

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

DOI: 10.24411/1815-3917-2019-10018

Окислительный метаболизм селенита натрия в изолированных эритроцитах человека *in vitro***С.Я.Гусейнова**

Институт биофизики Национальной академии наук, г.Баку, Азербайджан

Резюме: Рассмотрено влияние селенита натрия на развитие перекисного окисления липидов (ПОЛ), накопление метгемоглобина (MetHb), селена, состояние восстановленного глутатиона (GSH) и активность глутатионпероксидазы (ГП) в изолированных эритроцитах в инкубационной среде содержащей различные конечные концентрации Na_2SeO_3 . Выяснено, что низкие (1 мкМ, 5 мкМ) концентрации Na_2SeO_3 мало влияют на статус GSH, а при высоких (50 мкМ и 100 мкМ) концентрациях, GSH заметно истощается, при этом ГП, имеющая GSH в качестве основного субстрата окисления также существенно снижается. Характерно, что высокие конечные концентрации Na_2SeO_3 приводят к усилению окислительных процессов как в гемоглобине, так и в эритроцитах. И наоборот, низкие концентрации Na_2SeO_3 приводят к уменьшению накопления продуктов реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) и MetHb.

Высказано предположение о том, что стимуляция высокими концентрациями Na_2SeO_3 окислительных процессов связано с ингибированием ключевого антиокислительного фермента ГП, что обусловлено образованием селенсульфидных групп в гемоглобине, приводящее к потере внутренних ресурсов GSH и как следствие к потере ГП активности.

Ключевые слова: селен, эритроциты, гемоглобин, глутатион, глутатионпероксидаза.

Для цитирования: Гусейнова С.Я. Окислительный метаболизм селенита натрия в изолированных эритроцитах человека *in vitro*. Биомедицина (Баку). 2019;17(3):18-23. DOI: 10.24411/1815-3917-2019-10018

Поступила в редакцию: 08.05.2019. Принята в печать: 15.08.2019.

Oxidative metabolism of sodium selenite in isolated human red blood cells *in vitro***Huseynova S.Y.**

Institute of Biophysics of National Academy of Sciences, Baku, Azerbaijan

Abstract: The influence of sodium selenite on the development of lipid peroxidation (LPO), the accumulation of methemoglobin (MetHb), selenium, the state of reduced glutathione (GSH) and the activity of glutathione peroxidase (GP) in isolated red blood cells in an incubation medium containing various final concentrations of Na_2SeO_3 are considered. It was found that low (1 μM , 5 μM) concentrations of Na_2SeO_3 have little effect on the status of GSH, and at high (50 μM and 100 μM) concentrations, GSH is noticeably depleted, while GP having GSH as the main oxidation substrate also decreases significantly. It is characteristic that high final concentrations of Na_2SeO_3 lead to an increase in oxidative processes both in hemoglobin and in erythrocytes. Conversely, low concentrations of Na_2SeO_3 lead to a decrease in the accumulation of thiobarbituric acid (TBA)-active products and MetHb. It has been suggested that stimulation of oxidative processes by high concentrations of Na_2SeO_3 is associated with inhibition of the key antioxidant enzyme GP, which is due to the formation of selenium sulfide groups in hemoglobin, which leads to a loss of internal GSH resources and, as a result, to a loss of GP activity.

Key words: selenium, erythrocytes, hemoglobin, glutathione, glutathione peroxidase.

For citation: Huseynova S.Y. Oxidative metabolism of sodium selenite in isolated human red blood cells *in vitro*. Biomedicine (Baku). 2019;17(3):18-23. DOI: 10.24411/1815-3917-2019-10018

Received: 03.05.2019. Accepted: 15.08.2019.

Для корреспонденции:**С.Я.Гусейнова**

Научный сотрудник, лаборатория экологической биофизики, Институт биофизики НАН Азербайджана, Баку, Азербайджан.
E-mail: seva.gy7@mail.ru

Corresponding author:**Huseynova S.Y.**

Researcher, Ecological Biophysics Laboratory, Institute of Biophysics of National Academy of Sciences, Baku, Azerbaijan
E-mail: seva.gy7@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ. Селен является эссенциальным элементом, обладающим важными биологическими свойствами, в том числе и многочисленными регуляторными. На сегодня в организме человека идентифицированы 25 селен содержащих белков, синтез которых осуществляется посредством специфического механизма Sesis, включающие в себя 21-ю аминокислоту, кодирующуюся стоп-кодоном (UGA). Причем селен входит в селенбелки через селен-цистеинильную тРНК, которая в свою очередь синтезируется посредством перехода селенольной группы из селенфосфата в серил-тРНК, тогда как в случае избытка селена, он выводится из организма путем метилирования. На этот счет имеется многочисленные обзоры и монографии [1-4].

Снижение активности селенсодержащих антиокислительных энзимов сопряжено с развитием патологий сердечно-сосудистой системы [4], заболеваний мозга [5], рака [6], развитием гемолитических анемий различного генеза [7-9] и т.д. Организм получает диетарный селен в форме неорганических и органических соединений (селенметионин, селенцистеин). Принято считать, что в основном, присутствующий в плазме селенпротеин SeP выполняет транспортную функцию по переносу селена в места синтеза других белков [5,6]. В то же время относительно недавно выяснилось, что и в отсутствие SeP селен из селенистой кислоты может распределяться по органам и тканям, образуя различные активные соединения пока еще по неизвестному механизму [10]. Кроме того, из-за широкого использования биологически активных добавок, содержащих селенит натрия, вопрос влияния неорганического селена на эритроциты предопределяет интерес для профилактической медицины и токсикологии. Однако при всех важных полезных свойствах селена, принимающего активное участие при регуляции многих жизненных процессов следует иметь ввиду его высокую токсичность, проявляющуюся при избыточном поступлении в организм. Это связано с очень узким диапазоном между его полезными и токсичными свойствами т.е. отравлением организма так называемым состоянием селеноза: выпадение волос и ногтей, нарушение работы многих органов и тканей [1,2,3].

В 70-е годы прошлого столетия было установлено, что селен из селенита натрия быстро поглощается эритроцитами и претерпевает сложный метаболический путь по восстановлению из (+IV) валентного состояния до (+II) валентного (т.е. до H_2S) [11]. Многочисленными опытами было также установлено, что селен при обогащении селенитом эритроцитов в опытах *in vitro* и *in vivo* активно

включается в гемоглибиновую фракцию [11-15]. Было также показано, что Se включается в эритроциты и оказывает определенный антиокислительный эффект, влияя на окислительную резистентность гемоглобина и эритроцитов [16,17]. В норме селен активно включается в SH-группы гемоглобина в β -цепи в положении β -цистеин 93, (причем, 95-98% включаемого в гемоглобин селена локализуется именно в β -цепи Hb) и выходит из эритроцитов в форме селенсодержащих альбуминов через анионообменник AE1, перемещаясь в печень, где в основном происходит синтез селенбелков de novo, после чего селен в виде селенбелков поступает в различные ткани и органы, в том числе и в эритроциты [10,18-20].

Избыток связывания селена в гемоглобине (β -цепи) конкурирует с обратимым связыванием с CO_2 и аминокислотной группой гемоглобина, тем самым увеличивает образование свободного CO_2 [15] и способствует образованию пероксинитрита, который является главной активной формой кислорода (АФК) в эритроцитах [21], что в конечном счете приводит к активации окисления белков и липидов эритроцитов. Таким образом, селенит в избыточных количествах может активировать окислительную модификацию эритроцитов.

В этой связи целью работы явилось изучение влияния концентрации селенита натрия в инкубационной среде, содержащей эритроциты человека, на окислительные процессы в них и окислительного состояния самого гемоглобина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В экспериментах были использованы: селенит натрия (Na_2SeO_3), 2,3-диаминонафталин (Acros 15959), глутатион восстановленный ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$) (AppliChem), 5,5-Dithio-bis (-2-nitrobenzoesaure) (Ellmans Reagents) crystallized ($C_{14}H_{8}N_2O_8S_2-MG$ 396,4) (Germany), тиобарбитуровая кислота (ТБК) (AppliChem), хлорная кислота ($HClO_4$) (ЛенРеактив), оксиметил аминометан (TRIS) (Везтон.Ру), азотная кислота (HNO_3), этилендиаминтетраоуксусная кислота (ЕДТА), соляная кислота (HCl), гексан, азид натрия (NaN_3) (Biochem (Франция), трихлоруксусная кислота (ТХУ), калий-гексацианид-феррат $K_3[Fe(CN)_6]$, NaCN. Все реактивы химически чистые.

В модельных опытах основным объектом исследования являлись эритроциты и плазма человека. Была использована кровь доноров, взятая из локтевой вены в пробирки с гепарином. Центрифугированием (850 g в течение 15 мин) проводились отделение плазмы крови от эритроцитов. Для получения суспензии эритроцитов осадок эритроцитов трижды отмывался в десятикратном объеме физиологического раствора (NaCl 0,9 %), центрифугировался при 850 g в течение 15 мин с последующим удалением надосадочной жидкости. Гемолиз эритроцитов достигался путем разбавления эритроцитарной массы дистиллированной водой в со-

отношении 1:9 с последующим замораживанием, оттаиванием и центрифугированием при 10000 G.

Накопление MetHb оценивали по полуэмпирическим формулам, предложенным Szebenі J. [22]. Активность глутатионпероксидазы (ГП) в лизатах эритроцитов определяли по методу Моина В.М. [23]. Уровень ПОЛ эритроцитов оценивали по накоплению окрашенных продуктов малонового диальдегида (МДА), реагирующих в цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [24]. Определение селена в биологическом материале проводилось флуориметрическим методом с применением 2,3-диаминонафталина [25]. Все измерения проводили на спектрофотометре СФ-46 (Россия) и флуориметре ФАС (СССР). Статистическая обработка данных проводилась с применением критерия Стюдента (при уровне значимости $p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Были проведены опыты по накоплению и распределению селена в изолированных эритроцитах после их инкубирования (гематокрит 20%, 37°C, 0,05 М изотонический НФБ + 0,14 мМ глюкозы) в среде, содержащей Na_2SeO_3 с различными конечными содержаниями в течении 2-ух часов.

Из рисунка 1 видно, что селен уже в первые 10-15 минут максимально накапливается в эритроцитах и чем выше конечная концентрация селенита натрия, тем медленнее идет накопление, т.е. максимум накопления достигается позднее и селен выходит из эритроцитов в более длительные сроки. Относительный выход тем выше, чем ниже количество внесенного в инкубационную среду Na_2SeO_3 . Инкубирование суспензии эритроцитов с Na_2SeO_3 после 3-ех кратного промывания НФБ-буфером при условиях, приведенных в рис. 1, также показано, что очень малая часть селена выходит за пределы мембран эритроцитов.

Рассмотрение распределения экзогенного селена по фракциям цитозоля и мембранного остатка показало что, соотношение селена в цельном цитозоле (полный гемолиз достигается дистиллированной водой в течении 10 минут при соотношении 0,5мл паста эритроцитов: 5мл вода, 1:10) и в центрифужном остатке (15000g*30 минут, трехкратное промывание изотоническим НФБ) составляет 95% : 5%, т.е. лишь малая часть селена локализуется в мембранном пространстве (1-5%) в зависимости от конечной концентрации. При низких (1 мкМ и 5 мкМ) и умеренных (10 мкМ) конечных концентрациях для мембраносвязанного селена эти показатели выше, чем при высоких концентрациях (50, 100 мкМ). Эти данные свидетельствуют о том, что быстро включаемый селен фактически остается в эритроцитах, в основном, в цитозольной фракции и плохо выводится из эритроцитов в буферное пространство, частично "застревая" в мембранах. По имеющимся многочисленным све-

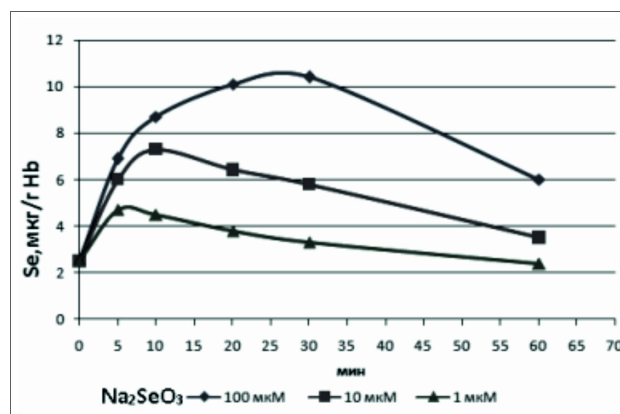


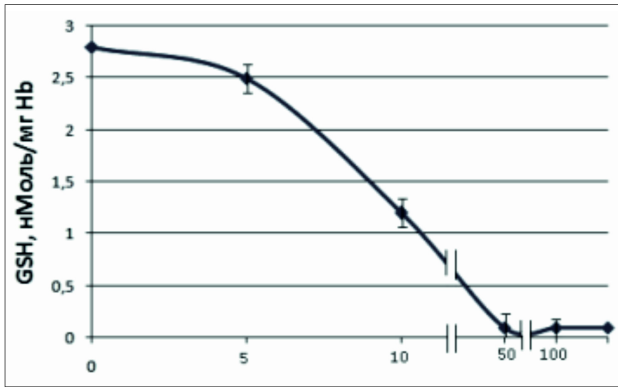
Рис. 1. Кинетика содержания селена в эритроцитах, инкубированных в среде, содержащей Na_2SeO_3 с конечной концентрацией 1 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ (период инкубирования 60 мин).

дениям литературы селенит проходит сложный химический метаболизм, в ходе которого селен из селенита накапливается в гемоглобиновой фракции и может выходить лишь при наличии альбуминов плазмы, что именно эти белки обеспечивают выход и последующий обратный транспорт их через анионообменник AE1 [10,19,20]. К 2000-ым годам специальными опытами было также установлено, что селен из селенита непосредственно не реагирует с гемоглобином, а реагирует посредством тиоловых групп, в том числе через GSH, образует селенотрисульфид (селендиглутатион) соединение, взаимодействующее с гемоглобином [19].

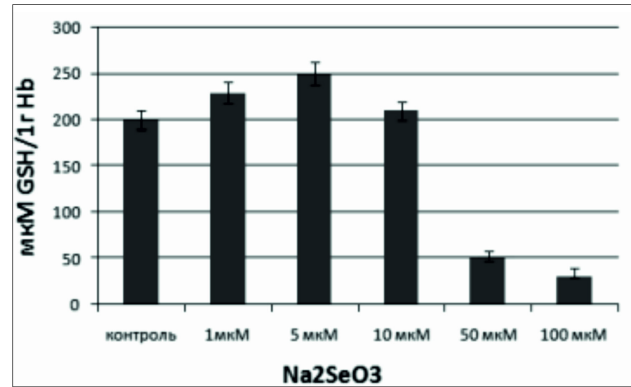
Существуют веские доказательства того, что в основе метаболизма селенита в эритроцитах лежит взаимодействие его с восстановленным глутатионом (GSH). Подобна реакция описана еще в 1941-ом году Painter E.P. [26]. В дальнейшем эти представления были успешно развиты во многих работах .E. Gatner (1968), M. Sandhocz (1973), T.A. Gasiewicz (1978), K.T. Susuki (1998) [19] и др.

В настоящей работе были изучено состояние статуса GSH в зависимости от конечной концентрации селенита натрия в инкубационной среде. Были выбраны малые (1 мкМ, 5 мкМ), умеренные (10 мкМ) и высокие (50 мкМ и 100 мкМ) концентрации Na_2SeO_3 .

Из рис. 2(а) видно, что (время инкубирования 30 минут) при высоких концентрациях Na_2SeO_3 практически полностью истощается GSH, при умеренной концентрации имеет место точка перегиба в изменении количества GSH в сторону уменьшения, тогда как низкие дозы селенита мало влияют на статус GSH. При этом активность ГП (рис. 3(б)) при малых конечных концентрациях селенита несколько поднимается, а при умеренных



а) Изменение содержания GSH в зависимости от концентрации Na_2SeO_3



б) Изменение активности ГП в эритроцитах при различных концентрациях Na_2SeO_3

Рис. 2. Изменения, происходящие в инкубационной среде (37°C , РФБ 0,005 М, pH 7,4) в течение 30 мин.

ее уровень мало отличается от контрольного. При высоких же дозах вследствие резкого уменьшения основного субстрата окисления GSH активность ГП заметно снижается вплоть до критических близких к нулю. По видимому, это и есть определенное отражение окислительной токсичности селенита натрия взятого в повышенных концентрациях.

Далее были проведены эксперименты по рассмотрению концентрационного влияния селенита на развитие ПОЛ и гемолиза, накопление MetHb в суспензиях эритроцитов при их обработке селенитом при тех же условиях, что и в предыдущих экспериментах.

Из рис. 3(а) видно, что накопление ТБК-активных продуктов имеет фазовый характер: при низких концентрациях имеет место уменьшение, при умеренных (10 мкМ) концентрациях наблюдается тенденция к уменьшению, а при высоких происходит стимуляция ПОЛ. В то же время изменение

концентрации селена в инкубационной среде не оказывает видимого влияния на гемолиз эритроцитов.

Аналогичная картина рис. 3(б) присутствует и при рассмотрении влияния концентрации Na_2SeO_3 на окислительную модификацию гемоглобина (накопление MetHb) из которой видно, что только высокие концентрации Na_2SeO_3 вызывают стимуляцию метгемоглобинообразования в то время, как низкие и умеренные не влияют на этот процесс.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Исходя из полученных результатов можно сделать некоторые умозаключения: 1. Внесенный в инкубационную среду селенит натрия в зависимости от конечной концентрации может оказывать как антиокислительное, так и проокислительное действие на эритроциты и окислительный статус гемоглобина. 2. Существует определенная отрицательная коррелятивная связь между активностью ГП и ПОЛ изолированных эритроцитов в условиях ограниченных внутриклеточных

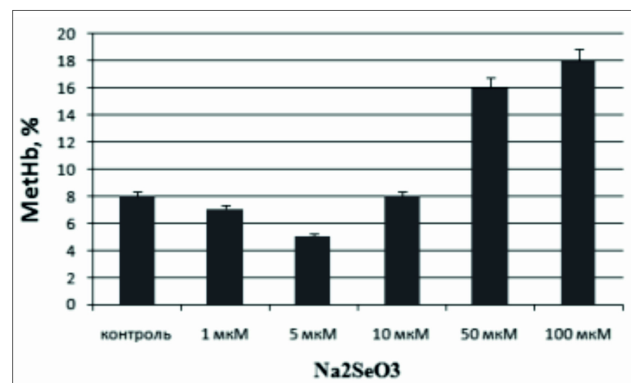
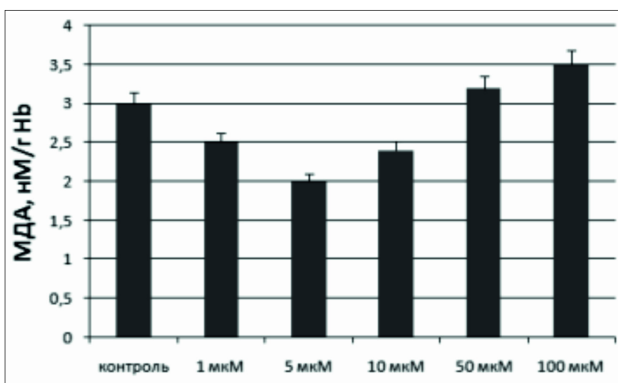


Рис. 3. Накопление продуктов ПОЛ (МДА) и MetHb, в эритроцитах, инкубированных (37°C , РФБ 0,005 М, pH 7,4) в среде, содержащей различные концентрации Na_2SeO_3 .

точных ресурсов ГП, что свидетельствует о ее важности в регулировании окислительных процессов. 3. По убыли внутриэритроцитарного восстановленного глутатиона, вызванного образованием селеноглутатиона, включенного в Hb возможна оценка токсичности селенита натрия для эритроцитов, что позволяет оценить концентрационный диапазон лимитирующего действия селенита натрия в эритроцитах на развитие окислительных процессов как в норме, так и при возможном индуцированном окислительном действии других прооксидантов.

Особый интерес представляет собой случай, когда оксид азота (NO) образуемый из нитритов в эритроцитах, выполняющий роль в зависимости от конечной концентрации как антиоксиданта, так и прооксиданта (Hogg), связывается с гемоглобином

в геме (нитрозогемоглобин) или включается в β -цепь Hb в положении β -цистеин 93(нитрозилгемоглобин) т.е. фактически в один и тот же сайт совместно с селеном. Ранее было установлено (Belstein, Whanger, 1983) 13, что в эритроцитах человека существует физиологически нормальное соотношение Se:Hb~1:225, а по данным Гусейнова Т.М. и др. (2012) [16] оно может составлять Se:Hb~1:300. В норме же включение NO в гемоглобин составляет NO: Hb~1:1000 [27], а в β -цепи цистеина-93 еще меньше (на 40%). Таким образом, число вакансий в β -цепи для Se в норме значительно выше, чем число вакансий для NO, что возможно может отразиться на функциональных свойствах Hb по отношению к NO, и в конечном счете на нитритном воздействии на эритроциты.

Литература / References

- Hatfield D.L., Schweizer U., Tsuji P.A. et al. Selenium. Its Molecular Biology and Role in Human Health. Springer Science+Business Media. 2016;628 p.
- Schrauzer G. N.. Selenium: Present Status And Perspectives In Biology And Medicine. Published by Humana Press Inc., United States. 2012;316 p.
- Reilly C.. Selenium in Food and Health. Second Edition, Springer. 2006;206 p.
- Schomburg L. Dietary Selenium and Human Health. *Nutrients*. 2017;9(1):22. DOI: 10.3390/nu9010022.
- Yoshida S., Hori E., Ura S., et al. Comprehensive Analysis of Selenium-Binding Proteins in the Brain Using Its Reactive Metabolite. 2016;64(1):52-58. DOI: 10.1248/cpb.c15-00689.
- Elhodaky M, Diamond A.M. Selenium-Binding Protein 1 in Human Health and Disease. Published online. 2018;19(11):34-37. DOI: 10.3390/ijms19113437.
- Hamdy M.M, Mosallam D.S, Jamal A.M. et al. Selenium and Vitamin E as antioxidants in chronic hemolytic anemia: Are they deficient? A case-control study in a group of Egyptian children. 2015. 6(6):1071-1077. DOI: 10.1016/j.jare.2015.01.002
- Liao C, Carlson B.A, Paulson R.F, Prabhu K.S. The intricate role of selenium and selenoproteins in erythropoiesis. *Free. Radic. Biol. Med.* 2018;127:165-171. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.
- Delesderrier E, Cople-Rodrigues C.S, Omena J. et al. Selenium Status and Hemolysis in Sickle Cell Disease Patients. 2019;11(9):2211. DOI: 10.3390/nu11092211.
- Hongoh M., Haratake M., Fachigame N. et al. A thiol-mediated active membrane transport of selenium by erythroid anion exchanger 1 protein. 2012;41(24):7340-7349. DOI: 10.1039/c2dt30707c.
- Sopyani M., Foller M., Gulbins., et al. Suicidal Death of Erythrocytes Due to Selenium Compounds. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2008;22:387-394. DOI:10.1159/000185452.
- Jekins K.J, Hidiroglou M. Binding of Se75 blood and liver cytozolic protein in the prerumenant calf. *J. Dairy Sci.* 1988;71(2):442-51. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(88)79574-0.
- Beilstein M.A, Whanger P.D. Distribution of selenium and glutathione peroxidase in blood fraction from humans, rhesus and a querel monkeys, rats and sheep. *J. Nutr.* 1983;113(11):2138-2146. DOI: 10.1093/jn/113.11.2138.
- Whanger P.D. Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. *J Am Coll Nutr.* 2002;21(3):223-232. DOI: 10.1080/07315724.2002.10719214.
- Mas A., Jiang J, Sarkar B. Selenium metabolism in rat and human blood. *Biological trace element research*; 1988;15(1):97-110. Doi:10.1007/BF02990129.
- Гусейнов Т. М., Яхьяева Ф.Р., Гулиева Р. Т. Влияние селена на устойчивость гемоглобина к фотоокислительным процессам. *Украинский биохимический журнал*. 2012;84(2):53-60.
Gusejnov T. M., Jahjaeva F.R., Gulieva R. T. Vlijanie selena na ustojchivost' gemoglobina k fotookislitel'nym processam. *Ukrainskij biohimicheskij zhurnal*; 2012;84(2):53-60. (In Russian).
- Гусейнов Т.М., Дадашов М.З., Гулиева Р.Т., Гусейнова С.Я., Джафаров А.И., Яхьяева Ф.Р. Действие умеренных доз нитрита натрия на окислительные процессы в эритроцитах. Участие в них селена. Тезисы докладов Международной научной конференции, посвященной 90-летию Национальной академии наук Беларуси и 45-летию Института биофизики и клеточной инженерии. Беларусь, Минск; 2018;150 с.
Gusejnov T.M., Dadashov M.Z., Gulieva R.T., i dr. Dejstvie umerennyh doz nitrита natrija na okislitelnyie processy v jer-

- itrocytah. Uzastie v nih selena. Tezisy dokladov Mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii, posvjashhennoj 90-letiju Nacionalnoj akademii nauk Belarusi i 45-letiju Instituta biofiziki i kletочноj inzhenerii, Belarus, Minsk; 2018;150 s. (In Russian).
18. Zappulla D. Environmental stress, erythrocyte dysfunctions, inflammation, and the metabolic syndrome: adaptations to CO₂ increases? *CardiometabSyndr.* 2008;30(1):30-34. DOI: 10.1111/j.1559-4572.2008.07263.x.
19. Suzuki K.T, Shiobara Y., Itoh M. et al. Selective uptake of selenite by red blood cells. *Analyst.* 1998;123(1):63-67. DOI:10.1039/a706230c
20. Haratake M., Fujimoto K., Masahiro Ono. et al. Selenium binding to human hemoglobin via selenotrissulfide. *Biochimica et BiophysicaActa.* 2005;1723(1-3):215-220. DOI: 10.1016/j.bbagen.2005.02.002.
21. Minetti M., Pietraforte D., Straface E. et al. Red blood cells as a model to differentiate between direct and indirect oxidation pathway of peroxynitrite. *Methods Enzymol.* 2008;440:253-272. DOI: 10.1016/S0076-6879(07)00816-6.
22. Szebeni J., Winterbourn C. C., Carrell R. W. Oxidative interactions between haemoglobin and membrane lipid. Aliposomemodel. *Biochem. J.* 1984;220(3):685-692. DOI: 10.1042/bj2200685
23. Моин В.М. Простой и специфический определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. Лабораторное дело. 1986;(12):724-727.
Moin V. M. Simple and specific method for determining the activity of glutathione peroxidase in erythrocytes. *Lab. Delo;* 1986, (12): 724-727. (In Russian).
24. Mengel C.F., Kann H. E. Effect of in vivo hyperoxid of erythrocytes, III in vivo peroxidation of erythrocytes lipid. *J. Nutr. Chemical Invest.* 1966;45(7):1150-1158. DOI: 10.1172/JCI105421.
25. Назаренко И.И., Кислова И.В., Гусейнов Т.М., Кислова А.М. Флуориметрическое определение селена 2,3-диаминонафталином в биологических материалах. *Ж. Аналитической химии.* 1975;30(4):733-738.
Nazarenko I.I., Kislova I.V., Gusejnov T.M. et al. Fluorimetricheeskoe opredelenie selena 2,3-diaminonaftalinom v biologicheskikh materialah zh. *Analiticheskoy himii.* 1975;30(4):733-738. (In Russian).
26. Painter E. P. The Chemistry and Toxicity of Selenium Compounds, with Special Reference to the Selenium Problem. *Chem. Rev.* 1941;28(2):179-213. DOI: 10.1021/cr60090a001.
27. Pawloski J.R, Hess D.T, Stamler J.S. Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. *Nature.* 2000;409(6820):622-626. DOI:10.1038/35054560.