پدیده‌ی آپوپتوزیز در سه قارچ درماتوفیت

پیام بهزادی[1*]، الهام بهزادی[2]، محسن گرامی شعار[3]

۱. کارشناس ارشد میکروب شناسی، عضو هیات علمی (مربی) گروه میکروب شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس
۲. کارشناس ارشد میکروب شناسی، فرهنگستان علوم پزشکی جمهوری اسلامی ایران
۳. کارشناس ارشد قارچ شناسی، مدرس گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

نشانی برای مکاتبه: تهران، خیابان امیرآباد شمالی، کوچه‌ی خسروی پ ۶۷ جدید، طبقه‌ی اول، کدپستی ۱۴۱۳۶، **تلفن** ۸۸۰۲۸۵۴۰،
behzadipayam@yahoo.com

دریافت مقاله: مهر هشتاد و هشت پذیرش برای چاپ: آذر هشتاد و هشت

چکیده

سابقه و هدف: *در گذشته، تاثیرات اشعه‌ی UV بر روی رشد کلنی قارچ های درماتوفیت Epidermophyton floccosum، Microsporum canis و Trichophyton mentagrophytes توسط نویسندگان مورد بررسی قرار گرفته است، ولی تاکنون هیچ گونه پژوهش ویژه ای درزمینه‌ی بررسی پدیده‌ی آپوپتوزیز در قارچ های مزبور صورت نگرفته است.*

روش کار: *در مطالعه حاضر، درماتوفیت های Epidermophyton floccosum، Microsporum canis و Trichophyton mentagrophytes در محیط های سابورو دکستروز براث همراه کلرامفنیکل کشت داده شدند و پس از رشد مناسب، بر اساس یک پروتکل مشخص توسط اشعه‌ی UV، پرتو دهی شدند (به جز نمونه های شاهد). برای بررسی بروز پدیده‌ی آپوپتوزیز ناشی از تابش اشعه‌ی UV در قارچ های درماتوفیت مزبور، مولکول های DNA نمونه های شاهد و اشعه دیده، استخراج گردیدند و با استفاده از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز، مورد مطالعه قرار گرفتند.*

یافته ها: *نتایج بدست آمده نشان می دهند که هیچ تغییری مبنی بر بروز پدیده‌ی آپوپتوزیز در مولکول های DNA نمونه های شاهد و اشعه دیده قارچ های درماتوفیت Epidermophyton floccosum، Microsporum canis و Trichophyton mentagrophytes ایجاد نگردید.*

نتیجه گیری: *با توجه به نتایج بدست آمده، می توان چنین استنباط کرد که با استفاده از پروتکل اشعه دهی در این مطالعه نمی توان پدیده‌ی آپوپتوزیز را در سه قارچ درماتوفیت Epidermophyton floccosum، Microsporum canis و Trichophyton mentagrophytes مشاهده نمود. به نظر می رسد که علت آن، گرایش منفی قارچ های مزبور نسبت به اشعه‌ی UVB باشد.*

واژگان کلیدی: ***آپوپتوزیز، اشعه‌ی UV، Epidermophyton floccosum، Microsporum canis، Trichophyton mentagrophytes***

مقدمه

واژه‌ی آپوپتوزیز که از دو بخش Apo (به معنای از) و Ptosis (به معنای سقوط) تشکیل شده؛ برای اولین بار توسط Kerr, Wylle, Currie در سال ۱۹۷۲ میلادی مطرح گردید(۳-۱). مطالعات نشان می دهند که پدیده‌ی آپوپتوزیز با رویداد نکروزه شدن، کاملا فرق دارد؛ زیرا آپوپتوزیز یا مرگ برنامه ریزی شده‌ی سلول، شکل مهم و کنترل شده‌ی مرگ سلولی است که در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک بسیار گوناگون رخ می دهد. یکی از مهمترین محرک های برون سلولی القا کننده‌ی آپوپتوزیز در سلول ها، اشعه‌ی UV است که با شکسته شدن DNA و حباب دار شدن غشای پلاسمایی مشخص می شود. معمول ترین رویداد در پدیده‌ی آپوپتوزیز، ایجاد باندهای نردبانی DNA برروی ژل آگارز است (۸-۱). اشعه‌ی UV، طیف نوری میان پرتوهای ایکس و نور مریی (بین ۱۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر) را شامل و به سه گروه UVA، UVB و UVC تقسیم می گردد. مولکول های DNA، بیشتر اشعه‌ی UVB (۳۲۰-۲۹۰ نانومتر) را جذب می کنند که انرژی جذب شده، پیوندهای موجود در DNA را می شکند(۱، ۲، ۴، ۷، ۹، ۱۰).

قارچ های درماتوفیت که از گروه میکروارگانیزم های کراتین دوست می باشند قادر به رشد بر روی بافت شاخی و مرده‌ی پوست بوده و بر اساس منبع عفونت و محل زندگی در طبیعت به سه گروه انسان دوست، حیوان دوست و خاک دوست تقسیم می شوند. با توجه به بررسی های انجام شده، قارچ های درماتوفیت نسبت به اکسیژن گرایش مثبت داشته در حالیکه نسبت به اشعه‌ی UV گرایش منفی از خود نشان می دهند. به همین دلیل است که این گروه از قارچ ها قادر به مقاومت در برابر اشعه‌ی UV بوده و از تخریب احتمالی در ژنوم خود، در امان می مانند (۱۴-۹). در گذشته، تاثیرات اشعه‌ی UV بر روی قارچ های درماتوفیت Trichophyton rubrum، Trichophyton mentagrophytes، Epidermophyton floccosum و Microsporum canis بررسی پدیده‌ی آپوپتوزیز در قارچ درماتوفیت Trichophyton rubrumتوسط نویسندگان مقاله‌ی حاضر به انجام رسیده است (۲، ۹). اما از آنجاییکه تاکنون هیچ گونه مطالعه ای در جهان بر روی پدیده‌ی آپوپتوزیز در سه قارچ درماتوفیت Epidermophyton floccosum، Microsporum canis و Trichophyton mentagrophytes انجام نگرفته، در پروژه‌ی حاضر، سعی بر آن شده است تا به کمک یک پروتکل مشخص اقدام به اشعه دهی قارچ های مزبور نموده و از طریق روش های مولکولی اقدام به بررسی پدیده‌ی آپوپتوزیز در آنها گردد. لازم به ذکر است که دو گونه‌ی Trichophyton mentagrophytes و Epidermophyton floccosum از انواع انسان دوست و گونه‌ی Microsporum canis از انواع حیوان دوست می باشد. استفاده از گونه های مزبور به دلیل اهمیت آنها در قارچ شناسی پزشکی و دامپزشکی می باشد (۱۳-۱۱).

روش کار

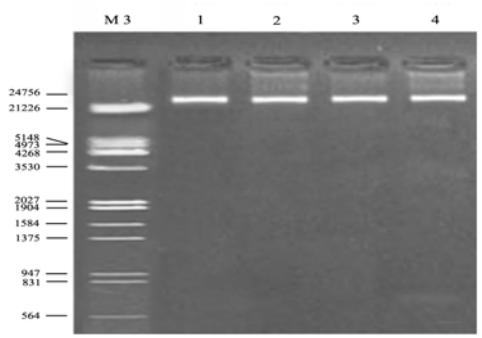
سه قارچ درماتوفیت Epidermophyton floccosum، Microsporum canis و Trichophyton mentagrophytes از بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه قارچ شناسی پزشکی دانشکده‌ی بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران جدا و به کمک روش های روتین آزمایشگاهی جنس و گونه آنها تشخیص و تایید گردید.سپس هر یک از گونه های مزبور در محیط کشت ساوبورو دکستروز براث همراه کلرامفنیکل کشت داده شدند و به مدت ۱۵ روز در دمای اتاق (۲۲ درجه‌ی سانتیگراد) گرما گذاری شدند. بعد از این مدت که کلنی قارچ ها رشد مناسبی داشتند، همه‌ی کلنی های مزبور (بجز کلنی نمونه های شاهد) به مدت ۱۰ دقیقه با طول موج ۳۰۲ نانومتر اشعه دهی شدند. فاصله میان پلیت ها و منبع تولید اشعه‌ی UV ۸ سانتیمتر بود و در پلیت ها به هنگام اشعه دهی باز بودند. لامپ های UV دستگاه Transilluminator بیشترین میزان نوردهی و کمترین میزان گرمادهی را داشتند(۲). کلنی های اشعه دیده به سه گروه مجزا تقسیم و هر گروه به ترتیب ۱، ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از اشعه دهی در محفظه‌ی تاریک و در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس میسلیوم های قارچی مربوط به هر گروه از نمونه ها به صورت جداگانه از محیط کشت مایع جدا و سانتریفیوژ شدند. بعد از سانتریفیوژ، میسلیوم ها دو بار با Phosphate-Buffered Saline (PBS) شسته شدند(۲). High-molecular-weight DNA میسلیوم های اشعه دیده و شاهد از سه قارچ درماتوفیت Epidermophyton floccosum، Microsporum canis و Trichophyton mentagrophytes به کمک روش کار DNP Kit (High yield DNA Purification Kit) شرکت سیناژن جداسازی شدند.

به طور خلاصه، میسلیوم های قارچی گروه های مختلف از هر گونه، به صورت جداگانه با نیتروژن مایع منجمد و در هاون های چینی استریل آنقدر کوبیده شدند تا به شکل پودر بسیار ریز و کاملا نرم در آمدند(۲). سپس، در داخل میکروتیوب های ۱/۵ میلی‌لیتری، ۱۰۰ میکرولیتر از Protease Buffer به ۵۰ میلی گرم از پودر نرم شده‌ی هر گروه قارچی اضافه شد. در مرحله‌ی بعد، با افزودن ۵ میکرولیتر از پروتئاز، هر یک از میکروتیوب ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتیگراد قرار گرفتند. پس از انجام مراحل بالا، مطابق با دستور کار شرکت سیناژن از هر میکروتیوب، ۱۰۰ میکرولیتر نمونه با ۷۰۰ میکرولیتر Lysis Solution مخلوط و ۲۰ ثانیه با میکروسانتریفیوژ مخلوط گردید. نمونه ها کاملا همگن شدند. سپس، ۵۰۰ میکرولیتر از Percipitation Solution افزوده و بعد از مخلوط شدن به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- سانتیگراد سرما گذاری شدند. با اتمام مدت زمان سرماگذاری، هر یک از نمونه ها برای ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. سپس، مایع رویین از لوله خارج و ۱ میلی لیتر Wash Buffer به رسوبات موجود در میکروتیوب ها اضافه شد. و بعد از تکان دادن آرام آنها، دوباره لوله ها برای ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ و مجددا مایع رویین از آنها خارج شد. بعد از خروج کامل Wash Buffer از میکروتیوب ها، رسوبات موجود در آنها برای ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتیگراد گرمادهی و خشک شدند. در مرحله بعد، به هریک از لوله ها ۵۰ میکرولیتر Solvent Buffer افزوده، به آرامی تکان داده شدند و برای ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتیگراد گرمادهی شدند. سپس، دیواره‌ی لوله ها شستشو و به آرامی عمل Pippeting انجام شد. در پایان، لوله ها به مدت۳۰ ثانیه با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شده و مایع رویین محتوی DNA خالص بود.

پس از اتمام جداسازی DNA، ۱۰ میکرولیتر از هر میکروتیوب محتوی DNA خالص (۱۲ میکروتیوب) برداشت و با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ (محتوی ۵ میکرولیتر اتیدیوم بروماید) ران شد و با مارکر شماره‌ی ۳ شرکت سیناژن مقایسه گردید. همچنین، باندهای DNA کلنی های اشعه دیده با نمونه های شاهد جهت بررسی پدیده‌ی آپوپتوزیز مقایسه شدند (۲، ۸).

یافته ها

میان باندهای تشکیل شده از مولکول های DNA نمونه های اشعه دیده و شاهد از سه قارچ درماتوفیت Epidermophyton floccosum، Microsporum canis و Trichophyton mentagrophytes که بر روی ژل آگارز ۱٪ ران شده بودند هیچ گونه تفاوتی دیدن نشد و در هیچ یک از باندهای مزبور حالت نردبانی شدن DNA که بیانگر ایجاد پدیده‌ی آپوپتوزیز می باشد مشاهده نگردید (تصاویر ۱، ۲ و ۳). همانطور که بیان شد، باندهای تشکیل شده با یکدیگر شباهت کامل داشته و هیچ تفاوتی میان آنها دیده نشد. این مراحل سه بار تکرار شد و وزن مولکول های DNA در باندهای تشکیل شده با باند مولکول DNA سایز مارکر شماره-ی ۳ شرکت سیناژن مقایسه گردید. وزن آنها حدود ۲۳۰۰۰ جفت باز ارزیابی شد.



تصویر ۱:

۴ باند سمت راست مربوط به مولکول های DNA جداشده از کلنی های اشعه دیده و شاهد از قارچ درماتوفیت Epidermophyton floccosum بوده و باند سمت چپ مربوط به سایز مارکر می باشد که بر روی ژل آگارز ۱٪ ران شده است.

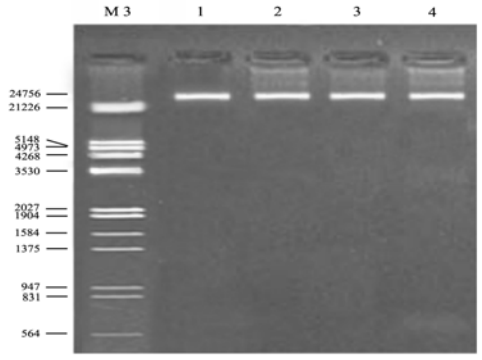
باند M3: مارکر شماره‌ی ۳ شرکت سیناژن. محدوده‌ی باندها حدود ۲۳۰۰۰ جفت باز می باشد.

باند ۱: مولکول های DNA جداشده از کلنی های شاهد

باند ۲: مولکول های DNA جداشده از کلنی های ۱۰ دقیقه اشعه دیده است که پس از پرتودهی، به مدت ۱ ساعت در محفظه تاریک و در دمای اتاق (۲۲ درجه‌ی سانتیگراد) قرار داده شدند.

باند ۳: مولکول های DNA جداشده از کلنی های ۱۰ دقیقه اشعه دیده است که پس از پرتودهی، به مدت ۲۴ ساعت در محفظه تاریک و در دمای اتاق (۲۲ درجه-ی سانتیگراد) قرار داده شدند.

باند ۴: مولکول های DNA جداشده از کلنی های ۱۰ دقیقه اشعه دیده است که پس از پرتودهی، به مدت ۷۲ ساعت در محفظه تاریک و در دمای اتاق (۲۲ درجه-ی سانتیگراد) قرار داده شدند.



تصویر ۲:

۴ باند سمت راست مربوط به مولکول های DNA جداشده از کلنی های اشعه دیده و شاهد از قارچ درماتوفیت Microsporum canis بوده و باند سمت چپ مربوط به سایز مارکر می باشد که بر روی ژل آگارز ۱٪ ران شده است.

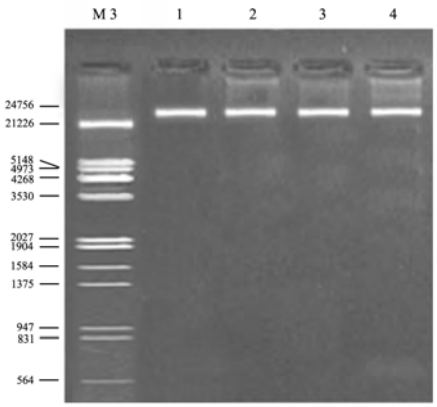
باند M3: مارکر شماره‌ی ۳ شرکت سیناژن. محدوده‌ی باندها حدود ۲۳۰۰۰ جفت باز می باشد.

باند ۱: مولکول های DNA جداشده از کلنی های شاهد

باند ۲: مولکول های DNA جداشده از کلنی های ۱۰ دقیقه اشعه دیده است که پس از پرتودهی، به مدت ۱ ساعت در محفظه تاریک و در دمای اتاق (۲۲ درجه‌ی سانتیگراد) قرار داده شدند.

باند ۳: مولکول های DNA جداشده از کلنی های ۱۰ دقیقه اشعه دیده است که پس از پرتودهی، به مدت ۲۴ ساعت در محفظه تاریک و در دمای اتاق (۲۲ درجه‌ی سانتیگراد) قرار داده شدند.

باند ۴: مولکول های DNA جداشده از کلنی های ۱۰ دقیقه اشعه دیده است که پس از پرتودهی، به مدت ۷۲ ساعت در محفظه تاریک و در دمای اتاق (۲۲ درجه‌ی سانتیگراد) قرار داده شدند.



تصویر ۳:

۴ باند سمت راست مربوط به مولکول های DNA جداشده از کلنی های اشعه دیده و شاهد از قارچ درماتوفیت Trichophyton mentagrophytes بوده و باند سمت چپ مربوط به سایز مارکر می باشد که بر روی ژل آگارز ۱٪ ران شده است.

باند M3: مارکر شماره‌ی ۳ شرکت سیناژن. محدوده‌ی باندها حدود ۲۳۰۰۰ جفت باز می باشد.

باند ۱: مولکول های DNA جداشده از کلنی های شاهد

باند ۲: مولکول های DNA جداشده از کلنی های ۱۰ دقیقه اشعه دیده است که پس از پرتودهی، به مدت ۱ ساعت در محفظه تاریک و در دمای اتاق (۲۲ درجه‌ی سانتیگراد) قرار داده شدند.

باند ۳: مولکول های DNA جداشده از کلنی های ۱۰ دقیقه اشعه دیده است که پس از پرتودهی، به مدت ۲۴ ساعت در محفظه تاریک و در دمای اتاق (۲۲ درجه‌ی سانتیگراد) قرار داده شدند.

باند ۴: مولکول های DNA جداشده از کلنی های ۱۰ دقیقه اشعه دیده است که پس از پرتودهی، به مدت ۷۲ ساعت در محفظه تاریک و در دمای اتاق (۲۲ درجه‌ی سانتیگراد) قرار داده شدند.

بحث

آپوپتوزیز همان مرگ سلولی است که به صورت منظم و برنامه ریزی شده و به عبارت دیگر، طی فرآیندی سازمان یافته اتفاق می افتد؛ و نتیجه‌ی آن خرد شدن ژنوم سلولی است (۳-۱).

اشعه‌ی UV یک عامل فیزیکی جهش زای مهم است که معمولا در آزمایشگاه ها جهت بررسی اثرات آن بر روی سلول های پروکاریوتی و یوکاریوتی مورد استفاده قرار می گیرد. اثر مخرب اشعه‌ی UVB (۳۲۰-۲۹۰ نانومتر) کاملا به اثبات رسیده و حتی به پوست انسان نیز صدمه می زند. به علاوه، اشعه‌ی UV مانع از رشد و تقسیم سلولی در سلول های پروکاریوتی و یوکاریوتی می گردد. نتایج حاصل از پژوهش ها نشان می دهد که اشعه‌ی UVB باعث تخریب DNA، RNA و ساخت پروتیین شده و در تقسیم سلولی از ورود به مرحله‌ی میتوز جلوگیری به عمل می آورد (۱، ۲، ۹، ۱۵، ۱۶).

سه قارچ درماتوفیت Epidermophyton floccosum ، Microsporum canis و Trichophyton mentagrophytes از گونه های مهم و بیماری زا در انسان بوده (۱۳-۱۱) و همین موضوع سبب شد تا در این مطالعه به بررسی پدیده‌ی آپوپتوزیز در سه قارچ مزبور پرداخته شود. در گذشته نیز، پدیده‌ی آپوپتوزیز در قارچ درماتوفیت Trichophyton rubrum توسط نویسندگان مقاله‌ی حاضر به انجام رسیده است (۲).

در این مطالعه -همانطور که پیش از این گفته شد- برای اشعه دهی نمونه های قارچی از اشعه UV با طول موج ۳۰۲ نانومتر استفاده گردید و فاصله‌ی منبع تابش اشعه از کلنی قارچ ها ۸ سانتیمتر انتخاب شد. برای جلوگیری از فعالیت احتمالی سیستم ترمیمی فتوراکتیواسیون، کلنی قارچ های اشعه دیده در محفظه‌ی تاریک نگهداری شدند (۱، ۲).

بایستی توجه داشت که تاثیر اشعه‌ی UV بر روی قارچ ها ها متفاوت بوده و به گونه‌ی قارچی و پروتکل اشعه دهی بستگی کامل دارد. اثر اشعه‌ی UV بر روی قارچ ها و از جمله درماتوفیت ها می تواند به اشکال مختلف نمایان شود؛ در این میان می توان به مواردی چون متوقف کننده‌ی رشد قارچ، قارچ کش و جهش زا اشاره نمود. (۲، ۹، ۱۴).

در اغلب موارد، سلول ها از طریق سیستم ترمیمی حذفی قادر به اصلاح تخریب های ایجاد شده در DNA ژنوم خود که ناشی از تابش اشعه‌ی UV است، می باشند. این مکانیزم در بیشتر موجودات زنده وجود داشته و به صورت مستقل از نور عمل می نماید (۱، ۹، ۱۵).

قارچ های درماتوفیت و از جمله Epidermophyton floccosum، Microsporum canis و Trichophyton mentagrophytes نسبت به اکسیژن گرایش مثبت داشته و در مقابل، نسبت به اشعه‌ی UVB از خود گرایش منفی نشان می دهند. از این رو، قارچ های درماتوفیت قادر به مقاومت در برابر مقادیر بالای تخریب کننده‌ی اشعه‌ی UVB در شرایط آزمایشگاهی می باشند (۲، ۹، ۱۴).

با توجه به موارد ذکر شده، بر اساس پروتکل اشعه دهی مربوطه نتنها هیچ گونه تفاوتی در میان باندهای تشکیل شده توسط مولکول های DNA نمونه های اشعه دیده و شاهد مشاهده نگردید بلکه هیچ حالتی از نردبانی شدن باندهای مولکول های DNA نیز دیده نشد. از این رو، چنین به نظر می رسد که گرایش منفی سه قارچ درماتوفیت Epidermophyton floccosum، Microsporum canis و Trichophyton mentagrophytes در برابر اشعه‌ی UVB مانع از ایجاد پدیده‌ی آپوپتوزیز در آنها می شود که برای روشن شدن این مسئله، نیاز به تحقیقات بیشتری می باشد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده، می توان چنین استنباط کرد که با استفاده از پروتکل اشعه دهی در این مطالعه نمی توان پدیده‌ی آپوپتوزیز را در سه قارچ درماتوفیت Epidermophyton floccosum، Microsporum canis و Trichophyton mentagrophytes مشاهده نمود. به نظر می رسد که علت آن، گرایش منفی قارچ های مزبور نسبت به اشعه‌ی UVB باشد.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس که بودجه‌ی مالی این پروژه‌ی تحقیقاتی را تامین نموده است، سپاسگزاری می گردد.

REFERENCES

۱. بهزادی پیام، بهزادی الهام. میکروب شناسی محیطی. چاپ نخست، تهران: انتشارات نیکتاب، بهار ۱۳۸۶

2. Behzadi P, Behzadi E. Detection of Apoptosis Feature in Ultraviolet Light-Exposed Trichophyton rubrum. Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences, 2006; 26(6): 607-610.

3. Kerr JF. History of the events leading to the formulation of the Apoptosis concept. Toxicology 2002; 181-182:471-4.

4. Aragane Y, Kulms D, Metze D, Wilkes G, Pöppelmann B, Luger TA, Schwarz T.Ultraviolet Light Induces Apoptosis via Direct Activation of CD95 (Fas/APO-1) Independently of Its Ligand CD95L. J Cell Biol. 1998 January 12; 140(1): 171–182.

5. Cohen JJ. Apoptosis. Immunol Today. 1993;14:126–130

6. Henderson B, Wilson M, McNab R, Lax AJ. Cellular Microbiology. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons, 1999.

7. Singleton P, Sainsburry D. Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, John Wiley and Sons, 3rd edition, 2002.

8. Studzinski GP, Hames BD, Rickwood D. Cell growth and Apoptosis, a practical approach. 1st ed. New York: Oxford university press; 1995; 121.

۹. بهزادی پیام، رضایی ساسان، خرمی زاده محمدرضا، بهزادی الهام، امامی مسعود. بررسی تاثیرات اشعه‌ی UVB بر روی قارچ های درماتوفیت. مجله‌ی علوم دانشگاه تهران، زمستان ۱۳۸۲، ۲۹ (۲ الف): ۳۲۷-۳۴۲

10.Gniadecki R, Thorn T, Vicanova J, Petersen A, Wulf HC. Role of mitochondria in ultraviolet-induce oxidative stress. J Cell Biochem 2000; 80(2): 216-22.

۱۱. بهزادی پیام، بهزادی الهام. قارچ شناسی پزشکی و روش های تشخیص آزمایشگاهی درماتوفیت های بیماری زا. چاپ نخست، تهران: انتشارات کمال دانش، دی ماه ۱۳۸۱

12. Rippon JW. Medical Mycology. W.B. Saunders Company, 3rd ed. 1988.

13. Richardson M, Elewski B. Superficial fungal infections. 1st ed. Oxford: Health Press; 2000; 7-12.

14. Brasch J, Menz A. UV susceptibility and negative phototropism of dermatophytes. Mycoses 1995; 38 (5-6): 197-203.

15. Häder DP, Tevini M. General photobiology, 1st ed. Oxford: Pergamon Press; 1987; 293-302.

16. Bånrud H, Stokke T, Moan J, Berg K. S phase arrest and induction of multinucleated cells after exposure to ultraviolet radiation. Carcinogenesis 1995; 16(5): 1087-94.