

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**Изучение полиморфизма гена DEFB4A у лиц, страдающих
воспалительными заболеваниями пародонта**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2 курса 241 группы
Направления 06.04.01 Биология
Биологического факультета
Верховского Романа Аркадьевича

Научный руководитель:

доцент кафедры микробиологии
и физиологии растений, к.б.н.

Е. В. Глинская

(подпись, дата)

Заведующий кафедрой:

д.б.н., профессор

С. А. Степанов

(подпись, дата)

Саратов 2017

Введение

Актуальность темы. Воспалительные заболевания пародонта (ВЗП) – могут быть вызваны дисбалансом нормальной микрофлоры полости рта [1]. Исход и течение инфекционного процесса в пародонте может быть предопределен не только вирулентностью микробов, но и генетическим полиморфизмом организма человека. К настоящему времени накоплен значительный объем данных, свидетельствующих об активном участии α - и β -дефензинов в процессах сано- и патогенеза широкого круга заболеваний [2].

Цель и задачи исследования. Целью работы являлось изучение полиморфизма гена DEFB4A, кодирующего β -дефензин-2 у людей, больных ВЗП. Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи: 1. изучить микробный состав зубного налета и десневой жидкости у больных ВЗП и у лиц со здоровым пародонтом; 2. сконструировать праймеры, фланкирующие 2 региона гена DEFB4A; 3. амплифицировать и выделить ДНК 2-х фрагментов гена DEFB4A; 4. Секвенировать и провести анализ нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК методом множественного выравнивания; 5. установить аминокислотную последовательность.

Материал и методы исследования. Исследования проводились с 2015 по 2017 гг. Объектом исследования явились образцы ДНК пародонтопатогенных микроорганизмов, выделенные из содержимого десневой борозды, и образцы тотальной ДНК, полученной из крови больных ВЗП.

Определение видового состава пародонтопатогенной микрофлоры проводили методом ПЦР с использованием набора реагентов «Мультиидент-5» производства ООО НПФ «Генлаб» [3]. Детекцию ампликонов проводили методом электрофореза в 1% агарозном геле с этидием бромидом и 10% буфере ТАЕ.

Конструирование праймеров, фланкирующих первый и второй экзона, а также 3'- и 5'- нетранслируемые регионы гена DEFB4A, осуществлялось на основе референсной нуклеотидной последовательности, взятой из базы данных NCBI, с использованием компьютерной программы Gene Runner [4].

Очистка ПЦР продуктов осуществлялась на колонках с использованием набора реагентов «QIAquick PCR Purification Kit». Очищенные продукты ПЦР были отправлены на в ОАО «СИНТОЛ» г. Москва.

Структура и объём работы. Работа изложена на 61 странице, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 10 таблицами и 20 рисунками. Список использованных источников включает 65 наименований.

Научная новизна. Данное исследование направлено на выявление связи между риском развития воспалительных заболеваний пародонта (ВЗП), в частности тяжелых форм пародонтита, и наличием точечных нуклеотидных замен (SNP) в гене DEFB4A, кодирующем β -дефензин-2.

Практическая значимость. На основе полученных данных о частоте встречаемости SNP в пределах гена DEFB4A возможно создание тест-системы по выявлению предрасположенности к ВЗП. Для двух часто встречающихся SNP в пределах 5'-UTR гена DEFB4A планируется создать сайт-специфические праймеры, с помощью которых будет возможно увеличить объем выборки для получения статистически значимых данных. В случае подтверждения предположения о том, что вышеупомянутые SNP могут являться маркерами предрасположенности к ВЗП, полученная пара сайт-специфических праймеров, может быть использована в качестве тест системы.

Апробация. Устный доклад на IX региональной научной конференции «Исследования молодых ученых в биологии и экологии», посвященной 80-летию образования Саратовской области.

Публикации.

1. Верховский Р.А., Тихомирова Е.В., Глинская Е.В., Зудина И.В. Поиск ассоциированных с ВЗП генетических маркеров // Биология – наука XXI века: Сб. тезисов 20-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых. Пущино, 2016. С.

2. Верховский Р.А., Тихомирова Е.В., Аль Зубейди А.Ф.А., Глинская Е.В., Зудина И.В. Бактериально-гостальные взаимоотношения при воспалительных заболеваниях пародонта // Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой. Издательство: Саратов ООО "Ракурс" 2016

3. Аль Зубейди А.Ф.А., Токмакова Е.В., Верховский Р.А., Чемодурова А.А., Ковалева Я.О., Идентификация супрогингивальной патогенной микрофлоры методом ПЦР // Исследования молодых ученых в биологии и экологии. Издательство Саратовского университета 2016.

Положения, выносимые на защиту:

1. *P. gingivalis* является одним из главных этиологических факторов ВЗП.

2. Причиной возникновения ВЗП в большинстве случаев является комплекс пародонтопатогенных микроорганизмов.

3. Предрасположенность к ВЗП может быть вызвана полиморфизмом гена DEFB4A, кодирующего H β D-2.

Основное содержание работы

В главе «Основная часть» представлен анализ литературных данных о строении пародонта человека в норме и при патологии, о ВЗП и их этиологии, о микрофлоре полости рта, об антимикробных пептидах (АМП) и роли нетранслируемых областей в экспрессии генов.

В главе «Результаты исследования» изложены экспериментально полученные данные о видовом составе пародонтопатогенной микрофлоры десневой борозды, и о полиморфизме гена DEFB4A лиц вошедших в выборку. Так же в этой главе описаны последовательности и характеристиками сконструированных в ходе исследования пар праймеров.

В ходе исследования пародонтопатогенной микрофлоры десневой борозды лиц, вошедших в выборку, было установлено, что *P. gingivalis* вне комплекса встречалась у 24,5% случаев. Комплексы пародонтопатогенных микроорганизмов, в состав которых входила *P. gingivalis*, встречались у 62,7%. Комплексы, в состав которых не входила *P. gingivalis*, выявлены у 7,3% представителей выборки. Пародонтопатогенные микроорганизмы не были обнаружены в 5,4 % случаев (рисунок 1).

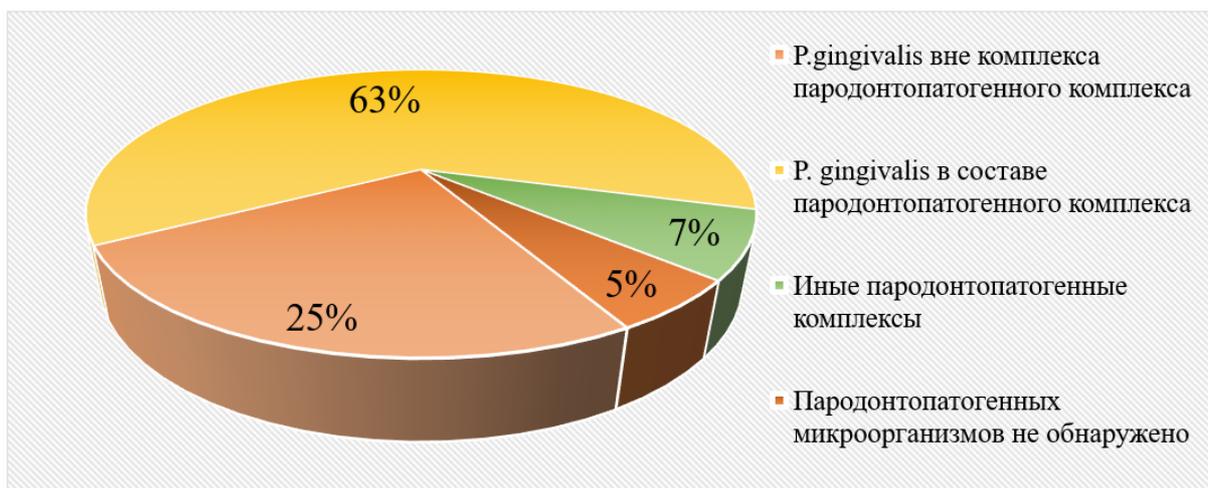
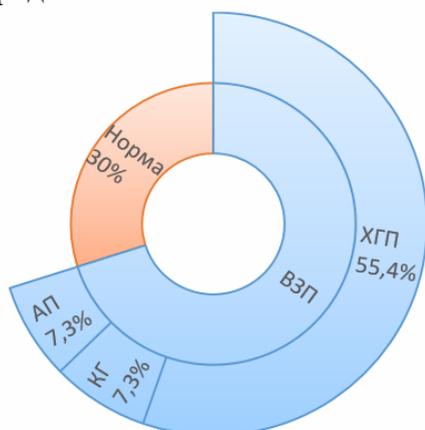


Рисунок 1 – Встречаемость пародонтопатогенных комплексов

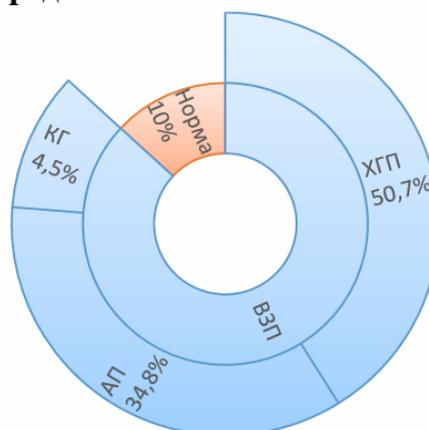
ВЗП чаще бывают вызваны комплексом пародонтопатогенных микроорганизмов, нежели одиночным возбудителем [6]. Так, у 30% лиц от общего числа лиц, у которых была выявлена *P. gingivalis* вне пародонтопатогенного комплекса, наблюдалось отсутствие воспалительного

процесса пародонта. Соответственно, у 70% наблюдался воспалительный процесс разной степени тяжести. Отсутствие же воспалительного процесса при наличии комплекса пародонтопатогенных микроорганизмов, в числе которых *P. gingivalis*, наблюдалось лишь у 10% лиц. В свою очередь воспалительный процесс разной степени тяжести наблюдался у 90% (рисунок 2).

***P.gingivalis* вне комплекса пародонтопатогенного комплекса**



***P. gingivalis* в составе пародонтопатогенного комплекса**



АП – агрессивный пародонтит; **ХГП** – хронический генерализованный пародонтит;
КГ – катаральный гингивит

Рисунок 2 – Характер проявления ВЗП в зависимости от состава пародонтопатогенной микрофлоры

Также нами была отмечена закономерность между встречаемостью того или иного сочетания пародонтопатогенных микроорганизмов и проявлением различных симптомов ВЗП.

Наличие *P. gingivalis* вне комплекса характеризовалось резорбцией кости. Липополисахариды (ЛПС) *P. gingivalis* инициируют продукцию эпителиальными клетками, нейтрофилами и макрофагами воспалительных цитокинов ИЛ-1, ФНОα, ПГЕ2, которые участвуют в стимуляции остеобластов к продукции лиганда рецептора, активатора ядерного фактора каппа-в (RANKL). При повышенной продукции лиганда происходит возрастание костной резорбции [7].

A. actinomycetemcomitans, в сочетании с другими пародонтопатогенными микроорганизмами из числа исследуемых,

характеризовался локализованным воспалительным процессом. По всей видимости, продуцируемый им лейкотоксин А, разрушая моноциты, лейкоциты и нейтрофилы, позволяет другим видам пародонтопатогенов проявлять свои свойства в месте паразитирования *A. actinomycetemcomitans*.

Для комплекса *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia* было характерно гноетечение. *P. intermedia* продуцирует ряд протеаз, которые разрушают компоненты внеклеточного матрикса и могут способствовать развитию гноетечения [7].

Комплекс *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia* характеризовался кровоточивостью десен. *T. denticola* для активного роста и размножения нуждается во внутриклеточном железе, наилучшим источником которого являются эритроциты. Гемолизин *P. gingivalis* способствует агглютинации и лизису эритроцитов. По всей видимости, *T. denticola* может способствовать усилению активности Гемолизина *P. gingivalis*, что вызывает повышение кровоточивости тканей.

Для комплекса *P. gingivalis*, *T. forsythia* был характерен абсцесс. В присутствии наружных мембранных везикул *P. gingivalis* происходит прилипание *T. forsythia* к эпителию полости рта. С пептидазной активностью *T. forsythia* связывают локальное разрушение пародонтальной ткани и формирование абсцессов (таблица 1) [7].

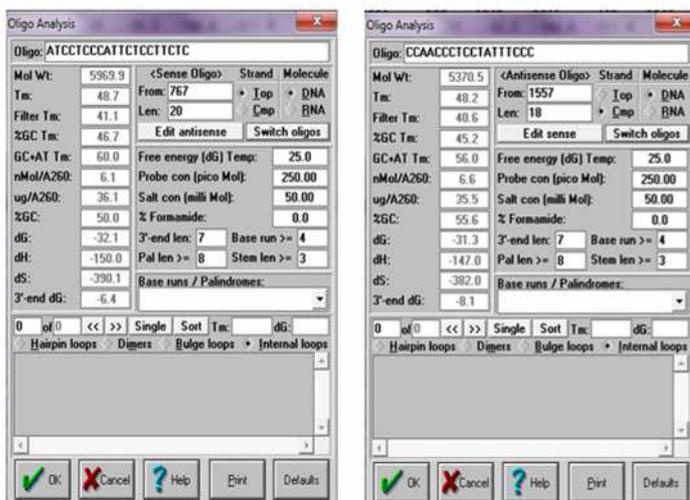
Таблица 1 – Характерные симптомы ВЗП

Пародонтопатогенные микроорганизмы	Проявление заболевания
<i>P. gingivalis</i>	Резорбция кости
<i>A. actinomycetemcomitans</i> , (<i>P. gingivalis</i> , <i>T.forsythia</i> , <i>P.intermedia</i>)	Локализованный воспалительный процесс
<i>P.gingivalis</i> , <i>T.forsythia</i> , <i>P.intermedia</i> , (<i>T.denticola</i>)	Гноетечение
<i>P.gingivalis</i> , <i>T.denticola</i> , <i>T.forsythia</i>	Кровоточивость десен
<i>P.gingivalis</i> , <i>T.forsythia</i>	Абсцесс

В ходе исследований было сконструировано две пары фланкирующих праймеров. Первая пара праймеров фланкирует участок в 753 нуклеотида (длина продукта 791 нуклеотид) в состав которого входит 5'-UTR гена DEFB4A и его Ex1. Вторая пара праймеров фланкирует участок в 576 нуклеотида (длина продукта 616 нуклеотидов) в состав которого входит часть второго интрона, Ex2 и 3'-UTR гена DEB4A (рисунок 3).

Sense: 5'- ATCCTCCCATTCCTCTCTC -3' C 767 длина 20

Antisense: 5'- CCAACCTCTATTTCCTCC -3' (GGGAAATAGGAGGGTTGG) C 1557 длина 18

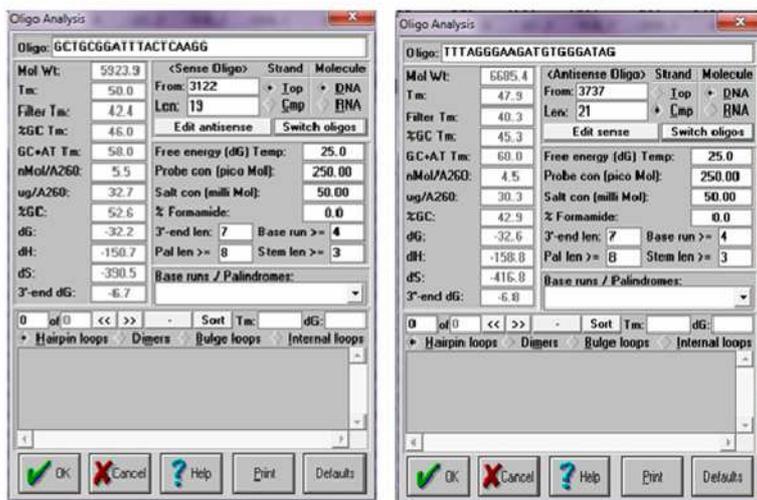


Длина продукта: 791

А

Sense: 5'- GCTGCGGATTACTCAAGG -3' C 3122 длина 19

Antisense: 5'- TTTAGGGAAGATGTGGGATAG -3' (СТАТСССАСАТСТСССТААА) C 3737 длина 21



Длина продукта: 616

Б

Рисунок 3 – Сконструированные пары праймеров

А – пара праймеров фланкирующих 5'-UTR и Ex1;

Б – пара праймеров фланкирующих часть Int2, Ex2 и 3'-UTR

В результате секвенирования для 23 образцов были получены последовательности 5'-UTR и Ex1. Последовательности Ex2 и 3'-UTR были определены для 12 образцов.

В результате анализа было выявлено 27 SNP, 17 из которых пришлось на 5'-UTR, 5 на Ex1, 2 на Int2, 1 на Ex2 и 2 на 3'-UTR. При этом стоит отметить, что 14 из 17 SNP выявленных в 5'-UTR не были описаны в SNP database базы NCBI. В Ex1 было обнаружено 3, а в интроне два - 2 не описанные мутации.

Буквенные обозначения точечных нуклеотидных замен представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Буквенные обозначения точечных нуклеотидных замен

Буквенные обозначения	Встречаемые аллели
W	T/A
K	T/G
Y	T/C
R	G/A
S	G/C
M	C/A
U	A/C/G
H	A/T/C
D	A/G/T
B	C/G/T
N	A/C/G/T

Буквенные обозначения аминокислот представлены в таблице 4 [8].

Таблица 4 – Буквенное обозначение аминокислот [8]

Буквенное обозначение аминокислоты	Название аминокислоты	Буквенное обозначение аминокислоты	Название аминокислоты
A	Alanine	M	Methionine
C	Cysteine	N	Asparagine
D	Aspartic acid	P	Proline
E	Glutamic acid	Q	Glutamine
F	Phenilalanine	R	Arginine
G	Glycine	S	Serine
H	Histidine	T	Threonine
I	Isoleucine	V	Valine
K	Lysine	W	Tryptophan
L	Leucine	Y	Tyrosine

Мутация #1 встречается у 5 представителей (21,7%) и приводит к замене валина (заряд -2) на аланин (заряд -1,9). Полиморфизм #2 выявлен в двух вариациях у 2 представителей (8,7%). Первая вариация - С, приводит к замене лейцин (-2,3) на серин (+5,1), вторая - К, к замене лейцина (-2,3) на триптофан (+5,9). SNP #3 у встречается у 1 представителя (4,4%) и не влечет за собой изменения аминокислотной последовательности. Полиморфизм #4 - А выявлен у 2 представителей (8,8%), приводит к замене фенил аланина (-1,9) на тирозин (+6,1). Мутация #5 - G выявлена у 2 представителей (8,8%) и влечет за собой замену пролина (+6) на аланин (-1,9). Частота встречаемости аллеля А - rs367865195 для южно-Азиатской популяции по данным NCBI составляет 0.002. В Европейской, Американской, Африканской и Восточно-Азиатской популяциях данная точечная замена обнаружена не была.

SNP обнаруженная в Ex2 - rs200885320 встречается у 10 человек - 83,3%, не несет аминокислотной замены.

Строгой привязанности выявленных мутаций к той или иной группе возбудителей установлено не было, однако стоит отметить что мутация #5 в пределах Ex1 встречается как у образца №108, который входит в контрольную группу так и у образца №109 с диагностированным ХГП тяжелой степени в стадии обострения. Полученные данные позволяют предположить, что данная аминокислотная замена не приводит к нарушению функции HBD-2 играющего не маловажную роль в защите ротовой полости от пародонтопатогенных микроорганизмов.

Мутация #6, в пределах 5'-UTR, не описанная в SNP database базы NCBI, встречается у 7 представителей (30,4%) со средней и тяжелой формами течения заболевания. Полученные данные позволяют предположить, что полиморфизм данного нуклеотида способен косвенно влиять на экспрессию кодируемого геном DEFB4A пептида.

Мутация #9, в пределах 5'-UTR, встречается у 14 представителей выборки, что составляет 60,8% от общего числа представителей у которых был проанализирован 5'-UTR гена DEFB4A. При этом стоит отметить, что

данная SNP отличится высоки степенью вариабельности. Нами было выявлено три различных «гетерозиготных» состояния данного нуклеотида, таких как: Y(T/C), W(T/A) и M(C/A), а также два «гомозиготных» отличных от исходного, таких как: G и A. Гомозиготное состояние A было отмечено у образца №15, который входил в контрольную группу. Все остальные нуклеотидные замены встречались у представителей с ВЗП разной степени тяжести. Исходя из полученных данных можно предположить, что наличие G или C в данной позиции может приводить к снижению уровня экспрессии данного гена.

Таблица 2 – SNP выявленные в пределах гена DEFB4A

Возбудители	#	N C	P.g.,T.f., P.i.,T.d.	P.g.,T.d.,T.f	P.g.,T.d.,T.f	P.g.,T.f., P.i.,T.d.	P.g.,T.d.,T.f	P.g.,T.d.,T.f	P.g.,T.f., P.i.,T.d.	P.g.,T.f., D.i.,T.d	P.g.,T.f., P.i.,T.d.	P.g.,T.d., T.f.	P.g.	P.g.	P.g.	P.g.,A.a.	P.g.,T.f	P.g.,A.a.,T.f	P.g.,T.f., P.i.	P.g.,A.a.,T.f.	P.g.,A.a., T.f.,P.f.	P.g.,T.f.	T.d.,T.f	T.d.,T.f	P.g.	P.g.	P.g.,A.a., T.f.	P.g.(хитро)
			1	17	19	20	23	27	28	29	41	43	12	14	54	109	4	5	8	37	53	95	26	30	15	16	88	108
5'UTR	1	C	-	-	-	*	-	-	*	-	-	*	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	-	-
	2	A	W	-	-	*	-	-	*	-	-	*	-	-	-	-	W	W	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	T	-	K	-	*	-	-	*	-	-	*	-	K	-	-	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	C	-	M	-	*	-	-	*	-	-	*	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	A	-	W	-	*	-	-	*	-	-	*	-	W	-	-	-	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	A	-	R	-	*	-	R	*	-	-	*	-	-	R	G	-	R	-	-	R	R	-	-	-	-	-	-
	7	C	-	-	-	*	-	Y	*	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	C	-	-	-	*	-	M	*	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	T	Y	W	-	*	-	-	*	Y	Y	*	-	M	Y	G	Y	M	-	Y	Y	-	Y	Y	A	-	-	-
	10	G	-	K	-	*	-	K	*	-	-	*	-	-	-	-	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11	C	-	-	-	*	-	-	*	-	-	*	-	Y	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	T	-	Y	-	*	-	-	*	-	-	*	-	K	-	Y	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13	G	-	A	-	*	-	R	*	-	-	*	-	-	-	-	-	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14	C	-	-	-	*	-	-	*	-	-	*	-	Y	-	-	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	G	-	S	-	*	-	-	*	-	-	*	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	16	A	-	R	-	*	-	R	*	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-
	17	G	-	S	-	*	-	S	*	-	-	*	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	#	N C	1	17	19	20	23	27	28	29	41	43	12	14	54	109	4	5	8	37	53	95	26	30	15	16	88	108
Ex1	1	T	-	Y (V>A)	-	*	-	Y (V>A)	*	-	-	*	-	Y (V>A)	-	-	-	Y (V>A)	-	-	-	-	Y (V>A)	-	-	-	-	-
	2	T	-	C (L>S)	-	*	-	-	*	-	-	*	-	K (L>W)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	G	-	-	-	*	-	-	*	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4	T	-	-	-	*	-	-	*	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	A (F>Y)	-	-	-	-	-	-	-
	5	C	-	-	-	*	-	-	*	-	-	*	-	-	-	G (P>A)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G (P>A)
	#	N C	1	17	19	20	23	27	28	29	41	43	12	14	54	109	4	5	8	37	53	95	26	30	15	16	88	108
In 2	1	G	*	-	*	-	*	*	-	S	*	-	*	-	*	-	-	S	*	*	*	*	*	*	*	S	*	-
	2	T	*	-	*	-	*	*	-	-	*	-	*	-	*	-	-	Y	*	*	*	*	*	*	*	-	*	-
	#	N C	1	17	19	20	23	27	28	29	41	43	12	14	54	109	4	5	8	37	53	95	26	30	15	16	88	108
Ex 2	1	T	*	Y	*	Y	*	*	Y	Y	Y	*	Y	Y	*	C	C	-	*	*	*	*	*	*	Y	*	-	
	#	N C	1	17	19	20	23	27	28	29	41	43	12	14	54	109	4	5	8	37	53	95	26	30	15	16	88	108
3'UTR	1	C	*	-	*	Y	*	*	-	Y	*	-	*	Y	Y	*	Y	Y	-	*	*	*	*	*	*	Y	*	-
	2	C	*	-	*	-	*	*	-	-	*	-	*	S	S	*	S	-	-	*	*	*	*	*	*	-	*	-

Выводы

1. ДНК *P. gingivalis* была выявлена у 96 человек (87% случаев). При этом у 81 человека наблюдался воспалительный процесс пародонта. Полученные данные позволяют говорить о *P. gingivalis* как об одном из главных этиологических агентов заболеваний пародонта. В 7% случаев были выявлены пародонтопатогенные комплексы в состав которых не входила *P. gingivalis*. У 5% пародонтопатогенной микрофлоры обнаружено не было.
2. *P. gingivalis* выявленная вне комплекса в 30% случаев не вызывает воспалительного процесса пародонта. В свою очередь, *P. gingivalis* выявленная в комплексе с другими пародонтопатогенными микроорганизмами лишь в 10% случаев не вызывает воспалительного процесса. Полученные данные хорошо соотносятся с литературными данными о комплексности ВЗП.
3. В результате анализа полученных данных сформировано пять групп относительно пародонтопатогенного комплекса и превалирующих симптомов.
4. С помощью программы Gene Runner сконструированы праймеры которые позволяют амплифицировать фрагменты гена DEFB4A. Амплифицированы фрагменты гена у 28 человек страдающих АП, 52 страдающих ХГП, 9 страдающих КГ и 21 здорового человека. Подготовлены к секвенированию и секвенированы 26 образцов.
5. Проведено анализ полученных последовательностей методом множественного выравнивания с использованием программы MEGA7. В результате анализа нами было выявлено 27 SNP, 17 из которых пришлось на 5'-UTR, 5 на Ex1, 2 на Int2, 1 на Ex2 и 2 на 3'-UTR.
6. Установлено две мутации #6 и #9, в пределах 5'-UTR встречающихся у 7 и 14 из 23 человек соответственно. Полученные данные позволяют предположить, что точечные нуклеотидные замены в этих позициях могут приводить к снижению уровня экспрессии данного гена.

Список использованных источников

1. Аболмасов, Н. Н. Стратегия и тактика профилактики заболеваний пародонта / Н. Н. Аболмасов // Стоматология. 2003. № 4. С. 34-39.
2. Greer, A. Defensins and LL-37: a review of function in the gingival epithelium / A. Greer, C. Zenobia, R. P. Darveau // Periodontol 2000. 2013. Vol. 63, №1. P. 67-79.
3. Лопухов, Л. В. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике /Л. В. Лопухов, М. В. Эйдельштейн // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2000. № 3. С. 96-106.
4. <http://primerssr.blogspot.ru/2011/04/generunner.html> (Дата обращения: 02.10.2015)
5. Кирсанов, А. И. Механизмы взаимосвязи патологии внутренних органов и пародонта / А. И. Кирсанов, И. А. Горбачева // Пародонтология. 1999. № 1. С. 95-96.
6. Parsek, R. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms / R. Parsek, E. P. Greenberg // PNAS. 2000. Vol. 97, №16. P. 8789-8793.
7. Socransky, S. S. Microbial complexes in subgingival plaque / S. S. Socransky, A. D. Haffajee, M. A. Cugini, R. L. Kent // J Clin periodontal. 1998. Vol. 25. P.134-144.
8. <http://www.scienceinschool.org/ru/content/> (Дата обращения: 27.03.2017)