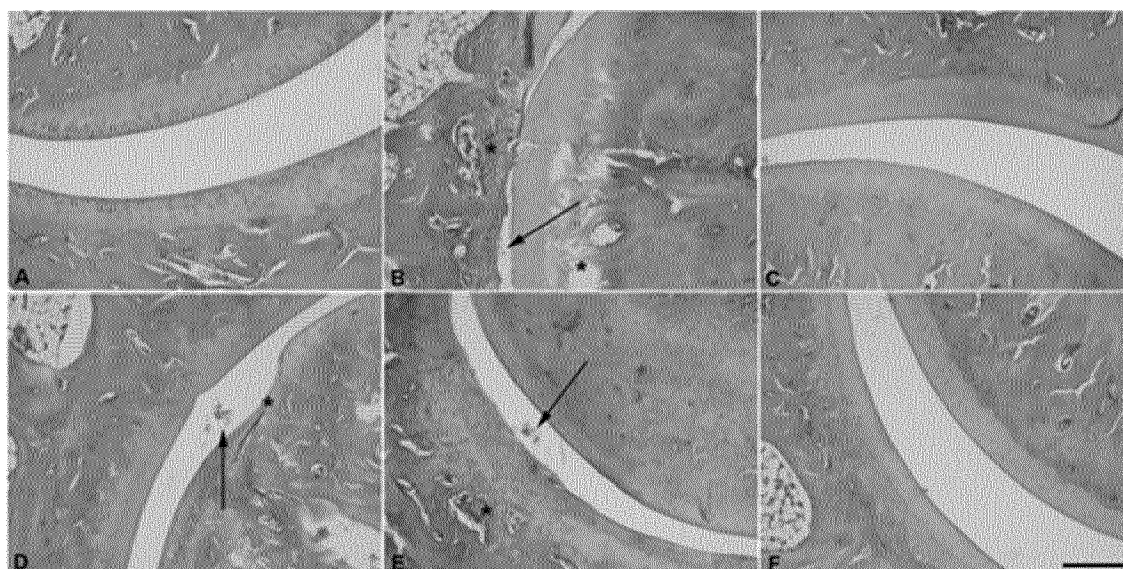


F

Фиг. 18 D-F



Фиг. 18 G



Фиг. 19