



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
*B01D 11/00 (2019.08)*

(21)(22) Заявка: 2019106608, 11.03.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
11.03.2019

Дата регистрации:  
03.12.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 11.03.2019

(45) Опубликовано: 03.12.2019 Бюл. № 34

Адрес для переписки:

690068, Приморский край, г. Владивосток, ул.  
Кирова, 31, кв. 68, Кравцовой Юлии Юрьевне

(72) Автор(ы):

Сидоренко Марина Леонидовна (RU),  
Дмитренко Павел Сергеевич (RU),  
Горбач Владимир Иванович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки "Федеральный научный  
центр биоразнообразия наземной биоты  
Восточной Азии" Дальневосточного  
отделения Российской академии наук (ФНЦ  
Биоразнообразия ДВО РАН) (RU),  
Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Тихоокеанский институт  
биоорганической химии им. Г.Б. Елякова  
Дальневосточного отделения Российской  
академии наук (ТИБОХ ДВО РАН) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: RU 2330676 C1, 10.08.2008.

АЙРАПЕТОВА А.Ю., и др., Выделение и  
идентификация агарициновой кислоты из  
мицелия *Fomitopsis officinalis* (vill.Fr.) bond et  
sing., Химия растительного сырья, N2, 2013,  
с101-106, Doi: 10/14258/jcprm.1302101. RU  
2619551 C1, 16.05.2017.

(54) Способ получения агарициновой кислоты из мицелия трутовика лекарственного

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Изобретение представляет собой способ получения агарициновой кислоты из глубинно культивированного мицелия гриба трутовика лекарственного (*Fomitopsis of ficinalis* Will. Bond. Et Sing.), путем экстракции изопропиловым спиртом при соотношении сырья и экстрагента, равном 1 г сырья на 50-60 мл экстрагента, при кипячении и перемешивании в течение не менее 6 часов, полученную смесь охлаждают, фильтруют и остаток повторно

экстрагируют при соотношении сырья и экстрагента 1 г сырья на 25-30 мл экстрагента, при кипячении и перемешивании в течение не менее 6 часов, полученную смесь охлаждают, фильтруют, полученные экстракты упаривают при температуре не выше +50°C до постоянной массы. Заявляемый способ позволяет упростить процесс, повысить выход агарициновой кислоты, обеспечивает получение целевого продукта с высокой степенью чистоты. 4 ил., 2 пр.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11)**2 708 034**<sup>(13)</sup> **C1**(51) Int. Cl.  
*B01D 11/00* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(52) CPC  
*B01D 11/00* (2019.08)(21)(22) Application: **2019106608, 11.03.2019**(24) Effective date for property rights:  
**11.03.2019**Registration date:  
**03.12.2019**

Priority:

(22) Date of filing: **11.03.2019**(45) Date of publication: **03.12.2019 Bull. № 34**

Mail address:

**690068, Primorskiy kraj, g. Vladivostok, ul. Kirova,  
31, kv. 68, Kravtsovoj Yulii Yurevne**

(72) Inventor(s):

**Sidorenko Marina Leonidovna (RU),  
Dmitrenok Pavel Sergeevich (RU),  
Gorbach Vladimir Ivanovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe  
uchrezhdenie nauki "Federalnyj nauchnyj tsentr  
bioraznoobraziya nazemnoj bioty Vostochnoj  
Azii" Dalnevostochnogo otdeleniya Rossijskoj  
akademii nauk (FNTS Bioraznoobraziya DVO  
RAN) (RU),  
Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe  
uchrezhdenie nauki Tikhookeanskij institut  
bioorganicheskoj khimii im. G.B. Elyakova  
Dalnevostochnogo otdeleniya Rossijskoj  
akademii nauk (TIBOKH DVO RAN) (RU)**(54) **METHOD OF PRODUCING AGARICIC ACID FROM A MYCELIUM OF A FOMES FOMENTARIUS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention represents a method for producing agaricic acid from deep cultivated mycelium mushroom of *Fomes fomentarius* (*Fomitopsis of ficinalis* Will. Bond. Et Sing.), by extraction with isopropyl alcohol at ratio of raw material and extractant equal to 1 g of raw material per 50–60 ml of extractant, during boiling and stirring for at least 6 hours, obtained mixture is cooled, filtered and residue is repeatedly

extracted at ratio of raw material and extraction agent 1 g of raw material to 25–30 ml of extractant, during boiling and stirring for at least 6 hours, obtained mixture is cooled, filtered, obtained extracts are evaporated at temperature not higher than +50 °C to constant weight.

EFFECT: disclosed method simplifies the process, increases output of agaricic acid, enables to obtain the desired product with high degree of purity.

1 cl, 4 dwg, 2 ex

C 1  
2 7 0 8 0 3 4  
R UR U  
2 7 0 8 0 3 4  
C 1

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, а именно к способам выделения биологически активных веществ из растительного сырья, в частности к технологии получения агарициновой кислоты.

Агарициновая кислота используется для проведения анализа и получения лекарственных препаратов [Garcia, N. Agaric acid induces mitochondrial permeability transition through its interaction with the adenine nucleotide translocase. Its dependence on membrane fluidity. / Garcia N., Zazueta C., Pavon N., Chavez E. // Mitochondrion. - 2005. - V.5. - Is. 4. - P.272-281; Chavez, E. The effect of agaric on citrate transport in rat liver mitochondria. / Chavez E., Chavez R., Carrasco N. // Life Sciences. - 1978. - V.23. - Is. 14. - P.1423-1429].

Известен способ комплексной переработки гриба трутовика лекарственного (*Fomitopsis officinalis* Will., сем. трутовиковых - Polyporaceae, класс базидиомицетов - Basidiomycetes), который характеризуется тем, что исходное сырье измельчают, затем подвергают трехступенчатой экстракции в аппарате Сокслета при 25-кратном избытке органического растворителя в течение 5-6 часов с последующей отгонкой растворителя, при этом на первой ступени экстракцию осуществляют гексаном, на второй ступени - этилацетатом, на третьей ступени - метиловым спиртом, далее остаток, полученный после экстракции метиловым спиртом, экстрагируют водой при 4-8-кратном избытке экстрагента в течение 4-х часов, фильтруя и повторяя экстракцию еще три раза, далее к нерастворимому остатку добавляют 6%-ный раствор гидроксида натрия при весовом соотношении остаток : гидроксид натрия, равном 1:10, смесь нагревают в течение 5-6 часов, охлаждают, фильтруют и промывают водой, к полученному осадку добавляют 2%-ный водный раствор хлористого водорода, при соотношении остаток : раствор хлористого водорода, равном 1:10, смесь нагревают в течение 5-6 часов, охлаждают, фильтруют и осадок промывают водой. (Патент RU № 2619551, МПК А61К 36/06, В01D 11/00, опубл. 16.05.2017).

Недостатками способа являются: сложность и многоэтапность экстракции, использование большого набора реагентов, использование природного сырья (плодовых тел гриба), незначительный выход агарициновой кислоты (20,0-24,0% с примесями каротиноидов, биофлавоноидов, витамина К).

Известен способ получения агарициновой кислоты из гриба трутовика лекарственного (*Fomitopsis of ficinalis* Will. Bond. Et Sing.). Способ основан на том, что сырье сначала экстрагируют сжиженным диоксидом углерода с выделением углекислотного экстракта, содержащего эфирное масло, жирные ненасыщенные кислоты, каротиноиды, витамины Е, А и стерины, затем остаток экстрагируют диэтиловым эфиром при температуре 34-36°C в течение 2-3 часов с выделением экстракта, содержащего агарициновую кислоту и липидно-каротиноидный комплекс (Патент RU № 2257222, МПК А61К 35/84, опубл. 27.07.2005).

К недостаткам способа следует отнести: использование экстракции диоксидом углерода, требующей сложного герметичного оборудования, использование дорогостоящего диэтилового эфира в качестве растворителя, получение готового продукта с примесью липидно-каротиноидного комплекса.

Известен способ получения экстрактов из мицелия лекарственных грибов (в том числе из *Fomitopsis of ficinalis* Will. Bond. Et Sing.) с помощью разных спиртов. Способ основан на том, что мицелий выращивают на зерне (рисе) или древесине в течение 30-180 дней, затем производят экстракцию смесью этанол-вода (50%) или другими спиртами в течение 14 дней. (Патент US20060171958A1, МПК А61К 36/09, опубл. 03.08.2006).

Однако данный способ не пригоден для получения агарициновой кислоты, поскольку газожидкостный анализ показал отсутствие агарициновой кислоты в экстракте.

Наиболее близким к заявляемому техническому решению является способ получения агарициновой кислоты из гриба трутовика лекарственного (*Fomitopsis officinalis* Will., семейство трутовиковых - Polyporaceae, класс базидиомицетов - Basidiomycetes). Способ включает измельчение гриба трутовика до размеров не более 3 мм, экстракцию 95%-ным этанолом при суммарном соотношении сырья и экстрагента 1:25 при нагревании на водяной бане при температуре +78°C до истощения сырья, упаривание полученного экстракта до суммарного соотношения сырья и экстракт 1 мас.ч. сырья : 6 об.ч. экстракта, с последующей выдержкой при температуре -4°C - -5°C, в течение 12 часов до образования осадка. Отделение осадка и промывание его на фильтре 95% этанолом при суммарном соотношении сырья : этанол 95% 1 мас.ч. осадка : 0,5 об.ч. этанола (температура этанола не более +5°C). В результате, получают техническую агарициновую кислоту, которая требует дальнейшей очистки. Полноту извлечения агарициновой кислоты контролируют хроматографическим методом.

С целью получения чистой агарициновой кислоты проводят дополнительную очистку. Для чего техническую агарициновую кислоту растворяют при нагревании, при +50 - +55°C, в 95% этаноле, взятом в соотношении агарициновая кислота : растворитель 1:10, охлаждают, выдерживают при -4°C - -5°C в течение 2 часов, отделяют осадок фильтрованием через стеклянный фильтр. Перекристаллизацию повторяют еще четыре раза - получают очищенную агарициновую кислоту. Полученный продукт высушивают в сушильном шкафу до постоянной массы при +50°C - +55°C (патент RU № 2330676, МПК А61К 36/074, опубл. 10.08.2008).

Недостатками способа являются: сложность и длительность процесса (около 5 суток), невысокий выход агарициновой кислоты (9,5 – 14,2%), необходимость проведения дополнительной очистки от примесей целевого продукта, использование для контроля полноты извлечения хроматографического метода, не позволяющего идентифицировать агарициновую кислоту быстро и с высокой степенью надежности.

Технической проблемой, решаемой изобретением является упрощение процесса, повышение выхода агарициновой кислоты, получение чистого целевого продукта, без примесей других веществ, удешевление процесса получения целевого продукта, а также сохранение биологических ресурсов.

Поставленная задача решается тем, что в известном способе получения агарициновой кислоты из мицелия гриба трутовика лекарственного (*Fomitopsis of ficinalis* Will. Bond. Et Sing.), включающем экстракцию сырья, согласно изобретению, в качестве сырья берут глубинно культивированный мицелий гриба трутовика лекарственного, экстракцию ведут изопропиловым спиртом при соотношении сырья и экстрагента равном 1 г сырья на 50-60 мл экстрагента, при кипячении и перемешивании в течение не менее 6 часов, полученную смесь охлаждают, фильтруют и остаток повторно экстрагируют при соотношении сырья и экстрагента 1 г сырья на 25-30 мл экстрагента, при кипячении и перемешивании в течение не менее 6 часов, полученную смесь охлаждают, фильтруют, полученные экстракты упаривают при температуре не выше +50°C до постоянной массы.

Важной отличительной особенностью нашего изобретения является сырье – мицелий гриба, выращенный глубинным способом. Заявителем не обнаружен ни один источник информации, описывающий способ получения агарициновой кислоты из мицелия гриба трутовика лекарственного (*Fomitopsis officinalis* Will., семейство трутовиковых - Polyporaceae, класс базидиомицетов - Basidiomycetes), культивированного глубинным методом. Применение мицелия позволяет оказаться от использования естественных ресурсов этого вида, так как он внесен во многие региональные Красные книги как

редкий исчезающий вид. В Дальневосточном федеральном округе как исчезающий вид  
лиственничная губка внесена в Красные книги Приморского края, Сахалинской области,  
Еврейской автономной области и Камчатки. Это один из видов трутовых грибов,  
который планируется включить и в очередное издание Красной книги России. Поэтому  
данная работа направлена на решение не только одной из приоритетных задач, стоящих  
перед отечественной наукой - "Химический и биологический синтез лекарственных  
средств и пищевых продуктов" (Постановление Правительства РФ N 2727/п-П8 от 21  
июля 1996 г.), - но и на решение фундаментальных вопросов сохранения биологического  
разнообразия путем разработки ресурсосберегающих технологий.

Более того, использование в качестве сырья мицелия гриба трутовика лекарственного  
позволяет также значительно упростить и сократить длительность процесса получения  
целевого продукта, а также обеспечивает получение целевого продукта высокой степени  
чистоты без применения дополнительной операции очистки.

Применение в качестве экстрагента изопропилового спирта не только обеспечивает  
упрощение, сокращение длительности процесса получения целевого продукта с высокой  
степени чистоты, но и значительно удешевляет его.

Проведение экстракции при соотношении сырья и экстрагента 1 г сырья на 50-60 мл  
экстрагента при кипячении и перемешивании не менее 6 часов позволяет довольно  
быстро извлечь основную массу агарициновой кислоты из сырья с высокой степенью  
чистоты. Экстракция изопропиловым спиртом в количестве менее 50 мл на 1 г сырья  
не обеспечивает высокий выход целевого продукта, а повышение количества  
изопропилового спирта более 60 мл на 1 г сырья уже не влияет на выход целевого  
продукта.

Проведение экстракции при перемешивании и кипячении менее 6 часов не приводит  
к извлечению целевого продукта с хорошим выходом.

С целью повышения степени извлечения агарициновой кислоты проводят повторную  
экстракцию остатка после проведения первой экстракции. Экстракцию, в этом случае,  
ведут при соотношении сырья и экстрагента 1 г сырья на 25-30 мл экстрагента при  
кипячении и перемешивании не менее 6 часов. Экспериментально установлено, что  
использование экстрагента в количестве менее 25 мл на 1 г сырья не приводит к  
дополнительному извлечению агарициновой кислоты, в то время как, проведение  
экстракции остатка экстрагентом в количестве более 30 мл на 1 г сырья практически  
не ведет к повышению выхода агарициновой кислоты, вследствие чего, является  
нецелесообразным.

Таким образом, отклонение от указанных в формуле изобретения параметров ведет  
либо к неполному выделению, либо к перерасходу сырья и экстрагента.

Для получения агарициновой кислоты предварительно получали исходное сырье  
мицелий гриба трутовика лекарственного известным методом.

Мицелий гриба получают глубинным культивированием в ферментере (Applikon  
Biotechnology, Нидерланды) на питательной среде следующего состава: глюкоза – 20.0  
г,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 3.5 г,  $\text{KCl}$  – 0.5 г,  $\text{K}_2\text{PO}_4$  – 1.0 г,  $\text{MgSO}_4$  – 0.5 г, пивное сусло 15° по Баллингу  
– 115.0 мл, вода – до 1 л. при соблюдении следующих условий: температура 25–28°C,  
скорость перемешивания 180 об/мин, в течение 14 суток. Более подробно метод  
получения мицелия описан в статье Sidorenko M.L., Semal V.A. Production of submerged  
mycelium of *Laricifomes officinalis* (Vill) Kotl.et Pouzar // World applied sciences journal. –  
2013. – Vol.23. – pp.685-689.

Изобретение иллюстрируется следующими фигурами:

- на фиг. 1 приведен MALDI TOF (МАЛДИ ВП МС) масс-спектр агарициновой

кислоты в режиме регистрации отрицательных ионов с использованием 2,5-дигидроксibenзойной кислоты в качестве матрицы. Депротонированная молекула агарициновой кислоты  $[M-H]^-$  представлена пиком с  $m/z$  415.3;

5 - на фиг. 2. представлен MALDI TOF/TOF (МАЛДИ ВП МС/МС) масс-спектр депротонированной молекулы агарициновой кислоты в режиме регистрации отрицательных ионов с использованием 2,5-дигидроксibenзойной кислоты в качестве матрицы. Характерные фрагментные ионы представлены пиками с  $m/z$  397, 379, 353, 335,309, 281;

10 - на фиг. 3 приведен ESI-MS (ИЭР МС) масс-спектр агарициновой кислоты в режиме регистрации отрицательных ионов. Депротонированная молекула агарициновой кислоты  $[M-H]^-$  представлена пиком с  $m/z$  415.3;

- на фиг. 4 представлен ESI-MS/MS (ИЭР МС/МС) масс-спектр депротонированной молекулы агарициновой кислоты в режиме регистрации отрицательных ионов.

15 Характерные фрагментные ионы представлены пиками с  $m/z$  397, 379, 353, 335,309, 281.

Способ осуществляется следующим образом:

#### Пример 1

20 Берут 1 г мицелия гриба трутовика лекарственного (*Fomitopsis of ficinalis* Will. Bond. Et Sing.), полученного глубинным культивированием, и помещают в плоскодонную колбу с обратным холодильником, приливают 50 мл изопропилового спирта. Кипятят 7 часов при перемешивании на магнитной мешалке 200 об/мин (Магнитная мешалка с подогревом Agimatic-ED, Selecta, Испания). Смесь охлаждают, фильтруют через стеклянный фильтр, получают экстракт 1. Остаток повторно экстрагируют с 25 мл изопропилового спирта в тех же условиях, получают экстракт 2. Полученные экстракты 25 1 и 2 объединяют и упаривают на роторном испарителе (RV 8 Flex, ИКА, Германия). Нерастворимый остаток высушивают в сушильном шкафу до постоянной массы при +50°C. Получают кристаллический порошок белого цвета с легким желтоватым оттенком, без запаха, практически не растворим в воде, растворим в этаноле 95%. Взвешивают. Суммарный выход экстрагируемой фракции составляет 30,0% в перерасчете на абсолютно сухое сырье. Для идентификации агарициновой кислоты применяли метод 30 масс-спектрометрического анализа с помощью матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) с использованием масс-спектрометра Ultraflex III MALDI-TOF/TOF (Bruker, Германия). В качестве стандарта использовали образец агарициновой кислоты Sigma Aldrich, США (Каталог «Sigma» № 666-99-9 FC № 211-566- 35 5. Степень чистоты агарициновой кислоты определялась методом электрораспылительной масс-спектрометрии на приборе Agilent 6510 Q-TOF и составляла 97,8%

#### Пример 2

40 Берут 1 г мицелия гриба трутовика лекарственного (*Fomitopsis of ficinalis* Will. Bond. Et Sing.), помещают в плоскодонную колбу с обратным холодильником, приливают 60 мл изопропилового спирта. Кипятят 6 часов при перемешивании на магнитной мешалке 200 об/мин (Магнитная мешалка с подогревом Agimatic-ED, Selecta, Испания). Смесь охлаждают, фильтруют через стеклянный фильтр, получают экстракт 1. Остаток повторно экстрагируют с 30 мл изопропилового спирта в тех же условиях, получают 45 экстракт 2. Полученные экстракты 1 и 2 объединяют и упаривают на роторном испарителе (RV 8 Flex, ИКА, Германия). Нерастворимый остаток высушивают в сушильном шкафу до постоянной массы при +50°C. Получают кристаллический порошок белого цвета с легким желтоватым оттенком, без запаха, практически не растворим в воде, растворим в этаноле 95%. Взвешивают. Суммарный выход экстрагируемой фракции

составляет 30,3% в перерасчете на абсолютно сухое сырье. Для идентификацию агарициновой кислоты применяли метод масс-спектрометрического анализа с помощью матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) с использованием масс-спектрометра Ultraflex III MALDI-TOF/TOF (Bruker, Германия). В качестве стандарта использовали образец агарициновой кислоты Sigma Aldrich, США (Каталог «Sigma» № 666-99-9 FC № 211-566-5), Степень чистоты агарициновой кислоты определялась методом электрораспылительной масс-спектрометрии на приборе Agilent 6510 Q-TOF и составляла 99,0%.

Идентификацию полученного вещества, как агарициновой кислоты, проводили метод масс-спектрометрического анализа с помощью матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) с использованием масс-спектрометра Ultraflex III MALDI-TOF/TOF (Bruker, Германия). Для этого полученные образцы растворяли в этаноле и центрифугировали в течение 10 мин при 10000 об/мин, пропускали через фильтр (размер пор 5 мкм). 1 мкл экстракта смешивали с 1 мкл матрицы, наносили на мишень и высушивали на воздухе. В качестве матриц были использованы 2,5-дигидроксibenзойная кислота (10 мг/мл в 33% водном ацетонитриле), альфа-цианокоричная кислота (насыщенный раствор в 33% водном ацетонитриле), 3-гидроксипиколиновая кислота (10 мг/мл в 33% водном ацетонитриле), а также применялся метод нанесения экстрактов на мишень при отсутствии матрицы. Наилучшие по чувствительности результаты были достигнуты при использовании в качестве матрицы 2,5-дигидроксibenзойной кислоты в режиме регистрации отрицательных ионов. Агарициновая кислота была идентифицирована по наличию пика депротонированной молекулы  $[M-H]^-$  при  $m/z$  415.2701±10 ppm (см. фиг. 1, фиг. 3) и пикам фрагментных ионов при  $m/z$  397, 379, 353, 335, 309 и 281 в режиме MS/MS (режим высокоэнергетичной столкновительной диссоциации, high energy CID) (см. фиг 2).

Для сравнения и определения эффективности примененного нами метода определения агарициновой кислоты применен метод электрораспылительной масс-спектрометрии на масс-спектрометре Agilent 6510 LC Q-TOF с ионизацией в режиме отрицательных ионов. Условия анализа: прямой ввод, скорость потока 5 мкл/мин.

Агарициновая кислота была идентифицирована в масс-спектрах, полученных методом электрораспыления ESI MS (ИЭР MS), по наличию в режиме высокого разрешения пика депротонированной молекулы  $[M-H]^-$  при  $m/z$  415.2701±2 ppm (вычислено  $m/z$  415.2701 для  $[M-H]^-$ ) и характерных значений  $m/z$  фрагментных ионов: при  $m/z$  397, 379, 353, 335, 309 и 281 в режиме MS/MS (режим низкоэнергетичной столкновительной диссоциации, low energy CID) (фиг. 1-4).

Как видно из представленных результатов, заявляемый способ значительно упрощает процесс получения агарициновой кислоты по сравнению с прототипом, не требует дополнительной очистки, так как сразу обеспечивает получение чистого целевого продукта, имеющего степень чистоты 97,8 – 99,0%. Кроме того, заявляемый способ позволяет повысить выход агарициновой кислоты в 2,1 раза.

#### (57) Формула изобретения

Способ получения агарициновой кислоты из гриба трутовика лекарственного (*Fomitopsis of ficinalis* Will. Bond. Et Sing.), включающий экстракцию сырья, отличающийся тем, что в качестве сырья берут глубинно культивированный мицелий гриба, экстракцию ведут изопропиловым спиртом при соотношении сырья и экстрагента 1 г сырья на 50-60 мл экстрагента, при кипячении и перемешивании не менее 6 часов, полученную смесь

охлаждают, фильтруют и остаток повторно экстрагируют при соотношении сырья и экстрагента 1 г сырья на 25-30 мл экстрагента, при кипячении и перемешивании не менее 6 часов, полученную смесь охлаждают, фильтруют, полученные экстракты объединяют и упаривают при 50°C.

5

10

15

20

25

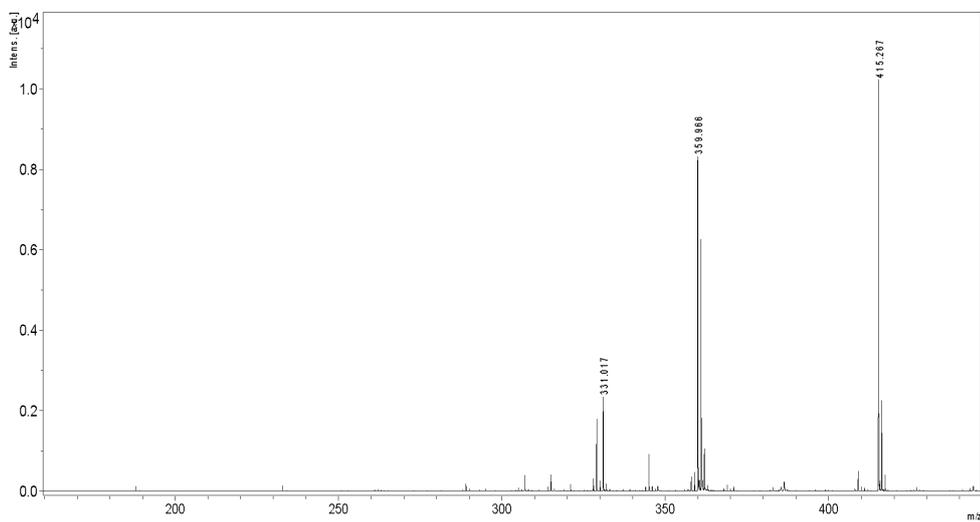
30

35

40

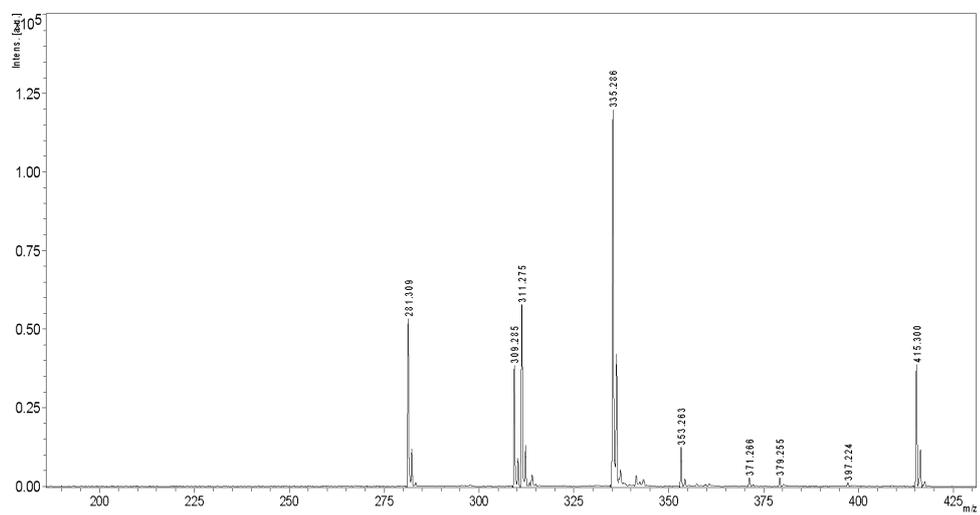
45

1

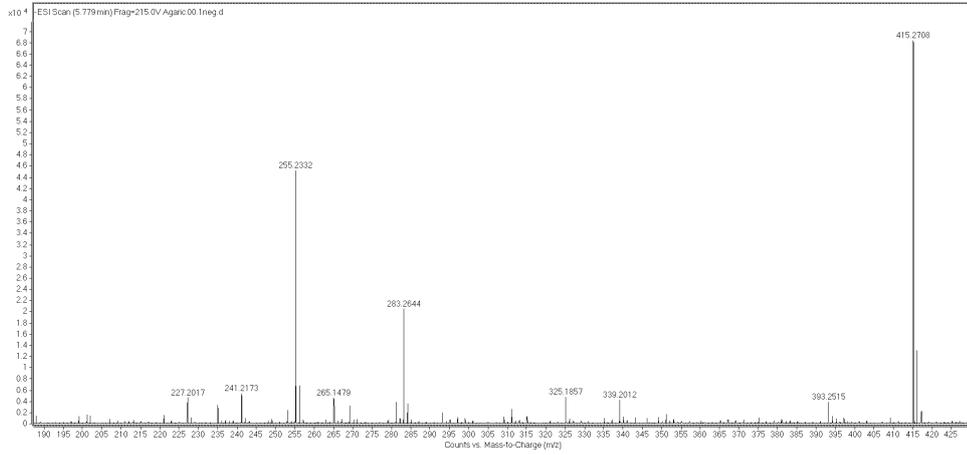


Фиг.1

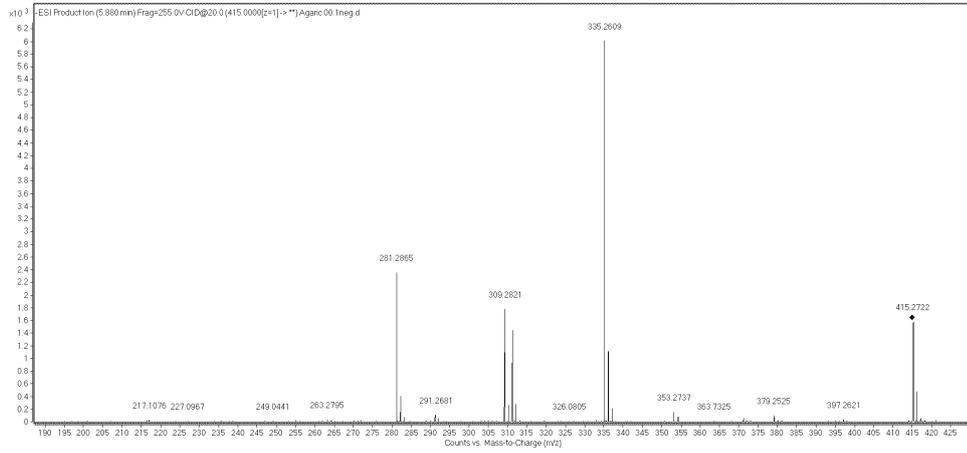
2



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг.4