

УДК 615.32: 547.9

АКТУАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ, СОДЕРЖАЩЕГО АНТРАЦЕНПРОИЗВОДНЫЕ, И СЛАБИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ

¹Куркин В.А., ¹Авдеева Е.В., ¹Петрухина И.К., ²Шмыгарева А.А.,
¹Агапов А.И., ¹Ежков В.Н.

¹ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Самара, e-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru;

²ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Оренбург, e-mail: a.shmygareva@mail.ru

В ходе настоящих исследований выделены и охарактеризованы доминирующие компоненты листьев кассии, или сенны александрийской – *Cassia acutifolia* Del. (1,7-дигидрокси-3-карбоксихантрахинон, кемпферол-3-О-гентиобиозид, 8-О-β-D-глюкопиранозид торахризона), коры крушины ломкой – *Frangula alnus* Mill. (франгулин А, франгулин В), плодов жостера слабительного – *Rhamnus cathartica* L. (1-О-β-D-глюкозида эмодаина, 3-О-рутинозид рамнетина), корней шавеля конского – *Rumex confertus* Willd. (эмодин, 8-О-β-D-глюкозид эмодаина). На основе результатов химических исследований обоснованы новые подходы к стандартизации лекарственного растительного сырья, содержащего антраценпроизводные, а именно: листьев сенны александрийской, коры крушины ломкой, плодов жостера слабительного, корней шавеля конского. Разработаны методики количественного определения суммы антраценпроизводных в сырье вышеперечисленных лекарственных растений методом прямой или дифференциальной спектрофотометрии при аналитической длине волны в диапазоне 520–530 нм в пересчете на сеннозид В (листья кассии остролистной), франгулин А (кора крушины ломкой, плоды жостера слабительного), 8-О-β-D-глюкозид эмодаина (корни шавеля конского). Обоснованы состав и технология получения лекарственных препаратов «Сенны сироп», «Крушины сироп», «Жостера сироп», «Шавеля конского сироп» из отвара сырья соответствующих лекарственных растений, а также методики качественного анализа и количественного определения антраценпроизводных с использованием тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии.

Ключевые слова: кассия остролистная, *Cassia acutifolia* Del., крушина ломкая, *Frangula alnus* Mill., жостер слабительный, *Rhamnus cathartica* L., шавель конский, *Rumex confertus* Willd., лекарственное растительное сырье, лекарственные препараты, антраценпроизводные, спектрофотометрия, стандартизация

THE ACTUAL ASPECTS OF PLANT MEDICINAL DRUGS, CONTAINED THE ANTHRACENDERIVATIVES, AND LAXATIVE PREPARATIONS ON THE BASIS OF THEIR

¹Kurkin V.A., ¹Avdeeva E.V., ¹Petrukhina I.K., ²Shmygareva A.A.,
¹Agapov A.I., ¹Ezhkov V.N.

¹Samara State Medical University, Samara, e-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru;

²Orenburg State Medical University, Orenburg, e-mail: a.shmygareva@mail.ru

In the course of the present studies there were isolated and characterized the dominant components *Cassia acutifolia* Del. leaves (1,7-dihydroxy-3-carboxyantraquinone, 8-O-β-D-glucopyranoside of torachryson, kaempferol-3-O-gentiobioside), *Frangula alnus* Mill. barks (frangulin A, frangulin B), *Rhamnus cathartica* L. fruits (1-O-β-D-glucoside of emodin, 3-O-rutinoside of rhamnetin), *Rumex confertus* Willd. roots (emodin, 8-O-β-D-glucoside of emodin). On the basis of results of chemical research there were substantiated the new approaches to standardization of medicinal plant raw materials containing anthracenderivatives, namely: *Cassia acutifolia* Del. leaves, *Frangula alnus* Mill. barks, *Rhamnus cathartica* L. fruits, *Rumex confertus* Willd. roots. In the course of the research there were developed the methods of quantitative determination of the total anthracenderivatives in raw materials of the above medicinal plants using direct or differential spectrophotometry at analytical wavelength in the range of 520–530 nm calculated on sennoside B (leaves of *Cassia acutifolia*), frangulin A (barks of *Frangula alnus*, fruits of *Rhamnus cathartica*), 8-O-β-D-glucoside of emodin (roots of *Rumex confertus*). There were substantiated the composition and technology of drugs «Senna syrup», «Frangula syrup», «Rhamnus syrup», «Rumex confertus syrup» from the decoction of the herbal materials of respectively medicinal plants, and methods of qualitative analysis and quantitative determination of anthracenderivatives using thin-layer chromatography and spectrophotometry.

Keywords: *Cassia acutifolia* Del., *Frangula alnus* Mill., *Rhamnus cathartica* L., *Rumex confertus* Willd., medicinal herbal materials, phytopharmaceuticals, anthracenderivatives, spectrophotometry, standardization

В медицинской практике широко применяются лекарственные препараты на основе растительного сырья, содержащего антраценпроизводные [1–4, 6], причем наиболее популярным источником являют-

ся два вида кассии (сенна) – кассия остролистная (*Cassia acutifolia* Del.), или сенна александрийская (*Senna alexandrina* Mill.), и кассия узколистная (*Cassia angustifolia* Vahl.). Слабительное действие препаратов

листьев кассии (отвар, сенадексин, глаксена и др.) обуславливают антраценпроизводные, представленные сеннозидами А, В, С, D, глюко-реином, глюко-алоэ-эмодином, реином, диреином [3, 6–9, 12, 13]. Среди сопутствующих веществ известны флавоноиды, в частности кемпферол-3-О-гентиобиозид, а также производные нафталина – 8-О-β-D-глюкопиранозид торахризона и др. [9]. Несмотря на высокую степень изученности химического состава листьев кассии, противоречивой остается информация относительно трактовки доминирующих компонентов. Так, в некоторых работах отмечается, что доминирующими веществами являются сеннозиды А, В, С и D [2, 6], в других работах – кемпферол-3-О-гентиобиозид [9], а в отдельных литературных источниках – реин [13]. Видимо, именно это обстоятельство является причиной того факта, что до сих пор не сложились единые подходы к стандартизации листьев кассии, а в существующих подходах к анализу не в полной мере используется все разнообразие химического состава сырья кассии [2, 7–10, 13]. Это в полной мере касается и другого лекарственного растительного сырья, содержащего антраценпроизводные, а именно: коры крушины ломкой (*Frangula alnus* Mill.), плодов жостера слабительного (*Rhamnus cathartica* L.), корней щавеля конского (*Rumex confertus* Willd.).

Цель настоящих исследований – разработка методологических подходов к созданию и стандартизации лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов, содержащих антраценпроизводные.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования служили листья сенны александрийской (*Cassia acutifolia* Del.), кора крушины ломкой (*Frangula alnus* Mill.), плоды жостера слабительного (*Rhamnus cathartica* L.), корни щавеля конского (*Rumex confertus* Willd.), фитопрепараты, полученные из вышеперечисленного ЛРС, а также антраценпроизводные, флавоноиды и производные нафталина, выделенные из ЛРС.

Препаративное выделение веществ из ЛРС осуществляли с использованием колоночной хроматографии. Воздушно-сухое сырье (100 г) подвергали исчерпывающему экстрагированию 70% этиловым спиртом, сочетая при этом способ мацерации (24 ч) с последующей экстракцией при температуре 85–90°C. Водно-спиртовые экстракты упаривали под вакуумом до густого остатка (около 30 мл). Сгущенный экстракт высушивали на силикагеле L 40/100 и полученный порошок (экстракт + силикагель) наносили на слой силикагеля, сформированный в хлороформе. Хроматографическую колонку элюировали хлороформом и смесью хлороформ – этиловый спирт в различных соотношениях. Контроль за разделением веществ осуществляли с помощью ТСХ-анализа на пластинках «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ». Окончательную очистку

веществ осуществляли рехроматографией на колонке с полиамидом «Woelm» (Германия), а также перекристаллизацией из различных растворителей.

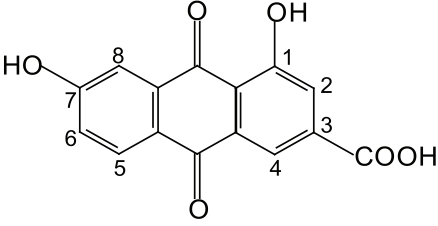
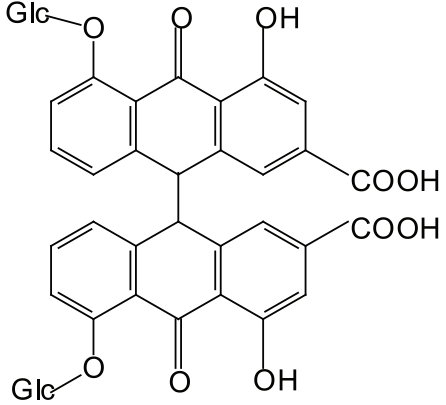
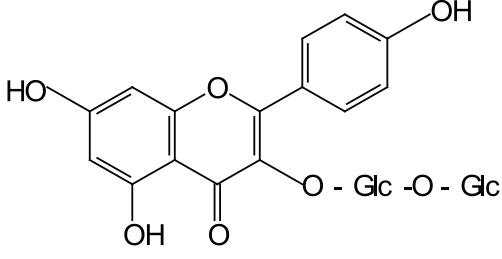
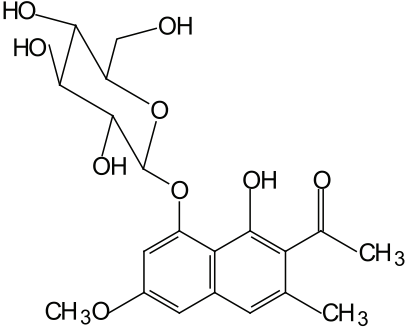
Спектры ЯМР ¹H и ЯМР ¹³C получали на приборе «Bruker AM 300», масс-спектры снимали на масс-спектрометре «Kratos MS-30», регистрацию УФ-спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena).

Результаты исследования и их обсуждение

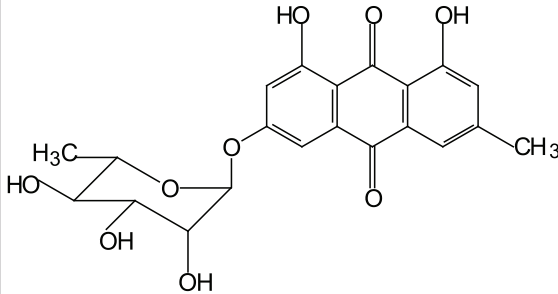
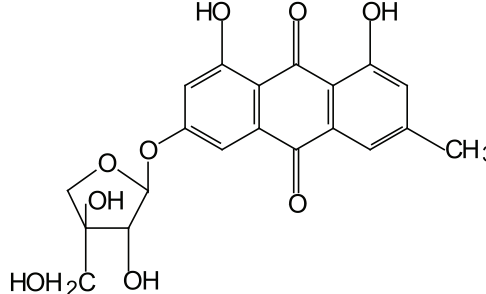
В результате исследования компонентного состава листьев сенны александрийской, коры крушины ломкой, плодов жостера слабительного, корней щавеля конского выделены доминирующие вещества – 1,7-дигидрокси-3-карбоксиантрахинон, франгулин А, франгулин В, эмодин, 1-О-β-D-глюкопиранозид эмодина, 8-О-β-D-глюкопиранозид эмодина (антраценпроизводные), кемпферол-3-О-гентиобиозид, 3-О-рутинозид рамнетина (флавоноиды) и 8-О-β-D-глюкопиранозид торахризона (производное нафталина).

С использованием ТСХ обнаружено, что именно 1,7-дигидрокси-3-карбоксиантрахинон, кемпферол-3-О-гентиобиозид и 8-О-β-D-глюкопиранозид торахризона являются доминирующими компонентами листьев сенны. На наш взгляд, обнаружение методом ТСХ данных соединений, диагностически значимых для листьев сенны, является перспективным подходом в плане идентификации сырья и препаратов данного растения. Это тем более важно, что в силу невысокого содержания сеннозида А и В в листьях кассии [8] определение данных соединений методом ТСХ весьма проблематично. Этот вывод согласуется с результатами исследований зарубежных ученых [13], в соответствии с которыми доминирующим антраценпроизводным листьев кассии является реин. При этом обращает на себя внимание тот факт, что, по нашим данным, доминирующим антраценпроизводным соединением листьев кассии является не реин, а близкий к нему по хроматографической подвижности, физико-химическим и спектральным характеристикам антрахинон – 1,7-дигидрокси-3-карбоксиантрахинон, названный нами неореином. Этот вывод сделан на основании данных ¹H-ЯМР-спектра 1,7-дигидрокси-3-карбоксиантрахинона: наличие при 11,91 м.д. одного уширенного синглетного сигнала, принадлежащего 1-ОН-группе, в сочетании с характером сигналов ароматических протонов при С-5, С-6 и С-8. По литературным данным, в ¹H-ЯМР-спектре реина характерными являются два синглетных сигнала в области 12,0 и 11,9 м.д. 1-ОН-группы и 8-ОН-группы [11].

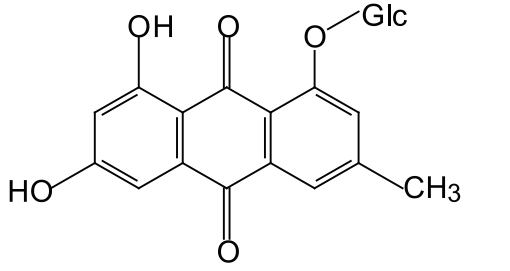
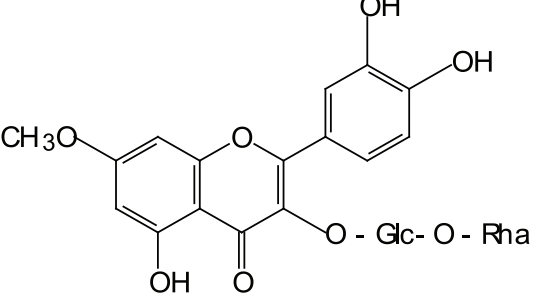
Компоненты листьев кассии остролистной

	
1,7-Дигидрокси-3-карбоксиантрахинон	Сеннозид В
	
Кемпферол-3-О-гентиобиозид	8-О-β-D-глюкопиранозид торахризона

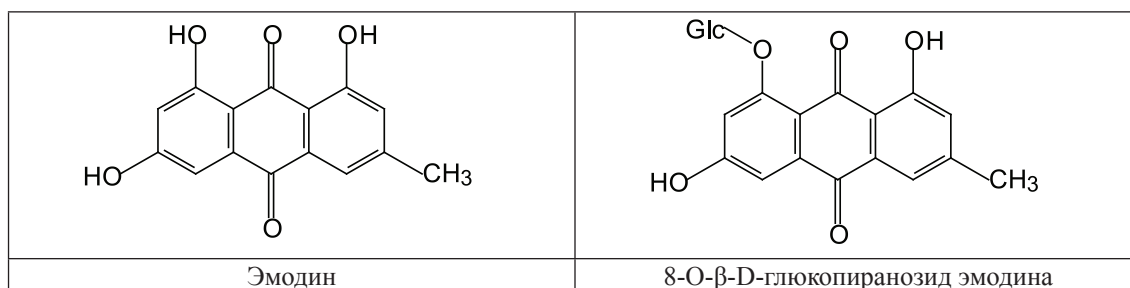
Доминирующие антраценпроизводные коры крушины ломкой

	
Франгулин А	Франгулин В

Доминирующие компоненты плодов жостера слабительного

	
1-О-β-D-глюкопиранозид эмодина	3-О-рутинозид рамнетина

Доминирующие антраценпроизводные корней шавеля конского



К доминирующим фенольным компонентам относятся также 8-О-β-D-глюкопиранозид торахризона и кемпферол-3-О-гентиобиозид, которые, на наш взгляд, имеют диагностическое значение в плане идентификации сырья кассии. Интересно, что, по данным зарубежных ученых, и в условиях ВЭЖХ кемпферол-3-О-гентиобиозид является доминирующим соединением [9].

Используемые подходы к стандартизации ЛРС, нашедшие отражение в Государственной фармакопее СССР XI издания [2], а также в Европейской и других зарубежных фармакопеях [7, 10], как правило, предусматривают громоздкие и многостадийные методики, включающие кислотный гидролиз и многократную экстракцию диэтиловым эфиром, что нельзя признать целесообразным с точки зрения точности методики и неизбежной потери антраценпроизводных.

Изучение условий экстракции ЛРС показало, что оптимальным для извлечения антраценпроизводных является этиловый спирт в диапазоне концентраций 40–70% при нагревании на кипящей водяной бане в течение 60–90 мин. В ходе исследований разработана методика количественного определения суммы антраценпроизводных в листьях сенны методом прямой спектрофотометрии щелочно-аммиачного раствора водно-спиртового извлечения при аналитической длине волны 530 нм в пересчете на сеннозид В (рис. 1). Заслуживает внимания тот факт, что характер кривой поглощения раствора водно-спиртового извлечения листьев сенны в основном обуславливают флавоноиды (рис. 2), в частности выделенный нами кемпферол-3-О-гентиобиозид, хотя определенный вклад вносят и другие компоненты: 1,7-дигидрокси-3-карбоксиантрахинон (неореин), 8-О-β-D-глюкопиранозид торахризона (производное нафталина).

Исследование УФ-спектров показало, что максимум поглощения щелочно-амми-

ачного раствора водно-спиртового извлечения из коры крушины ломкой в длинноволновой области спектра находится при 524 ± 2 нм (рис. 3). В длинноволновой области электронного спектра щелочно-аммиачного раствора франгулина А также наблюдается четкий максимум поглощения при 524 ± 2 нм (рис. 4). Следовательно, в качестве аналитической длины волны может быть использовано значение 524 нм, а стандартным образцом может служить доминирующий антрагликозид – франгулин А, причем в случае отсутствия стандарта в расчетной формуле может быть использовано теоретическое значение удельного показателя поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) – 180. Интересно, что в Европейской фармакопее также предусмотрено использование значения $E_{1\text{см}}^{1\%}$ (204), но для глюкофрангулина А (аналитическая длина волны – 515 нм) [10].

Исследование УФ-спектров растворов водно-спиртовых извлечений из плодов жостера слабительного показало (рис. 5), что данная аналитическая длина волны может быть использована и в методике количественного определения суммы антраценпроизводных в сырье данного растения, хотя кривая поглощения УФ-спектр исходного раствора извлечения обусловлена в основном флавоноидами (3-О-рутинозид рамнетина). В длинноволновой области спектра щелочно-аммиачного раствора 1-О-β-D-глюкозида эмодина, как и в случае щелочно-аммиачного раствора извлечения плодов жостера, наблюдается четкий максимум поглощения при 520 ± 2 нм (рис. 6).

Исследование УФ-спектров водно-спиртового извлечения из корней шавеля конского показало, что максимум поглощения щелочно-аммиачного раствора водно-спиртового извлечения из корней шавеля конского находится при длине волны 520 ± 2 нм (рис. 7). В длинноволновой области спектра щелочно-аммиачного раствора 8-О-β-D-глюкозида эмодина также наблюдается четкий максимум поглоще-

ния при 520 ± 2 нм (рис. 8). Следовательно, за аналитическую длину волны можно принять значение 520 нм, а стандартным образцом может служить доминирующий антрагликозид – 8-О-β-D-глюкозида эмодаина. В случае отсутствия стандарта в расчетной формуле может быть использовано значение удельного показателя поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) – 160.

С использованием разработанных методик проанализирован ряд промыш-

ленных образцов ЛРС и показано, что содержание суммы антраценпроизводных в образцах листьев сенны варьирует в пределах от 1,51 до 1,88 % (в пересчете на сеннозид В), в коре крушины – от 5,63 до 8,51 % (в пересчете на франгулин А), в плодах жостера слабительного – от 2,57 % до 5,10 % (в пересчете на франгулин А) и в корнях щавеля конского – от 4,25 до 5,04 % (в пересчете на 8-О-β-D-глюкозида эмодаина).

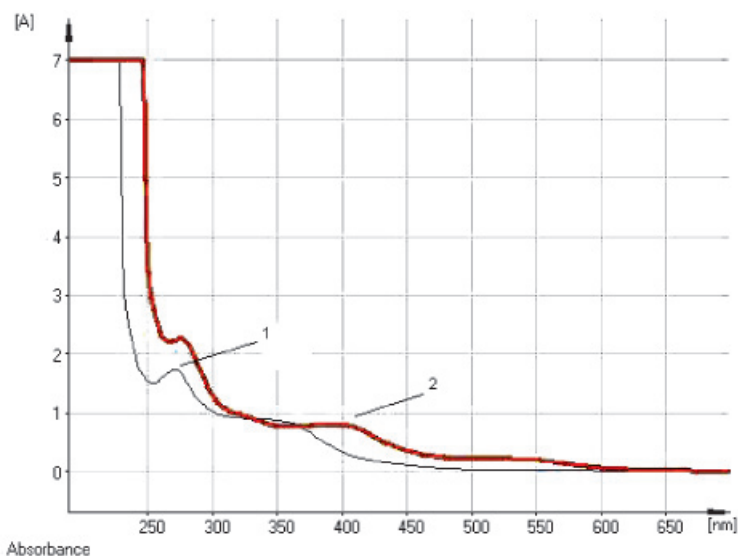


Рис. 1. Электронные спектры раствора водно-спиртового извлечения (1) и щелочно-аммиачного раствора водно-спиртового извлечения листьев сенны (2)

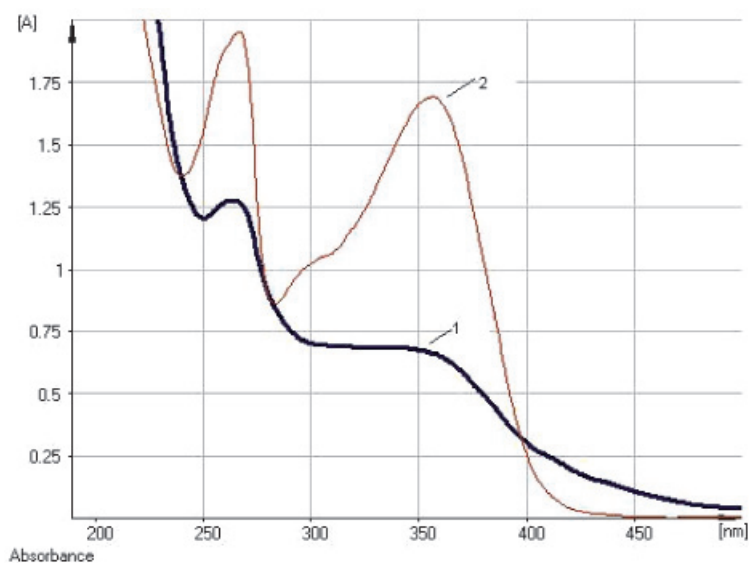


Рис. 2. Электронные спектры раствора водно-спиртового извлечения листьев сенны (1) и раствора кемпферол-3-О-гентиобиозида (2)

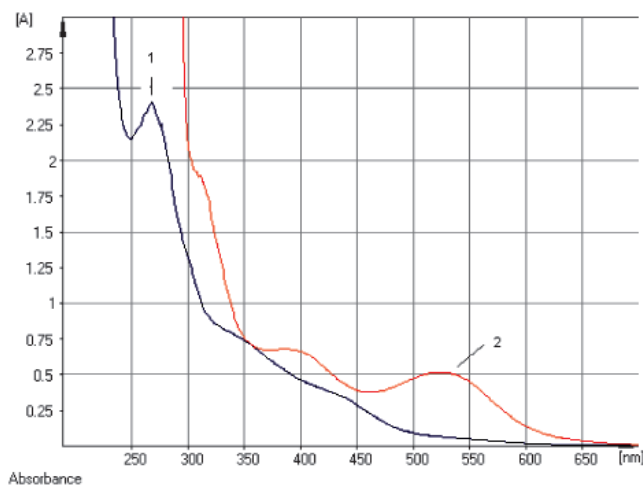


Рис. 3. УФ-спектр исходного раствора (1) и щелочно-аммиачного раствора (2) водно-спиртового извлечения из коры крушины ломкой

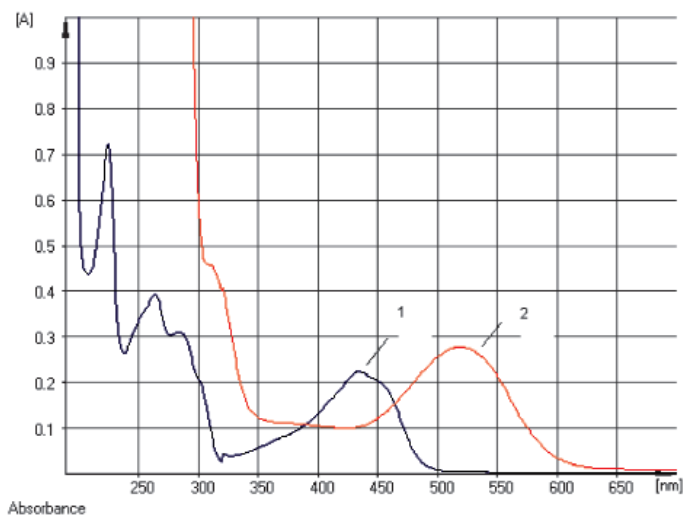


Рис. 4. УФ-спектр исходного раствора франгулина А (1) и щелочно-аммиачного раствора франгулина А (2)

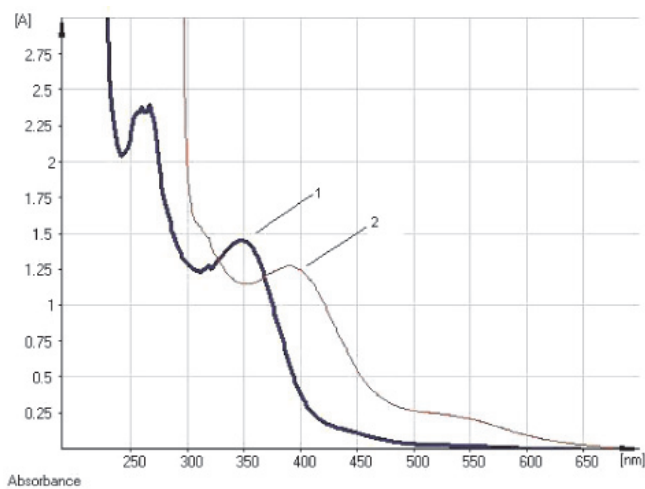


Рис. 5. Электронные спектры извлечений из плодов жостера слабительного. Обозначения: 1 – спиртовой раствор извлечения; 2 – извлечение в щелочно-аммиачном растворе

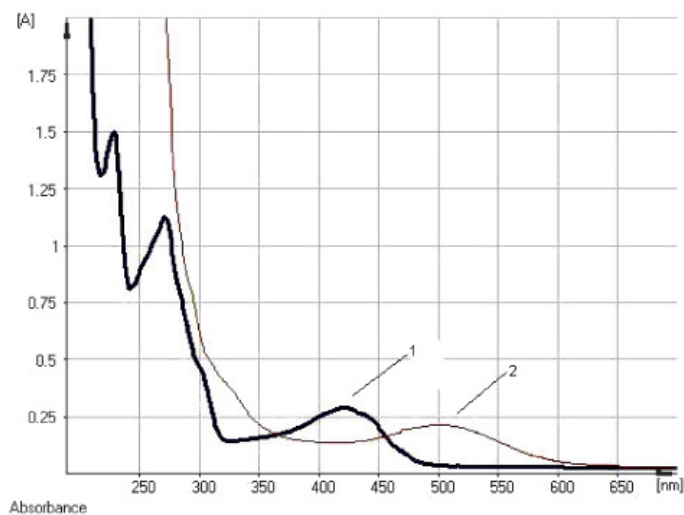


Рис. 6. Электронные спектры растворов 1-О-β-D-глюкопиранозида эмодина. Обозначения: 1 – исходный раствор вещества; 2 – щелочно-аммиачный раствор вещества

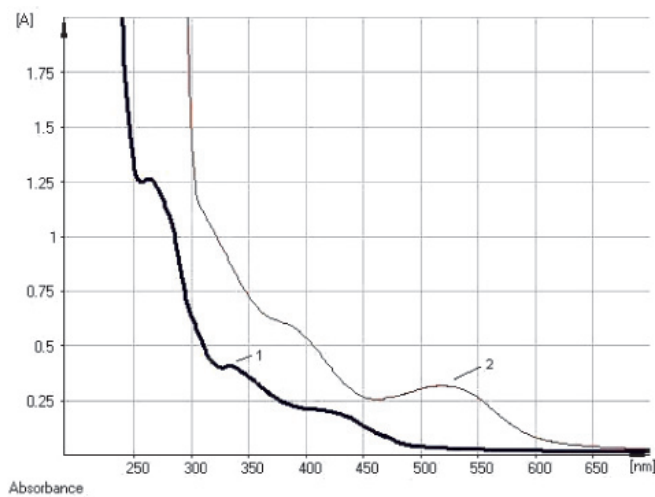


Рис. 7. Электронные спектры водно-спиртового извлечения из корней щавеля конского (1) и щелочно-аммиачного раствора извлечения из корней щавеля конского (2)

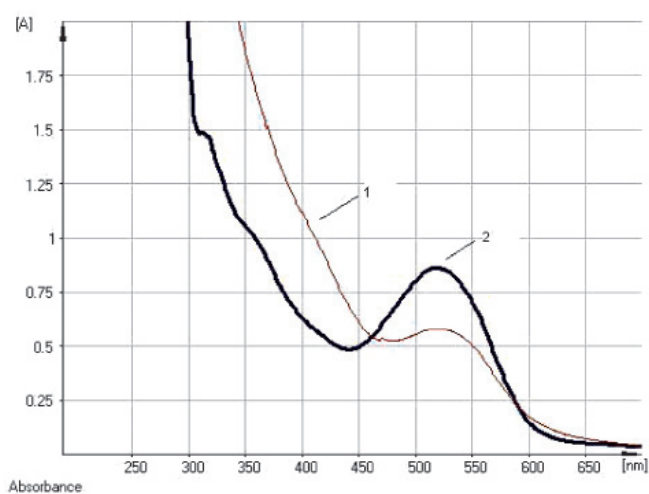


Рис. 8. Электронные спектры щелочно-аммиачных растворов водно-спиртового извлечения из корней щавеля конского (1) и 8-О-β-D-глюкозида эмодина (2)

На основе результатов химических и аналитических исследований обоснованы состав и технология получения лекарственных препаратов «Сенны сироп», «Крушины сироп», «Жостера сироп» и «Щавеля конского сироп», предусматривающие использование в качестве лекарственной субстанции водного извлечения (отвар) из сырья соответствующих растений, что является актуальным с точки зрения импортозамещения [5]. Научно обоснованные подходы к стандартизации исследуемого сырья использованы при разработке методик количественного определения суммы антраценпроизводных в лекарственных препаратах. Содержание суммы антраценпроизводных в сиропе сенны, сиропе крушины, сиропе жостера и сиропе щавеля конского составляет $0,055\% \pm 0,002$; $0,30\% \pm 0,01$; $0,22\% \pm 0,003$; $0,25\% \pm 0,003\%$ соответственно.

Выводы

Результаты проведенных исследований позволили создать методологическую базу для совершенствования стандартизации ЛРС, содержащего антраценпроизводные, а также расширить возможности целенаправленного поиска новых сырьевых источников для получения эффективных отечественных фитопрепаратов слабительного действия. Научно обоснованы состав и технология получения новых лекарственных препаратов «Сенны сироп», «Крушины сироп», «Жостера сироп» и «Щавеля конского сироп».

Список литературы

1. Государственный реестр лекарственных средств. – Т. 1. Официальное издание. – М.: ООО «Информационно-издательское агентство «Ремедиум», 2008. – 1398 с.
2. Государственная Фармакопея СССР. – Одиннадцатое издание. – Вып. 2. – М.: Медицина, 1990. – 400 с.
3. Куркин В.А. Фармакогнозия: учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов). – 2-е изд., перераб. и доп. Самара: ООО «Офорт»; ГОУ ВПО СамГМУ Росздрава, 2007. – 1239 с.
4. Куркин В.А. Основы фитотерапии: учебное пособие для студентов фармацевтических вузов. – Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО СамГМУ Росздрава, 2009. – 963 с.
5. Куркин В.А., Петрухина И.К. Актуальные аспекты создания импортозамещающих растительных препаратов // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 11(2). – С. 366–371.
6. Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П. Фармакогнозия: учебник. – М.: Медицина, 2002. – 656 с.
7. British Pharmacopoeia. – Vol. III. Herbal Drugs and Herbal Drug Preparations. – 2009.
8. Dave H., Ledwani L. A review on anthraquinones isolated from *Cassia* species and their applications // Indian Journal of Natural Products and Resources. – 2012. – Vol. 3, № 3. – P. 291–319.
9. Demirezer L.O., Karahan I.N., Ucakurk E., Kuruuzum-Uz A., Guvenalp Z., Kazaz C. HPLC Fingerprinting of Sennosides in Laxative Drugs with Isolation of Standard Substances from Some *Senna* Leaves // Rec. Nat. Prod. 2011. – Vol. 5, № 4. – P. 261–270.
10. European Pharmacopoeia. – 4-th Ed. – Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, Inc., 2002.

11. Liu R., Li A., Sun A. Preparative isolation and purification of hydroxyanthraquinones and cinnamic acid from the Chinese medicinal herb *Rheum officinale* Bill. by high-speed counter-current chromatography // Journal of Chromatography A. – 2004. – Vol. 1052. – P. 217–221.

12. Muzychkina R.A. Natural Anthraquinones. Biological properties and physicochemical characteristics / Ed. by G.A. Tolstikov. – Moscow: PHASIS, 1998. – 864 p.

13. Sakulpanich A., Gritsanapan W. Determination of Anthraquinone Glycoside Content in *Cassia fistula* Leaf Extracts for Alternative Source of Laxative Drug // International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences. – 2009. – Vol. 3, № 1. – P. 42–45.

References

1. Gosudarstvennyi reestr lekarstvennykh sredstv. T.1. Ofit-sialnoe izdanie. M. OOO «Informatsionno-izdatelskoe agentstvo «Remedium», 2008. 1398 p.
2. Gosudarstvennaya Farmakopeya SSSR. Odinnadtsatoe izdanie. Vyp. 2. M.: Meditsina, 1990. 400 p.
3. Kurkin V.A. Farmakognozija: Uchebnik dlja studentov farmaceuticheskikh vuzov (fakul'tetov). 2-e izd., pererab. i dop., Samara, 2007, 1239 p.
4. Kurkin V.A. Osnovy fitoterapii: Uchebnoe posobie dlja studentov farmaceuticheskikh vuzov. Samara: OOO «Ofort», GOU VPO «SamGMU», 2009. 963 p.
5. Kurkin V.A., Petrukina I.K., Actualnye aspekty sozdaniya importozameschayuschikh rastitelnykh preparatov // Fundamentalnye issledovaniya. 2014. no. 11 (2). pp. 366–371.
6. Murav'eva D.A., Samylina I.A., Yakovlev G.P. *Farmakognozija*: Uchebnik. M.: Medicina, 2002. 656 p.
7. British Pharmacopoeia. Volume III. Herbal Drugs and Herbal Drug Preparations. 2009.
8. Dave H., Ledwani L. A review on anthraquinones isolated from *Cassia* species and their applications // Indian Journal of Natural Products and Resources. 2012. Vol. 3, no. 3. pp. 291–319.
9. Demirezer L.O., Karahan I.N., Ucakurk E., Kuruuzum-Uz A., Guvenalp Z., Kazaz C. HPLC Fingerprinting of Sennosides in Laxative Drugs with Isolation of Standard Substances from Some *Senna* Leaves // Rec. Nat. Prod. 2011. Vol. 5, no. 4. pp. 261–270.
10. European Pharmacopoeia. 4-th Ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, Inc., 2002.
11. Liu R., Li A., Sun A. Preparative isolation and purification of hydroxyanthraquinones and cinnamic acid from the Chinese medicinal herb *Rheum officinale* Bill. by high-speed counter-current chromatography // Journal of Chromatography A. 2004. Vol. 1052. pp. 217–221.
12. Muzychkina R.A. Natural Anthraquinones. Biological properties and physicochemical characteristics / Ed. by G.A. Tolstikov, Moscow: PHASIS, 1998. 864 p.
13. Sakulpanich A., Gritsanapan W. Determination of Anthraquinone Glycoside Content in *Cassia fistula* Leaf Extracts for Alternative Source of Laxative Drug // International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences. 2009. Vol. 3, no. 1. pp. 42–45.

Рецензенты:

Шаталаев И.Ф., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой химии фармацевтического факультета, ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Самара;

Дубищев А.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой фармакологии им. заслуженного деятеля науки РФ, профессора А.А. Лебедева, ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Самара.

Работа поступила в редакцию 06.03.2015.