

Ультрафиолетовая люминесценция и светорассеяние систем фотодитазина с альгинатом натрия, поли-N-винилпирролидоном и триптофаном*

© Л.В. Беловолова¹, М.В. Глушков¹, Н.А. Аксенова², А.Б. Соловьева², О.В. Хасанова²

¹ Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН,
119991 Москва, Россия

² Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН,
119991 Москва, Россия

e-mail: est123321@mail.ru

Поступила в редакцию 28.12.2018 г.

В окончательной редакции 19.02.2019 г.

Принята к публикации 26.02.2019 г.

В рамках исследования полимерных систем на основе хлоринового фотосенсибилизатора фотодитазина (PD) для фотодинамической терапии изучены спектры флуоресценции и релеевского светорассеяния при возбуждении на длинах волн $\lambda_{ex} = 260, 280, 400$ и 450 nm. В качестве полимера использовали нетоксичный водорастворимый поли-N-винилпирролидон (PVP) и растительный полисахарид альгинат натрия (SA). Данные двойной системы PD-SA отличаются вариабельностью характеристик в зависимости от условий приготовления, в то время как в тройном комплексе PD-SA-PVP наблюдается благоприятное взаимное влияние двух полимеров SA и PVP на молекулу PD, обусловленное созданием локального микроокружения активного центра PD с повышенной полярностью. Показано, что введение триптофана (Trp), используемого в качестве субстрата в модельных процессах фотоокисления при тестировании эффективности фотосенсибилизаторов в генерации синглетного кислорода, существенно не меняет параметры флуоресценции комплекса PD-SA-PVP.

DOI: 10.21883/OS.2019.06.47773.54-19

Введение

В настоящее время фотодинамическая терапия (PDT) является эффективным методом лечения заболеваний опухолевой и неопухолевой природы. Несмотря на большое число исследований, посвященных детальному анализу отдельных стадий процесса на биохимическом и модельном уровнях, механизм PDT до конца не изучен. Как следует из литературных данных, существуют две основные теории, объясняющие механизм противоопухолевого действия PDT [1–5]. В реакциях первого типа молекула фотосенсибилизатора (PS), поглотив квант света, из основного состояния PS переходит сначала в возбужденное синглетное $^1PS^*$, затем в триплетное состояние $^3PS^*$ [5,6]. Происходит непосредственное взаимодействие $^3PS^*$ с молекулами окружения, в частности с водой (отрыв электрона или непосредственно атомов водорода), что ведет к образованию свободных радикалов, которые затем реагируют с молекулярным кислородом и дают сложную смесь высокоактивных продуктов. В реакциях второго типа происходит перенос энергии от $^3PS^*$ к молекулам кислорода и генерация синглетного ($^1O_2^*$) кислорода, являющегося активным окислителем.

* The 22nd Annual Conference Saratov Fall Meeting 2018 (SFM'18): VI International Symposium „Optics and Biophotonics“ and XXII International School for Junior Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophotonics, September 24–29, 2018, Saratov, Russia. <https://www.sgu.ru/structure/fiz/saratov-fall-meeting/previous-conferences/saratov-fall-meeting-2018>

Появление $^1O_2^*$ дает начало сложной системе взаимопревращений активных форм кислорода и воды (АФК), важнейшими из которых являются анион-радикал супероксида ($O_2^{\bullet-}$) и гидроксильный радикал (OH^\bullet), а также перекись водорода (H_2O_2) [7–9]. При взаимодействии $^1O_2^*$ с двойными связями органических молекул образуются органические пероксиды $ROOR^1$, способные накапливаться и затем разлагаться с образованием вторичных активных соединений. При использовании порфиринов в качестве PS первичным действующим агентом обычно является синглетный кислород [5,10,11].

Известно, что в результате возбуждения кислорода в биологических системах и водных средах могут возникать долгоживущие колебательные и релаксационные процессы, обусловленные накоплением и распадом H_2O_2 и органических пероксидов [6–9,12–14], в результате чего в системе появляются и исчезают различные виды АФК. На конечном этапе фотодинамического воздействия оба типа фотохимических реакций приводят к деструктивным процессам в жизненно важных структурах клеток и их гибели [14,15].

Гидрофобная природа большинства PS приводит к образованию их агрегатов в водной среде, которые не только ограничивают доставку PS к опухолевым клеткам, но также могут приводить к самотушению PS в возбужденном состоянии, что снижает образование $^1O_2^*$ [16]. Одним из путей решения таких проблем, может служить комплексообразование PS с нетоксичными

водорастворимыми полимерами, которое, как было показано в [16], может не только снижать агрегированность PS, но и приводить к увеличению фотокаталитической активности PS. Поскольку полимерные компоненты — PVP и SA, вводимые в систему с исходным раствором фотодитазина, могут сами вступать в реакции с $^1\text{O}_2^*$ и вовлекаться в иные процессы с участием АФК, одна из задач данной работы состоит в рассмотрении возможности участия АФК, генерируемых порфириносодержащими полимерными системами, в процессах фотосенсибилизированного окисления триптофана.

В модельных экспериментах, направленных на выбор оптимальных порфириносодержащих полимерных систем, активность PS (фотодитазина (PD)) в комплексах с полимерами PVP и SA [13] определялась по уменьшению поглощения в полосе Trp ($\lambda_{\text{obs}} = 280 \text{ nm}$) в результате его окисления синглетным кислородом при возбуждении PD при $\lambda_{\text{obs}} = 400 \text{ nm}$ (полоса Core) [17]. Присутствие Trp в изучаемой системе само по себе способно оказывать влияние на структуру, динамику и активность комплексов, поэтому изучены также возможные взаимодействия триптофана с PS и вводимыми полимерами.

Спектры флуоресценции и светорассеяния порфириносодержащих двух- (PD-SA, PD-PVP) и трехкомпонентных (PD-SA-PVP) полимерных композиций изучали при возбуждении на длинах волн $\lambda_{\text{ex}} \sim 260, 280, 400$ и 450 nm . Выбор этих длин волн возбуждения позволил сравнить особенности систем на длине волны проведения PDT (400 nm), в полосе поглощения Trp (280 nm) и в области поглощения $\text{O}_2^{\bullet -}$ (260 nm), а также вне полос существенного поглощения всех хромофоров (450 nm).

Экспериментальная часть

В работе использовали (рис. 1) PS N-метил-D-глюкаминавая соль хлорина е6 (фотодитазин, PD) (Бета-Гранд, Россия), амфифильный полимер — поли-N-винилпирролидон (PVP) ($M_w 40000$, Dr. Theodor Schuchardt, Германия), полисахарид — альгинат натрия (SA) ($M_w(80000-100000)$, Sigma Aldrich, США), триптофан (Trp) (Реахим, Россия).

Приготовление образцов

К водному раствору PD (5 M/l) добавляли водные растворы полимеров — PVP и SA, затем раствор субстрата — Trp ($100 \mu\text{M/l}$). Концентрация вводимых полимеров: PVP ($100 \mu\text{M/l}$) и SA ($10 \mu\text{M/l}$). Водный раствор перемешивали в течение трех минут, после чего регистрировали спектры флуоресценции и светорассеяния.

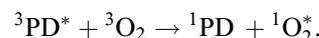
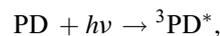
Запись спектров

Спектры флуоресценции и светорассеяния записывали с помощью модернизированного спектрально-измери-

тельного комплекса СДЛ-2 (ЛОМО, Россия) в режиме счета фотонов. В этой установке свет ксеноновой лампы мощностью 150 Вт пропускается через монохроматор МДР-12 и системой линз фокусируется в объеме кюветы (2 cm^3) на площадку $\sim 2 \text{ mm}^2$. Флуоресценцию и светорассеяние регистрировали под прямым углом к возбуждающему свету с использованием второго монохроматора МДР-23. Условия записи поддерживали постоянными. Запись спектров проводили при комнатной температуре без коррекции спектров на чувствительность аппаратуры. Относительная ошибка измерения интенсивности светорассеяния и флуоресценции не превышала 10% .

Результаты и обсуждение

При $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$ возбуждается порфириновая группировка PD, флуоресценция которой проявлена в области $650-670 \text{ nm}$ (рис. 2). Тушение триплетного состояния $^3\text{PD}^*$ растворенным кислородом приводит к образованию $^1\text{O}_2^*$, который является, по крайней мере, первичным агентом, обуславливающим биологическую активность исследуемых систем [5,10,11]:



При постоянной концентрации PD ($5 \mu\text{M/l}$) (в насыщенном воздухом водных средах содержание кислорода $\sim 0.2 \text{ mM/l}$) скорость образования синглетного кислорода пропорциональна содержанию возбужденных молекул PD^* и, следовательно, интенсивности флуоресценции, наблюдаемой в области $650-680 \text{ nm}$. Однако следует отметить, что измеряемые значения констант скоростей реакций исследуемых систем определяются не только содержанием $^1\text{O}_2^*$, но и параметрами микроокружения активного центра PS и эффективностью столкновения $^1\text{O}_2^*$ с реакционными группами молекулы Trp. При связывании PS и Trp с разными полимерами эти характеристики могут быть различными. На рис. 2, *a, b* представлены спектры флуоресценции комплексов в присутствии и в отсутствие Trp соответственно. Из рисунка можно видеть, что в присутствии Trp добавление SA существенно снижает интенсивность флуоресценции PD. Без Trp (рис. 2, *b*) влияние SA на спектр флуоресценции PD существенно меньше. Комплексообразование PD с PVP независимо от присутствия Trp приводит к сдвигу спектра флуоресценции в красную область. При этом в отсутствие Trp наблюдается появление плеча в области $640-650 \text{ nm}$, что указывает на появление дополнительного продукта или состояния PD. Поскольку в системах PD-PVP и PD-SA-PVP с Trp это плечо отсутствует, то можно заключить, что Trp связывает или устраняет этот продукт или состояние PD.

В системе с Trp высокая интенсивность флуоресценции PD с максимумом около 670 nm наблюдается

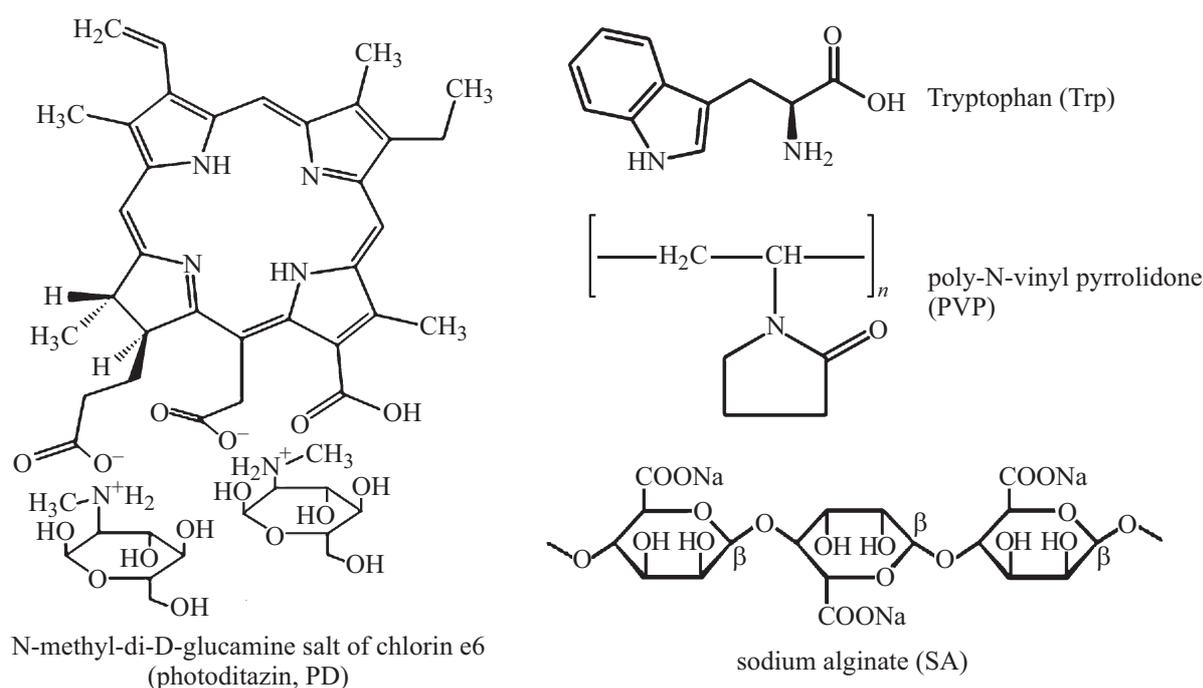


Рис. 1. Структурные формулы использованных соединений.

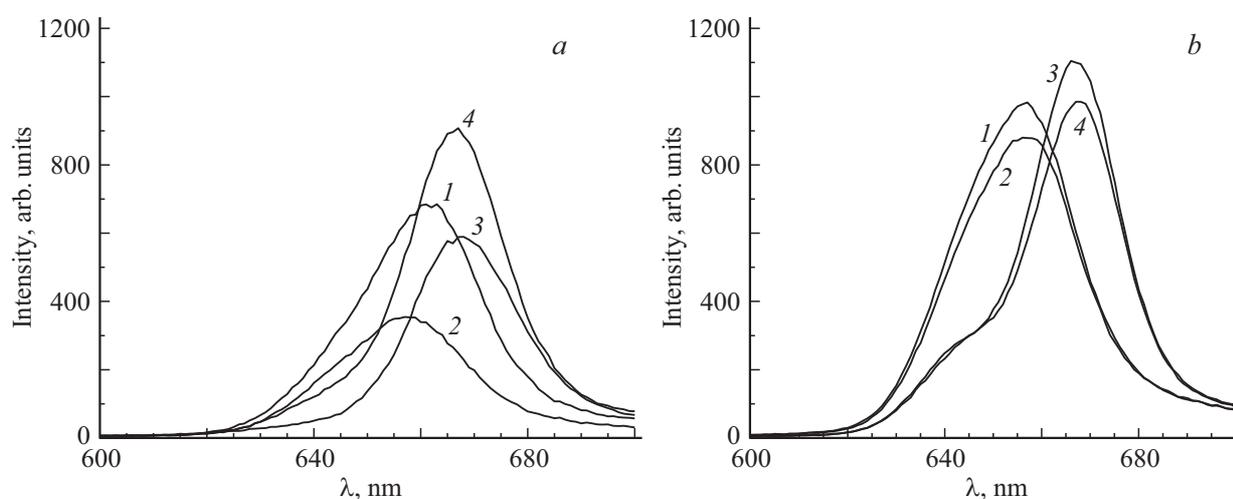


Рис. 2. Спектры флуоресценции при $\lambda_{ex} = 400$ nm: 1 — PD (5 μM/l), 2 — PD-SA (10 μM/l), 3 — PD-PVP (100 μM/l), 4 — PD-SA-PVP; в присутствии (a) и в отсутствие (b) Trp (100 μM/l).

для комплекса PD-SA-PVP, что указывает на наиболее высокую биологическую активность этого комплекса по сравнению с другими системами (PD, PD-PVP, PD-SA). Этот факт подтверждается результатами кинетических измерений. Обнаружено, что фотосенсибилизирующая активность PS, которую характеризует эффективная константа скорости окисления Trp, возрастает по сравнению с фотокаталитической активностью исходного раствора фотодитазина (при относительной ошибке в определении константы скорости 10%) в PD-PVP в 1.5 раза, в комплексе PD-SA в 1.1 раза, а в тройных системах PD-PVP-SA в 2 раза. Можно говорить о

взаимном влиянии PVP и SA на активность PD. Сдвиг максимума пика флуоресценции PD в тройной системе PD-PVP-SA в сторону длинных волн свидетельствует об увеличении полярности локального окружения хромофора PD по сравнению с исходным раствором PD и двойным комплексом PD-SA [18]. Таким образом, спектр флуоресценции тройного комплекса PD-SA-PVP (рис. 2) указывает на симбиотическое влияние SA и PVP на состояние хромофора. В тройном комплексе PD-SA-PVP присутствие Trp существенно влияет на флуоресценцию с максимумом ~ 670 nm не оказывает.

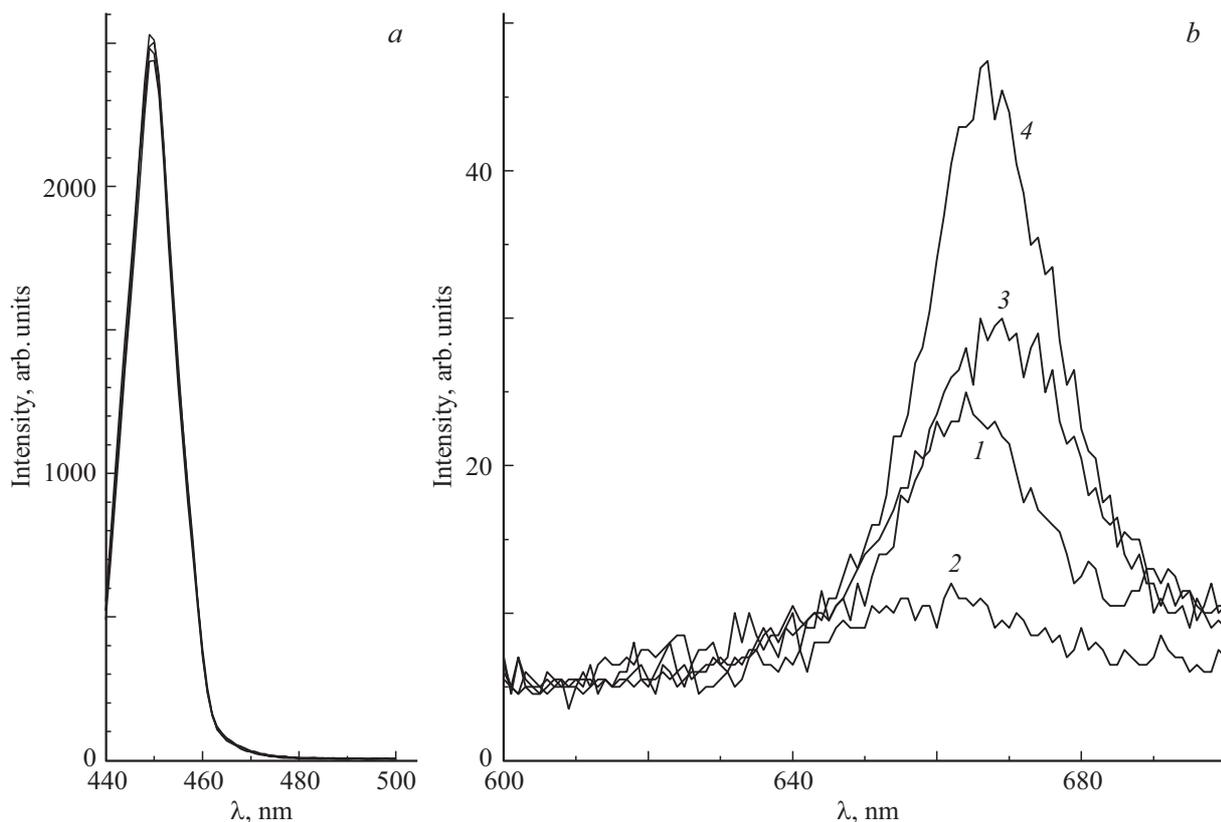


Рис. 3. Спектры светорассеяния (а) и флуоресценции (b) при $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$ в присутствии Трп ($100 \mu\text{M/l}$): 1 — PD ($5 \mu\text{M/l}$), 2 — PD-SA ($10 \mu\text{M/l}$), 3 — PD-PVP ($100 \mu\text{M/l}$), 4 — PD-SA-PVP.

Характер спектров флуоресценции PD в диапазоне длин волн $600\text{--}700 \text{ nm}$ в присутствии триптофана в исследуемых системах практически не зависит от длины волны возбуждения света в диапазоне $260\text{--}450 \text{ nm}$, хотя их интенсивность меняется существенно (рис. 2, а, 3, b, 5, с). Зависимость интенсивности спектров светорассеяния и флуоресценции, наблюдаемых под прямым углом к пучку возбуждающего света, от длины волны возбуждения позволяет судить о характере взаимодействия рассеивающих центров с возбуждающим светом. При $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$ все системы рассеивают одинаково (рис. 3), но при $\lambda_{\text{ex}} < 400 \text{ nm}$ интенсивность рассеяния систем с PVP значительно превышает интенсивность рассеяния других систем (рис. 4, 5, а).

Анализ спектров поглощения исследуемых систем показал, что введение полимера PVP в раствор PD существенно не изменяет оптическую плотность в областях возбуждения $260\text{--}280 \text{ nm}$ ($\Delta D \leq 0.05$), в то время как интенсивность рассеяния в разных системах различается существенно (рис. 4, 5). Из спектров светорассеяния (рис. 4, а) можно заключить, что при $\lambda_{\text{ex}} \sim 280 \text{ nm}$ PVP влияет на характер неоднородностей системы на масштабах, сравнимых с длиной волны возбуждения. По-видимому, эти особенности связаны с увеличением размеров комплексов PD-PVP и PD-SA-PVP по сравнению с PD и PD-SA. Однако интенсивность рассеяния двойной

системой PD-PVP в ~ 2 раза выше интенсивности рассеяния PD-SA-PVP (рис. 4, а). По-видимому, это связано с уплотнением структурной матрицы вокруг активного центра PD в тройных системах PD-SA-PVP.

Интенсивность Трп-флуоресценции максимальна в отсутствие полимеров (рис. 4, b), но существенно снижается в присутствии SA и PVP. Эти факты указывают на изменение состояния Трп в разных фотодитазинсодержащих полимерных системах. Об этом же свидетельствуют спектры Трп флуоресценции при $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$ (рис. 5).

Характер спектров флуоресценции систем Трп при $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$ (рис. 5) близок к показанному на рис. 4 для $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, за исключением высокой интенсивности флуоресценции и рассеяния системы PD-SA-PVP. Кроме того, при $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$ в тройной системе PD-SA-PVP четко выражен дополнительный пик флуоресценции с максимумом около 425 nm (рис. 5, с), отсутствующий в PD-SA. В PD и PD-PVP этот пик проявлен в виде ступеньки. Его яркое выражение в PD-SA-PVP свидетельствует об отличии тройной системы от других исследуемых систем. При $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$ спектры флуоресценции с максимумами в области $420\text{--}450 \text{ nm}$ имеют многие производные карбонильных соединений [19]. В частности, они наблюдаются в аптечной перекиси водорода и при перекисном окислении органических соединений [19,20].

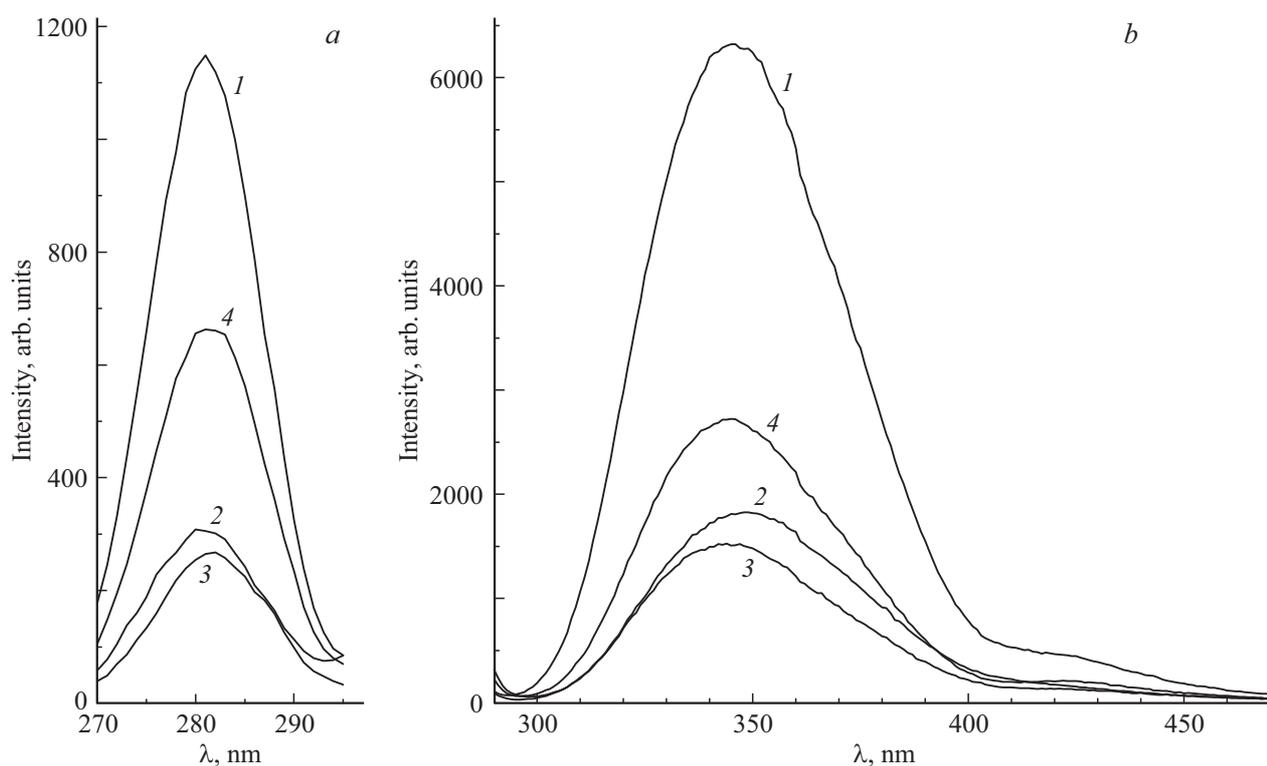


Рис. 4. Спектры светорассеяния (а) и Trp-флуоресценции (Trp — $100\ \mu\text{M/l}$) (b) систем при $\lambda_{\text{ex}} = 280\ \text{nm}$: 1 — PD ($5\ \mu\text{M/l}$), 2 — PD-SA ($10\ \mu\text{M/l}$), 3 — PVP ($100\ \mu\text{M/l}$), 4 — PD-SA-PVP.

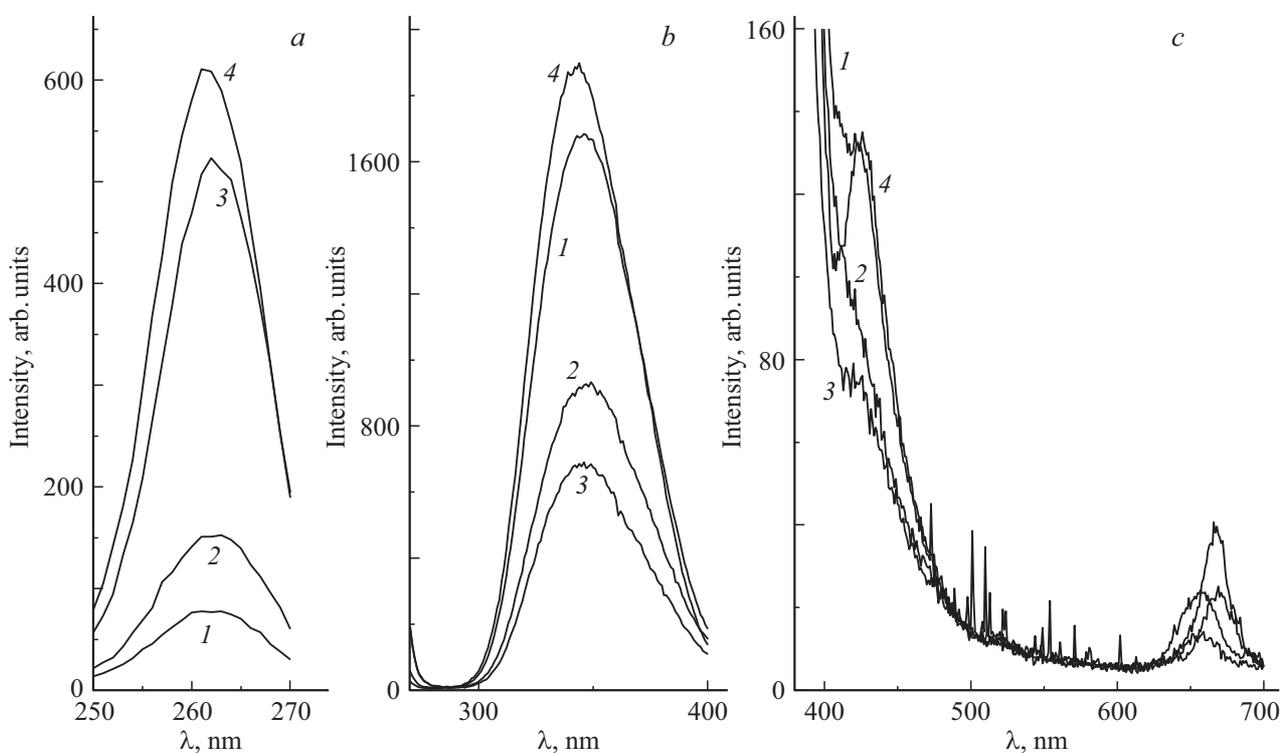


Рис. 5. Спектры светорассеяния (а), флуоресценции (b, c) систем с Trp ($100\ \mu\text{M/l}$) при $\lambda_{\text{ex}} = 260\ \text{nm}$: 1 — PD ($5\ \mu\text{M/l}$), 2 — PD-SA ($10\ \mu\text{M/l}$), 3 — PD-PVP ($100\ \mu\text{M/l}$), 4 — PD-SA-PVP.

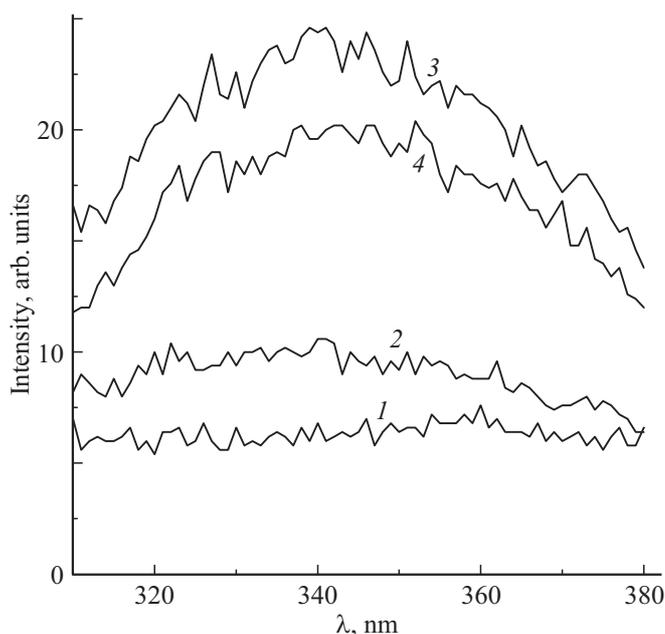


Рис. 6. Спектры флуоресценции при $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$ в отсутствие Тгр (в образце PD (1) сигнал мало отличается от нулевой линии): 1 — PD ($5 \mu\text{M/l}$), 2 — PD-SA ($10 \mu\text{M/l}$), 3 — PD-PVP ($100 \mu\text{M/l}$), 4 — PD-SA-PVP.

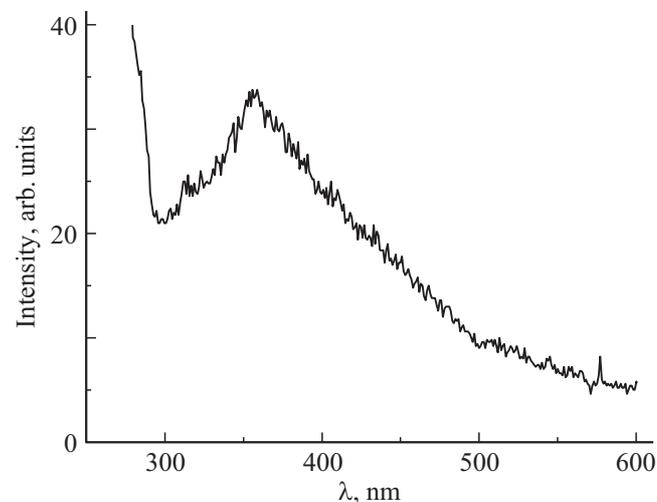


Рис. 7. Спектр флуоресценции PVP ($100 \mu\text{M/l}$) при $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$.

Спектры флуоресценции систем PD-PVP и PD-SA-PVP при $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$ в отсутствие Тгр (рис. 6) также указывают на возникновение АФК в реакционных смесях с PVP. Они проявляются в виде слабого широкого сигнала флуоресценции с максимумом в области 340–350 nm. Спектр флуоресценции PVP с максимумом около 350–360 nm (без коррекции на чувствительность установки, рис. 7) при $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$ свидетельствует о появлении $\text{O}_2^{\bullet-}$ и связанных с ним процессах в водном растворе PVP [20]. Поскольку такие сигналы проявля-

ются в системах, содержащих органические пероксиды, можно полагать, что процессы образования перекисных соединений имеют место и в используемых системах.

Следует отметить, что в настоящее время спектры АФК в водных средах исследованы слабо из-за высокой активности, низких концентраций и малого времени жизни этих частиц. [7–9, 19–21]. Концентрация наиболее стабильного и легко уловимого вида АФК — H_2O_2 в природных водах и клетках живых организмов в обычных условиях составляет $\sim 0.1 \mu\text{M/l}$ [21]. Концентрация радикальных форм АФК обычно на порядки ниже. Однако в определенные моменты нормальной жизнедеятельности клеток концентрация АФК может повышаться, что можно регистрировать по повышению содержания пероксидов [7–9]. При этом могут возникать периодические или квазипериодические изменения интенсивности свечения водных и биологических систем, обусловленные накоплением и последующим разложением пероксидов на радикалы [7–9]. Излучения обычно вызваны рекомбинациями радикалов, образующихся при распаде H_2O_2 и органических пероксидов и вторичными реакциями с их участием.

Заключение

Из полученных данных можно сделать вывод, что на длине волны $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$, при которой происходит возбуждение порфириновой группировки молекулы PD, можно наблюдать рост интенсивности и сдвиги полос флуоресценции при добавлении полимеров (PVP и SA) по сравнению со спектром для исходного фотодитазина. В спектрах флуоресценции в присутствии триптофана при возбуждении светом с $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$ (рис. 2) для тройной системы PD-SA-PVP интенсивность флуоресценции PD выше в ~ 1.3 раза по сравнению с интенсивностью полосы исходного PD, в ~ 1.6 раз выше, чем для двойной системы PD-PVP, и в ~ 3 раза выше, чем для системы PD-SA. Помимо проявляемого повышения интенсивности флуоресценции в системе PD-SA-PVP в присутствии и в отсутствие Тгр в полосах флуоресценции зафиксированы bathochromic сдвиги (на $\sim 5 \text{ nm}$) относительно полос в спектрах чистого фотодитазина. Очевидно, такое повышение интенсивности и сдвиг полос флуоресценции в тройной системе PD-SA-PVP связаны с взаимным влиянием PVP и SA на молекулу PD. Это приводит к уплотнению структурной матрицы вокруг активного центра порфирина и созданию благоприятного локального микроокружения с повышенной полярностью. Интересен и тот факт, что значительно меняется спектр флуоресценции именно двойной системы PD-SA в присутствии и в отсутствие триптофана. Присутствие триптофана оказывает влияние на флуоресценцию PD в системе PD-SA в большей степени по сравнению с другими системами.

Наибольшая интенсивность светорассеяния при возбуждении системы светом $\lambda \sim 280 \text{ nm}$ (полоса погло-

шения триптофана) наблюдается для систем с PVP, причем в тройной системе PD-SA-PVP интенсивность рассеяния вдвое ниже, чем в PD-PVP (рис. 4). Такое поведение системы PD-SA-PVP, очевидно, связано с образованием более плотных частиц меньшего размера по сравнению с двойными системами PD-PVP(SA). По-видимому, PVP выступает в роли связующего агента между SA и PD, что, очевидно, приводит к большей дезагрегации молекул PD в тройных системах, нежели в двойных PD-PVP и PD-SA.

Особенности спектров флуоресценции систем свидетельствуют о возможном участии в исследуемых процессах не только $^1\text{O}_2^*$, генерируемого при возбуждении PD в полосе Core, но и других видов АФК, появляющихся в данных системах при окислении синглетным кислородом и ультрафиолетовом освещении. Использование Тгр в качестве субстрата в модельных процессах фотоокисления при тестировании эффективности фотосенсибилизаторов в генерации синглетного кислорода существенно не меняет параметры флуоресценции комплекса PD-SA-PVP. Однако полученные спектры флуоресценции и светорассеяния свидетельствуют о наличии некоторого химического сродства триптофана к фрагментам вводимых полимеров, около которых, по-видимому, координируются молекулы PS. Эти наблюдения требуют дальнейшего исследования.

Финансирование работы

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований. Грант РФФИ 17-02-00294.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Rosenkranz A.A., Jans D.A., Sobolev A.S. // Immun. Cell Biol. 2000. V. 78. P. 452.
- [2] Улащик В.С. // Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. 2013. № 1. С. 36.
- [3] Узденский А.Б. // Биофизика. 2016. Т. 61. № 3. С. 547.
- [4] Акопов А.Л., Казаков Н.В., Русанов А.А., Карлсон А. // Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. 2015. № 2. С. 9.
- [5] Красновский А.А. (мл.) // Проблемы регуляции в биологических системах. / Под ред. Рубина А.Б. М., Ижевск: НИЦ „Регулярная и хаотическая динамика“, 2006. 480 с.
- [6] Oniszczyk A., Wojtunik K.A. // Biomed Pharmacotherapy. 2016. V. 83. P. 912.
- [7] Voeikov V.L. // Reactive Oxygen Species, Water, Photons, and Life. 2010. V. 103. N 2-3. P. 321.
- [8] Gudkov S.V., Bruskov V.I., Astashev M.E., Chernikov A.V., Yaguzhinsky L.S., Zakharov S.D. // J. Phys. Chem. 2011. V. 115. P. 7693.
- [9] Belovolova L.V., Glushkov M.V., Vinogradov E.A. // Biophysics. 2014. V. 59. N 4. P. 524.
- [10] Wagner J.R., Ali H., Langlois R., Brasseur N., van Lier J.E. // Photochem. Photobiol. 1987. V. 45. N 5. P. 587.
- [11] Rossi E., Van de Vorst A., Jori G. // Photochem. Photobiol. 1981. V. 34. P. 447.
- [12] Lion Y., Delmelle M., Van De Vorst // Nature Publish. Group. 1976. V. 263. P. 442.
- [13] Wang Sh.Y., Jiao H. // J. Agric. Food Chem. 2000. V. 48. N 11. P. 5677.
- [14] Jonson P.G., Bellnier D.A., Henderson B.W. // Photochem. Photobiol. 1993. V. 57. P. 50–58.
- [15] Campbell A.K. // Principles and Applications in Biology and Medicine. 1988. P. 608.
- [16] Aksenova N.A., Zhientaev T. M., Brilkina A.A. et al. // Photonics & Lasers in Medicine. 2013. V. 2. N 3. P. 189.
- [17] Po Chun Pengs, Ruey Long Hong, Yi Jane Tsai, Pei Tzu Li, Tsuimin Tsai, Chin Tin Chen // Lasers Surg. Med. 2015. V. 47. N 1. P. 77.
- [18] Бахшиев Н.Г. Спектроскопия межмолекулярных взаимодействий. Л., 1972. С. 263
- [19] Васильев Р.Ф., Цаплев Ю.Б. // Успехи химии. 2006. Т. 75. С. 1103.
- [20] Belovolova L.V., Glushkov M.V., Vinogradov E.A., Babintsev V.A., Golovanov V.I. // Phys. Wave Phenom. 2009. V. 17. N 1. P. 21.
- [21] Fridovich I. // Med. Princ. Pract. 2013. V. 22. P. 131. doi 10.1159/000339212