

УДК 577.24:612.014.462.4

Низкотемпературная плазма вызывает р53-зависимый апоптоз клеток карциномы кишечника

А. И. Тухватулин¹, Е. В. Сысолятина¹, Д. В. Щебляков¹, Д. Ю. Логунов¹, М. М. Васильев², М. А. Юрова¹, М. А. Данилова¹, О. Ф. Петров², Б. С. Народицкий¹, Г. Е. Morfill³, А. И. Григорьев⁴, В. Е. Фортон², А. Л. Гинцбург¹, С. А. Ермолаева^{1*}

¹ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития Российской Федерации, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

² Объединенный институт высоких температур РАН, 125412, Москва, ул. Ижорская, 13/19

³ Max Planck Institute for Extraterrestrial Physics, 85748 Garching, Giessenbachstrasse, Germany

⁴ Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН, 123007, Москва, Хорошевское ш., 76А

*E-mail: sveta@ermolaeva.msk.su

Поступила в редакцию 10.05.2012 г.

РЕФЕРАТ Низкотемпературная плазма (НТП) – это поток частично ионизированного газа, имеющего температуру, близкую к температуре окружающей среды. НТП включает большое количество биологически активных частиц (ионы, электроны, свободные радикалы, частицы в метастабильных состояниях), что позволяет использовать НТП для решения различных биомедицинских задач, в том числе в терапии новообразований. Обработка опухолевых клеток НТП вызывает дозозависимые эффекты, такие, как арест клеточного цикла и вступление клеток в апоптоз, однако точные молекулярные механизмы воздействия НТП на эукариотические клетки не изучены. В представленной работе мы изучили механизм развития и тип гибели клеток карциномы кишечника НСТ116 человека, обработанных низкотемпературной аргоновой плазмой, и определили влияние НТП на основной активируемый стрессом фактор транскрипции р53. Показано, что выживаемость клеток НСТ116 после обработки НТП зависит от наличия функционального белка р53. Воздействие НТП приводит к увеличению внутриклеточной концентрации р53 и индукции экспрессии контролируемых им генов, в частности активации основной проапоптотической каспазы-3. Впервые показано, что обработка клеток карциномы кишечника низкотемпературной плазмой приводит к р53-зависимому апоптозу. Эти результаты важны для понимания возможностей использования НТП в медицине в качестве противоопухолевого средства.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА низкотемпературная плазма, белок р53, апоптоз.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ НТП – низкотемпературная плазма; СВЧ – сверхвысокочастотный.

ВВЕДЕНИЕ

Низкотемпературная плазма (НТП) представляет собой частично ионизированный газ, полученный при атмосферном давлении и имеющий макроскопическую температуру, близкую к температуре окружающей среды [1]. Интенсивное изучение возможностей применения НТП в медицине началось около 10 лет назад, хотя первые работы появились намного раньше, преимущественно в России [2–4].

В состав факела НТП входят заряженные частицы, нейтральные активные частицы, в том числе свободные радикалы и частицы в метастабильных состояниях, а также ультрафиолетовое излучение. Биологические эффекты НТП связаны с синергичным действием перечисленных факторов, подпорого-

вая концентрация каждого из которых в большинстве случаев не вызывает изменений в биологическом объекте [5, 6].

В настоящее время активно изучают возможность использования НТП в качестве антибактериального агента, так как установлено, что НТП обладает неспецифической бактерицидной активностью, позволяющей применять НТП для стерилизации термочувствительных поверхностей и для санирования тканей, в том числе раневых поверхностей [7–9]. Другая потенциальная область применения НТП – терапия новообразований. Так, сообщается о селективности цитотоксического действия плазмы в отношении разных типов клеток человека, а также о возможности подбора условий, обеспечивающих избиратель-

ную гибель опухолевых клеток определенного типа [10, 11]. Показано, что воздействие НТП на опухолевые клетки вызывает задержку клеточного цикла и переход этих клеток к апоптозу [12–14].

В отличие от конечных эффектов, вызванных обработкой клеток НТП, о молекулярных механизмах, лежащих в основе взаимодействия НТП с эукариотическими клетками, известно весьма немного. Такие данные необходимы для выяснения природы селективности действия НТП в отношении опухолевых клеток и определения границ применения НТП. В связи с этим цель нашей работы состояла в изучении молекулярных механизмов действия НТП на опухолевые клетки и определение типа гибели клеток, подвергнутых воздействию НТП.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии и условия выращивания клеток

В работе использовали две сублинии клеток карциномы прямой кишки человека (HCT116): сублинию HCT116(p53+/+)-ConA-lacZ, содержащую активный ген p53, а также репортерный ген β-галактозидазы под контролем p53-зависимого промотора, и сублинию HCT116(p53-/-)-ConA-lacZ, в которой делетированы обе копии гена, кодирующего белок p53. Исходные линии клеток HCT116(p53+/+) и HCT116(p53-/-) любезно предоставлены А.В. Гудковым (Roswell Park Cancer Institute, США). Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10 об.% сыворотки эмбрионов крупного скота («Nuclone», США), 1 мг/мл глутамина («ПанЭко», Россия), 50 Ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко», Россия) при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Клетки рассеивали в отношении 1 : 6 на вторые сутки при достижении монослоя.

Определение количества живых клеток

Выживаемость клеток определяли спектрофотометрическим методом через 24 ч после обработки холодной плазмой по интенсивности окраски живых клеток красителем метиленовым голубым. Оптическую плотность измеряли при 540 и 620 нм. Относительное количество выживших клеток определяли по формуле $x = OE_{620} - OE_{540}$.

Определение активности p53-контролируемого промотора по экспрессии репортерного гена β-галактозидазы

После удаления культуральной среды к клеткам добавляли лизирующий буфер, содержащий субстрат для β-галактозидазы (1 мМ MgCl₂, 0.25 М Трис-НСl, рН 7.4, 0.02% NP40, 2 г/л о-нитрофенил-β-D-галактопиранозид). После инкубации при 37°C в те-

чение 30 мин уровень активности β-галактозидазы определяли спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность раствора при длине волны 414 нм.

Источник НТП

В работе использовали источник низкотемпературной аргоновой СВЧ плазмы MicroPlaSter β. Источник НТП содержал генератор тока с частотой 2.45 ГГц, горелку и систему подачи газа (аргон). Прибор может работать в двух режимах: режиме НТП и режиме продува неионизированного аргона. Горелка способна генерировать высокостабильный поток плазмы (факел) низкой мощности (60—150 Вт) с низкой скоростью газового потока (4–8 л/мин). Длина плазменного факела – примерно 5 см, диаметр – около 3.5 см. Температура факела на расстоянии 2 см от горелки, где помещались образцы, равнялась 36 ± 2°C.

Облучение клеток НТП

За один день до начала эксперимента клетки высеивали на культуральные чашки диаметром 3 см по 2 × 10⁵ клеток/чашка. На следующий день непосредственно перед облучением из культуральных чашек удаляли среду, оставляя 0.5 мл, располагали чашки на расстоянии 2 см от плазменной горелки и облучали НТП в течение времени, указанного далее. Сразу после облучения культуральную среду заменяли свежей и переносили чашки в CO₂-инкубатор. Количество жизнеспособных клеток и активность репортерного гена β-галактозидазы определяли через 24 ч после облучения.

Измерение уровня активности каспазы-3

Активность каспазы-3 измеряли, используя конъюгат антител, специфичных для активной формы белка, с флуоресцентным красителем флуоресцеинизотиоцианатом (FITC, «BD Pharmingen», США). Через 18 ч после обработки плазмой клетки собирали и осаждали центрифугированием в течение 10 мин при скорости 1200 об/мин. Для фиксации и пермеаблизации клеток использовали реагент BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit («BD Pharmingen»). Внутриклеточное окрашивание активной формы каспазы-3 осуществляли согласно протоколу производителя («BD Pharmingen»). Флуоресценцию детектировали методом проточной цитофлуориметрии, используя цитометр Beckman-Coulter FC-500.

Измерение уровня активности p53

Уровень p53 измеряли, используя конъюгат антител к белку p53 с флуоресцентным красителем фикоэритрином («BD Pharmingen», США). За 1 день до начала опыта на культуральные чашки

диаметром 3 см высевали по 2×10^5 клеток линии НСТ116(p53+/+)-ConA-lacZ и НСТ116(p53-/-)-ConA-lacZ. На следующий день при достижении клетками 60–80% конfluenceности из чашек отбирали культуральную среду, оставив 0.3 мл для предотвращения высыхания клеток. После обработки клеток плазмой в течение 2 мин клеточную среду заменяли свежей. После инкубации в течение 6 ч клетки собирали и осаждали центрифугированием (10 мин, 1200 об/мин). Для фиксации и пермеаблизации клеток использовали реагент BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit («BD Pharmingen»). Внутриклеточное окрашивание белка p53 производили согласно протоколу производителя («BD Pharmingen»). В качестве изотипического контроля использовали IgG1 мыши. Флуоресценцию детектировали методом проточной цитофлуориметрии, используя цитометр BeckmanCoulter FC-500.

Статистика

Каждый эксперимент был выполнен не менее 3 раз, измерения проводились в двух повторах. Среднее значение и стандартную ошибку определяли с использованием функций, включенных в программный пакет Excel 2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обработка НТП вызывает дозозависимую гибель клеток НСТ116

Одной из возможных причин гибели опухолевых клеток после обработки НТП, может быть способность плазмы активировать фактор транскрипции p53 и инициировать развитие p53-зависимых программ, ведущих к апоптотической гибели.

Для проверки этого предположения мы выбрали линию клеток НСТ116(p53+/+) карциномы прямой кишки человека, содержащих функциональный ген p53. На первом этапе определили способность НТП вызывать гибель этих клеток. С этой целью клетки НСТ116(p53+/+) облучали НТП с различным временем экспозиции. Через 24 ч после облучения определяли количество живых клеток. Контролем служили необлученные клетки, а также клетки, обработанные потоком неионизированного аргона в течение соответствующего времени. Воздействие НТП в течение 2 мин не вызывало статистически значимого снижения числа живых клеток (рис. 1). После облучения в течение 5 мин число живых клеток снижалось в 2 раза ($p < 0.01$), а после 7 мин – в 14.5 раза по сравнению с интактными контрольными клетками ($p < 0.005$). Снижение числа живых клеток после облучения плазмой в течение 7 мин статистически значимо отличалось от эффекта неионизированно-

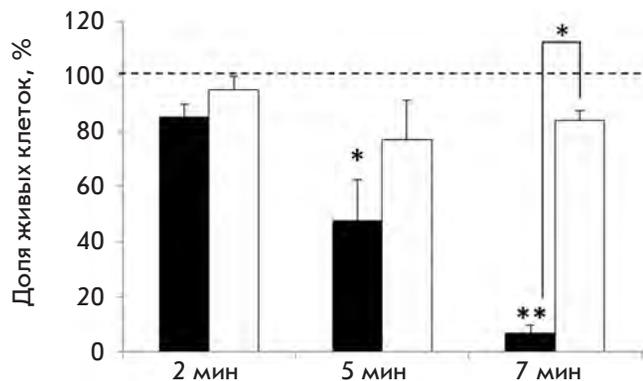


Рис. 1. Определение выживаемости клеток линии НСТ116(p53+/+), обработанных НТП (черные столбцы) и неионизированным аргоном (белые столбцы), в зависимости от времени экспозиции. Показан процент живых клеток по сравнению с интактным контролем, число клеток в котором принято за 100% (показано пунктиром). Приведены средние значения \pm стандартное отклонение. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ по сравнению с интактными клетками.

го аргона ($p < 0.01$). При облучении неионизированным аргоном число живых клеток снижалось относительно контрольных, однако было статистически незначимым при всех временах экспозиции. Наблюдаемое снижение числа живых клеток могло быть обусловлено последствиями обдува клеток потоком газа, приводящего к испарению культуральной среды или другим неспецифическим эффектам.

Таким образом, нами было показано, что обработка НТП приводит к уменьшению количества живых клеток, при этом выраженность цитотоксического эффекта зависит от времени воздействия плазменного потока. Снижение числа живых клеток при обработке потоком неионизированного аргона было меньше и не зависело от времени экспозиции. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что цитотоксичность НТП обеспечивается специфическим воздействием ионизированных частиц НТП на эукариотические клетки.

В клетках НСТ116, обработанных НТП, активируется белок p53 и контролируемые им элементы

Известно, что одним из основных активируемых стрессом регуляторов транскрипции является белок p53, активация которого способна инициировать развитие ряда программ, приводящих к клеточной гибели.

Влияние НТП на активность белка p53 изучали с использованием сублиний клеток НСТ116

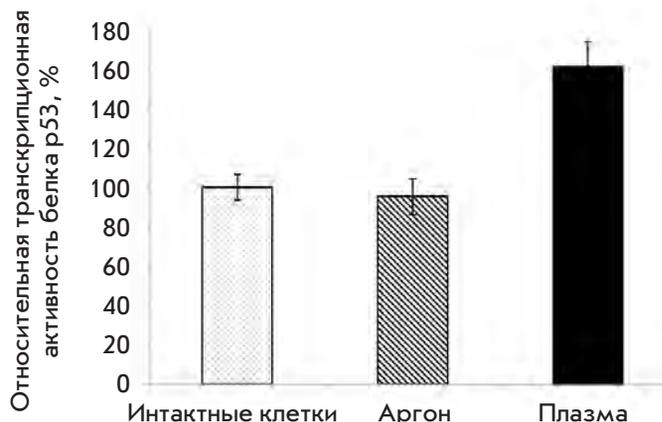


Рис. 2. Относительная транскрипционная активность белка p53 в клетках HCT116(p53+/+), обработанных НТП. Приведены средние значения ± стандартное отклонение.

(HCT116(p53+/+)-ConA-lacZ). В геном клеток HCT116(p53+/+)-ConA-lacZ был введен репортерный ген *lacZ*, кодирующий бактериальную β-галактозидазу. Экспрессия репортерного гена контролировалась p53-зависимым промотором. Использование данной репортерной системы позволяет определять транскрипционную активность белка p53 по уровню активности β-галактозидазы. Исходя из полученных ранее данных, определили субтоксическое время обработки клеток НТП, которое не приводит к выраженной гибели клеток (2 мин). Уровень экспрессии гена β-галактозидазы определяли спектрофотометрически через 24 ч после воздействия на клетки НТП. В качестве контроля использовали клетки, обработанные потоком неионизированного аргона. Обработка клеток НТП в течение 2 мин приводила к статистически значимому повышению уровня активности β-галактозидазы, что указывало на увеличение транскрипционной активности p53 в клетках линии HCT116 (рис. 2).

Дополнительно методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител к p53, конъюгированных с флуоресцентной меткой, определили количество самого белка p53. В качестве контрольной линии использовали клетки HCT116(p53-/-) с делецией обеих копий гена p53. Показано, что обработка НТП в течение 2 мин приводит к статистически значимому увеличению количества белка p53 в клетках HCT116(p53+/+) по сравнению с контрольными интактными клетками (рис. 3А). Неспецифический сигнал в клетках линии HCT116(p53-/-), как и следовало ожидать, не изменялся после воздействия НТП (рис. 3Б).

Таким образом, установлено, что обработка эукариотических клеток НТП при субтоксических временах экспозиции приводит к статистически значимому ($p < 0.05$) увеличению количества белка p53 и повышению его транскрипционной активности.

Воздействие НТП приводит к апоптотической гибели клеток HCT116

На заключительном этапе работы необходимо было идентифицировать тип клеточной смерти индуцируемой обработкой НТП. Среди известных на сегодняшний день механизмов клеточной смерти одним из основных является инициация апоптоза путем программ с участием активированного белка p53 [15]. Один из ключевых ферментов, активизирующихся при апоптозе, – эффекторная каспаза-3 [16]. Активация этого белка является неотъемлемой чертой заключительных стадий апоптотической гибели клеток. Для выявления связей между активацией белка p53 и гибелью клеток HCT116 определили уровень активированной каспазы-3 в клетках сублиний HCT116(p53+/+) и HCT116(p53-/-), обработанных НТП.

В популяции клеток HCT116(p53+/+), обработанных НТП в течение 2 мин, наблюдалось значительное (до 20%) увеличение доли клеток с активной каспазой-3 (рис. 4А), тогда как в клетках HCT116(p53-/-) такая обработка к подобному эффекту не приводила (рис. 4Б). Таким образом, можно заключить, что обработка клеток НТП приводит к p53-зависимой активации основной эффекторной проапоптотической каспазы-3.

Суммируя полученные результаты, можно сделать вывод, что обработка клеток человека НТП при-

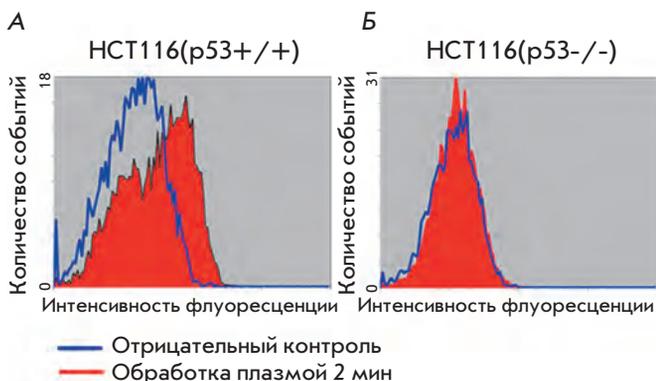


Рис. 3. Внутриклеточная концентрация белка p53 в клетках HCT116(p53+/+) и HCT116(p53-/-) (А и Б соответственно), контрольных или обработанных НТП в течение 2 мин.

водит к активации белка p53, основного регулятора ответа клетки на стресс, и индуцирует экспрессию p53-зависимых генов, в том числе эффекторной каспазы-3, запуская тем самым гибель клеток по апоптотическому пути. Впервые прямо показано, что апоптоз, вызванный НТП, развивается по p53-зависимому пути. Ранее на основании данных об усилении транскрипции гена p53 и гена p21, контролируемого белком p53, в клетках гепатокарциномы Hep2G человека предположили, что p53 участвует в ответе клеток на облучение НТП [17]. Однако прямых доказательств существования связи между выживаемостью клеток и наличием функционального белка p53 не было. Полученные нами результаты соответствуют индукции сигнального пути, регулируемого β -катенинами, в клетках рака кишечника человека, подвергнутых воздействию НТП, поскольку этот путь связан с основным сигнальным каскадом, контролируемым белком p53 [18]. Еще одна сигнальная система, вовлеченная в клеточный ответ на воздействие НТП, это генерация внутриклеточных активных форм кислорода (ROS, reactive oxygen species) [14]. Внутриклеточные ROS, прямо или опосредованно взаимодействующие с такими компонентами сигнальных путей, как протеинкиназы, фосфатазы, факторы транскрипции, служат вторичными сигнальными молекулами, которые участвуют в контроле клеточного цикла и влияют на окончательный исход событий, запущенных в результате активации белка p53 [19].

Однако последовательность сигнальных событий, развивающихся в клетке в ответ на воздействие НТП, до настоящего времени не установлена. Прежде всего, не полностью выяснен характер повреждений, приводящих к активации белка p53. Ряд исследований указывает на возможность повреждений ДНК как фактора, приводящего к апоптозу облученных клеток. Так, воздействие дибарьерного разряда как источника воздушной плазмы на клетки рака молочной железы MCF10A приводит к фосфорилированию гистона H2A, что является маркером возникновения двухцепочечных разрывов в ДНК [14]. Однако эти результаты противоречат многочисленным данным, полученным на прокариотах и очищенных препаратах ДНК, о минимальном количестве двухцепочечных разрывов, обусловленных воздействием НТП [20–23]. Для объяснения этого противоречия авторы предположили, что двухцепочечные разрывы в ДНК могут возникать, например, в результате образования внутриклеточных ROS под действием НТП [14]. Другим потенциальным сигналом развития апоптоза могут быть повреждения цитоплазматической мембраны. Например, активация кислой сфингомиелиназы при повреждении мембраны и увеличенная продукция церамидов могут приводить к развитию

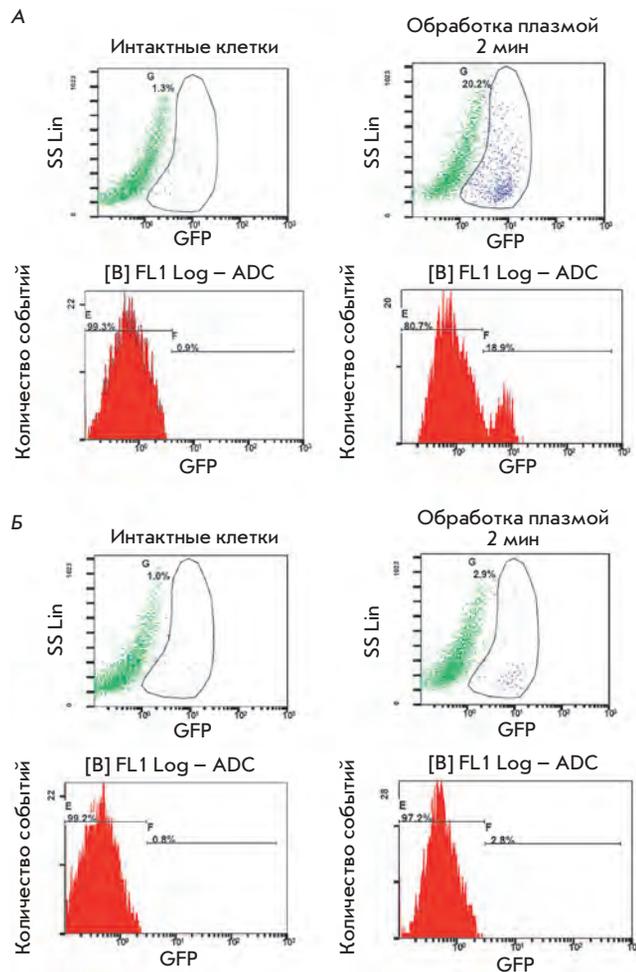


Рис. 4. Количество активной каспазы-3 в клетках НСТ116(p53+/+) и НСТ116(p53-/-) (А и Б соответственно), контрольных или обработанных НТП в течение 2 мин.

как p53-зависимого, так и независимого апоптоза [24]. В пользу этого механизма запуска апоптоза свидетельствуют многочисленные экспериментальные данные, показывающие, что именно поверхностные структуры клетки и, в частности, мембрана, служат основной мишенью для активных частиц НТП [20, 25–27]. Однако доказательств в пользу данного механизма инициации апоптоза не получено, и детали событий, происходящих в клетке сразу после воздействия НТП, не изучены. Вместе с тем, очевидно, что для успешного применения НТП в медицине необходимо понимать, какие сигнальные события НТП запускает в зависимости от дозы и типа плазменного облучения, поскольку именно эти знания позволяют оптимизировать параметры воздействия и получить необходимый эффект.

ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований показано, что выживаемость клеток карциномы кишечника НСТ116, обработанных НТП, зависит от наличия функционального белка p53. Воздействие НТП на клетки приводит к увеличению внутриклеточной концентрации p53 и индукции экспрессии контролируемых им генов, в частности основной проапоптотической каспазы-3. Таким образом, впервые показано, что обработка клеток карциномы кишечника аргоновой НТП приводит к p53-зависимому апоптозу. Эти результаты важны для понимания возмож-

ностей применения НТП в качестве противоопухолевого средства. ●

Авторы благодарят ADTEC Plasma Technology Co. Ltd за вклад в создание источника НТП MicroPlaSter β.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Государственные контракты № 02.512.12.2023, 16.512.12.2013).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фортвов В.Е. Энциклопедия низкотемпературной плазмы. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2004. 530 с.
2. Kong M., Kroesen G., Morfill G., Nosenko T., Shimizu T., van Dijk J., Zimmermann J. // N. J. Physics. 2009. V. 11. № 11. P. 115012–115048.
3. Ермолаева С.А., Петров О.Ф., Миллер Г.Г., Шагинян И.А., Сысолятина Е.В., Мухачев А.Я., Народицкий Б.С., Morfill G.E., Фортвов В.Е., Григорьев А.И. и др. // Вестн. РАМН. 2011. № 10. С. 15–21.
4. Шехтер А.Б., Кабисов Р.К., Пекшев А.В., Козлов Н.П., Перов Ю.Л. // Бюлл. эксп. биол. мед. 1998. V. 126. № 4. С. 210–215.
5. Stoffels E., Sakiyama Y., Graves D. // IEEE Trans. Plasma Sci. 2008. V. 36. № 4. P. 1441–1457.
6. Fridman G., Friedman G., Gutsol A., Shekhter A., Vasilets V., Fridman A. // Plasma Proc. Polym. 2008. V. 5. № 6. P. 503–533.
7. Ermolaeva S.A., Varfolomeev A.F., Chernukha M.Y., Yurov D.S., Vasiliev M.M., Kaminskaya A.A., Moisevich M.M., Romanova J.M., Murashev A.N., Selezneva I.I., et al. // J. Med. Microbiol. 2011. V. 60. № 1. P. 75–83.
8. Lee K., Paek K., Ju W., Lee Y. // J. Microbiol. 2006. V. 44. № 3. P. 269–275.
9. Moisan M., Barbeau J., Crevier M., Pelletier J., Philip N., Saoudi B. // Pure Appl Chem. 2001. V. 74. № special. P. 349–358.
10. Vandamme M., Robert E., Dozias S., Sobilo J., Lerondel S., Le Pape A., Pouvesle J. // Plasma Med. 2011. V. 1. № 1. P. 27–43.
11. Georgescu N., Lupu A. // IEEE Trans. Plasma Sci. 2010. V. 38. № 8. P. 1949–1955.
12. Stoffels E., Roks A., Deelman L. // Plasma Proc. Polym. 2008. V. 5. № 6. P. 599–605.
13. Kieft I., Darios D., Roks A., Stoffels E. // IEEE Trans. Plasma Sci. 2005. V. 33. № 6. P. 771–775.
14. Kalghatgi S., Kelly C.M., Cerchar E., Torabi B., Alekseev O., Fridman A., Friedman G., Azizkhan-Clifford J. // PLoS ONE. 2011. V. 6. № 1. P. e16270.
15. Wyllie A. // Nature. 1997. V. 389. № 6648. P. 237–238.
16. Abu-Qare A.W., Abou-Donia M.B. // J. Toxicol. Environ. Hlth B Crit. Rev. 2001. V. 4. № 3. P. 313–332.
17. Yan X., Zou F., Zhao S., Lu X., He G., Xiong Z., Xiong Q., Zhao Q., Deng P., Huang J., et al. // IEEE Trans. Plasma Sci. 2010. V. 38. № 9. P. 2451–2457.
18. Reya T., Clevers H. // Nature. 2005. V. 434. № 7035. P. 843–850.
19. Sauer H., Wartenberg M., Hescheler J. // Cell. Physiol. Biochem. 2001. V. 11. № 4. P. 173–186.
20. Venezia R.A., Orrico M., Houston E., Yin S., Naumova Y.Y. // Infect. Control Hosp. Epidemiol. 2008. V. 29. № 5. P. 430–436.
21. Birmingham J. // IEEE Trans. Plasma Sci. 2004. V. 32. № 4. P. 1526–1531.
22. Yasuda H., Hashimoto M., Rahman M., Takashima K., Mizuno A. // Plasma Proc. Polym. 2008. V. 5. № 6. P. 615–621.
23. Mizuno A. // NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology. Plasma for Bio-Decontamination, Medicine and Food Security / Eds Machala Z., Hensel K., Akishev Y. Germany: Springer Science+Business Media. B.V., 2012.
24. Heffernan-Stroud L.A., Obeid L.M. // Adv. Enzyme Regul. 2011. V. 51. № 1. P. 219–228.
25. Tarasenko O., Nourbakhsh S., Kuo S., Bakhtina A., Alusta P., Kudasheva D., Cowman M., Levon K. // IEEE Trans. Plasma Sci. 2006. V. 34. № 4. P. 1281–1289.
26. Joshi S.G., Paff M., Friedman G., Fridman G., Fridman A., Brooks A.D. // Am. J. Infect. Control. 2010. V. 38. № 4. P. 293–301.
27. Laroussi M., Mendis D., Rosenberg M. // New J. Phys. 2003. V. 5. №41. P. 1–10.