

7. Agaeva N.A. Microbiological and immunological characteristics of periodontitis and gingivitis with aktinomikoticheskoy etiology. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2010; 3: 7–12. (in Russian)
8. Ebersole J.L., Dawson D.R., Morford L.A., Peayala R., Miller C.S., González O.A. Periodontal disease immunology: 'double indemnity' in protecting the host. *Periodontol*. 2000. 2013; 62(1): 163–202.
9. Tamarova Je.R., Mavzjutov A.R. Clinical laboratory Parallels between the species composition of the microbiota of the oral cavity and somatic pathology in patients with periodontitis. *Permskij meditsinskij zhurnal*. 2014, 31(6): 68–73.
10. Ivanjushko T.P., Tumbinskaja L.V., Donnikov A.E. Investigation of opportunistic pathogens by real-time PCR in patients with periodontitis. *Stomatologiya*. 2011; 5: 22–6. (in Russian)
11. Zorina O.A., Kulakov A.A., Rebrikov D.V. Quantitative detection of periodontopathogenic microflora in periodontosis and healthy control. *Stomatologiya*. 2011; 3: 40–2. (in Russian)
12. Zyrjanova N.V., Grigor'jan A.S., Grudjanov A.I. Species composition of an anaerobic microflora of periodontal pockets depending on the stage of periodontitis. *Stomatologiya*. 2009; 4: 43–7. (in Russian)
13. Wade W.G. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol. Res*. 2013; 69: 137–43.
14. Kuramitsu H.K., He X., Lux R., Anderson M.H., Shi W. Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2007, 71(4): 653–70.
15. Komleva A.S., Chesnokova M.G., Nedoseko V.B., Mironov A.Ju. Pathogens biotope periodontal and their sensitivity to antibiotics in patients with chronic generalized periodontitis. *Stomatolog*. 2012; 3: 54–60.

Received 29.04.15

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.311.2-002-07:616.314.17-091.8-078-076.4

Ипполитов Е. В.¹, Диденко Л. В.², Царев В. Н.¹

ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИИ БИОПЛЕНКИ ПАРОДОНТА ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ДЕСЕН (ХРОНИЧЕСКИЙ КАТАРАЛЬНЫЙ ГИНГИВИТ, ХРОНИЧЕСКИЙ ПАРОДОНТИТ, КАНДИДА-АССОЦИИРОВАННЫЙ ПАРОДОНТИТ) ПО ДАННЫМ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

¹ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А. И. Евдокимова» Минздрава России, 127473, г. Москва, Россия; ²ГУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» РАН, 123098, г. Москва, Россия

Цель исследования – изучить морфологию биопленки пародонта и разработать электронно-микроскопические критерии дифференциальной диагностики воспалительных заболеваний десен. С помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) проведено исследование образцов биопленки пародонта у 70 человек, в том числе 10 пациентов каждой нозологической формы, включая группы с хроническим пародонтитом легкой, средней, тяжелой степени, хроническим катаральным гингивитом, кандида-ассоциированным пародонтитом, и 20 здоровых людей с интактным пародонтом. Исследования выполняли с помощью двухлучевого сканирующего электронного микроскопа Quanta 200 3D (FEI Company, США) и просвечивающего электронного микроскопа JEM 100B (JEOL, Япония). Для определения маркерной ДНК пародонтопатогенных бактерий в исследуемых образцах использовали набор реагентов для ПЦР «МультиДент-5» («ГенЛаб», Россия). СЭМ в сочетании с трансмиссионной электронной микроскопией и ПЦР позволяет не только изучать строение, состав и степень развития биопленки пародонта, но также проводить дифференциальную диагностику разных нозологических форм воспалительных заболеваний пародонта, включая легкую форму хронического пародонтита и гингивит. Установлены электронно-микроскопические признаки заболеваний пародонта воспалительной природы: катаральный гингивит (кокковый морфологический вариант), хронический пародонтит (бацилярный морфологический вариант), кандида-ассоциированный пародонтит (кандидозный морфологический вариант биопленки пародонта).

Ключевые слова: биопленка пародонта; сканирующая электронная микроскопия; трансмиссионная электронная микроскопия; ПЦР; пародонтит.

Для цитирования: Клиническая лабораторная диагностика. 2015;60(12): 59–64.

Ippolitov E.V.¹, Didenko L.V.², Tzarev V.N.¹

THE CHARACTERISTICS OF MORPHOLOGY OF BIOFILM OF PERIODONTIUM UNDER INFLAMMATORY DISEASES OF GUMS (CHRONIC CATARRHAL GINGIVITIS, CHRONIC PERIODONTITIS, CANDIDA-ASSOCIATED PERIODONTITIS) ACCORDING RESULTS OF ELECTRONIC MICROSCOPY

¹The A.E. Evdokimov Moscow state medical stomatological university, 127473 Moscow, Russia; ²The N.F. Gamaleia research institute of epidemiology and microbiology, 123098 Moscow, Russia

The study was carried out to analyze morphology of biofilm of periodontium and to develop electronic microscopic criteria of differentiated diagnostic of inflammatory diseases of gums. The scanning electronic microscopy was applied to analyze samples of biofilm of periodont from 70 patients. Including ten patients with every nosologic form of groups with chronic catarrhal periodontitis of light, mean and severe degree, chronic catarrhal gingivitis, Candida-associated parodontitis and 20 healthy

Для корреспонденции: Ипполитов Евгений Валерьевич, ippo@bk.ru

For correspondence: Ippolitov E.V. ippo@bk.ru

persons with intact periodontium. The analysis was implemented using dual-beam scanning electronic microscope Quanta 200 3D (FEI company, USA) and walk-through electronic mic.JEM 100B (JEOL, Japan). To detect marker DNA of periodont pathogenic bacteria in analyzed samples the kit of reagents for polymerase chain reaction "MultiDent-5" ("GenLab", Russia). The scanning electronic microscopy in combination with transmission electronic microscopy and polymerase chain reaction permits analyzing structure, composition and degree of development of biofilm of periodontium and to apply differentiated diagnostic of different nosologic forms of inflammatory diseases of periodontium, including light form of chronic periodontitis and gingivitis. The electronic microscopical indications of diseases of periodontium of inflammatory character are established: catarrhal gingivitis, (coccal morphological alternate), chronic periodontitis (bacillary morphological alternate), Candida-associated periodontitis (Candida morphological alternate of biofilm of periodontium).

Key words: *biofilm of periodontium; scanning electronic microscopy; transmission electronic microscopy; polymerase chain reaction; periodontitis*

Citation: *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. 2015; 60 (12): 59–64. (in Russ.)*

Формирование микробных биопленок происходит в несколько стадий. Определяющими являются процессы адгезии микробов к субстрату, которая может быть специфической и неспецифической [1, 9]. На процесс прикрепления бактерий к субстрату влияют различные факторы: химическое сродство поверхностных молекул, разность зарядов, шероховатость поверхности, подвижность [2, 3, 9, 10]. Установлено, что жгутики, обеспечивающие движение бактерий к источнику питания, могут содержать химические соединения – аттрактанты, способствующие прилипанию клеток к тканям. Перитрихальные жгутики осуществляют особое поступательное движение и роение клеток, а полярно расположенные могут также обеспечивать движение бактерий и по поверхности субстрата [7].

В адгезии бактерий к субстратам большую роль играют экзополисахариды, синтез которых наиболее выражен у грамотрицательных бактерий [2]. Адгезия жгутиковых бактерий (синегнойная палочка) происходит быстрее, чем безжгутиковых [8, 9].

У безжгутиковых бактерий адгезия происходит посредством увеличения экспрессии поверхностных адгезинов (белок Вар и экзополисахариды (PIA или PN), которые способствуют прикреплению к субстрату и обеспечивают межклеточные взаимодействия [2, 8, 9].

На следующем этапе происходит образование микроколоний (деление и объединение бактериальных клеток в единую структуру). На этом этапе можно наблюдать начало синтеза экзоклеточного матрикса, который объединяет бактерии и является облигатным признаком формирования биопленки [10].

Экзоклеточный матрикс, в состав которого входят гомо- и гетерополисахариды, урновые кислоты, аминокислоты и их сополимеры, белки, нуклеиновые кислоты, липополисахариды, различные минералы (кальций, фосфор и в небольших количествах магний, калий, натрий), выполняет защитную функцию, препятствуя диффузии бактерицидных агентов и действию физических факторов, таких как ультрафиолетовое облучение, изменение pH, осмотический шок, высыхание, участвует в образовании полимикробных биопленок [2–4, 6, 10].

Цель исследования – изучить морфологию биопленки пародонта и разработать электронно-микроскопические критерии дифференциальной диагностики воспалительных заболеваний десен (хронический катаральный гингивит, хронический пародонтит, кандидо-ассоциированный пародонтит).

Материалы и методы. Проведено комплексное обследование 370 человек в возрасте от 18 до 54 лет (183 женщины и 187 мужчин) за период с 2009 по 2015 г. на базе пародонтологических отделений консультативно-диагностических центров при Московском государственном медико-стоматологическом университете им. А.И. Евдокимова (МГМСУ).

На основании эпидемиологических, клинико-анамнестических и лабораторных данных выделены следующие группы пациентов: группа 1 – пациенты с хроническим генерализованным пародонтитом ($n = 210$), 1а – с легкой степенью хронического пародонтита – ХПЛ ($n = 70$), 1б – со средней степенью хронического пародонтита – ХПС ($n = 70$), 1в – с тяжелой степенью хронического пародонтита – ХПТ ($n = 70$); группа 2 – пациенты с катаральным гингивитом ($n = 50$);

группа 3 – пациенты с кандидо-ассоциированным пародонтитом – КАП ($n = 40$); группа 4 – контрольная – 70 человек со здоровым пародонтом.

Для выполнения электронной микроскопии в каждой группе методом случайной выборки отбирали по 10 человек, а в контрольной – 20 (всего 70 человек), у которых проводили исследование трех проб материала (биопленка десны в области десневой борозды 1–2-го моляров сверху, снизу и из наиболее глубокого пародонтального кармана при его наличии). По результатам микроскопии выделяли несколько морфологических вариантов биопленки. Положительным решением в пользу того или иного варианта считали те пробы, в которых морфологическая картина как минимум двух проб из трех совпадала. У здоровых (при отсутствии пародонтальных карманов) исследовали две пробы, взятые в области десневой борозды 1–2-го моляров сверху и снизу.

Для изучения морфологии биопленки десен проводили сканирующую электронную микроскопию (СЭМ). Образцы десневой биопленки, взятые из пародонтального кармана путем соскоба скейлером, фиксировали 10% раствором нейтрального формалина. Исследование выполняли с помощью двухлучевого сканирующего электронного микроскопа Quanta 200 3D (FEI Company, США) в режимах высокого вакуума при ускоряющих напряжениях 5 и ЮкВ, с предварительным напылением золотом (999) в установке SPI-Module Sputter/Carbon Coater System (SPI Inc., США). В процессе подготовки образцов не применялось традиционное для СЭМ обезвреживание спиртами или ацетоном. Отсутствие дегидратации образцов позволило сохранить их нативную структуру, в частности структуру экзоклеточного матрикса биопленок, на 90% состоящего из воды [10].

Для оценки морфологии бактерий проведено также ультраструктурное исследование соскобов биопленки с использованием просвечивающей трансмиссионной электронной микроскопии. Образцы препаратов для исследования приготовлены по общепринятой методике для исследования методом ультратонких срезов и проанализированы в просвечивающем электронном микроскопе JEM 100B (JEOL, Япония). Микроскопическое исследование выполнено на базе лаборатории анатомии микробов НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи.

Для подтверждения наличия в исследуемом материале бактерий пародонтопатогенных видов использована мультиплексная ПЦР – набор реактивов «МультиДент-5» НПФ «Ген-Лаб» (Россия). Молекулярно-биологическое исследование выполнено на базе кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и лаборатории молекулярно-биологических исследований НИМСИ МГМСУ им. А. И. Евдокимова.

Результаты исследования обработаны методом вариационной статистики с вычислением вероятности различий P и критерия χ^2 .

Результаты и обсуждение. Основное содержание исследования состояло в оценке цитоморфологической картины смешанной биопленки пародонта пациентов с интактным пародонтом (условно здоровые) и основными нозологическими формами воспалительных заболеваний пародонта по данным различных видов микроскопического исследования.

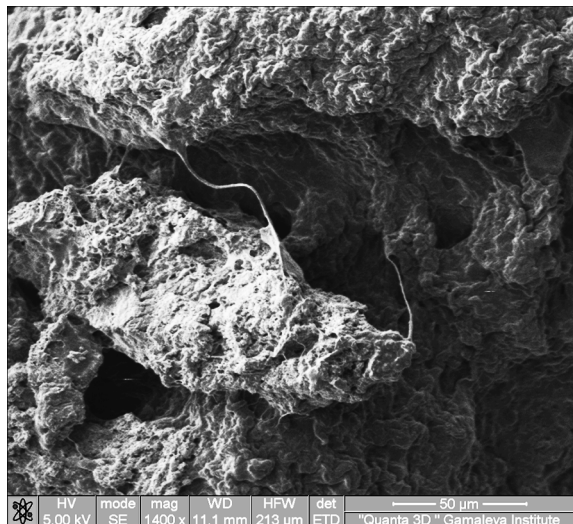


Рис. 1. Холмообразные скопления симбионтов, покрытых мантией, и отверстия, выполняющие дренажную функцию. Ув. 1400.

Микроскопическая характеристика биопленки интактного пародонта показана на рис. 1–3.

На рис. 1 при увеличении 1400 представлен общий вид смешанной микробной биопленки, которая четко структурирована. Отчетливо видны отверстия, выполняющие дренажную функцию, тяжи, укрепляющие матрикс, при данном увеличении слабо прослеживаются контуры бактерий, прикрытые мантией.

На рис. 2 при увеличении 100 виден разрыв пролиферирующей биопленки с выходом микробной массы в виде бугра. Подобные образования, которые формируются при росте однородной биопленки получили название «номады». Они представляют собой способ пролиферации микробного сообщества и выхода его за пределы первоначальной локализации. Этот механизм имеет место и в случае смешанной биопленки в клинических условиях.

На рис. 3 при значительно большем увеличении (16 000) видна поверхность смешанной биопленки интактного пародонта. Отчетливо видны контуры микробных клеток под мантией (кокки и палочковидные или бациллярные клетки).

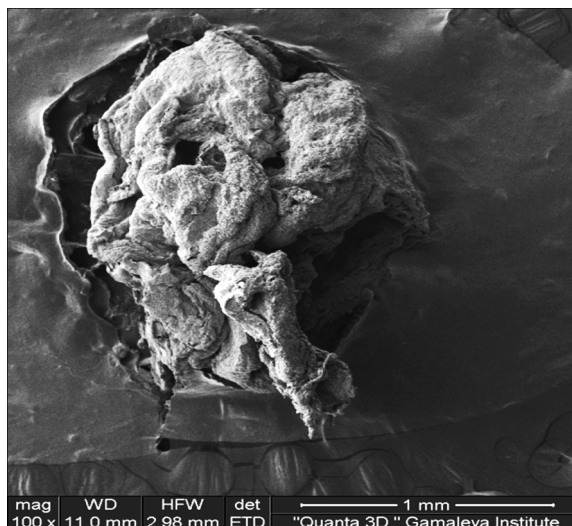


Рис. 2. Проллиферирующая биопленка интактного пародонта. Виден разрыв мантии с выростом микробной биомассы. Ув. 100.

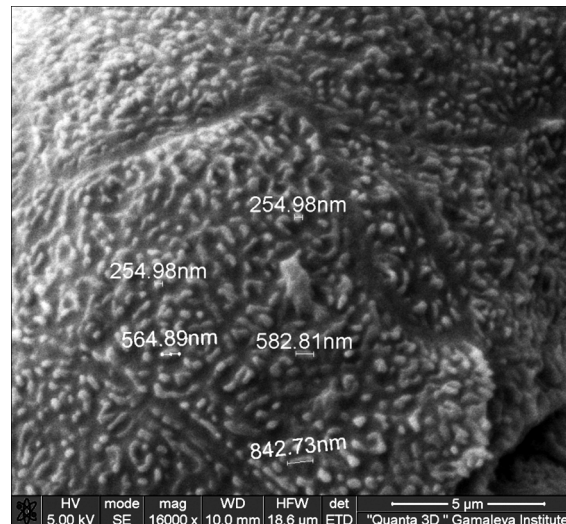


Рис. 3. Поверхность смешанной биопленки интактного пародонта.

Видны контуры микробных клеток под мантией. Указаны размеры структурных компонентов. Ув. 16 000.

Величина клеточных элементов микробной биомассы составляет примерно от 250 до 850 нм для кокковидных и палочковидных форм соответственно.

При исследовании клинического материала от пациентов выявили патогномичные особенности микробного состава биопленки пародонта при разных нозологических формах воспалительных заболеваний, описание которых представлено ниже.

Хронический катаральный гингивит. При катаральном гингивите наблюдаются воспалительная инфильтрация и отек слизистой десны (пародонта), прикрепление десны не нарушается и патологический (пародонтальный) карман не образуется. Микробный состав представлен преимущественно гемолитическими микроаэрофильными стрептококками [5]. Удалось получить электронно-микроскопическую картину смешанной биопленки слизистой оболочки десен при катаральном гингивите (рис. 4); подтверждается доминирование кокковых форм с четкой морфологической картиной стрепто-

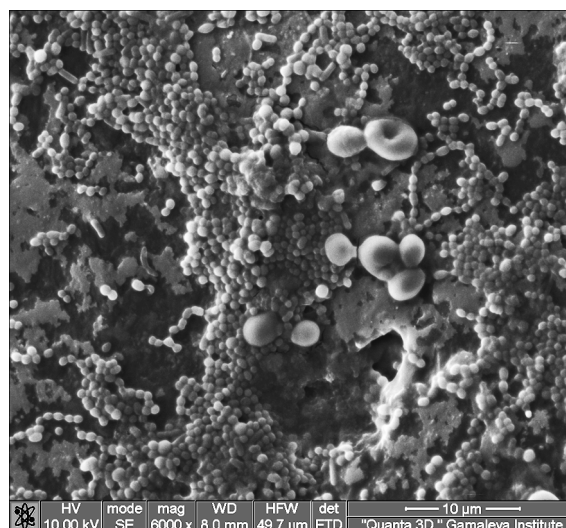


Рис. 4. Фрагмент смешанной биопленки (преимущественно кокковый морфологический вариант) при хроническом катаральном гингивите. СЭМ. Ув. 6000.

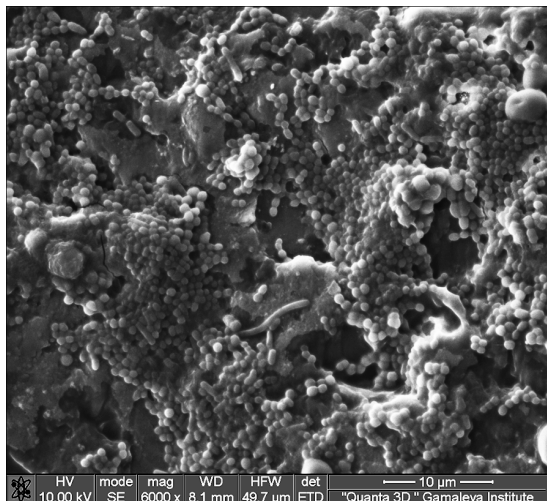


Рис. 5. Фрагмент смешанной биопленки (преимущественно бациллярный морфологический вариант) при хроническом пародонтите средней степени тяжести. СЭМ. Ув. 6000.

кокков и единичных клеток сахаромицетов. Данная картина может быть охарактеризована как кокковый морфологический вариант, который, на наш взгляд, можно считать патогномоничным микроскопическим признаком катарального гингивита.

Хронический генерализованный пародонтит. Иная картина наблюдалась при хроническом пародонтите (рис.5). При увеличении 6000 отмечается наличие как кокковых, так и палочковидных или бациллярных форм, главным образом за счет представителей родов пародонтопатогенных бактерий *Porphyromonas*, *Prevotella*. Этот морфологический вариант наиболее выражен у пациентов с ХПД и ХПС, в то время как при ХПТ микрофлора еще более разнообразна; встречались сочетания разных вариантов, включая мицелий грибов и большое количество извитых форм.

При использовании трансмиссионной электронной микроскопии (рис.6) можно отметить особенности строения грамположительных кокков и грамотрицательных бациллярных форм, а также извитых (трепонемы), которые позволяют провести их ориентировочную идентификацию. Представленный на рис.6 клеточный состав характерен для представителей пародонтопатогенных видов бактерий, относящихся к родам *Porphyromonas*, *Prevotella* и *Treponema*.

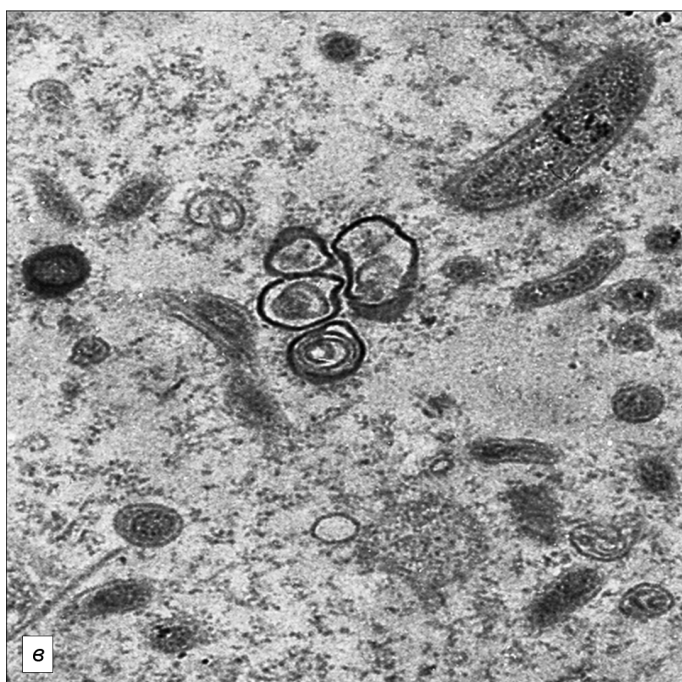
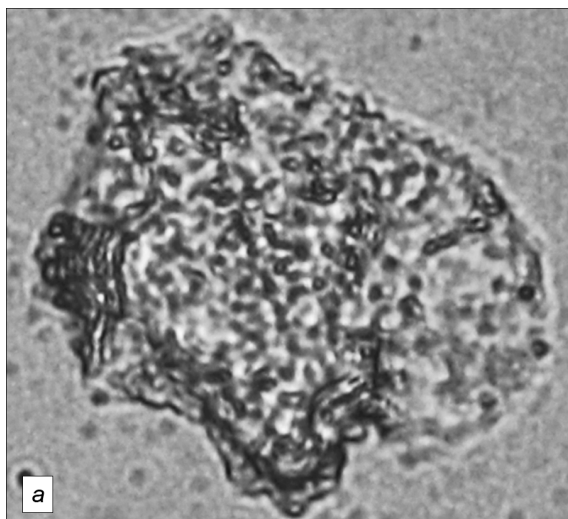


Рис. 6. Микробный состав биопленки при хроническом пародонтите.

а – фрагмент биопленки при световой микроскопии; б – *T. denticola*; в – палочковидные (бациллярные) и кокковые формы. Видны различия между пептидогликановым слоем грамположительных кокков и клеточной стенкой грамотрицательных бактерий.

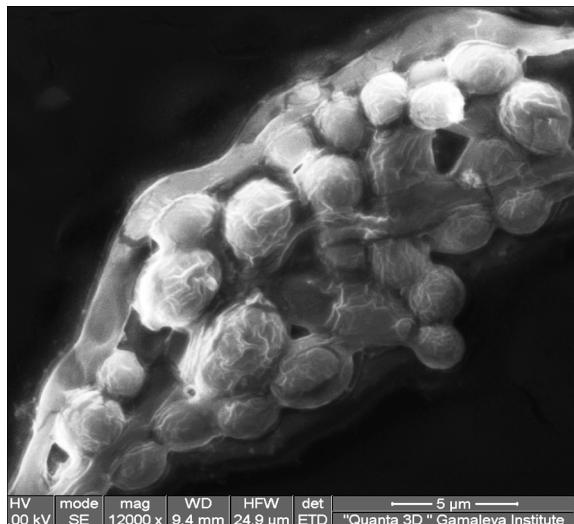


Рис. 7. Фрагмент биопленки дрожжевых грибов *Candida albicans* из пародонтального кармана при КАП. СЭМ. Ув. 12 000.

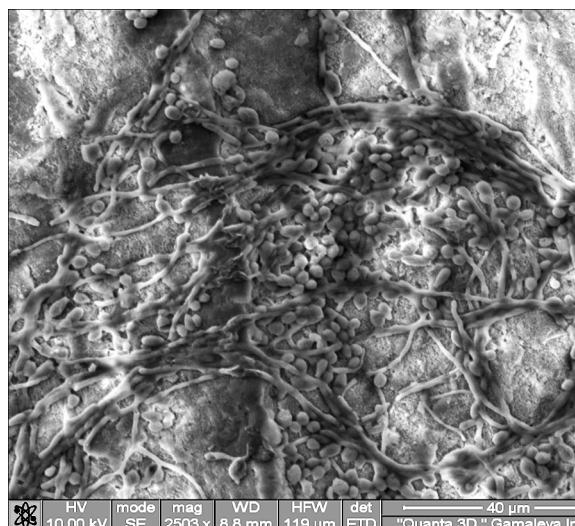


Рис. 8. Биопленка дрожжевых грибов рода *Candida albicans* на слизистой пародонта при КАП. СЭМ. Ув. 2503.

Таксономическая принадлежность выявленных морфологических форм подтверждена с помощью ПЦР, которая позволила установить наличие в образцах биопленки пародонта представителей пародонтопатогенных видов 1-го порядка – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, а также пародонтопатогенных видов 2-го порядка – *Prevotella intermedia* и *Treponema denticola*.

Кандида-ассоциированный пародонтит (КАП). При КАП структура биопленки отличалась доминированием грибов рода *Candida*. На рис. 7 при большом увеличении (12000) на сканирующем электронном микроскопе видны фрагменты биопленки, заключенные в мантию. Клеточный состав представляет собой типичные бластоспоры *Candida albicans*.

На рис. 8 при увеличении 2503 видна типичная биопленка с мантией, покрывающая фрагменты псевдомицелия *Candida albicans*. В пользу видовой принадлежности данного штамма свидетельствует наличие единичных хламидоспор на концах нитей псевдомицелия.

Заключение. С помощью сканирующей электронной микроскопии можно не только изучать строение, состав, степень развития биопленки пародонта, но также проводить

дифференциальную диагностику разных нозологических форм воспалительных заболеваний пародонта. Установлены электронно-микроскопические признаки таких форм воспалительных заболеваний пародонта, как катаральный гингивит (кокковый морфологический вариант), хронический пародонтит (бациллярный морфологический вариант), кандида-ассоциированный пародонтит (кандидозный морфологический вариант биопленки пародонта). Особенно важен данный подход, на наш взгляд, при дифференциальной диагностике катарального гингивита и хронического пародонтита легкой степени, поскольку эти нозологические формы трудно различимы по данным объективного клинического исследования и индексной оценке состояния тканевой пародонта. В отличие от катарального гингивита при хроническом пародонтите легкой степени уже запускается процесс нарушения зубодесневого прикрепления и начинается формирование патологического (пародонтального) кармана.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнов С. Д., Царев В. Н., Ипполитов Е. В., Аapresян С. В., Трефилов А. Г. Формирование биопленки на временных зубных протезах: соотношение процессов первичной микробной адгезии, коаггрегации и колонизации. *Стоматология*. 2012; 91(5–1): 5–10.
2. Маянский А. Н., Чеботарь И. В. Стафилококковые биопленки: структура, регуляция, отторжение. *Журнал Микробиология*. 2011; 1: 101–8.
3. Царев В. Н., Арутюнов А. С., Седракан А. Н., Орлова О. А., Спиранде И. В. Микробиологическое обоснование выбора базисного материала зубочелюстных лечебных аппаратов больным с послеоперационными дефектами верхней челюсти. *Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН*. 2009; 20(1): 58–63.
4. Царев В. Н., Ипполитов Е. В., Трефилов А. Г., Арутюнов С. Д., Пивоваров А. А. Взаимосвязь адгезии анаэробных пародонтопатогенных бактерий и грибов *Candida albicans* к экспериментальным образцам стоматологических базисных пластмасс с шероховатостью и рельефом поверхности. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014; 6: 21–7.
5. Шишкина И. М., Ипполитов Е. В., Горбачёва Е. А. *Методы лабораторной диагностики хронического катарального гингивита*. Сборник трудов V Всероссийской научно-практической конференции «Образование, наука и практика в стоматологии». Москва. 2008.
6. Чепуркова О.А., Чеснокова М.Г., Недосеко В.Б., Миронов А.Ю. Принципы терапии кандида-ассоциированного пародонтита. *Стоматолог*. 2011; 2: 21–7.
7. Donlan R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8: 1–20.
8. Latasa C., Solano C., Penades J. R., Lasa I. Biofilm-associated protein. *C. R. Biol.* 2006; 329: 849–57.
9. Handley P. S., Harty D. W., Wyatt J. E., Brown C. R., Doran J. P., Gibbs A. C. A comparison of the adhesion, coaggregation and cell-surface hydrophobicity properties of fibrillar and fimbriate strains of *Streptococcus salivarius*. *J. Gen. Microbiol.* 1987; 133 (11): 3207–17.
10. Tucker K. D., Passador L. *Cell-to-Cell Communication in Bacteria. Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy*. Eds: J. L. Pace, M. F. Rupp, R. G. Finest. London–New York–Syngapur. – Taylor&Francis Group. 2006.

Поступила 27.05.15

REFERENCES

1. Arutyunov S. D., Tsarev V. N., Ippolitov E. V., Apresyan S. V., Trefilov A. G. *Dentistry*. The formation of biofilms on temporary dentures: the ratio of the primary processes of bacterial adhesion and colonization koaggregatsii. *Stomatologiya*. 2012; 91(5–1): 5–10. (in Russian)
2. Mayanskiy A. N., Chebotar' I. V. Staphylococcal biofilms: structure, regulation, rejection. *Zhurnal Mikrobiologiya*. 2011; 1: 101–8. (in Russian)

3. Tsarev V. N., Arutyunov A. S., Sedrakyan A. N., Orlova O. A., Spirande I. V. Microbiological rationale for the selection of the base material dentition medical devices to patients with postoperative defects of the upper jaw. *Vestnik RONTs im. N. N. Blokhina RAMN*. 2009; 20(1): 58–63. (in Russian)
4. Tsarev V. N., Ippolitov E. V., Trefilov A. G., Arutyunov S. D., Pivovarov A. A. Relationship adhesion parodontopatogennyh anaerobic bacteria and fungi *Candida albicans* to the experimental samples of basic dental plastics roughness and surface topography. *Zhurnal microbiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2014; 6: 21–7. (in Russian)
5. Shishkina I. M., Ippolitov E. V., Gorbacheva E. A. Methods of laboratory diagnosis of chronic catarrhal gingivitis. In: Proceedings of the V All-Russian scientific-practical conference «Education, science and practice of dentistry» [Sbornik trudov V Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Obrazovanie, nauka i praktika v stomatologii»]. Moscow. 2008: 154–6. (in Russian)
6. Chepurkova O.A., Chesnokova M.G., Nedoseko V.B., Mironov A.Yu. Principles of therapy of *Candida*-associated periodontitis. *Stomatolog*. 2011; 2: 21–7. (in Russian)
7. Donlan R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect Dis*. 2002; 8: 1–20.
8. Latasa C., Solano C., Penades J. R., Lasa I. Biofilm-associated protein. *C. R. Biol*. 2006; 329: 849–57.
9. Handley P. S., Harty D. W., Wyatt J. E., Brown C. R., Doran J. P., Gibbs A. C. A comparison of the adhesion, coaggregation and cell-surface hydrophobicity properties of fibrillar and fimbriate strains of *Streptococcus salivarius*. *J. Gen. Microbiol*. 1987; 133 (11): 3207–17.
10. Tucker K. D., Passador L. Cell-to-Cell Communication in Bacteria. Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy. Eds: J. L. Pace, M. F. Rupp, R. G. Finest. London–New York–Syngapur. – Taylor&Francis Group. 2006.

Received 27.05.15

Уважаемые читатели!

Архив журналов Издательства «Медицина» 2012–2014 гг.
находится в открытом (бесплатном) доступе на сайтах
Научной электронной библиотеки **www.elibrary.ru**
и Киберленинки **www.cyberleninka.ru**