

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.33-022.2-022:579.835.12-008.9-092.18-078.33

В.Ю. Кравцов*, Я.Я. Мазурова,
Ю.А. Грухин**, С.Н. Прошин*, И.А. Михайлова*,
Т.В. Суровцева***, М.Г. Кобишвили***

E-mail: psn@arccerm.spb.ru

БАЦИЛЛЯРНЫЕ И КОККОВЫЕ ФОРМЫ HELICOBACTER PYLORI В СЛИЗИСТЫХ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ И АНТРУМА ЖЕЛУДКА (ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

* Всероссийский центр экстренной и радиационной
медицины им. А.М. Никифорова МЧС России;

** Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова;

*** Городская клиническая больница № 20,
г. Санкт-Петербург

ВВЕДЕНИЕ

К настоящему времени доказана и общепризнана роль *Helicobacter pylori* (НР) в развитии заболеваний желудка и двенадцатиперстной кишки. Широкое применение антихеликобактерной эрадикационной терапии привело к выдающимся успехам в лечении кислотозависимых заболеваний, а австралийским ученым Уоррену и Маршаллу за открытие патогенности НР в 2005 г. была присуждена Нобелевская премия.

В настоящее время широко обсуждаются и изучаются все возможные пути передачи хеликобактерной инфекции (фекально-оральный, орально-оральный и т.д.), а ротовая полость рассматривается как самые возможные ворота инфекции НР [1, 2, 3]. Многочисленными исследованиями, выполненными генодиагностическим, культуральным и уреазным методами, была показана возможность присутствия НР в ротовой полости [2, 4, 5, 6, 7, 8]. Однако следует признать, что сведения о прямых бактериоскопических наблюдениях НР в ротовой полости крайне скудны. Бактериальные клетки НР в ротовой полости можно визуализировать с помощью специфических к клеточной стенке НР антител. На этом принципе основан иммуноцитохимический метод, который применим в клинико-лабораторной практике и с помощью кото-

рого можно выявлять и спиралевидные, и кокковые формы НР [9, 10]. В результате в цитологическом препарате после проведенной иммуноцитохимической реакции характерное окрашивание приобретают только те бактериальные клетки, в том числе и кокки, которые имеют антигены, специфичные для НР.

Учитывая, что бактериальные клетки НР проявляют кокко-бациллярный диморфизм в результате трансформации из бациллярных (спиралевидных) форм в кокковые и, наоборот открытыми остаются следующие вопросы [11, 12]. В каком виде (бациллярном или кокковом) бактериальные клетки НР находятся в ротовой полости, а также возможно ли обсеменение слизистой ротовой полости вегетирующими бактериями НР, как это имеет место при хеликобактериозах в слизистой оболочке желудка?

В связи со всем вышесказанным целью нашей работы стало бактериоскопическое исследование клеток НР иммуноцитохимическим методом, позволяющим визуализировать его бациллярные и кокковые формы, в группе пациентов с хроническим гастритом и в группе пациентов с хроническим парадонтитом. Иммуноцитохимические исследования НР проводились параллельно в ротовой полости (в соскобе с зубодесневой борозды) и в слизистой оболочке желудка.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Группы обследованных пациентов. Для выполнения исследования изначально был использован целенаправленный отбор больных, проходивших лечение в клинике ФГУЗ ВЦРЭМ им. А.М. Никифорова МЧС России, в Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова МО РФ и в Городской клинической больнице № 20 (Санкт-Петербург) в период с 2004-2008 гг.

Иммуноцитохимические исследования НР проводили в двух группах пациентов. Группу 1 составили 70 человек (46 женщин и 24 мужчины в возрасте от 24 до 55 лет) с различными вариантами течения хронического гастрита. Группу 2 составили 40 человек (23 мужчины и 17 женщин в возрасте от 20 до 60 лет) с диагнозом хронический парадонтит перед началом хирургического лечения. Пациенты группы 2 имели глубину десневого кармана более 4 мм, абсцедирующую форму парадонтита и 3-ю степень подвижности зубов.

Все пациенты группы 1 и группы 2 были обследованы на предмет НР иммуноцитохимическим методом в гастробиоптатах антрального отдела желудка и в эксфолиатах (соскобах) с поверхности зубодесневой борозды.

Инструментальный метод исследования (фиброэзофагогастродуоденоскопия). Метод инструментальной диагностики включал обязательное выполнение эзофагогастродуоденофиброскопии с одновременной биопсией слизистой оболочки желудка. Эндоскопическое исследование выполнялось по общепринятой методике, в процессе которой оцени-

валось состояние слизистой оболочки, – степень выраженности воспаления (гиперемия, отек, подслизистые кровоизлияния и эрозии (острые или хронические), гиперплазия складок, повышенная ранимость), наличие атрофических изменений гастродуоденальной слизистой оболочки (бледность, сглаженность, истончение, мозаичность слизистой в теле и антральном отделе, просвечивание сосудов). Прицельная биопсия проводилась из антрального отдела желудка. Биопсийный материал слизистой оболочки желудка был использован для проведения иммуноцитохимических исследований.

Иммуноцитохимический метод. Биоптаты слизистой оболочки желудка, полученные при выполнении фиброэзофагогастродуоденоскопии с прицельной биопсией, отпечатывали на обезжиренные предметные стекла тонким слоем. Для исследований НР из ротовой полости соскобы с поверхности зубодесневой борозды с помощью стерильной одноразовой щетки для браш-биопсий также наносили на обезжиренные предметные стекла тонким слоем. Полученные таким образом цитологические мазки, фиксированные смесью спирт:ацетон в соотношении 1:1 в течение 10 мин, высушивали на воздухе и инактивировали эндогенную пероксидазу в 1%-ном азиде натрия (Merck) в течение 30 мин. Промывали в двух сменах бидистиллированной воды и оставляли на 5 мин в Трис-NaCl буфере (pH 7,6). До нанесения преиммунной свиной сыворотки (Novocastra) поле для иммуноцитохимического анализа локализовывали гидрофобным карандашом (DakoCytomation). По окончании инкубации с преиммунной сывороткой (30 мин при комнатной температуре) наносили поликлональные кроличьи антитела (NCL-NRр, Novocastra), направленные против антигенов клеточной стенки *Helicobacter pylori*, и инкубировали препараты в течение часа при +37°C. По завершении мечения первыми антителами препараты проводили в двух сменах буфера по 5 мин и наносили свиные биотинилированные антитела (DakoCytomation), направленные против кроличьих антител. Со вторыми антителами препараты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Следующим этапом иммуноцитохимической процедуры, которому предшествовала отмывка препаратов в двух сменах буфера, являлось нанесение на 30 мин при комнатной температуре системы визуализации, состоящей из растворимого комплекса – авидин и биотинилированная пероксидаза хрена (DakoCytomation). В качестве субстрата для проявления иммуноцитохимической реакции использовали 3,3'-diaminobenzidine (ДАБ) в формате от фирмы Novocastra. Для контрастирования препараты подкрашивали с использованием красителя ЦитоСтейн-ГК (Диахим, Абрис+). Следует отметить, что при использовании в качестве первых антител поликлональных кроличьих от фирмы «DakoCytomation» результат иммуноцитохимической верификации *H. pylori* ин-

фекции полностью соответствовал результату, когда вариантом первых антител являлись поликлональные кроличьи от фирмы «Novocastra».

Микроскопирование проводили под иммерсией на микроскопе Leica DM 4000.

Для определения НР в мазках с поверхности зубодесневой борозды просматривали по 300 полей зрения. Бактериальные клетки, позитивные по антигенам НР, при использовании в качестве субстрата ДАБ проявляются, как правило, темно-коричневым цветом с четкими контурами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Принцип примененного в настоящей работе иммуноцитохимического метода основан на специфическом связывании антител с антигенами клеточной стенки НР, что в дальнейшем выявляется с помощью системы визуализации, основанной на сродстве авидина к биотинилированным молекулам антител. В результате иммуноцитохимической реакции между пероксидазой, связанной на авидине и субстратом-красителем, только те бактериальные клетки, в том числе и кокки, которые имеют антигены, специфичные для НР, должны иметь характерное окрашивание.

Представление полученных результатов начнем с демонстрации и описания бактериальных клеток НР, выявленных иммуноцитохимическим методом в гастробиоптатах антрума желудка. В цитологических мазках, полученных из биоптатов слизистой оболочки желудка после положительной иммуноцитохимической реакции, бактериальные клетки НР окрашивались, как правило, в темно-коричневый цвет. В подавляющем большинстве случаев в желудке мы наблюдали спиралевидные формы НР в виде «крыла чайки» (см. рис. 1, обложка 2). Одновременно с ними, но значительно реже обнаруживались кокковые формы НР (см. рис. 2, обложка 2). Размеры спиралевидных форм НР варьировали от 3-5 мкм в длину (включая жгутики) и составляли около 0,5 мкм в поперечнике. Нередко наблюдались спиралевидные формы, соединенные между собой последовательно образуя цепочки. Кокковые формы НР имели размеры от 0,5 до 1 мкм в диаметре, идеально округлую форму и окрашивались равномерно с несколько большей интенсивностью, чем спиралевидные формы НР. Наряду с одиночными кокками НР мы наблюдали диплококковые формы (ассоциированные по два кокка НР), нередко встречались U-формы (см. рис. 3, обложка 2).

Важно отметить, что в антруме желудка кокковые формы НР в среднем составляли 5% от всей микробной популяции бактериальных клеток НР (кокков, переходных U-форм и спиралевидных форм), обсеменяющей слизистую оболочку желудка. Частота встречаемости кокков свыше 15-20% наблюдалась достаточно редко (не более чем у 5% обследованных).

Таким образом, по нашим данным, полученным иммуноцитохимическим методом, в слизистой оболочке желудка бациллярные (спиралевидные) формы НР представляют абсолютное большинство и, очевидно, доминируют над кокковыми формами НР.

Что касается частот обнаружения НР в антруме желудка у пациентов группы 1 и группы 2, то они составили 53,5% и 57,5% соответственно.

Прежде чем перейти к результатам иммуноцитохимических исследований НР в мазках с поверхности зубодесневой борозды, напомним, что в качестве первых антител мы использовали поликлональные антитела к антигенам клеточной стенки НР, и исключить их реагирование с общими антигенами бактерий рода *Helicobacter*, но уже других видов полностью нельзя. Применяемые для выявления НР поликлональные антитела (Novocastra) адаптированы и дают гарантию для исследования гастробиоптатов [9]. Поэтому в дальнейшем при описании результатов исследования материала из ротовой полости для обозначения бактериальных клеток, выявленных вышеописанным иммуноцитохимическим методом, корректнее будет использовать термин «НР-антиген-позитивные бактерии».

Бактериальные клетки, позитивные по антигенам НР в ротовой полости, при использовании в качестве субстрата ДАБ проявлялись в мазках из гастробиоптатов, темно-коричневым цветом с четкими контурами. В подавляющем большинстве случаев в исследованных образцах из ротовой полости бактериальные клетки с антигенами НР выглядели как кокки и U-образные бактерии (см. рис. 4, обложка 2). Они ничем не отличались от кокковых и U-форм, обнаруживаемых в слизистой оболочке желудка. Однако наряду с тем у 6 из 71 обследованного пациента группы 1 (хронический гастрит) и у 12 из 40 пациентов группы 2 (хронический парадонтит) в ротовой полости удалось увидеть НР антигенпозитивные бактерии спиралевидных форм со жгутиками (см. рис. 5, обложка 2).

На наш взгляд, очень важно отметить, что в мазках, взятых от пациентов группы 1 (хронический гастрит) мы ни в одном из 71 случая не обнаружили такой обильной обсемененности бактериальными клетками с антигенами НР, как при хеликобактериозе в слизистой оболочке желудка.

Напротив, у 5 из 40 пациентов группы 2 (хронический парадонтит) мы наблюдали обсемененность эпителия десен бактериальными клетками с антигенами НР аналогично тому, как это имеет место в слизистой оболочке желудка (см. рис. 6, обложка 2).

Стоит отметить еще одно интересное наблюдение. Как правило, бактериальные клетки с антигенами НР находились в ассоциациях с микрофлорой, внешне схожей с актиномицетами (см. рис. 7, обложка 2) и псевдомицелием кандиды, а также с эпителиоцитами.

Частота обнаружения НР в соскобах с зубодесневой борозды у пациентов группы 1 составила 63,4%, а у пациентов группы 2 – 67,5%.

Таким образом, выше мы представили морфологическую характеристику бактериальных клеток НР, выявляемых иммуноцитохимическим методом. Полученные с помощью этого метода наблюдения за бактериальными клетками НР позволяют сделать следующие заключения. В слизистой оболочке желудка бациллярные (спиралевидные) формы НР в значительной степени преобладают над кокковыми формами НР, в то время как в ротовой полости, а точнее, в соскобах с поверхности зубодесневой борозды, куда попадает и зубной налет, и эпителий десны, значительно чаще обнаруживаются кокковые формы НР. Также с уверенностью можно сказать, что колонизация ротовой полости вегетирующими бактериальными клетками НР возможна, и такие хеликобактериозы нередко обнаруживаются при хроническом парадонтите.

Бактериальные клетки НР спиралевидных и кокковых форм в зубном налете были впервые визуализированы сканирующей электронной микроскопией Йонг и соавт. в 2001 г. [13]. В этой работе образцы зубного налета предварительно подвергали иммуномагнитическому разделению, в котором использовали поликлональные кроличьи антитела, специфичные к НР. После такого разделения в бактериальных агрегатах сканирующей электронной микроскопией удалось визуализировать спиралевидные и кокковые формы НР [13]. В нашей работе также были использованы поликлональные кроличьи антитела, но, в отличие от исследования Йонг и соавт., мы проводили прямую визуализацию бактериальных клеток НР (минуя пробоподготовку в суспензиях, где возможна трансформация НР из бациллярных форм в кокковые). Отметим еще раз, что в исследованные нами мазки, полученные методом браш с поверхности зубодесневой борозды, попадал материал из зубного налета и вместе с ним эпителий слизистой десны.

На наш взгляд, внимания заслуживают наблюдения, когда бактериальные с антигенами НР ассоциированы с другой флорой ротовой полости (см. рис. 7, обложка 2). Возможно, что из ротовой полости в слизистую оболочку желудка НР попадает не автономно, а в симбиотических колониях, которые формируются в ротовой полости.

По представленным данным, полученным иммуноцитохимическим методом, НР в ротовой полости выявляется в 63,4-67,5% случаев (городские жители Санкт-Петербурга). У пакистанских пациентов с хроническим гастритом частота обнаружения НР уреазным тестом в ротовой полости составила 92,3% [14]. Присутствие НР в ротовой полости было выявлено у 54,1% [7] и у 69,7% [6], обследованных культуральным методом. Реже всего НР в ротовой полости выявляется методом ПЦР – 35,1% [8], 12,5-37,5% [2].

В данной работе мы не ставили цель сопоставить результаты обнаружения НР в ротовой полости и в желудке, а также обосновать целесообразность иммуноцитохимического выявления НР в ротовой полости как неинвазивного метода для выявления хеликобактериозов. Тем не менее, проинформируем читателя о том, что в настоящее время идет дискуссия по вопросу о диагностической значимости выявления НР в ротовой полости [4-6, 15].

Возможно, справедливо, что оральные исследования НР не совсем адекватны для первичной диагностики кислотозависимых заболеваний, обусловленных хеликобактериозами в желудке. Но, учитывая реинфицирование слизистой оболочки желудка бактериальными клетками НР, сохранившимися в ротовой полости после антихеликобактерной эрадикационной терапии, практическое значение выявления НР в ротовой полости для осмысленной терапии НР-ассоциированных кислотозависимых заболеваний, а также надежности контроля эффективности эрадикации несомненно [16, 17]. Показано, что у пациентов, не достигших эрадикации после курса антихеликобактерной антибиотикотерапии, в ротовой полости сохраняются бактериальные клетки с антигенами НР. Повысить эффективность антихеликобактерной антибиотикотерапии возможно путем усиления стандартного эрадикационного курса сопутствующей санацией ротовой полости [18]. Для обоснования назначения таких санаций также может быть рекомендован иммуноцитохимический метод выявления НР, который позволяет визуализировать спиралевидные и, как правило, кокковые формы НР в зубном налете и эпителии десен.

Мы уже упоминали, что у 5 из 40 пациентов группы 2 (хронический парадонтит) обнаружилась такая обсемененность эпителия десен бактериальными клетками НР (см. рис. 6, обложка 2), какая имеет место в слизистой оболочке желудка с оценкой «+++» (см. рис. 1, обложка 2). Причем у всех этих пациентов был обнаружен НР в слизистой антрума желудка (на «+++»), эндоскопическая картина гастрита, а у одного из пациентов – язва луковицы двенадцатиперстной кишки без проявления болевого синдрома. Поэтому, на наш взгляд, в курсы лечения хронических парадантитов, сопровождающихся одновременно хеликобактериозами ротовой полости и НР-ассоциированными кислотозависимыми заболеваниями, целесообразно включать и антихеликобактерную эрадикационную терапию.

ЛИТЕРАТУРА

- Chumpitaz C.J., Gutierrez M.J., Cordova A.R., Sanchez M.M., Vasquez V.N., Rivadaira M.C., Del Carpio B., Solano M.L., Marocho C.L., Pareja C.F., Huaman R.A., Valencia B.E. Isolation of helicobacter pylori in dental plaque in patients with gastritis at «Angamos» clinic // Review gastroenterology Peru. – 2006. – Vol. 26. – № 4. – P. 373-376.
- Al-Hawajri A.A., Keret D., Simhon A., Zlotkin A., Fishman Y., Bercovier H., Rahav G. Helicobacter pylori DNA in dental plaques, gastroscopy, and dental devices // Digestion disease science. – 2004. – Vol. 49. – № 7/8. – P. 1091-1094.
- Honda K., Ohrusa T., Takashimizu I., Watanabe M., Amagasa M. High risk of Helicobacter pylori infection in young Japanese dentists // Journal of gastroenterology and hepatology. – 2001. – Vol. 16. – № 8. P. 862-865.
- Nasrolahei M., Maleki I., Emadian O. Helicobacter pylori colonization in dental plaque and gastric infection // Rom journal of gastroenterology. – 2003. – Vol. 12. – № 4. – P. 293-296.
- Chisazi M.T., Fattahi E., Farahani R.M., Fattahi S. Helicobacter pylori in the dental plaque: is it of diagnostics value for gastric infection? // Medical oral pathology and oral cir bucalis. – 2006. – Vol. 11. – № 4. – P. 325-328.
- Ogunbodede E.O., Lawal O.O., Lamikanra A., Okeke I.N., Rotimi O., Rasheed A.A. Helicobacter pylori in the dental plaque and gastric mucosa of dyspeptic Nigerian patients // Tropical gastroenterology. – 2002. – Vol. 23. – № 3. – P. 127–133.
- Czesnikiewicz-Guzik M., Bielanski W., Guzik T.J., Losler B., Konturek S.J. Helicobacter pylori in the oral cavity and its implications for gastric infection, periodontal health, immunology and dyspepsia // Journal of physiology and pharmacology. – 2005. – Vol. 56. (Suppl 6). – P. 77-89.
- Umeda M., Kobayashi Y., Takeuchi Y., Hayashi J., Morotome-Hayashi Y., Yano K., Aoki A., Ohsuka T., Ishikawa I. High prevalence of Helicobacter pylori detected by PCR in the jral cavities of periodontitis patients // Journal of periodontology. – 2003. – Vol. 74. – № 1. – P. 129-134.
- Ashton-Kay M., Diss T.C., Isaacson P.G. Detection of Helicobacter pylori in gastric biopsy and resection specimens // Journal of clinical pathology. – 1996. – Vol. 49. – P. 107-111.
- Кравцов В.Ю., Никифоров А.М., Прошин С.Н., Кондрашин А.С., Кобиашвили М.Г., Михайлова И.А. Иммуноцитохимическое исследование кокковых форм Helicobacter pylori в биоптатах слизистой оболочки желудка у больных хроническим гастритом // Клиническая лабораторная диагностика. – 2006. – Том 3. – С. 52-54.
- Benaissa M., Babin P., Quellard N., Pezennec L., Cenatiempo Y., Fauchere J.L. Changes in Helicobacter pylori ultrastructure and antigens during conversion from the bacillary to the coccoid form // Infection and Immunity. – 1996. – Vol. 64. – № 6. – P. 2331-2335.
- She F.F., Lin J.Y., Lin J.Y., Huang C., Su D.H. Virulence of water-induced coccoid Helicobacter pylori and its experimental infection in mice // World journal of gastroenterology. – 2003. – Vol. 9. – № 3. – P. 516-520.
- Yong K.A., Allaker R.P., Hardie J.M. Morphological analysis of Helicobacter pylori from gastroc biopsies and dental plaque by scanning electron microscopy // Oral microbiology and immunology. – 2001. – Vol. 16. – № 3. – P. 178-181.
- Siddiq M., Haseeb-ur-Rehman, Mahmood A. Evidence of Helicobacter pylori infection in dental plaque and gastric mucosa // Journal of colloquium physicians surgery Pakistan. – 2004. – Vol. 14. – № 4. – P. 205-207.
- Sousa De L., Vasquez L., Velasco J., Parlapiano D. Isolation of Helicobacter pylori in gastric mucosa, dental plaque and saliva in a population from the Venezuelan Andes // Investigation of clinic. – 2006. – Vol. 47. – № 2. – P. 109-116.

16. Anand P.S., Nandakumar K., Shenoy K.T., Are dental plaque, poor oral hygiene, and periodontal disease associated with *Helicobacter pylori* infection? // Journal of periodontology. – 2006. – Vol. 77. – № 4. – P. 692-698.
17. Aboderin O.A., Abdu A.R., Odetoyin B., Okeke I.N., Lawal O.O., Ndububa D.A., Agbakwuru A.E., Lamikanra A., Antibiotics resistance of *Helicobacter pylori* from patients in Ile-Ife, South-west, Nigeria // African health science. – 2007. – Vol. 7. – № 3. – P. 143-147.
18. Кравцов В.Ю., Грухин Ю.А., Михайлова И.А., Прошин С.Н., Кондрашин А.С., Кобиашвили М.Г., Кухина Н.Г. Значение иммуноцитохимического метода выявления *Helicobacter pylori* для повышения эффективности антихеликобактерной антибиотикотерапии путем дополнения стандартного эрадикационного курса санацией ротовой полости // Клиническо-лабораторный консилиум. – 2007. – № 18. – С. 66-70.

BACILLAR AND COCCAL TYPES OF *HELICOBACTER PYLORI* IN MUCOUS MEMBRANES OF ORAL CAVITY AND VENTRICULAR ANTRUM (IMMUNE CYTOCHEMICAL INVESTIGATION)

V.Yu. Kravtsov, Ya.Ya. Mazourova, Yu.A. Groukhin, S.N. Proshin, I.A. Mikhailova, T.V. Sourovtsseva, M.G. Kobiashvili

SUMMARY

Bacterial cells of *Helicobacter pylori* (HP) of spiral and coccial types were studied in oral and gastric mucous membrane received from the ventricular antrum in chronic gastritis and paradontitis patients. It was revealed that spiral forms prevailed over coccoids in gastric mucosa but coccial types were more frequently found in oral cavity. Samples from oral cavity included squamous cells and dental plaques. *Helicobacteriosis* in oral cavity are usually revealed in chronic paradontitis.

Key words: *helicobacter pylori*, immune cytochemistry, mouth cavity.

~ÑÈÁÈÐÑÊÈÈ
ÌÄÄÈÖÈÍÑÊÈÈ
ÆÓÐÍÀË

**ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
ЦЕНТРАЛЬНОЕ ИЗДАНИЕ**

*Издавался в г.Томске с 1923-го по 1931 год.
С 1996 года возрождено издание журнала
решением президиума Томского
научного центра СО РАМН.*

Адрес в сети INTERNET:

<http://www.medicina.tomsk.ru>

**В настоящее время начинается
подписка на первое полугодие 2009 года.**

Стоимость журналов:

для индивидуальных

подписчиков

690 руб.

для организаций

1610 руб., вкл. НДС

**Тарифы на размещение рекламного материала
Для отечественного рекламодателя:**

1 черно-белая страница	4000 руб.
1/2 черно-белой страницы	2200 руб.
1/4 черно-белой страницы	800 руб.
1 цветная страница	8000 руб.
1/2 цветной страницы	4300 руб.

Наценки:

2-я стр. обложки – +40%

3-я стр. обложки – +25%

4-я стр. обложки – +35%

(плюс 5% налог на рекламу)

Подписку на журнал можно оформить:

• **ДЛЯ ЮРИДИЧЕСКИХ ЛИЦ,**

выслав заявку с указанием полного названия заказчика, его почтового адреса, ИНН по адресу: 634012, г. Томск, ул. Киевская, 111а, редакция «СМЖ»; факс (3822) 55-87-17.

E-mail: medicina@tomsk.ru

По заявке высылается счет для оплаты.

• **ДЛЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ПОДПИСЧИКОВ,**

отправив почтовый перевод с указанием полных Ф.И.О., почтового адреса и заказываемых номеров по адресу: 634012, г. Томск, а/я 922, Коломийцеву Андрею Юрьевичу, прислав копию квитанции почтового перевода по факсу редакции: (3822) 55-87-17.