

УДК 621.929.1: 616-097:616.992.282

DOI: 10.24959/ubphj.17.98

М. В. РИБАЛКІН, Л. С. СТРЕЛЬНИКОВ, О. П. СТРИЛЕЦЬ

Національний фармацевтичний університет

## ОБҐРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ ЗМІШУВАННЯ КЛІТИН ГРИБІВ *C. ALBICANS* ТА *C. TROPICALIS*

**Актуальність.** Кількість хворих на кандидоз зростає з кожним роком, а для його лікування лікарі вже впродовж багатьох років використовують одні і ті ж антимікотики, до яких збудник поступово втрачає чутливість. Зараз за кордоном активно проводяться дослідження з розробки вакцин проти кандидамікозу.

**Метою даних досліджень** є обґрунтування технології змішування клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*.

**Матеріали та методи.** Для проведення ультразвукового змішування використовували ультразвукову установку при інтенсивності 0,3, 0,5 та 0,7 Вт/см<sup>2</sup> та експозиції 5, 10 та 15 хв. Для проведення механічного змішування використовували перемішувач з електричною мішалкою зі швидкістю обертання 50, 70 та 100 об/хв протягом 5, 10 та 15 хв. Після закінчення процесу змішування відбирали у кожному випадку по 1 мл одержаної суспензії, яку розводили в 10<sup>6</sup> та висівали на середовища Гісса в однакових об'ємах по 1 мл.

**Результати та їх обговорення.** Результати одержаних досліджень показали, що використання ультразвуку при досліджуваних параметрах не забезпечувало рівномірного змішування клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*. При використанні електромішалки зі швидкістю обертання 100 об/хв при експозиції 15 хв кількість КУО грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* була майже однаковою, що свідчить про повне та рівномірне змішування клітин грибів.

**Висновки.** В результаті експерименту встановлено, що змішування за допомогою електромішалки зі швидкістю обертання 100 об/хв протягом 15 хв в об'ємі 100 мл при змішуванні 50 мл суспензії клітин грибів *C. albicans* та 50 мл суспензії клітин грибів *C. tropicalis* забезпечує найкращий результат.

**Ключові слова:** кандидамікоз; антиген; вакцина; змішування; технологія

M. V. Rybalkin, L. S. Strelnikov, O. P. Strilets

### Foundation mixing technology of cells and mushrooms *C. albicans* and *C. tropicalis*

**Topicality.** Number of patients with candidiasis grow every year, and for its treatment doctors the same antimycotics for many years, the agent gradually loses sensitivity for them. Nowadays abroad, actively conducted research to develop vaccines against candidiasis.

**Aim.** To justify the technology mixing cell fungi *C. albicans* and *C. tropicalis*.

**Materials and methods.** For the ultrasonic mixing used ultrasonic intensity setting at 0.3, 0.5 and 0.7 W/cm<sup>2</sup> and exposure 5, 10 and 15 min. For the mechanical mixing used the device using mixing with an electric mixer with a speed of 50, 70 and 100 rev/min for 5, 10 and 15 min. After having finished the mixing process, 1 ml of the suspension was selected in each case, which was diluted in 10<sup>6</sup> and plated on medium Hissia in the same volume of 1 ml.

**Results and discussion.** The obtained results were showed that the use of ultrasound in investigating parameters have not provide uniform mixing cell fungi *C. albicans* and *C. tropicalis*. The using of mixer at rotation speed of 100 t/min for 15 min exposure amount CFU mushrooms *C. albicans* and *C. tropicalis* was almost identical, that is indicated a complete and uniform mixing of cells of fungi.

**Conclusions.** The result of experiment has found the using of mixer with speed of 100 rev/min for 15 min in 100 ml t/min by mixing 50 ml suspension of cell *C. albicans* fungi and 50 ml suspension of cell mushrooms *C. tropicalis* provides the best results.

**Key words:** candidiasis; antigen; vaccine; mix; technology

Н. В. Рыбалкин, Л. С. Стрельников, О. П. Стрилец

### Обоснование технологии смешивания клеток грибов *C. albicans* и *C. tropicalis*

**Актуальность.** Количество больных кандидозом растет с каждым годом, а для его лечения врачи уже много лет используют одни и те же антимикотики, к которым возбудитель постепенно теряет чувствительность. Сейчас за рубежом активно проводятся исследования по разработке вакцин против кандидамикоза.

**Целью данных исследований** является обоснование технологии смешивания клеток грибов *C. albicans* и *C. tropicalis*.

**Материалы и методы.** Для проведения ультразвукового смешивания использовали ультразвуковую установку при интенсивности 0,3, 0,5 и 0,7 Вт/см<sup>2</sup> и экспозиции 5, 10 и 15 мин. Для проведения механического смешивания использовали перемешивающее устройство с электрической мешалкой со скоростью вращения 50, 70 и 100 об/мин в течение 5, 10 и 15 мин. После окончания процесса смешивания отбирали в каждом случае по 1 мл полученной суспензии, которую разводили в 10<sup>6</sup> и высевали на среды Гисса в одинаковых объемах по 1 мл.

**Результаты и их обсуждение.** Результаты полученных исследований показали, что использование ультразвука при исследовании по параметрам не обеспечивало равномерного смешивания клеток грибов *C. albicans* и *C. tropicalis*. При использовании электромешалки со скоростью вращения 100 об/мин при экспозиции 15 мин количество КОЕ грибов *C. albicans* и *C. tropicalis* было почти одинаковым, что свидетельствует о полном и равномерном смешивании клеток грибов.

**Выводы.** В результате эксперимента установлено, что смешивание с помощью электромешалки со скоростью вращения 100 об/мин в течение 15 мин в объеме 100 мл при смешивании 50 мл суспензии клеток грибов *C. albicans* и 50 мл суспензии клеток грибов *C. tropicalis* обеспечивает лучший результат.

**Ключевые слова:** кандидамикоз; антиген; вакцина; смешивание; технология

## ВСТУП

Актуальним питанням сучасної фармації та медицини є розробка вакцин для попередження та лікування кандидозної інфекції. Це пов'язано з тим, що кількість хворих на кандидоз зростає з кожним роком [1-3], а для його лікування лікарі вже багато років використовують одні і ті ж антимікотики [4], до яких збудник поступово втрачає чутливість. Зараз за кордоном активно проводяться дослідження з розробки вакцин проти кандидамікозу. Іноземні дослідники пропонують різні варіанти вакцин: з живим послабленим збудником, з інактивованим збудником, субодиночні та полівалентні вакцини на основі різних видів збудника. Заявлені вакцини проходять стадію доклінічних та клінічних випробувань у США [5-6]. Необхідно зазначити, що в Україні на сьогодні не випускається та не зареєстровано жодної вакцини проти кандидамікозу.

У попередніх дослідженнях було обґрунтовано метод інактивації клітин грибів *Candida* [7]. Було з'ясовано, що інактивовані клітини грибів *Candida* володіють здатністю стимулювати протективну дію у здорових мишей до кандидозної інфекції та володіють здатністю стимулювати захисні реакції організму до кандидозної інфекції у хворих на кандидоз мишей, тобто володіють профілактичним та терапевтичним ефектами [8]. Дані ефекти були одержані окремо для інактивованих клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*. Враховуючи те, що кандидоз частіше за все викликають гриби *C. albicans* та *C. tropicalis*, було б доцільно перевірити поєднані інактивовані клітини грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* при попередженні та лікуванні кандидозної інфекції.

Для одержання поєднаних інактивованих клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* необхідно провести процес змішування суспензії інактивованих клітин грибів *C. albicans* та суспензії інактивованих клітин грибів *C. tropicalis*. Процес змішування повинен забезпечити рівномірний розподіл інактивованих клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* по всьому об'єму загальної суспензії клітин. Для цього можливе використання різних технологічних процесів: механічної мішалки, ультразвуку та тиску [9-10].

У нашому випадку для змішування інактивованих клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* подрібнення і руйнування інактивованих клітин грибів не потрібне, оскільки цілі інактивовані клітини грибів є антигенами. Тому ми не будемо розглядати процеси змішування, які призводять до руйнування клітин. Для проведення процесу змішування інактивованих клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* було обрано механічне та ультразвукове змішування як більш доступні та ефективні.

Метою дослідження є обґрунтування технології змішування клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для визначення якості процесу гомогенізації дослідження проводили з не інактивованими живими клітинами грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*. Живі клітини грибів були обрані для того, щоб можна було визначити рівномірність розподілу клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* після завершення процесу змішування. Це можливо буде виконати завдяки ферментативній активності грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*. Усі дріжджоподібні гриби ферментують глюкозу, *C. albicans* – глюкозу, мальтозу; *C. tropicalis* – глюкозу, мальтозу, сахарозу. Середовища Гісса – середовища з вуглеводами та індикаторами, які використовуються для визначення цукролітичних властивостей мікробів у процесі їх ідентифікації. Сухі комерційні середовища містять вуглевод (глюкозу, лактозу, сахарозу, маніт, мальтозу та інші), індикатор ВР (суміш водного голубого та розової кислоти), поживний агар та мінеральні солі.

Для проведення ультразвукового змішування використовували ультразвукову установку з параметрами роботи, які не призведуть до руйнування клітин – при довжині хвилі 22 кГц, інтенсивності 0,3, 0,5 та 0,7 Вт/см<sup>2</sup> та експозиції 5 хв. Потім згідно з одержаними результатами використовували обрану інтенсивність при експозиції 10 та 15 хв. Процес проводили в об'ємі 100 мл при змішуванні 50 мл суспензії клітин грибів *C. albicans* та 50 мл – *C. tropicalis* з концентрацією клітин грибів в обох випадках 5 млн кл./мл. Використання більшої експозиції може привести до руйнування клітин грибів. Для проведення механічного змішування використовували перемішувач з електричною мішалкою зі швидкістю обертання 50, 70 та 100 об/хв протягом 5 хв в об'ємі 100 мл при змішуванні 50 мл суспензії клітин грибів *C. albicans* та 50 мл – *C. tropicalis* з концентрацією клітин грибів в обох випадках 5 млн кл./мл. Використання більшої швидкості обертання може привести до руйнування клітин грибів. Далі згідно з одержаними результатами використовували обрану швидкість обертання при експозиції 10 та 15 хв. Використання більшої експозиції може привести до руйнування клітин грибів. Після закінчення процесу змішування відбирали у кожному випадку по 1 мл одержаної суспензії, яку розводили в 10<sup>6</sup> та висівали на середовища Гісса в однакових об'ємах по 1 мл.

Для визначення якості змішування проводили підрахунок колонієутворюючих одиниць (КУО) на середовищі для ідентифікації клітин грибів *C. albicans* та проводили підрахунок (КУО) на середовищі для ідентифікації клітин грибів *C. tropicalis*. Якщо кількість КУО на обох середовищах для визначення клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* буде максимально наближеною одна до одної, то можна стверджувати, що процес гомогенізації пройшов відповідним чином.

Таблиця 1

**ДОСЛІДЖЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ УЛЬТРАЗВУКУ  
ПРИ ЗМІШУВАННІ КЛІТИН ГРИБІВ  
*C. ALBICANS* ТА *C. TROPICALIS***

Метод змішування	Час, хв	Інтенсивність, Вт/см <sup>2</sup>	Кількість КУО <i>C. albicans</i> та <i>C. tropicalis</i>	
Ультразвук	5	0,3	38 ± 4	11 ± 2
		0,5	35 ± 3	16 ± 2
		0,7	32 ± 3	20 ± 2

Примітка: n = 6; P &lt; 0,5.

**РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ**

Змішані культури клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* висівали на перше середовище (агар Сабуру + середовище Гісса з глюкозою + середовище Гісса з мальтозою) та на друге середовище (агар Сабуру + середовище Гісса з сахарозою). У контролі культури гриба *C. albicans* висівали на перше середовище (агар Сабуру + середовище Гісса з глюкозою + середовище Гісса з мальтозою), а *C. tropicalis* висівали на друге середовище (агар Сабуру + середовище Гісса з сахарозою). Середовище Гісса з глюкозою та мальтозою має ніжно-блакитний колір, середовище Гісса з сахарозою – кремовий. Середовище Гісса з глюкозою та мальтозою має ніжно-блакитний колір, середовище Гісса з сахарозою – кремовий. Середовища з висівами витримували у термостаті протягом 48 год при температурі 28 ± 2 °C. Гриби *C. albicans* ростуть газоном або одиничними колоніями, які мають синій колір на середовищі Гісса з глюкозою та мальтозою, гриби *C. tropicalis* також ростуть газоном або одиничними колоніями, які мають синій колір на середовищі Гісса з сахарозою.

У результаті проведених досліджень було підтверджено, що клітини грибів *C. albicans* утворюють колонії синього кольору на середовищі Гісса з глюкозою та мальтозою, а клітини грибів *C. tropicalis* утворюють колонії синього кольору на середовищі Гісса з сахарозою. Одержані дані відповідають властивостям досліджуваних штамів грибів *Candida*.

За результатами проведених досліджень з визначення оптимальної інтенсивності було з'ясовано,

Таблиця 2

**ДОСЛІДЖЕННЯ ТРИВАЛОСТІ ЕКСПОЗИЦІЇ ПРИ  
УЛЬТРАЗВУКОВОМУ ЗМІШУВАННІ КЛІТИН  
ГРИБІВ *C. ALBICANS* ТА *C. TROPICALIS***

Метод змішування	Інтенсивність, Вт/см <sup>2</sup>	Час, хв	Кількість КУО <i>C. albicans</i> та <i>C. tropicalis</i>	
Ультразвук	0,7	10	30 ± 3	21 ± 2
		15	28 ± 3	22 ± 2

Примітка: n = 6; P &lt; 0,5.

Таблиця 3

**ДОСЛІДЖЕННЯ ШВИДКОСТІ ОБЕРТАННЯ  
ЕЛЕКТРОМІШАЛКИ ПРИ ЗМІШУВАННІ КЛІТИН  
ГРИБІВ *C. ALBICANS* ТА *C. TROPICALIS***

Метод змішування	Час, хв	Швидкість обертання, об/хв	Кількість КУО <i>C. albicans</i> та <i>C. tropicalis</i>	
Електрична мішалка	5	50	35 ± 3	16 ± 2
		75	33 ± 3	18 ± 2
		100	30 ± 3	21 ± 2

Примітка: n = 6; P &lt; 0,5.

що при всіх досліджуваних інтенсивностях кількість КУО грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* була різною, що свідчить про неповне змішування клітин грибів в усіх випадках. Результати досліджень наведені в табл. 1.

Однак найкращий результат серед одержаних був при інтенсивності 0,7 Вт/см<sup>2</sup>. Тому далі були проведені дослідження при інтенсивності 0,7 Вт/см<sup>2</sup> та збільшеній експозиції до 10 та 15 хв. Результати одержаних досліджень показали, що при всіх досліджуваних експозиціях кількість КУО грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* була різною, що свідчить про неповне змішування клітин грибів в усіх випадках. Результати дослідження наведені в табл. 2.

За результатами проведених досліджень з визначення оптимальної швидкості обертання електромішалки було з'ясовано, що при всіх досліджуваних швидкостях кількість КУО грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* була різною, що свідчить про неповне змішування клітин грибів в усіх випадках. Результати досліджень наведені в табл. 3.

Однак найкращий результат серед одержаних був при швидкості обертання 100 об/хв. Тому далі були проведені дослідження при швидкості обертання 100 об/хв та збільшеній експозиції до 10 та 15 хв. Результати одержаних досліджень показали, що при експозиції 15 хв кількість КУО грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* була майже однаковою, що свідчить про повне та рівномірне змішування клітин грибів. Результати дослідження наведені в табл. 4. Для по-

Таблиця 4

**ДОСЛІДЖЕННЯ ТРИВАЛОСТІ ЕКСПОЗИЦІЇ ПРИ  
ЗМІШУВАННІ ЕЛЕКТРОМІШАЛКОЮ КЛІТИН  
ГРИБІВ *C. ALBICANS* ТА *C. TROPICALIS***

Метод змішування	Швидкість обертання, об/хв	Час, хв	Кількість КУО <i>C. albicans</i> та <i>C. tropicalis</i>	
Електрична мішалка	100	10	28 ± 3	22 ± 2
		15	26 ± 2	25 ± 3

Примітка: n = 6; P &lt; 0,5.

дальших досліджень було обрано використання електромішалки для змішування клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*.

### ВИСНОВКИ

Таким чином, можна зробити висновок, що змішування за допомогою електромішалки зі швидкістю обертання 100 об/хв протягом 15 хв в об'ємі 100 мл

при змішуванні 50 мл суспензії клітин грибів *C. albicans* та 50 мл суспензії клітин грибів *C. tropicalis* забезпечує найкращий результат. У подальшому планується проведення досліджень з визначення оптимальної концентрації клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* при попередженні та терапії кандидозної інфекції.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

### ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Kullberg, B. J. Invasive Candidiasis / B. J. Kullberg, M. C. Arendrup // *New Engl. J. Med.* – 2015. – Vol. 373. – P. 1445–1456.
2. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review / S. Antinori, L. Milazzo, S. Sollima et al. // *NCBI.* – 2016. – № 34. – P. 21–28.
3. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America / P. G. Pappas, C. A. Kauffman, D. R. Andes et al. // *Clin. Infect Dis.* – 2016. – 62:e1.
4. Маркетингові дослідження ринку протигрибкових лікарських засобів для місцевого застосування / О. І. Тихонов, О. Є. Фролова, О. П. Гудзенко, С. В. Барнатович // *Соціальна фармація в охороні здоров'я.* – 2015. – Т. 2, № 2. – С. 77–81.
5. Cassone, A. Development of vaccines for *Candida albicans*: fighting a skilled transformer / A. Cassone // *Nature Rev. Microbiol.* – 2013. – Vol. 11. – P. 884–891.
6. Vaccines in the treatment of invasive candidiasis / X. Wang, X. Sui, L. Yan et al. // *Virulence.* – 2015. – Vol. 6, № 4. – P. 309–315.
7. Рибалкін, М. В. Обґрунтування оптимального методу інактивації клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* / М. В. Рибалкін // *Фармаком.* – 2014. – № 2. – С. 30–33.
8. Визначення здатності інактивованих клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* окремо формувати імунітет проти кандидозної інфекції / М. В. Рибалкін, Н. І. Філімонова, О. П. Стрілець, Л. С. Стрельников // *Укр. біофармац. журн.* – 2014. – Т. 31, № 2. – С. 8–12.
9. Краснополський, Ю. М. Фармацевтическая биотехнология. Технология производства иммунобиологических препаратов / Ю. М. Краснополський, М. И. Борщевская. – Х. : НТУ «ХПИ», 2009. – 352 с.
10. Crommelin, D. J. A. *Pharmaceutical biotechnology: fundamentals and applications.* 4th ed. / D. J. A. Crommelin, R. D. Sindelar, B. Meibohm. – New York : Springer, 2013. – 490 p.

### REFERENCES

1. Campion, E. W., Kullberg, B. J., Arendrup, M. C. (2015). Invasive Candidiasis. *New England Journal of Medicine*, 373(15), 1445–1456. doi: 10.1056/nejmra1315399
2. Antinori, S., Milazzo, L., Sollima, S., Galli, M., Corbellino, M. (2016). Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. *European Journal of Internal Medicine*, 34, 21–28. doi:10.1016/j.ejim.2016.06.029
3. Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D. R., Clancy, C. J., Marr, K. A., Ostrosky-Zeichner et al. (2015). Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 62 (4). doi:10.1093/cid/civ933
4. Tykhonov, O. I., Frolova, O. Ye., Hudzenko, O. P., Barnatovych, S. V. (2015). *Social pharmacy in health care*, 2 (2), 77–81.
5. Cassone, A. (2013). Development of vaccines for *Candida albicans*: fighting a skilled transformer. *Nature Reviews Microbiology*, 11(12), 884–891. doi: 10.1038/nrmicro3156
6. Wang, X., Sui, X., Yan, L., Wang, Y., Cao, Y., Jiang, Y. (2015). Vaccines in the treatment of invasive candidiasis. *Virulence*, 6 (4), 309–315. doi: 10.4161/21505594.2014.983015
7. Rybalkin, M. V. (2014). *Farmakom*, 2, 30–33.
8. Rybalkin, M. V., Filimonova, N. I., Strilets', O. P., Strel'nykov L. S. (2014). *Ukrains'kyi biofarmatsevtichnyi zhurnal – Ukrainian biopharmaceutical journal*, 31 (2), 8–12.
9. Krasnopol'skyi, Yu. M., Borshchevskaia, M. Y. (2009). *Farmatsevticheskaia biotekhnolohiia. Tekhnolohiia proizvodstva immunobiologicheskikh preparatov.* Kharkov: NTU «KHP», 352.
10. Crommelin, D. J. A., Sindelar, R. D., Meibohm, B. (2013). *Pharmaceutical biotechnology: fundamentals and applications.* (4th ed). New York: Springer, 490. doi: 10.1007/978-1-4614-6486-0

#### Відомості про авторів:

Рибалкін М. В., канд. фарм. н., асистент кафедри біотехнології, Національний фармацевтичний університет. E-mail: ribalkin.nikolay@mail.ru. ORCID – <http://orcid.org/0000-0001-8887-1086>

Стрельников Л. С., д-р фарм. н., професор, завідувач кафедри біотехнології, Національний фармацевтичний університет. E-mail: biotech@nuph.edu.ua. ORCID – <http://orcid.org/0000-0002-0883-470X>

Стрілець О. П., д-р фарм. н., професор кафедри біотехнології, Національний фармацевтичний університет. E-mail: biotech@nuph.edu.ua. ORCID – <http://orcid.org/0000-0003-0846-8663>

#### Information about authors:

Rybalkin M. V., c. pharm. s, assistant of the Biotechnology Department, National University of Pharmacy. E-mail: ribalkin.nikolay@mail.ru. ORCID – <http://orcid.org/0000-0001-8887-1086>

Strelnikov L. S., d. pharm. s, professor, head of the Biotechnology Department, National University of Pharmacy. E-mail: biotech@nuph.edu.ua. ORCID – <http://orcid.org/0000-0002-0883-470X>

Strilets O. P., d. pharm. s, professor of the Biotechnology Department, National University of Pharmacy. E-mail: biotech@nuph.edu.ua. ORCID – <http://orcid.org/0000-0003-0846-8663>

#### Сведения об авторах:

Рыбалкин Н. В., канд. фарм. н., ассистент кафедры биотехнологии, Национальный фармацевтический университет. E-mail: ribalkin.nikolay@mail.ru. ORCID – <http://orcid.org/0000-0001-8887-1086>

Стрельников Л. С., д-р фарм. н., профессор, заведующий кафедрой биотехнологии, Национальный фармацевтический университет. E-mail: biotech@nuph.edu.ua. ORCID – <http://orcid.org/0000-0002-0883-470X>

Стрилец О. П., д-р фарм. н., профессор кафедры биотехнологии, Национальный фармацевтический университет. E-mail: biotech@nuph.edu.ua. ORCID – <http://orcid.org/0000-0003-0846-8663>

Рекомендовано д. мед. н., професором Н. І. Філімоною

Надійшла до редакції 11.01.2017 р.