

УДК 612.115.12

**НАРУШЕНИЯ В СИСТЕМЕ ГЕМОСТАЗА
ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СЕРОВОДОРОДСОДЕРЖАЩЕГО ГАЗА
И ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ КОРРЕКЦИИ**

Николай Николаевич Тризно, доктор медицинских наук, профессор, Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России, Российская Федерация, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121, triznon@mail.ru

Давид Львович Теплый, доктор биологических наук, профессор, Астраханский государственный университет, Российская Федерация, 414000, г. Астрахань, пл. Шаумяна, 1

Екатерина Валерьевна Голубкина, ассистент, Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России, Российская Федерация, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121, neuron-2010@mail.ru

Матвей Николаевич Тризно, кандидат медицинских наук, доцент, Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России, Российская Федерация, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121, pakotmnt@gmail.com

Оксана Сергеевна Дюкарева, аспирант, Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России, Российская Федерация, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121, oksana.dyukareva2011@yandex.ru

Проведено исследование с целью установления специфики реагирования системы гемостаза и фибринолиза в результате воздействия сероводородсодержащего газа в хроническом эксперименте и изучения возможности коррекции возникших изменений с помощью ацетилсалициловой кислоты (АСК). Объектами эксперимента явились белые крысы самцы, помещаемые в затравочные камеры с контролируемым составом сероводородсодержащей газовой смеси (H₂S) на 4 часа в день в течение четырёх месяцев. Для коррекции полученных изменений в одной из опытных групп была применена ацетилсалициловая кислота. В результате работы выявлен дисбаланс гемостазиологического профиля прокоагулянтной направленности. Установлено влияние АСК на совокупность параметров гемостаза и фибринолиза, снижающее гиперкоагуляционную напряжённость системы.

Ключевые слова: тромбоциты, эндотелий, плазма крови, гемостаз, тромбин, фибринолиз, сероводородсодержащий газ, крысы, ацетилсалициловая кислота

**EFFECTS OF HYDROGEN SULFIDE GAS ON HEMOSTASIS
AND POSSIBLE WAYS OF CORRECTION**

Trizno Nikolay N., D.Sc. (Medicine), Professor, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, 121 Bakinskaya Str., Astrakhan, 414000, Russian Federation, triznon@mail.ru

Tepliy David L., D.Sc. (Biology), Professor, Astrakhan State University, 1 Shaumyana Str., Astrakhan, 414000, Russian Federation

Golubkina Ekaterina V., Assistant, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, 121 Bakinskaya Str., Astrakhan, 414000, Russian Federation, neuron-2010@mail.ru

Trizno Matvey N., Ph.D. (Medicine), Associate Professor, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, 121 Bakinskaya Str., Astrakhan, 414000, Russian Federation, pakotmnt@gmail.com

Dyukareva O. S., postgraduate student, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, 121 Bakinskaya Str., Astrakhan, 414000, Russian Federation, oksana.dyukareva2011@yandex.ru

Main aim of this research was to find out specificity of response of the hemostatic system and fibrinolysis as a result of inhalation of hydrogen sulfide gas (H₂S) during the chronic intoxication and explore the possibility of correcting changes with acetylsalicylic acid. White male rats were used as a intoxication model by placing in a chamber with controlled concentration of hydrogen sulfide gas mixture for 4 hours each day for four months. Acetylsalicylic acid has been used for correction of changes in one of the test groups. As a result we revealed imbalance of hemostatic profile to procoagulant state. The effect of acetylsalicylic acid on the set of parameters of hemostasis and fibrinolysis, hypercoagulable slightly reduce this changes.

Keywords: thrombocytes, endothelium, blood plasma, hemostasis, thrombin, fibrinolysis, hydrogen sulfide gas, rats, acetylsalicylic acid

Адекватность функционирования сердечно-сосудистой системы напрямую зависит от балансирующего состояния многокомпонентных систем гемостаза и фибринолиза [2; 4; 7]. Увеличивается количество работ по всему миру, касающихся изучения механизма воздействия экзогенных токсикантов на гомеостаз в целом и кардиоваскулярную систему в частности [3; 6; 10; 16–18]. Широкий диапазон разнонаправленных результатов действия сероводорода на систему крови, существующий в современной литературе, послужил основанием к данному исследованию влияния в долгосрочной перспективе на организм сероводородсодержащего газа [11; 12; 14; 15] с коррекцией изменений [5; 14].

Целью работы явилось установление механизма ответных реакций параметров систем гемостаза и фибринолиза на хроническое воздействие сероводорода и определение возможностей корректировки выявленных изменений.

Материалы и методы исследований

Работа выполнена на крысах-самцах (32 особи) из НИИ по изучению лепры (Астрахань), массой 230 ± 21 г, возрастом 180 ± 6 суток с соблюдением регламентов по содержанию лабораторных животных [9]. Крысы были разделены на три группы: контрольную (10 особей), опытную № 1 (11 особей), опытную № 2 (11 особей). В ходе эксперимента животные всех групп помещались в затравочные камеры на 4 ч, пять дней в неделю в течение четырёх месяцев. На момент пребывания опытных групп в камерах поддерживалась концентрация 150 мг/м^3 по сероводороду в газовой-воздушной смеси. Контрольные группы животных выдерживались в условиях камер с обычным составом воздуха. На протяжении 14 последних дней эксперимента крысам второй опытной группы вводилась АСК внутризондовым способом интрагастрально во взвеси 1%-й крахмальной слизи. Кровь для исследования забиралась сразу после истечения четырёх месяцев затравки у наркотизированного животного тиопенталом натрия (40 мг/кг) из нижней полой вены в объёме $4,5\text{--}5,0$ мл. Полученная кровь помещалась в стерильную одноразовую лабораторную посуду со стабилизатором (оксалат аммония 1 : 9).

Оценивались параметры систем гемостаза и фибринолиза с помощью диагностических наборов фирмы «Технология-Стандарт» (Россия), а также спектрофотометра ПЭ-5400 (на длине волны 405 нм) и камеры Горяева (для подсчёта тромбоцитов) [1].

Представлены данные в виде $M \pm s$, где M – среднее в выборке; s – стандартное отклонение. Достоверность различий оценивали с помощью таблиц для нормальных распределений. Различия принимались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Статистический анализ полученных результатов осуществляли на персональном компьютере при помощи утилиты “OpenOffice Calc” (“OpenOffice, ver. 3.0”) под управлением “Windows 10”.

Результаты исследований и их обсуждение

Как видно из данных, представленных в таблице, после четырёх месяцев воздействия газа число тромбоцитов уменьшилось на $20,8\%$ ($p < 0,05$). Агрегационная способность пластинок крови в данной группе возросла, исходя из сократившегося

показателя индуцированной агрегации (ИАТ) на 17,8 % ($p < 0,05$) и увеличенной степени агрегации тромбоцитов (САТ) на 16 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Со стороны плазменного гемостаза отмечались гиперкоагуляция по внешнему пути, учитывая что протромбиновое время (ПВ) сократилось на 11 % ($p < 0,05$), а также по пути контактной активации, на что указывает уменьшение показателей активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) на 17,8 % ($p < 0,05$), каолинового времени (КВ) – на 6,9 % ($p < 0,05$) по отношению к контрольной группе. На конечном этапе свёртывания наблюдалась гиперкоагуляция. Так, тромбиновое время (ТВ) сократилось на 6,03 % ($p < 0,05$), эхитоксовое время (ЭВ) ускорилось на 8,3 % ($p < 0,05$) (табл.).

Таблица 1

**Изменение параметров гемостаза и фибринолиза
при хроническом воздействии сероводородсодержащего газа
в концентрации 150 мг/м³ и при последующем применении АСК, М ± s**

Показатели гемостаза	Контроль (n = 10)	Опыт № 1 (n = 11)	Опыт № 2 (n = 11)
PLT x10 ⁹ /L	760 ± 21,52	602 ± 16,96 p1 < 0,05	659 ± 15,42 P2 < 0,05
ИАТ, сек	18,0 ± 0,45	14,8 ± 0,34 p1 < 0,05	19,6 ± 0,40 P2 < 0,05
САТ, %	100,0 ± 2,69	116,0 ± 3,32 p1 < 0,05	89,0 ± 2,50 P2 < 0,05
КВ, сек	72,1 ± 1,48	67,1 ± 1,59 p1 < 0,05	71,3 ± 2,07 P2 < 0,05
АЧТВ, сек	24,2 ± 0,64	19,9 ± 0,58 p1 < 0,05	25,7 ± 0,55 P2 < 0,005
ПВ, сек	13,6 ± 0,36	12,1 ± 0,34 p1 < 0,05	13,3 ± 0,29 P2 < 0,05
ТВ, сек	23,2 ± 0,66	21,8 ± 0,48 p1 < 0,05	22,6 ± 0,46 P2 < 0,05
ЭВ, сек	24,1 ± 0,58	22,1 ± 0,56 p1 < 0,05	25,4 ± 0,71 P2 < 0,05
РС, ЕдНО	0,7 ± 0,01	0,64 ± 0,01 p1 < 0,05	0,72 ± 0,02 P2 < 0,05
РФМК, мг/100мл	3,3 ± 0,11	4,1 ± 0,12 p1 < 0,05	3,6 ± 0,10 P2 < 0,05
D-димер, особи	abs	9 (81,8 %)	9 (81,8 %)
XIIa- ЗЭЛ, мин	7,6 ± 0,22	8,3 ± 0,18 p1 < 0,05	7,1 ± 0,21 P2 < 0,05
ИТАП-1, Ед/мл	2,7 ± 0,07	4,1 ± 0,09	3,9 ± 0,10 P2 > 0,05

Примечание. М – среднее в выборке; s – стандартное отклонение; p1 – достоверность в сравнении с группой контроля ($p < 0,05$); p2 – достоверность в сравнении с опытной группой № 1 ($p < 0,05$).

Угнетение активности компонента противосвёртывающей системы, протеина С, регистрировалось на 8,6 % ($p < 0,05$) к окончанию затравочного периода.

Отмечалось увеличение промежуточных продуктов на этапах формирования фибрина: растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК) на 24,2 % ($p < 0,05$), а также поздних продуктов активации фибринолиза, D-димеров, исходя из роста числа крыс с превышенным порогом (500 нг/мл) показателя у девяти (81,8 %) особей в опытной группе № 1.

Регистрировалось замедление XIIa-зависимого эуглобулинового лизиса (XIIa-ЗЭЛ) на 9,2 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. К окончанию экспериментально-

го периода увеличилась активность ингибитора тканевого активатора плазминогена – 1 (ИТАП-1) на 51,9 % ($p < 0,01$) у животных в данной группе (табл.).

После применения АСК в опытной группе № 2 возросло количество тромбоцитов на 9,5 % ($p < 0,05$). Увеличилось время ИАТ на 32 % ($p < 0,05$), уменьшилась степень агрегации тромбоцитов на 23,3 % ($p < 0,05$), что говорит о понижении функциональной активности указанных клеток (табл., рис.).

Отмечалось гипокоагулянтное воздействие на плазменные факторы системы гемостаза. Так, на компонентах внутреннего пути активации свёртывания сдвиг дисбаланса отразился на увеличенных параметрах АЧТВ (на 29 %, при $p < 0,005$) и КВ (на 6,3 %, при $p < 0,05$).

На пути тканевого фактора понижение гиперкоагуляционного тонуса проявилось в пролонгировании показателя ПВ (на 10 % при $p < 0,05$).

На конечных этапах фибринообразования изменения проявились в увеличении ТВ (на 3,6 % при $p < 0,05$) и ЭВ (на 15 % при $p < 0,05$; табл., рис.).

Результатом действия АСК явилось повышение активности протеина С на 12,5 % ($p < 0,05$). Количество РФМК уменьшилось на 12,5 % ($p < 0,05$). Количество крыс с превышающим пороговое значение D-димера в 500 нг/мл осталось неизменным.

После применения АСК во второй опытной группе понизилась активность ИАП-1 на 4,9 % ($p < 0,05$), параметр XIIa-зависимого эуглобулинового лизиса возрос на 15 % ($p < 0,05$), что говорит об увеличении активности плазминогена. Подавление работы последнего может происходить под воздействием выброса его активаторов [13], понижением функциональной активности фибриногена (табл., рис.).

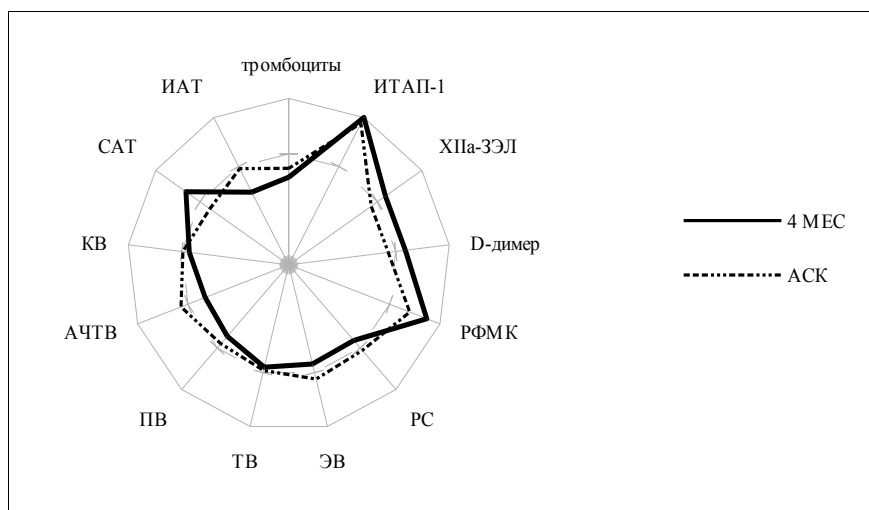


Рис. 1. Параметры системы гемостаза крыс после применения АСК в группе, находившейся 4 месяца в условиях воздействия сероводородсодержащего газа

Таким образом, на основании вышеописанного, можно заключить, что 4 месяца хронического воздействия сероводородсодержащего газа в концентрации 150 мг/м³ способствует в результате дестабилизации мембран эндотелиальных клеток [8] запуску пути тканевого фактора. В отсутствии явных признаков тромбообразования наблюдается повышение предтромботической напряжённости параметров гемостазиологических параметров в виде гиперагрегации и тромбинемии. Стимуляция тромбоцитов является результатом как непосредственного воздействия газа на каскад арахидоновой кислоты, так опосредованно через тромбинемии. В сформированных условиях эксперимента определено гипокоагулянтное значение АСК, реализуемое вследствие стабилизации клеточного звена. Присущая кислоте гипоагрегация за счёт блокады циклооксигеназы-1 (ЦОГ-1) здесь лимитирует запущенную сероводородом активацию фосфолипазы А2 [14], устраняя тем самым один из рычагов акти-

вации плазменных компонентов системы гемостаза в венозном русле. Распространяющееся следствие гипотромбинемии опосредованно активизирует систему фибринолиза.

Список литературы

1. **Баркаган З. С.** Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза / З. С. Баркаган, А. П. Момот. – Москва : Ньюдиамед-АО, 2008. – 292 с.
2. **Киричук В. Ф.** Реологические свойства крови и их нарушения у больных ишемической болезнью сердца. Обзор литературы / В. Ф. Киричук, Н. В. Мамонтова // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2007. – № 1. – С. 16–24.
3. **Мажитова, М. В.** Исследование влияния серосодержащих поллютантов на свободнорадикальные процессы в мозжечке белых крыс / М. В. Мажитова // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 10. – С. 422–427.
4. **Николаев В.Ю.** Система гемостаза у крыс при различных режимах однократной гипертермической нагрузки / В. Ю. Николаев, И. И. Шахматов, В. И. Киселев, В. М. Вдовин // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 4 (54). – С. 6.
5. **Плотников М.Б.** Влияние комплекса ацетилсалициловой кислоты и диквертина на агрегацию тромбоцитов и гемореологические параметры у крыс с ишемией головного мозга / М. Б. Плотников, А. В. Ямкин, О. И. Алиев, Н. А. Тюкавкина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2005. – Т. 68, № 2. – С. 33–35.
6. **Тризно Н. Н.** Серосодержащие газы, их действие на организм и пути дезинтоксикации в эксперименте / Н. Н. Тризно, Ф. Р. Асфандияров, И. А. Беднов, А. К. Аюпова. – Астрахань : Астраханская гос. мед. акад., 2005. – 116 с
7. **Шахматов И. И.** Состояние системы гемостаза при различных видах гипоксического воздействия / И. И. Шахматов, В. М. Вдовин, В. И. Киселев // Бюллетень СО РАМН. – 2010. – Т. 30, № 2. – С. 131–137.
8. **Шишкина Т. А.** Особенности реакции микроциркуляторного русла лёгких на действие неблагоприятных факторов среды / Т. А. Шишкина, Л. И. Наумова, И. Ю. Чекунова // Морфологические ведомости. – 2009. – Т. 1, № 1–2. – С. 156–158.
9. **Штефель В. О.** О сроках воздействия при моделировании интоксикаций в токсиколого-гигиенических исследованиях // Гигиена и санитария. – 1996. – № 8. – С. 70–72.
10. **Эсаулова Т. А.** Молекулы средней массы как показатель интоксикации у работников Астраханского газового комплекса и критерий эффективности проводимых лечебно-оздоровительных мероприятий / Т. А. Эсаулова // Вестник новых медицинских технологий. – 2009. – Т. 16, № 1. – С. 50–51.
11. **Zhao W.** The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener / W. Zhao, J. Zhang, Y. Lu and R. Wang // EMBO J 20. – 2001. – P. 6008–6016.
12. **Kimura H.** Hydrogen sulfide: Its production, release and functions. / H. Kimura // Amino Acids. – 2011. – Vol. 41 (1). – P. 113–121.
13. **Patrono C.** European Society of Cardiology. Expert consensus document on the use of antiplatelet agents. / Patrono C, Bachmann F, Baigent C et al. // The task force on the use of antiplatelet agents in patients with atherosclerotic cardiovascular disease of the European Society of Cardiology. Eur. Heart J. – 2004. – Vol. 25 (2). – P. 166–181.
14. **R. d'Emmanuele di Villa Bianca.** Hydrogen sulphide pathway contributes to the enhanced human platelet aggregation in hyperhomocysteinemia / R. d'Emmanuele di Villa Bianca, E. Mitidieri, M. N. Minno et al. // PNAS. – 2013. – Vol. 110, № 39. – P. 15812–15817.
15. **Reiffenstein R. J.** Toxicology of hydrogen sulfide / R. J. Reiffenstein, W. C. Hulbert, S. H. Roth // Annual Review of Pharmacology and Toxicology. – 1992. – Vol. 32. – P. 109–134.
16. **Wang R.** Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed // Physiological Reviews. – 2012. – Vol. 92, № 2. – P. 791–896.
17. **Webb G. D.** Contractile and vasorelaxant effects of hydrogen sulfide and its biosynthesis in the human internal mammary artery / G. D. Webb, L. H Lim, V. M. Oh, S. B. Yeo et al. // J Pharmacol Exp Ther. – 2008. – Vol. 324. – P. 876–882.
18. **Whiteman M.** Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide / M. Whiteman, L. Li, I. Kostetski, S. H. Chu et al. // Biochem Biophys Res Commun. – 2006. – Vol. 343. – P. 303–310.

References

1. Barkagan Z. S., Momot A. P. *Diagnostika i kontroliruemaya terapiya narusheniy gemostaza* [Diagnosis and therapy controlled hemostasis disorders]. Moscow, Nyudiamed Publ., 2008, 292 p.

2. Kirichuk V. F., Mamontova N. V. Reologicheskie svoystva krovi i ih narusheniya u bol'nyh ishemicheskoy bolezn'ju serdca. Obzor literatury [The rheological properties of blood and disorders in patients with coronary heart disease. Literature review]. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal* [Saratov Journal of Medical Scientific Research], 2007, no. 1, pp. 16–24.
3. Mazhitova M. V. Issledovanie vliyaniya serosoderzhashchikh pollyutantov na svobodnoradikalnye protsessy v mozzhechke belykh kryss [Investigation of the effect of sulfur pollutants in the free-radical processes in the cerebellum white rats]. *Fundamentalnye issledovaniya* [Fundamental investigations], 2011, no. 10, pp. 422–427.
4. Nikolaev V. Yu., Shahmatov I. I., Kiselev V. I., Vdovin V. M. Sistema gemostaza u kryss pri razlichnykh rezhimakh odnokratnoy gipertermicheskoy nagruzki [Hemostatic system in rats with different modes single hyperthermic stress]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* [Modern problems of science and education], 2014, no. 4 (54), pp. 6–11.
5. Plotnikov M. B., Jamkin A. V., Aliev O. I., Tjukavkina N. A. Vliyanie kompleksa atsetilsalicilovoy kisloty i dikvertina na agregatsiyu trombotsitov i gemoreologicheskie parametry u kryss s ishemiey golovnogo mozga [Influence of a complex of acetylsalicylic acid and diquertin on platelet aggregation and hemorheological parameters in rats with cerebral ischemia]. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya* [Experimental and Clinical Pharmacology], 2005, no. 2 (68), pp. 33–35.
6. Trizno N. N., Asfandiyarov F. R., Bednov. I. A., Ayupova A. K. Serosoderzhashhie gazy, ikh deystvie na organizm i puti dezintoksikatsii v eksperimente [The sulfur-containing gases, their effect on the body and in the path of detoxification experiment]. Astrakhan, Astrakhan State Medical Academy Publ., 2005, 116 p.
7. Shakhmatov, I. I., Vdovin V. M., Kiselev V. I. Sostoyanie sistemy gemostaza pri razlichnykh vidakh gipoksicheskogo vozdeystviya [System Status hemostasis at various kinds of hypoxia]. *Bulleten SO RAMN* [Bulletin SB RAMS], 2010, no. 2 (30), pp. 131–137.
8. Shishkina T. A., Naumova L. I., Chekunova I. Yu. Osobennosti reaktsii mikrotsirkulyatornogo rusla lyogkikh na deystvie neblagopriyatnykh faktorov sredy [Features reaction microvasculature light on the action of unfavorable factors]. *Morfologicheskie vedomosti* [Morphological statements], 2009, no. 1–2 (1), pp. 156–158.
9. Shtefel V. O. O srokakh vozdeystviya pri modelirovani intoksikatsii v toksikologo-gigienicheskikh issledovaniyakh [On the timing of exposure in modeling intoxication in toxicological and hygienic studies]. *Gigiena i sanitariya* [Hygiene and sanitation], 1996, no. 8, pp. 70–72.
10. Yesaulova T. A. Molekuly sredney massy kak pokazatel intoksikoza u rabotnikov Astrahanskogo gazovogo kompleksa i kriteriy effektivnosti provodimykh lechebno-ozdorovitelnykh meropriyatiy [The molecules of average weight as an indicator of intoxication at workers of the Astrakhan gas complex and the criterion of the effectiveness of therapeutic interventions]. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy* [Bulletin of New Medical Technologies], 2009, no. 16, pp. 50–51.
11. Zhao W., Zhang J., Lu Y., Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *EMBO J*, 2001, no. 20, pp. 6008–6016.
12. Kimura H. Hydrogen sulfide: Its production, release and functions. *Amino Acids*, 2011, no. 41 (1), pp. 113–121.
13. Patrono C., Bachmann F., Baigent C. et al. European Society of Cardiology. Expert consensus document on the use of antiplatelet agents. The task force on the use of antiplatelet agents in patients with atherosclerotic cardiovascular disease of the European Society of Cardiology. *Eur. Heart J.*, 2004. Vol. 25 (2). pp. 166–181.
14. R. d'Emmanuele di Villa Bianca, Mitidieri E., Minno M. N. et al. Hydrogen sulphide pathway contributes to the enhanced human platelet aggregation in hyperhomocysteinemia. *PNAS*, 2013, vol. 110, no. 39. pp. 15812–15817.
15. Reiffenstein R. J., Hulbert W. C., Roth S. H. Toxicology of hydrogen sulfide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 1992, vol. 32, pp. 109–134.
16. Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiological Reviews*, 2012, vol. 92, no. 2. pp. 791–896.
17. Webb G. D., Lim L. H., Oh V. M., Yeo S. B. et al. Contractile and vasorelaxant effects of hydrogen sulfide and its biosynthesis in the human internal mammary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2008, vol. 324, pp. 876–882.
18. Whiteman M., Li L., Kostetski I., Chu S. H. et al. Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, vol. 343, pp. 303–310.