



НАНОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНО- ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Н.Полещук*, А.Асташонок*, Л.Рубаник*, С.Капитулец*, Г.Жавнерко**, И.Парибок**,
П.Фарния***, И.Яминский****, д.ф.-м.н. / pnn@belriem.by, spm@nanoscopy.net

При персистентных формах инфекции, когда количество продуцируемых в очаге воспаления патогенов ниже пороговой чувствительности стандартных методов диагностики, актуальна проблема обнаружения возбудителей [1, 2]. Известно, что для вирусных и бактериальных инфекций на одну полностью сформированную, содержащую нуклеиновую кислоту (НК), частицу, может продуцироваться до нескольких тысяч дефектных, не имеющих полноценного генома или вообще лишенных НК, частиц. В организме часто основные иммуно-патологические процессы обуславливаются не НК, а белковыми компонентами, входящими в состав патогенов. Сложное строение вирусов и бактерий, когда одну НК экранирует до нескольких десятков тысяч белковых, полисахаридных и других соединений, указывает на возможность детектирования возбудителей по специфическим структурным элементам, формирующим капсид или поверхностную липопротеидную оболочку патогенов. Следует отметить, что фенотипические признаки микроорганизмов, обусловленные поверхностной укладкой антигенов, часто связаны с их патогенностью. Это открывает новые возможности для изучения на молекулярном уровне бактериальных и вирусных агентов, особенно благодаря значительному прогрессу в развитии методов атомно-силовой микроскопии (АСМ) [3].

Анализируя взаимодействия поверхности и зонда микроскопа – кантилевера, можно получить трехмерные изображения поверхностных структур патогенов с нанометровым разрешением в реальном времени. Разработаны подходы для высокочувствительной идентификации HCVcore белка вируса гепатита С, основанные на использовании АСМ, позволяющей без применения меток количественно детектировать вирусные белки в режиме подсчета единичных молекул, и масс-спектрометрии (МС), дающей возможность их идентифицировать [4]. Показана возможность применения АСМ для выявления вирусных частиц

(гепатита С и В, вируса иммунодефицита человека) в сыворотке крови [5, 6].

В биологию и медицину активно внедряется анализ с применением биочипов – систем нового поколения, в которых используется принцип молекулярного узнавания. Однако большинство предлагаемых биочипов может применяться только в специализированных лабораториях, требует дорогостоящего оборудования и высококвалифицированного персонала, что затрудняет их широкое внедрение. В этой связи актуальна разработка доступных высокоспецифичных сенсорных систем. Заслуживает внимания также создание носителей с биосовместимыми сенсорными покрытиями, на которых молекулы различной природы локализованы на определенных участках одной и той же поверхности. Такие микроструктурированные поверхности могут быть получены с помощью микроконтактной печати (МКП), которая позволяет

* Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии МЗРБ (Минск).

** National Research Institute of Tuberculosis and Lung Diseases (Tehran).

*** Институт химии новых материалов НАН Беларуси (Минск).

**** ООО "НПП "Центр перспективных технологий" (Москва).



активировать поверхность в соответствии с заданным шаблоном.

Таким образом, исследования по созданию доступных и высокоспецифичных нанодиагностикумов для обнаружения различных бактериально-вирусных агентов социально-значимых инфекций перспективны при решении практических задач. Цель работы – формирование методических подходов с использованием АСМ для идентификации и анализа структурной организации *Chlamydia trachomatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, патологических прионных белков PrP27-30.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались штамм *C. trachomatis* MT-2A – депонент Республиканского научно-практического центра эпидемиологии и микробиологии Беларуси (НКВ-№ХЗ-3), клинические изоляты возбудителя, выделенные от пациентов с урогенитальной патологией.

Mycobacterium tuberculosis – штамм H₃₇RV (предоставлен доктором van Soolingen D. Национальная лаборатория туберкулеза, Голландия). Клинические изоляты возбудителя с различной устойчивостью к антибиотикам: МЛУ (множественная лекарственная устойчивость), ШЛУ (широкая ЛУ), ТЛУ (тотальная ЛУ) получены из Национального исследовательского института туберкулеза и легочных заболеваний Ирана. Использовался также штамм патологического прионного белка PrP27-30: скрепи (шт. 263К, Франция). Накопление возбудителя проводилось заражением в мозг сирийских хомяков.

АСМ. Образцы материала (аликвоты *C. trachomatis*, *M. tuberculosis*, патологические прионные белки PrP27-30) наносились на разработанные нанокompозитные покрытия подложек согласно [7-9]. Наличие аномальной формы прионного белка устанавливалось по обнаружению на поверхности "иммуночипов" узких белковых комплексов, превышающих уровень БСА. АСМ-изображения поверхности образцов получались на воздухе с помощью микроскопа Nanoscope IIIa (Veeco, США) в контактном режиме или при прерывистом контакте. Использовались контактные 100-мкм и 200-мкм кантилеверы Nanoprobe из Si₃N₄ с константами упругости 0,12 и 0,36 Н/м и теппинговые иглы из кремния с резонансной частотой ~315 кГц. Частота строчной развертки изображения варьировалась от 1 до 5 Гц, а сила воздействия при сканировании – от 1 до 10 нН. Обработка и анализ изображений осуществлялись с помощью программы "ФемтоСкан Онлайн" (www.nanoscopy.ru).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Chlamydia trachomatis – патоген, вызывающий широкий спектр заболеваний органов человека с преимущественным поражением урогенитального тракта, в том числе острые и хронические инфекции. Наиболее серьезную проблему представляют хламидии из-за тяжести вызываемых ими патологий и вследствие отсутствия эффективных методов их диагностики в условиях персистентной инфекции [10]. Поэтому актуальна разработка высокочувствительных методов обнаружения и идентификации исследуемого патогенна, что позволит расширить знания о структурной организации хламидий и понимание мимикрии и ускользания возбудителя от иммунологического надзора.

В данном разделе констатирована принципиальная возможность МКП на основе АСМ для диагностических целей на примере детекции *C. trachomatis* в пробах биологических образцов. На рис.1 показано формирование сенсорных покрытий на поверхности кремниевых подложек включением поликлональных противохламидийных антител, использованных для последующей иммобилизации возбудителя.

АСМ показала, что на микроструктурированных сенсорных покрытиях из поликлональных противохламидийных IgG происходит селективная адсорбция различных морфотипов частиц *C. trachomatis* [11]. Среди них различались одиночные частицы округлой и кокковидной формы со средними размерами 0,3±0,05 и 0,15±0,05 мкм. Также удалось обнаружить "ультрамалые" частицы плеоморфной формы диаметром 0,09±0,02 мкм [12].

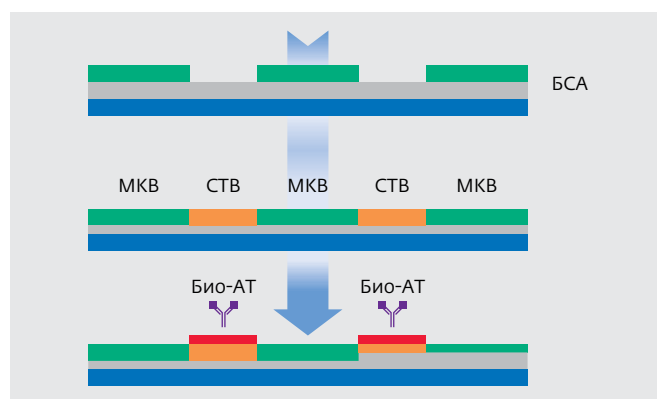


Рис.1. Поверхность кремниевой подложки с локально-активированным сенсорным покрытием: иммобилизация поликлональных биотинилированных противохламидийных IgG на полосках, содержащих стрептавидин



На следующем этапе исследована топография *C. trachomatis*, позволившая охарактеризовать особенности организации поверхностных антигенов возбудителя. На рис.2 представлены АСМ-изображения типичной "зрелой" формы *C. trachomatis* (средние размеры - $0,3 \pm 0,05$ мкм) и даны параметры структурированности ее поверхности при сканировании в режиме прерывистого контакта.

На поверхности частицы (см. рис.2а) заметны регулярно чередующиеся и параллельные "гребневидные" структуры. В увеличенном виде они представлены на рис.2б. Ширина одного "гребня" - 20-30 нм, высота - 10-15 нм. "Гребни", по-видимому, характеризуют структуру весьма неоднородной и даже складчатой поверхности частицы - отмечаются резкие перепады высот (параметр, определяющий среднеквадратичную шероховатость (R_q - 24,03 нм) значительно ниже, чем наибольшая высота профиля поверхности (R_{max} - 112,1 нм). Последнее обстоятельство указывает на прерывистость слоев оболочки и, вероятно, на неоднородность укладки поверхностных антигенов возбудителя.

Для ее характеристики фазовые изображения ЭТ *C. trachomatis* подвергались преобразованию Фурье. При полосовой Фурье-фильтрации в диапазонах частот, соответствующих локальным максимумам, визуализировалась регулярная упорядоченная структура, напоминающая паракристаллическую гексагональную решетку. Структурные единицы, входящие в ее состав, характеризовались

периодичностью, равномерной упаковкой отдельных "субъединиц" с характерным расстоянием между центрами ~11 нм ($a=11$ нм, $b=11$ нм, $\phi=60^\circ$).

Таким образом, с помощью АСМ охарактеризованы несколько морфотипов ЭТ-возбудителя, включая "зрелые" и "миниатюрные" формы *C. trachomatis*. Они содержат поверхностные детерминанты, специфически связывающиеся с поликлональными противохламидийными IgG. Дана характеристика укладки антигенов в виде упорядоченных чередующихся кластеров, образующих пространственную гексагональную решетку на поверхности "зрелых" ЭТ. Такой подход перспективен для дифференцированной диагностики хламидийной инфекции и ее персистентных форм, когда в биологическом материале количество ДНК возбудителя ниже 10^3 копий/мл. Разработанные нанокompозитные покрытия из противохламидийных IgG могут использоваться для иммобилизации и идентификации различных полиморфных форм *C. Trachomatis*, причем не требуется знать, содержат ли все охарактеризованные морфотипы частиц возбудителя полноценный геном, включая плазмидную ДНК.

Проблема туберкулеза остается актуальной во многих странах. Ее составляющими, помимо типичного, является химиорезистентный туберкулез, вызванный лекарственно-устойчивыми штаммами *M. tuberculosis*, резистентными к изониазиду, рифампицину, другим противотуберкулезным препаратам.

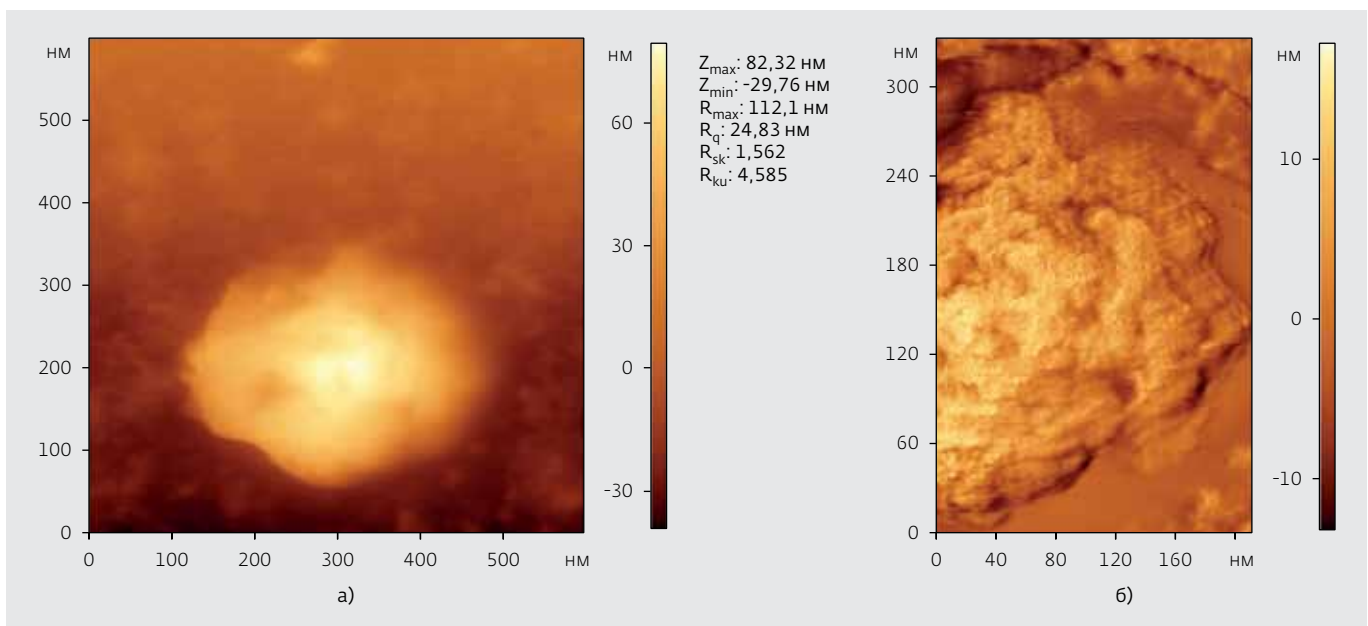


Рис.2. Морфоструктурная организация ЭТ *C. trachomatis*: а – топография поверхности частицы с указанием параметров шероховатости (размер скана 500:500 нм); б – фазовое изображения поверхности



По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 2010 году в некоторых регионах мира у каждого четвертого человека с туберкулезом развиваются особые формы ШЛУ и ТЛУ, практически или полностью не поддающиеся лечению по стандартным схемам, причем единые подходы к лабораторной диагностике, выявлению групп риска, степени контагиозности, определению вирулентных свойств *M. tuberculosis*, устойчивых к химиотерапевтическим соединениям, отсутствуют. В этой связи актуально не только обнаружение *M. tuberculosis*, но и идентификация полирезистентных штаммов возбудителя.

Методом АСМ проведено сравнение штаммов *M. tuberculosis*: чувствительных и устойчивых к основным противотуберкулезным препаратам (рис.3). На подложках локально-активированных положительно заряженным полиэлектролитом – полиэтиленмином адсорбировались преимущественно частицы возбудителя: сферической (овоидной) или овальной формы (от 250 ± 30 до 560 ± 30 нм) и кокковидные частицы (400–500 нм). Напротив, при внесении на покрытия подложек отрицательно заряженного полиэлектролита – полистиролсульфоната удалось визуализировать палочковидные (1,2–1,5 мкм), реже коккобациллярные формы (700–800 нм) возбудителя. При изучении архитектоники поверхности двух штаммов *M. tuberculosis* методом АСМ показано, что чувствительные штаммы, как правило, обладают характерной складчатостью или "зернистостью" с множественными локальными выступами или впадинами, имеющими кластерное расположение. Высота подобных "складок" варьировалась от 10 до 20 нм, а толщина составляла в среднем 3–5 нм. Совершенно другая укладка у резистентных штаммов возбудителя. Подобные частицы имели хорошо различимую, но "аномально" структурированную поверхность. Средний перепад высот рельефа при анализе профилей сечений составлял 5–10 нм. Одну треть поверхности (около 20–30% микрорельефа) занимали шероховатости в виде упорядоченных глобулярных выступов с характерной высотой 5–7 нм и толщиной 7–9 нм. При анализе других участков рельефа также обнаруживались глобулярные выступы, однако они теряли регулярное расположение и высота их равнялась 10–12 нм. Таким образом, исследованные штаммы возбудителя различались по морфологии (длина, ширина, высота, площадь поверхности) и по параметрам структурированности поверхности. Кроме того, выявлены особенности в характере адсорбции морфологических форм возбудителя на подложках из различных пленок полиэлектролитов. Результаты указывают на полиморфизм

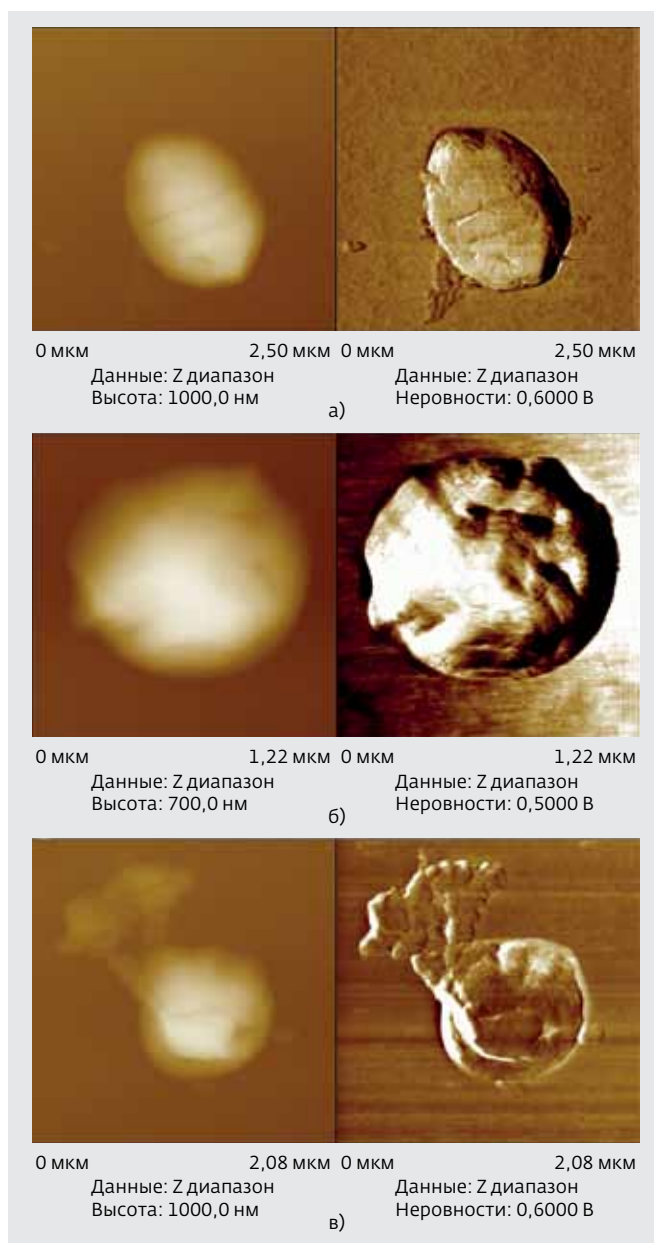


Рис.3. АСМ-изображения адсорбции МЛУ *M. tuberculosis* на подложках, содержащих сенсорные покрытия из: а – полиэтиленмина; б, в – полистиролсульфоната

в структурной организации *M. tuberculosis* и, по-видимому, характеризуют основные биологические отличительные особенности чувствительных и устойчивых к противотуберкулезным препаратам штаммов возбудителя.

На подложках с сенсорными покрытиями из поликлональных противотуберкулезных IgG проводилась управляемая адсорбция, а с помощью АСМ осуществлялась детекция и идентификация выделенных из сыворотки крови больных



МЛУ-форм *M. tuberculosis*. Многие частицы возбудителя на сенсорных покрытиях подложек извлекались в виде агрегатов или разрозненных хаотичных бактериальных субнанофрагментов, образующих небольшие скопления. Значительно реже встречались целостные структуры возбудителя, представленные преимущественно двумя типами частиц: первый тип – овоидной или яйцевидной формы со средними размерами 230 ± 20 нм – 400 ± 30 нм; второй – частицы кокковидной или "коккобацилярной" формы (400–600 нм) (рис.4).

Такие частицы соответствовали общему плану организации полирезистентных штаммов *M. tuberculosis* [7]. В тоже время при их исследовании выявлен ряд особенностей. Во-первых, ультрамалые размеры (230 ± 20 нм) возбудителя указывают на существование в популяции *M. tuberculosis* покоящихся форм, способных длительно находиться в организме в неактивном состоянии. Во-вторых, аномально высокая ригидность (жесткость) оболочки при силовом воздействии (5–7 нН) зонда микроскопа, по-видимому, связана с устойчивостью частиц к основным противотуберкулезным препаратам. В-третьих, укладка поверхностных детерминат, отличная от классической паракристаллической тетрагональной решетки, характерна для большинства представителей *Mycobacteriaceae*. При исследовании топографии частиц показано наличие на их поверхности образований, имеющих преимущественно глобулярную текстуру. Латеральные размеры этих структур – 10–12

нм в длину и около 5–7 нм в толщину. По профилям сечений поверхности удалось оценить высоту глобул, составившую около 3–5 нм. На изображениях высокого разрешения продемонстрировано, что подобные структуры состоят из более мелких зерен, напоминающих белковые субъединицы со средними размерами около 3 нм.

Таким образом, использование АСМ позволило выявить различия в поверхностной организации чувствительных и МЛУ-форм *M. tuberculosis*. Резистентность возбудителя напрямую связана с его морфологией, что актуально для разработки морфологических критериев диагностики и идентификации полирезистентных форм микобактерий. С помощью АСМ показана возможность детектирования, индикации и идентификации выделенных из крови полирезистентных штаммов *M. Tuberculosis*.

Патологическая форма прионного белка (PrP^d, молекулярная масса 27–30 кДа) – основной компонент инфекционного агента, вызывающего медленно прогрессирующие фатальные нейродегенеративные заболевания, объединенные в группу трансмиссивных губкообразных энцефалопатий, или прионные болезни. Наиболее изучены болезнь Крейтцфельда-Якоба, а у животных – скрепи. При нейроинфекциях накопление патологической изоформы прионного белка в ЦНС характеризуется уменьшением содержания α -спиральных участков, увеличением структур β -складчатого слоя в молекуле белка, ростом устойчивости к деградации

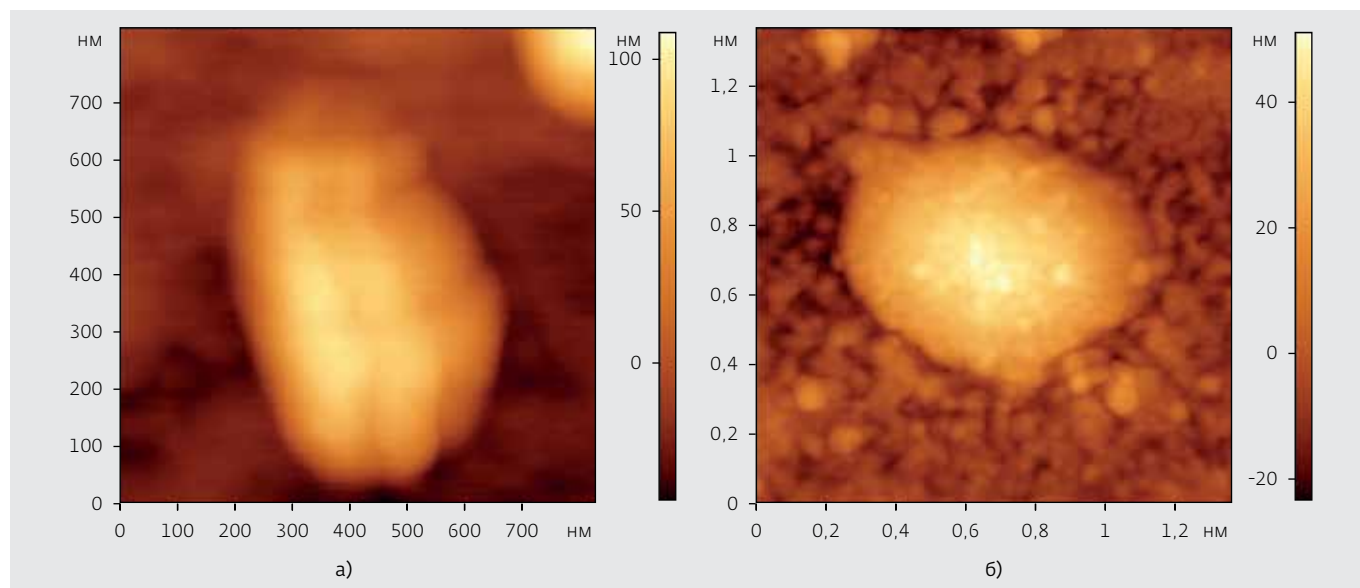


Рис.4. Морфология МЛУ-форм *Mycobacterium tuberculosis* на подложках, содержащих сенсорные покрытия из моноклональных противотуберкулезных IgG и активированных: а – полиэтиленимином; б – полистиролсульфонатом



протеиназой К [13]. К сожалению, работы, направленные на обнаружение конформационно-измененного PrP^d-белка в анализируемых пробах посредством его концентрирования на заданных участках локально активированной поверхности твердой подложки, практически не проводились.

Показана возможность использования комбинации МКП и АСМ для идентификации патологической формы прионного белка PrP27-30 (рис.5а). Осуществлена адсорбция этого агента из пробы на микроструктурированные участки поверхности. Анализ АСМ-изображений показал, что в результате осаждения анти-PrP моноклональных антител (МАТ) выявлялись узкие, равномерно чередующиеся полосы белкового материала высотой 1-3 нм, ограниченные широкими участками - полосами БСА-белка. Таким образом, высота комплекса "МАТ-PrP27-30" составила в среднем $3,2 \pm 0,4$ нм. После взаимодействия МАТ с PrP27-30 отмечались узкие полосы белковых комплексов "МАТ-PrP27-30", превышающие уровень полос БСА в среднем на $1,6 \pm 0,2$ нм (рис.5в). Перекрестное взаимодействие БСА с белком PrP27-30 выявлено не было. Количество белковых комплексов на полосах МАТ и их плотность увеличивались пропорционально кратности разведения анализируемого материала.

Установлено также, что на полосы МАТ адсорбируется белок PrP27-30, выделенный из гомогенатов мозга после их обработки протеиназой К. Комплексы удавалось наблюдать при разведении образцов 10^{-2} , 10^{-4} и 10^{-6} , что превышало пороговую чувствительность, например, метода иммунного блоттинга, на несколько порядков [14].

Выявление агрегатов PrP, специфически связывающихся с МАТ, свидетельствует о том, что подобное взаимодействие может быть эффективно только когда PrP27-30 находится в состоянии, близком к мономерному, и его вторичная и третичная структуры обеспечивают расположение активных антигенсвязывающих структур на поверхности белковой частицы.

При АСМ-исследовании (режим прерывистого контакта) фракций гомогенатов мозга, обработанных протеиназой К, на активированных поверхностях подложек выявлены структуры, располагающиеся в виде характерных для прионных белков одиночных, реже довольно крупных, скоплений. Чаще всего наблюдались тонкие филаментозные структуры длиной до 200-400 нм. Выявлено два типа нитевидных агрегатов: первый - диаметром 12 ± 1 нм и высотой около 1,2 нм, второй - диаметром 18 ± 2 нм и высотой приблизительно 1,8 нм. В отдельных случаях на подложках визуализировались белковые ассоциаты

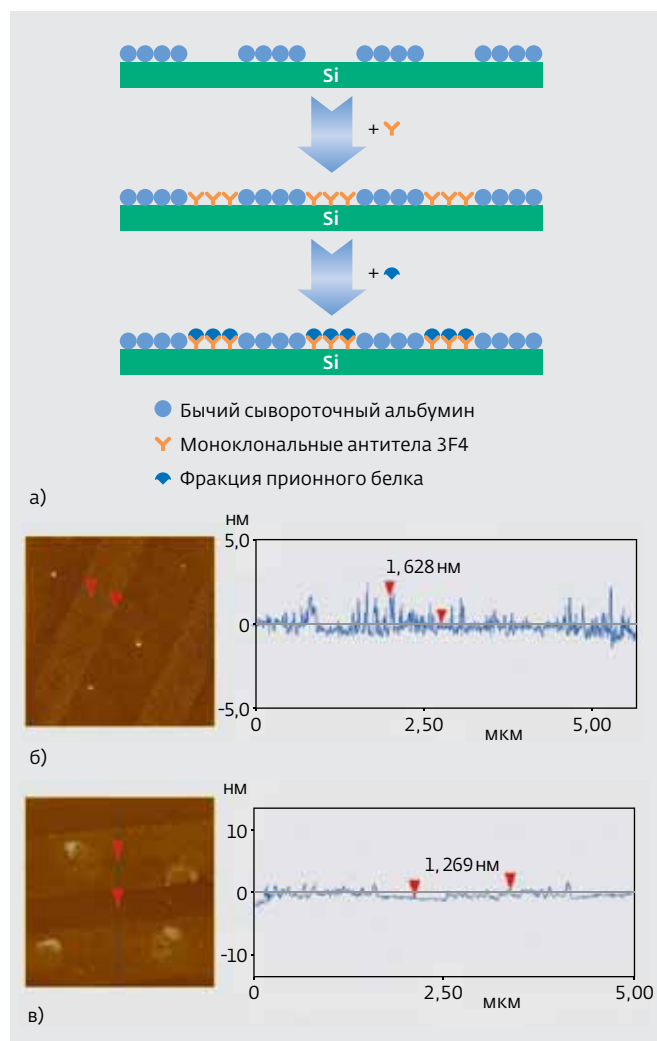


Рис.5. Схема управляемой фиксации инфекционной формы прионного белка (АСМ-изображения) (а); микроструктурированная пленка БСА на кремнии (б); после адсорбции МАТ и PrP27-30 (в)

в виде глобул с диаметром 5-10 нм, напоминавшие дискретные, сравнительно единообразно сформированные эллипсоидные частицы.

Таким образом, локально-активированные специфическими анти-PrP-моноклональными антителами подложки позволяют производить из исследуемых проб селективную адсорбцию в наномолярных концентрациях патологического прионного белка. Управляемая иммобилизация конформационно-измененного прионного белка на разработанном "иммуночипе" открывает возможности для скрининговых выявлений патологических белковых биомаркеров при нейродегенеративных заболеваниях прионной этиологии.

В целом АСМ открывает новые возможности в диагностике бактериально-вирусных инфекций:



- иммобилизация поликлональных противохламидийных IgG на подложки монокристаллического кремния позволяет адсорбировать различные морфотипы внеклеточных форм *C. Trachomatis* и использование комбинации МКП и АСМ дает возможность анализировать укладку антигенов на их поверхности;
- с помощью АСМ антимиkobактериальных антител класса IgG показана возможность визуализации и дифференциации чувствительных и полирезистентных к противотуберкулезным препаратам штаммов *M. tuberculosis*;
- АСМ предоставляет принципиальную возможность с высокой пороговой чувствительностью иммобилизовать и идентифицировать отдельные молекулы конформационно-измененного протеазорезистентного прионного белка PrP27-30, что, в свою очередь, даст возможность ранней диагностики нейродегенеративных заболеваний прионной этиологии,
- усовершенствованная методика МКП селективной посадкой на сенсорные покрытия противовирусных и антибактериальных антител позволяет адсорбировать и визуализировать различные возбудители. Комбинация МКП и АСМ-определение антигенантитело специфических взаимодействий и идентификация патологических белковых компонентов – перспективное направление исследований при разработке высокочувствительных диагностических сенсорных устройств.

Литература

1. Жукова О.Б., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. Вирусная персистенция: иммунологические и молекулярно-генетические аспекты патогенеза. – Бюллетень сибирской медицины, 2003, №4, с.113–120.
2. Маянский А.Н., Бурков А.Н., Астафьев Д.Г., Рассанов С.П. Персистенция вирусов: иммунологические и патогенетические аспекты. – Клиническая медицина, 1998, №12, с.19–25.
3. Dubrovin E.V., Drygin Yu.F., Novikov V.K., Yaminsky I.V. Atomic force microscopy as a tool of inspection of viral infection. – Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2007, №3, p.128–131.
4. Ivanov I.D., Frantsuzov P.A, Pleshakova T.O., Ziborov V.S., Svetlov S.K., Archakov A.I., Atomic force microscopy detection of serological markers of viral hepatitis B and C. – Biomed Khim, 2009, v.55, p. 689–701.
5. Kaisheva A., Ivanov I., Zgoda V., Frantsusov P., Pleshakova T. Visualization and identification of hepatitis C viral particles by atomic force microscopy combined with MS/MS analysis. – Biomed Khim, 2010, v.56, p.26–39.
6. Kuznetsov Y.G, Victoria J.G., Robinson W.E., McPherson A. Atomic Force Microscopy Investigation of Human Immunodeficiency Virus (HIV) and HIV-Infected Lymphocytes. – J. Virol, 2003, v.77, p.11896–11909.
7. Velayati A., Farnia P., Masjedi M., Merza M., Tabarsei P., Zhavnerko G., Farnia P., Poleschuyk N., Titov L. Growth and cell-division in extensive (XDR) and extremely drug resistant (XXDR) tuberculosis strains: transmission and atomic force observation. – Int J Clin Exp Med., 2010, v.3, p.308–314.
8. Velayati A, Farnia P., Masjedi M., Zhavnerko G., Ghanavi J., Poleschuyk N. Morphological modification by tubercle bacilli: no time for denial. – J Infect Dev Ctries, 2012, v.6, p.97–99.
9. Zhavnerko G., Poleschuyk N. Mycobacterium under AFM tip: Advantages of polyelectrolyte modified substrate. – International Journal of Mycobacteriology, 2012, v.1, p.53–56.
10. Карягина А.С., Алексеевский А.В., Спиринов С.А., Зигангирова Н.А., Гинцбург А.Л. Эффекторная белки хламидий. – Молекулярная биология, 2009, №6, с.963–983.
11. Асташонок А.Н., Рубаник Л.В., Жавнерко Г.К., Полещук Н.Н. Ультратруктурная и наноскопическая характеристика различных по морфологии элементарных телец *Chlamydia trachomatis* (серовар D) // XXIV Российская конференция по растровой электронной микроскопии. – М.: 2012.
12. Асташонок А.Н., Полещук Н.Н., Рубаник Л.В., Жавнерко Г.К., Парибок И.В. Использование современных достижений атомно-силовой микроскопии для визуализации возбудителя *Chlamydia trachomatis* // Современные достижения бионаноскопии. – М.: 2012.
13. Полещук Н.Н., Кальнов С.Л., Капитулец С.П. и др. Прионы: характеристика возбудителей, основные методы обнаружения и разработка новых способов прижизненной диагностики трансмиссивных губчатых энцефалопатий. – Медицинские новости, 2005, №3, с.29–34.
14. Капитулец С.П., Жавнерко Г.К., Парибок И.В., Капитулец Н.Н., Полещук Н.Н., Агабеков В.Е. Управляемая фиксация конформационно-измененных белков на локально активированной поверхности кремния при нейродегенеративных заболеваниях человека. – Современные проблемы инфекционной патологии человека, Минск, 2011, №4, с.186–193.



ТЕХНОСФЕРА
Рекламно - издательский центр

Москва, ул. Краснопролетарская, д. 16, подъезд 5
Тел. (495) 234-01-10, факс (495) 956-33-46
e-mail: journal@electronics.ru

Подписка на журналы на сайте www.technosphere.ru



Стоимость: 275 руб за номер
Периодичность: 8 номеров в год
www.nanoindustry.ru



Стоимость: 275 руб за номер
Периодичность: 6 номеров в год
www.lastmile.ru

100 %
гарантия
получения
ВСЕХ
номеров



Стоимость: 385 руб за номер
Периодичность: 6 номеров в год
www.j-analytics.ru



Стоимость: 275 руб за номер
Периодичность: 6 номеров в год
www.photonics.ru



Стоимость: 583 руб за номер
Периодичность: 8 номеров в год
www.electronics.ru