

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЭНДОДОНТИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКИХ ФОРМ ПУЛЬПИТА И ПЕРИОДОНТИТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФОТОАКТИВИРУЕМОЙ ДЕЗИНФЕКЦИИ И УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ОБРАБОТКИ

Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова

Цель. Лабораторное обоснование применения комплексного воздействия ультразвуковой обработки и фотоактивируемой дезинфекции в экспериментах *in vitro* с использованием штаммов анаэробных и микроаэрофильных микроорганизмов, выделенных у пациентов с хроническими формами пульпита и периодонтита. *Материалы и методы.* Микробиологическое изучение корневых каналов проводили с помощью бактериологического метода (2 вида облигатно-анаэробных бактерий и 2 — микроаэрофильных стрептококков). Оценку влияния ультразвуковой обработки в комплексе с системой фотоактивируемой дезинфекции на микрофлору корневого канала проводили с использованием биореактора. Исследование биопленок системы корневых каналов зуба у больных хроническими формами пульпита (52 человека) и периодонтита (16 человек) проведены с использованием сканирующей электронной микроскопии. *Результаты.* Установлено наличие обильной микробной биопленки в устьях дентинных канальцев и obturation дентинных канальцев в отдельных случаях. В экспериментальной части исследования описаны особенности формирования кривых роста бактериальных популяций оральной микрофлоры (*Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*) в результате комплексного воздействия фотодинамической активации и ультразвука по сравнению с контролем. *Заключение.* Полученные данные позволяют заключить, что комплексное воздействие существенно угнетает рост микробных популяций оральных бактерий.

Журн. микробиол., 2016, № 6, С. 66—73

Ключевые слова: хронический пульпит, корневые каналы, микробная биопленка, эндодонтическое лечение, ультразвуковая ирригация, фотодинамическая терапия, биореактор, антимикробная активность *in vitro*

V.N.Tsarev, M.S.Podporin, E.V.Ippolotov, G.A.Avtandilov, T.V.Tsareva

EXPERIMENTAL RATIONALE OF ENDODONTIC THERAPY OF CHRONIC FORMS OF PULPITIS AND PERIODONTITIS USING PHOTO-ACTIVATED DISINFECTION AND ULTRASOUND TREATMENT

Evdokimov Moscow State Medical-Stomatologic University, Russia

Aim. Laboratory rationale of application of a complex effect of ultrasound treatment and photo-activated disinfection in experiments *in vitro* using strains of anaerobic and microaerophilic microorganisms isolated from patients with chronic forms of pulpitis and periodontitis. *Materials and methods.* Microbiologic study of root canal was carried out using a bacteriologic method (2 species of obligatory-anaerobic and 2 — microaerophilic streptococci). Evaluation of the effect of ultrasound treatment in a complex with a system of photo-activated disinfection on microflora of root canal was carried out using a bioreactor. Study of biofilms of the root canal system of a tooth in patients with chronic forms of pulpitis (52 individuals) and periodontitis (16 individuals) were carried out using scanning electron microscopy. *Results.* The presence of an ample microbial biofilm in the ostiums of dentinal canaliculi and obturation of dentinal canaliculi in certain cases was established. Features of formation of growth curves for bacterial populations of oral microflora (*Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*) were described in the experimental part of the study as a result of a complex effect of photody-

dynamic activation and ultrasound compared with control lacking those. *Conclusion.* The data obtained allow to conclude that complex effect significantly suppresses the growth or microbial populations of oral bacteria.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 6, P. 66—73

Key words: chronic pulpitis, root channels, microbial biofilm, endodontic therapy, ultrasound irrigation, photodynamic therapy, bioreactor, antimicrobial activity *in vitro*

ВВЕДЕНИЕ

В связи со стремительно развивающимися технологиями аэробного и анаэробного культивирования бактерий исследователями высказывается единодушное мнение, что осложнения кариеса зубов как важнейшей патологии полости рта имеют полибактериальный характер. Многие из них представляют большие сложности при культивировании. Среди патогенов, колонизирующих корневые каналы, выделяют грамотрицательные облигатно-анаэробные палочки группы *Bacteroides*, *F. nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Eubacterium alactolyticum*, *Eubacterium lentium*, *Wolinella recta*, *Campylobacter sputorum* (составляют 85% от общего числа возбудителей). Существенное место занимают также микроаэрофильные стрептококки групп *sanguinis* и *mutans* [5, 10].

В России обращения в стоматологические поликлиники по поводу лечения осложнений кариеса доминируют в структуре стоматологической заболеваемости и составляет от 20 до 30% [6]. Эндодонтальная бактериальная инфекция является основной причиной такого тяжелого осложнения пульпита как некроз пульпы зуба, а при отсутствии адекватного лечения — прогрессирования с развитием одонтогенной инфекции головы и шеи или сепсиса [5].

В последние годы установлено, что сохранение жизнеспособных бактерий в системе дентинных канальцев может быть связано с формированием микробных биопленок на уровне так называемого «смазанного слоя», которые препятствуют или нейтрализуют действие антисептических препаратов и антибиотиков [4, 7].

Эндодонтическая обработка каналов остается основным этапом в комплексной терапии заболеваний пульпы. От того, как проведен этот этап, напрямую зависят отдаленные результаты лечения. Зачастую определяющую роль в недопущении дальнейших осложнений эндодонтического лечения является эффективная и качественная инструментальная обработка при пульпите и периодонтите. Основной протокол лечения может быть дополнен физиотерапевтическими методами воздействия на область корневых каналов, в частности, использованием физических факторов: ультразвука, медицинского озона и фотохимической реакции [2, 3].

Одним из наиболее популярных является в настоящее время метод фотоактивируемой дезинфекции. Он основан на использовании различных фотобиологических эффектов, вызываемых посредством сочетанного применения светового излучения, кислорода и фотосенсибилизатора [9].

Особое значение приобретает также качественная ирригация корневых каналов с активацией ирриганта с помощью ультразвукового файла пьезоэлектрической группы, что, возможно, повышает эффективность эндодонтического лечения с точки зрения очистки стенок дентинных канальцев, особенно в области апекса [1, 3].

Считается доказанным, что применение ультразвуковой активации ирри-

ганта в процессе обработки корневых каналов является более эффективной методикой по сравнению с традиционным ручным методом обработки [10]. В эндодонтии ультразвук стали применять благодаря эффекту кавитации (в жидкой среде — формирование пузырьков пара, сопровождающееся шумом и гидравлическими ударами) и акустическим вихревым потокам, возникающим вокруг эндодонтического файла в процессе работы. Вихревые потоки размывают детрит корневого канала на опилки и нагревают дезинфицирующий раствор, что значительно повышает качество эндодонтического лечения и создает условия для герметичной obturации корневого канала, что можно рассматривать как одно из перспективных направлений лечения [3, 9, 10].

Вместе с тем, четких клинико-лабораторных доказательств формирования биопленок в системе дентинных канальцев и их разрушения в процессе указанных видов воздействия в отечественной и зарубежной литературе нет.

В связи с вышеизложенным, целью нашего исследования являлось лабораторное обоснование применения комплексного воздействия ультразвуковой обработки и фотоактивируемой дезинфекции в экспериментах *in vitro* с использованием штаммов анаэробных и микроаэрофильных микроорганизмов, выделенных у пациентов с хроническими формами пульпита и периодонтита.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были обследованы 52 пациента с диагнозом хронический пульпит, в том числе: 26 с диагнозом хронический фиброзный пульпит (ХФП) и 26 с хроническим гангренозным пульпитом (ХГП); 16 пациентов с диагнозом хронический периодонтит в фазе обострения. Возраст пациентов составил от 25 до 45 лет (для «чистоты» эксперимента, т.к. у пациентов более старшего возраста была выявлена общесоматическая патология); мужчин и женщин — 35 и 32 человек соответственно.

Всем пациентам проводили традиционную методику эндодонтического лечения в соответствии со стандартным протоколом Европейского общества эндодонтистов, которая сопровождалась взятием материала для проведения сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) системы дентинных канальцев.

В экспериментальной части исследования для оценки воздействия ультразвуковой активации ирриганта на штаммы микроорганизмов использовали аппарат пьезоэлектрической группы «Ultrasonic DTE-D5», а для проведения фотоактивируемой дезинфекции — аппарат «Fotosan 360» с применением в качестве фотосенсибилизатора толуидинового синего.

Структуру биопленки корневых каналов изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии с использованием двулучевого микроскопа «Quanta 200 3D» (FEI Company, USA) в режиме высокого вакуума с предварительным напылением золотом (999°) в установке «SPI-Module Sputter/Carbon Coater System» (SPI Inc., USA).

Микробиологическое изучение патологического содержимого корневых каналов осуществляли с помощью бактериологического метода исследования, включавшего в обязательном порядке анаэробное культивирование, путем количественных высевов на питательную среду M144 (Himedia, Индия) с добавлением крови, которую использовали для культивирования грамотрицательных анаэробных и грамположительных микроаэрофильных бактерий. Посевы помещали в термостат при температуре 37°С на 48 часов (для анаэробных культур — в анаэроостат на 7 суток), после чего использовали автома-

тическую систему по подсчету количества колоний «Scan 500» (Interscience, Франция).

Из числа выделенных штаммов для экспериментальной части исследования были отобраны наиболее часто встречавшиеся у обследованных нами пациентов (2 вида облигатно-анаэробных бактерий и 2 — микроаэрофильных стрептококков): *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *S. sanguis*, *S. mutans*. Проводили оценку влияния ультразвуковой обработки в комплексе с системой фотоактивируемой дезинфекции на микрофлору корневого канала с использованием биореактора «Реверс-Спиннер RTS-1» (BioSan, Латвия). В настоящем исследовании данная система, предназначенная для культивирования микроорганизмов и оценки их роста в режиме реального времени, была использована нами впервые в отечественной практике для культивирования анаэробных бактерий пародонтопатогенной группы и микроаэрофильных стрептококков. Интерпретацию результатов проводили по изменению оптической плотности при длине волны $\lambda=850$ нм.

Для определения чувствительности выделенных штаммов применяли собственную модификацию метода серийных разведений, разработанную на кафедре микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ им. А.И.Евдокимова.

В стерильные пластиковые пробирки Eppendorf помещали в равном соотношении взвесь испытуемого штамма и фотосенсибилизатор (по 0,20 мл соответственно), что в конечном количестве равнялось 10^6 КОЕ (в логарифмическом выражении 6,0 соответственно). Концентрация ФС — средняя, экспозиций ультразвуковой обработки — 10 секунд.

При проведении эксперимента первоначально помещали наконечник ультразвукового аппарата непосредственно в бактериальную взвесь, включали на необходимый период времени, а затем добавляли ФС и помещали наконечник диодного аппарата в световое излучение на 30 секунд (в соответствии с инструкцией). В качестве контроля использовали бактериальную взвесь без последующей дальнейшей ее обработки.

Для культивирования микроорганизмов в биореакторе использовали 2 типа пробирок: пробирки 50 мл с мембранным фильтром (TubeSpin®) для аэробов и пробирки 50 мл по типу Falcon с крышкой без мембраны. В каждую пробирку добавляли 15 мл питательной среды и вносили заранее подготовленную бактериальную взвесь с помощью биохимической пипетки.

Пробирки помещали в биореактор и с помощью программного обеспечения задавали необходимые параметры культивирования в соответствии с разработанными рекомендациями.

Для каждого вида микроорганизмов использовались свои настройки биореактора. При общих для всех микроорганизмов 37°C и Volume: 15 ml λ : 850 nm использованы настройки: *P. gingivalis* (RPM: 1200 min^{-1} ; Measurement freq.: 3 h^{-1} ; Rev. Spin period: 1 sec); *F. nucleatum* (RPM: 1200 min^{-1} ; Measurement freq.: 2 h^{-1} ; Rev. Spin period: 2 sec); *S. sanguis* (RPM: 1500 min^{-1} ; Measurement freq.: 3 h^{-1} ; Rev. Spin period: 2 sec); *S. mutans* (RPM: 1700 min^{-1} ; Measurement freq.: 3 h^{-1} ; Rev. Spin period: 2 sec).

Культивирование пародонтопатогенных видов бактерий и микроаэрофильных стрептококков проводили в течение 5 суток. Регистрация точек кривой роста — каждый 4 час.

Результаты эксперимента отображались в графике динамики изменения оптической плотности на протяжении всего периода культивирования. По ключевым точкам кривых роста микробных популяций проводили статисти-

ческую обработку данных в 5 повторах и обрабатывали методом параметрической статистики для малой выборки по Манну-Уитни ($p \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При проведении сканирующей электронной микроскопии препаратов, приготовленных из спилов в области корневых каналов инфицированных зубов, установлено наличие высокого уровня микробной контаминации зоны корневого канала и дентинных канальцев. При увеличении $\times 1500$ видны устья дентинных канальцев, которые obturированы скоплениями микроорганизмов, формирующих биопленку. При увеличении $\times 5000$ хорошо различимы палочковидные (бактероидные) микробные клетки и округлые дрожжевые элементы грибов.

Как известно, система корневого канала зуба часто имеет сложную морфологию, особенно у зубов жевательной группы. Идеально круглый в поперечном сечении конусовидный корневой канал с одним апикальным отверстием является, пожалуй, редким исключением. Тем самым, достичь полноценной очистки, стерилизации и оптимального формирования стенок корневых каналов возможно далеко не во всех случаях. В подавляющем большинстве случаев каналы имеют неправильную форму, различный диаметр в букколингвальном и мезиодистальном направлении, многочисленные поднутрения, так называемые, «плавники». От основного канала на разных уровнях отходит множество латеральных канальцев. Известно, что основной канал в апикальной части образует дельту и открывается на верхушке корня не одним, а несколькими апикальными отверстиями [7].

При эндодонтической обработке формируется «смазанный слой», содержащий микроорганизмы. «Смазанный слой» для микроорганизмов является питательной средой, а также он нарушает адгезию пломбирочных материалов к стенкам корневых каналов. При сканирующей электронной микроскопии видно, что он представлен элементами микробной биопленки. Ассоциации микроорганизмов полости рта колонизируют экосистему корневых каналов в виде биопленки, что существенно изменяет их свойства и затрудняет их удаление из системы корневых каналов.

В связи с этим, мы проводили экспериментальную оценку чувствительности штаммов предполагаемых возбудителей пульпита и периодонтита к

Характеристика изменений оптической плотности в процессе культивирования микробных популяций в биореакторе в режиме реального времени

Шаг	P. gingivalis		F. nucleatum		S. sanguinis		S. mutans	
	К	ФД+УЗ	К	ФД+УЗ	К	ФД+УЗ	К	ФД+УЗ
Начало подъема лаг-фазы	0,19±0,04	0,09±0,03*	0,19±0,04	0,09±0,03*	0,24±0,04	0,15±0,04*	0,30±0,04	0,27±0,04
Начало подъема логарифм. фазы	0,32±0,04	0,21±0,04*	0,29±0,04	0,15±0,02*	0,67±0,04	0,57±0,04	0,54±0,04	0,61±0,04
Начало подъема стац. фазы	2,13±0,05	0,93±0,04*	2,37±0,05	1,34±0,04*	2,37±0,05	1,56±0,04*	2,37±0,05	1,8±0,03*
Средний показатель стац. фазы	2,26±0,05	1,22±0,03*	2,28±0,05	1,37±0,03*	2,23±0,05	1,51±0,03*	2,42±0,05	1,79±0,04*

Примечание. * Достоверное снижение показателя при исследуемом физическом воздействии ($p < 0,05$).

физиотерапевтическим воздействиям — фотохимической дезинфекции (ФД) и ультразвуковой ирригации (УЗ). В табл. представлены результаты анализа кривых роста бактериальных популяций исследуемых штаммов с учетом узловых точек. В большинстве сравниваемых узловых точек для всех исследуемых штаммов отмечено достоверное снижение показателей, характеризующих лаг-фазу, экспоненциальную и стационарную фазы роста.

Это позволило нам дать описание эффекта комплексного физиотерапевтического воздействия на исследуемые штаммы облигатно-анаэробных и микроаэрофильных бактерий.

Оценка чувствительности к ультразвуковой обработке в комплексе с фотоактивируемой дезинфекцией штаммов грамотрицательных анаэробных бактерий с использованием собственного модифицированного метода разведений показала следующее (рис. 1). Лаг-фаза, охватывающая промежуток от момента посева бактерий до начала их роста, продолжалась в среднем одинаково у всех исследуемых штаммов — в пределах суток. Так, для *P. gingivalis* начало роста отмечалось на 16 час культивирования, а для *F. nucleatum* на 20 час как в контрольной, так и в исследуемой пробе. Экспоненциальная (логарифмическая) фаза, характеризующаяся прогрессирующим нарастанием скорости деления клеток, имела достоверные отличия: как по достижению максимума биомассы (определяемой при данной методике по оптической плотности — OD), так и по скорости прироста клеток. Показатели пикового максимума оптической плотности контрольной пробы составили: *P. gingivalis* — 2,37 OD (40 h); *F. nucleatum* — 2,45 OD (48 h). Задержка логарифмической фазы и переход в стационарную фазу в исследуемых пробах наблюдали еще через 20 — 28 час культивирования. Показатели пикового максимума оптической плотности исследуемой пробы составили: *P. gingivalis* — 1,47 OD (88 h); *F. nucleatum* — 1,46 OD (44 h) соответственно.

Оценка чувствительности к ультразвуковой обработке в комплексе с фотоактивируемой дезинфекцией штаммов грамположительных микроаэрофильных бактерий показала следующее (рис. 2).

Лаг-фаза продолжалась немного дольше, чем у грамотрицательных бактерий и отмечалась на 24 час культивирования в контрольной и исследуемой пробе. Экспоненциальная (логарифмическая) фаза также имела достоверные отличия как по достижению максимума биомассы, так и по скорости прироста клеток. Показатели пикового максимума оптической плотности контрольной пробы составили: *S. sanguinis* — 2,39 OD (40 h); *S. mutans* — 2,49 OD (48 h).

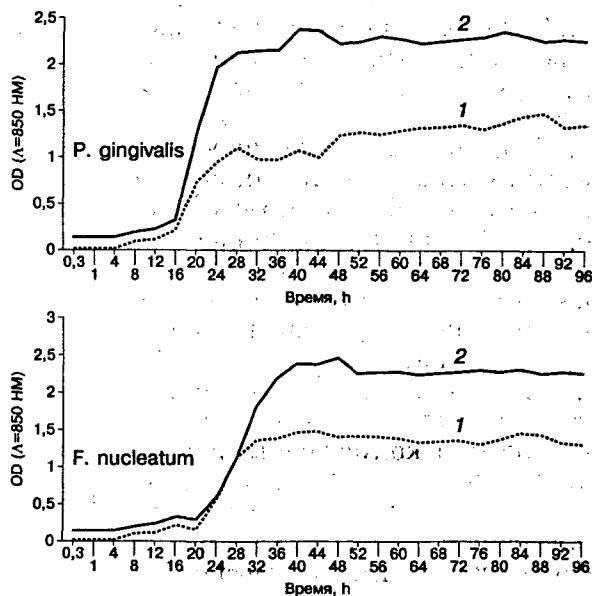


Рис. 1. Оценка чувствительности штаммов грамотрицательных бактерий к комплексному физиотерапевтическому воздействию.

Здесь и на рис. 2 — ультразвуковая + фотодинамическая обработка (1) *in vitro*; контроль (2).

Задержка логарифмической фазы и переход к стационарной фазе в исследуемых пробах наблюдали в промежутке от 32 час до 40 час культивирования. Наиболее чувствительным к УЗ и ФД обработке оказался *S. sanguinis* — максимум был отмечен на 36 час и составил 1,58 OD; более устойчивым оказался *S. mutans* — 2,01 OD (44 h).

ОБСУЖДЕНИЕ

Биопленка представляет собой сообщество микроорганизмов, окруженных внеклеточным полисахаридным матриксом и прикрепленных к влажной поверхности. Плотное прикрепление биопленки защищает присутствующие в ней микроорганизмы от воздействия неблагоприятных факторов, тем самым создавая благоприятные условия для размножения микроорганизмов [8]. Полисахаридный матрикс является специфическим барьером для проникновения внутрь биопленки антибактериальных агентов, в связи с чем повышается резистентность микробов к антисептикам и антибиотикам [4].

Полученные в нашем исследовании результаты позволяют предположить, что любой из представителей микробиоты, колонизирующей поверхность зуба, может контаминировать кариозную полость и проникнуть в пульпу зуба и далее — в систему дентинных канальцев, что является причиной воспалительного процесса. К ранним колонизаторам, которые формируют начальную биопленку, относят различные виды микроаэрофильных стрептококков, обладающих высокими адгезивными свойствами по отношению к эмали зуба. К промежуточным колонизаторам относят фузобактерии, к поздним — большинство представителей пародонтопатогенных видов (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* и др.).

По данным наших предыдущих исследований из системы дентинных канальцев могут выделяться с высокой частотой (от 50 до 90%) представители облигатно-анаэробных видов — *P. anaerobius*, *Peptococcus niger*, *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp., *T. forsythia*, но с меньшей (от 25 до 40%) — представители преимущественно микроаэрофильных видов — *Streptococcus sanguinis*, *Propionibacterium* spp., *Corynebacterium* spp., *Actinomyces* spp., а также некоторых облигатно-анаэробных — *Streptococcus intermedius*, *T. denticola*, *Eubacterium* spp. При этом частота выделения стафилококка составляла всего лишь 6,2%, энтерококка — 24,1%, а грибов рода *Candida* — 13,8% [8].

При проведении сканирующей электронной микроскопии подтверждено наличие обильной микробной колонизации «смазанного слоя» в области устьев дентинных канальцев корня зуба, имеющей признаки микробной био-

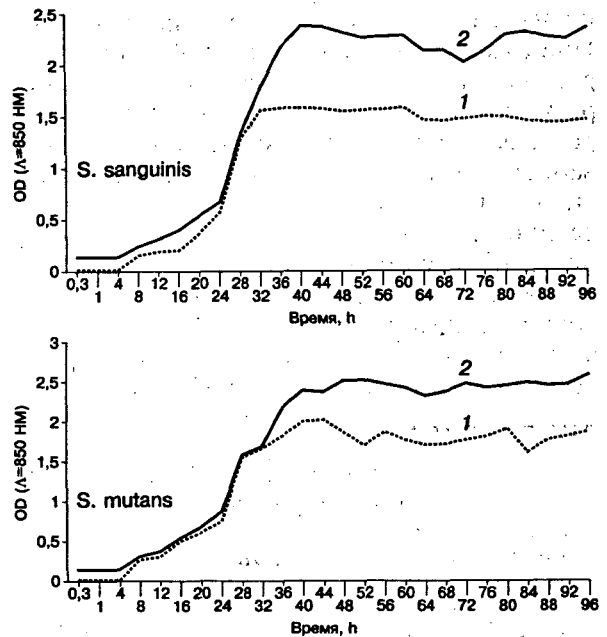


Рис. 2. Оценка чувствительности штаммов грамположительных бактерий к комплексному физиотерапевтическому воздействию.

пленки, представленной ассоциацией бактериоидных и дрожжевых клеток. При анализе динамики роста популяций бактерий у них были установлены различия в наступлении основных фаз кривой роста популяции, максимума размножения (стимуляции роста) и перехода к стационарной фазе. Кривые роста бактериальных популяций *in vitro* во всех случаях (со всеми использованными штаммами бактерий) демонстрировали статистически достоверное снижение по сравнению с контрольными образцами. Фотоактивируемая дезинфекция в комплексе с ультразвуковой активацией ирриганта *in vitro* по-разному влияют на процесс размножения микробных клеток штаммов — представителей нормальной микрофлоры полости рта и бактерий пародонтопатогенной группы, но во всех случаях имеет место бактериостатический эффект, выражающийся в торможении размножения бактерий по сравнению с контрольными образцами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бородина Н.Б., Петрова Т.Г. Пути повышения эффективности ирригации корневых каналов с использованием аппарата P5 Newtron XS фирмы Satelec. Новое в стоматологии. 2009, 1: 2.
2. Бир Р., Бауман М., Ким С. Эндонтология. Под ред. Т.Ф.Виноградовой. М., МЕДпресс-информ, 2004.
3. Деннхардт Х. Ультразвук в эндодонтии. Медицинский алфавит. 2014, 217 (1): 10-13.
4. Ипполитов Е.В., Диденко Л.В., Царев В.Н. Особенности морфологии биопленки пародонта при воспалительных заболеваниях десен (хронический катаральный гингивит, хронический пародонтит, кандидо-ассоциированный пародонтит) по данным электронной микроскопии. Клиническая лабораторная диагностика. 2015, 60 (12): 59-64.
5. Лабинская А.С., Костюкова Н.Н. и др. Руководство по медицинской микробиологии. Под ред. А.С.Лабинской М., Бином, 2014.
6. Митронин А.В., Чунихин А.А. Важные аспекты применения диодного лазера при эндодонтическом лечении хронического пульпита. Анализ клинико-лабораторного исследования. Российская стоматология. 2011, 4 (4): 34-40.
7. Роудз Джон С. Повторное эндодонтическое лечение: консервативные и хирургические методы. М., МЕДпрессинформ, 2009.
8. Царев В.Н., Дмитриева Л.А., Ипполитов Е.В., Нисанова С.Е. Последовательное применение антибактериальных и детоксицирующих препаратов при эндодонтическом лечении хронического апикального периодонтита. Эндодонтия Today. 2013, 1: 8-14.
9. Царев В.Н., Митронин А.В., Ипполитов Е.В., Малазония Т.Т., Подпорин М.С., Манучарян Л.А. Оценка антимикробного действия фотодинамической терапии на возбудителей неклостридиальной анаэробной инфекции полости рта и грибы рода *Candida* в экспериментальных и клинических исследованиях. Эндодонтия Today. 2015, 3: 15-20.
10. Plotino G., Pameijer C.H., Grande N.M., Somma F. Ultrasonic in endodontics: a review of the literature. J. Endod. 2007, 33 (2): 81-95.

Поступила 26.05.16

Контактная информация: Царев В.Н., д.м.н., проф.,
124473, Москва, ул. Делегатская, 20, стр. 1, р.т. (495)609-67-00