

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОГРИБКОВЫХ СВОЙСТВ ХИНОЛИНИЕВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

Г.А. Александрова¹, Н.Е. Щепина¹, С.Ю. Баландина¹, И.И. Бойко²,
И.М. Агафонова¹

¹Естественнонаучный институт ФГБОУ ВПО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия

²ООО «Технолог», г. Переславль-Залесский, Россия

Резюме. Исследованы противогрибковые (*Candida albicans*, *Candida krusei*) свойства ряда замещенных хинолиниевых производных. Установлено, что наиболее перспективным соединением для дальнейшего детального исследования фунгицидных свойств методом меченых биомаркеров является N-фенил-[5,6]-бензохинальдиний борфторид.

Ключевые слова: хинолиниевые производные, противогрибковые свойства, *Candida albicans*, *Candida krusei*, бензохинальдиниевые соли, меченные тритием биомаркеры.

Введение

В последние десятилетия количество заболеваний, вызванных дрожжеподобными грибами рода *Candida*, значительно возросло. Известны многие факторы, способствующие развитию кандидоза. Среди них наиболее важные:

- иммуносупрессия, вторичные иммунодефициты;
- антибиотикотерапия;
- эндокринопатия и нарушения обмена веществ;
- тяжелые и длительные заболевания, ослабляющие организм.

В развитии кандидоза ведущее значение имеет нарушение общей сопротивляемости организма [8, 18].

Развитие кандидозоинфекции у людей с ослабленной резистентностью может происходить как эндогенным, так и экзогенным путем. Эндогенный путь — активизация микрофлоры при носительстве *Candida spp.* в организме. При экзогенном пути заражения грибы попадают из внешней среды. Наиболее часто кандидоз возникает в результате активизации собственной микрофлоры [4].

Из патогенных грибов наиболее часто вызывают инфекционный процесс *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis* [2, 22].

Для специфического противокандидозного лечения наиболее часто используют антибиотики полиеновой группы (продукты различных видов актиномицетов). Среди них чаще используются амфотерицин В, амфоглюкамин, нистатин, леворин. Все применяемые полиены свето- и термочувствительны, особенно в присутствии влаги. Кроме того, эти препараты довольно токсичны. Так амфотерицин В нарушает функцию почек (у 80% больных), выявлена и некоторая гепатотоксичность; амфоглюкамин может вызвать осложнения [6].

Из синтетических противогрибковых средств имеют широкое применение азолы, к которым относятся имидазолы (клотримазол, миконазол, изоконазол, кетоконазол или низорал) и триазолы (флуконазол (дифлюкан), интраконазол, фторконазол и др.). В настоящее время доказана устойчивость многих грибов к азолам [7].

Аллиламины — синтетические препараты: тербинафин, нафтифин. Устойчивость грибов к ним развивается редко.

Авторы:

Александрова Г.А., старший научный сотрудник лаборатории «Бактерицид» ЕНИ ПГНИУ, Пермь, Россия;

Щепина Н.Е., к.х.н., старший научный сотрудник, зав. лабораторией радиохимии ЕНИ ПГНИУ, Пермь, Россия;

Баландина С.Ю., младший научный сотрудник лаборатории «Бактерицид» ЕНИ ПГНИУ, Пермь, Россия;

Бойко И.И., к.х.н., директор ООО «Технолог», Переславль-Залесский, Россия;

Агафонова И.М., соискатель лаборатории радиохимии ЕНИ ПГНИУ, Пермь, Россия.

Адрес для переписки:

Щепина Надежда Евгеньевна
614990, Россия, г. Пермь, ул. Генкеля, 4, ЕНИ ПГНИУ.
Тел.: (342) 239-67-21 (служебн.). Факс: (342) 237-14-80.
E-mail: neshchepina@mail.ru

поступила в редакцию 18.11.2013
принята к печати 02.12.2013

© Александрова Г.А. и соавт., 2013

К прочим антимикотикам относятся препараты ундециленовой кислоты, гризеофульвин и др. Из них гризеофульвин имеет побочный эффект — гепатотропное действие. Особенностью антимикотических препаратов является их высокая токсичность, кроме того, клинические штаммы грибов все чаще проявляют устойчивость, поэтому поиск и разработка новых антимикотических средств сохраняет свою актуальность.

Ранее нами был проведен скрининг бактерицидной активности ряда синтезированных соединений хинолининового ряда [15] и выявлены перспективные соединения. На основании полученных результатов был осуществлен ядерно-химический синтез эффективного биомаркера — борфторида N-фениллепидиния, меченного тритием [12].

В связи с этим, представляло особый интерес изучение антимикотических свойств данного класса соединений с выявлением перспективных производных для последующего получения радиоактивных маркеров при детальных исследованиях их биологического действия.

Материалы и методы

Соли N-фенилхинальдиния и лепидиния получены нами [13, 14] по известным в литературе методикам [5, 11].

Синтезы солей N-фенил-[5,6]-бензохинальдиния проводились по видоизмененной методике [10] путем реакции циклизации фенил-β-нафтиламина и паральдегида. Методики синтеза и т. пл. синтезированных соединений приведены в работе [15].

В экспериментах использовали музейный штамм *Candida albicans* штамм 264/624 и госпитальный штамм *Candida krusei*, выделенный с объектов больничной среды.

Candida albicans — растет на твердой питательной среде Сабуро при $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$, 48 ч. Колонии круглые кремового цвета с матовой поверхностью. При микроскопии клетки овальные, иногда с отростками, расположены отдельно, цепочками или группами.

Candida krusei — колонии сухие и тусклые, часто линзовидные. На кукурузном агаре образуют многочисленные обильно ветвящиеся псевдогифы, способны расти при 42°C . Устойчив к флуконазолу. Встречается в пробах воздуха, в молочных продуктах, в почве, у человека.

В данной работе использован метод двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде с последующим установлением минимальной фунгистатической и фунгицидной концентраций. Готовили серии разведений исследуемых соединений в питательной среде, в каждое разведение вносили культуру микроорганизма. Соединения растворяли в ДМСО, максимально испытанная концентрация соот-

ветствовала 1000,0 мкг/мл. Микробная нагрузка составляла $2,5 \times 10^5$ микробных тел в 1 мл. Результаты учитывали, определяя наличие или отсутствие роста микроорганизма в среде, содержащей различные концентрации испытуемых соединений. В случае сомнительного результата проводили высевы на твердую скошенную среду Сабуро.

Результаты и обсуждение

Были определены минимальные ингибирующие (МИК) и минимальные бактерицидные концентрации (МБК) хинолининовых производных для грибов видов *Candida albicans* и *Candida krusei*. Полученные результаты исследования антимикотической активности ряда синтезированных N-арилхинолининовых солей представлены в табл.

Широко известно, что шестичленные азотсодержащие гетероциклические соединения, являющиеся крайне важными объектами биологических исследований [16, 24]. Эффективность лекарственных препаратов во многом определяется их растворимостью в воде и проницаемостью через клеточные мембраны, и этим во многом объясняется широкое использование гидрофобных липофильных четвертичных пиридиниевых солей [19, 20, 25].

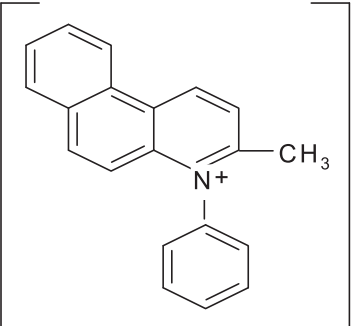
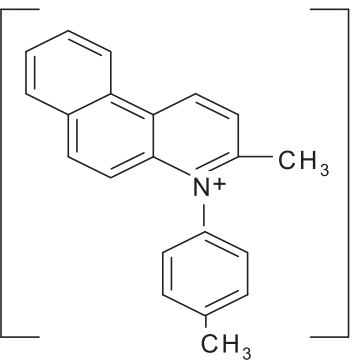
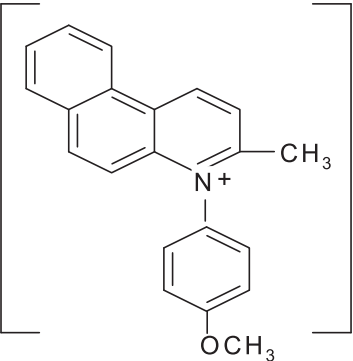
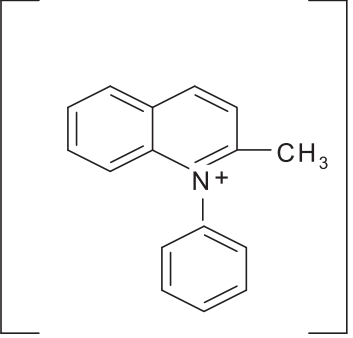
Ранее некоторыми авторами исследовалась возможность использования производных хинолина для противомикотической терапии [1, 9, 21, 23]. Поэтому особый интерес представляло изучение противогрибкового действия ряда четвертичных хинолининовых производных по отношению к наиболее опасным грибам рода *Candida*.

Из табл. видно, что соединения 1, 2, 3 (йодиды) обладают как фунгистатической, так и фунгицидной активностью в отношении грибка *Candida albicans*; гибель грибка наступала при воздействии концентрации 1000,0 мкг/мл 1-го соединения, 500,0 мкг/мл 3-го соединения, 125,0 мкг/мл — 2-го соединения. Все три соединения ингибируют рост госпитального штамма концентрацией 250,0 мкг/мл, но гибель его вызывает 1-е соединение концентрацией 500,0 мкг/мл.

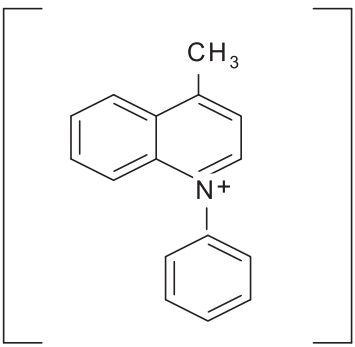
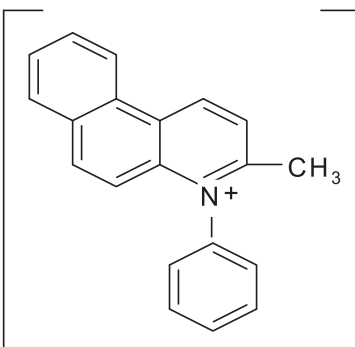
Соединения 4, 5 (перхлораты) показали антимикотическую активность в отношении штамма *C. albicans* в концентрациях, соответственно, 1000,0 и 250,0 мкг/мл. Гибель госпитального штамма наступала от воздействия концентрации 1000,0 мкг/мл обоих соединений.

Высокую антимикотическую активность проявило соединение 6 (N-фенил-[5,6]-бензохинальдиний борфторид), которое при воздействии концентрации 15,6 мкг/мл вызывало 100% гибель грибка *C. albicans*. Фунгицидные свойства в отношении *C. krusei* были выявлены при концентрации 1000,0 мкг/мл.

ТАБЛИЦА. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИМИКОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РЯДА N-АРИЛХИНОЛИНИЕВЫХ СОЛЕЙ

№ п/п	Соединение	Антимикотическая активность, мкг/мл			
		<i>Candida albicans</i>		<i>Candida crusei</i>	
		МИК	МБК	МИК	МБК
1	 N-фенил-[5,6]-бензохинальдиний йодид	500,0	1000,0	250,0	500,0
2	 N-толил-[5,6]-бензохинальдиний йодид	> 62,0 < 125,0	125,0	250,0	-
3	 N-(4-метоксифенил)-[5,6]-бензохинальдиний йодид	31,2	500,0	250,0	-
4	 N-фенилхинальдиний перхлорат	> 250,0 < 500,0	1000,0	> 500,0 < 1000,0	1000,0

ОКОНЧАНИЕ ТАБЛИЦЫ. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИМИКОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РЯДА N-АРИЛХИНОЛИНИЕВЫХ СОЛЕЙ

№ п/п	Соединение	Антимикотическая активность, мкг/мл			
		<i>Candida albicans</i>		<i>Candida crusei</i>	
		МИК	МБК	МИК	МБК
5	 N-фениллепидиний перхлорат	ClO_4^- > 125,0 < 250,0	250,0	> 500,0 < 1000,0	1000,0
6	 N-фенил-[5,6]-бензохинальдидиний борфторид	BF_4^- 7,8	15,6	250,0	1000,0
	Эталон — нитроксолин (5-нитро-8-оксихинолин)		5000,0		

Рядом авторов установлено, что природа аниона не существенно влияет на антимикробные свойства, а основную роль играет как органический радикал у четвертичного азота, так и заместители в пиридиновом кольце. Бóльшей антимикробной активностью обладают соединения с длинной углеводородной цепочкой ($C > 8$) и арильными заместителями [17, 25]. Кроме того, электронодонорные заместители, увеличивающие заряд на атоме азота в пиридиновом кольце, приводят к усилению бактерицидных свойств [3, 11, 17, 25]. Данная тенденция хорошо просматривается в проведенных нами биологических исследованиях (см. табл.). Более перспективными препаратами для дальнейшего

исследования являются N-арилбензохинальдиниевые соединения, особенно соединение 6 (N-фенил-[5,6]-бензохинальдидиний борфторид), которые при сравнении с N-фенилхинолиниевыми производными имеют дополнительное аннелированное бензольное кольцо, а также электронодонорную метильную группу, что приводит к перераспределению положительного заряда в молекуле.

Таким образом, в проведенном исследовании показано, что наиболее перспективным для дальнейшего расширенного биологического изучения с помощью меченных тритием биомаркеров является соединение 6 (N-фенил-[5,6]-бензохинальдидиний борфторид).

Список литературы

1. Антибактериальные препараты: сб. науч. тр. ВНИХФИ / Под ред. Падейской Е.Н. — М.: ВНИХФИ, 1984. — 158 с.
2. Аравийский Р.А., Климко Н.Н., Васильева Н.В. Диагностика микозов. — СПб.: СПбМАПО, 2004. — 186 с.
3. Звездина Э.А., Жданова М.П., Нечаюк И.И., Барчан И.А., Симкина Ю.Н., Бучная Т.А. Исследование фармакологических свойств солей пиридиния, пирозолинов и пиразолов // Химико-фармацевтический журнал. — 1986. — Т. 20, № 11. — С. 1328–1331.

4. Караев З.О., Лебедева Т.Н. Патогенез кандидоза и аллергии к грибам рода *Candida*. — Баку: Издательство «Тэбиз», 2007. — 215 с.
5. Коган Е.Ш., Ардашев В.И. 1-фениллепидиний перхлорат // Методы получения химических реактивов и препаратов. — 1964. — № 11. — С. 99–101.
6. Кулага В.В., Романенко И.М., Черномордик А.Б. Кандидозы и их лечение. — Киев: Здоров'я, 1985. — 128 с.
7. Кулага В.В., Романенко И.М., Афонин С.Л., Кулага С.М. Аллергия и грибковые болезни. — Луганск: Элтон-2, 2005. — 519 с.
8. Лебедева Т.Н. Иммуитет при кандидозе (обзор) // Проблемы медицинской микологии. — 2004. — Т. 6, № 4. — С. 8–16.
9. Падейская Е.Н. Хинолоны в педиатрической практике и при беременности. Обоснованность их применения // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2004. — Т. 6, № 4. — С. 377–393.
10. Пилюгин Г.Т., Опанасенко Е.П. Синтез иодфенилата β -нафтохинальдина и некоторые его превращения // Украинский химический журнал. — 1952. — Т. 18, № 6. — С. 625–630.
11. Сидорчук И.И., Стаднийчук Р.Ф., Тищенко Е.И., Бордяковская Л.Т. Антимикробная активность четвертичных солей хинолиния // Химико-фармацевтический журнал. — 1978. — Т. 12, № 7. — С. 78–80.
12. Щепина Н.Е., Аврорин В.В., Александрова Г.А., Бадун Г.А. Меченные тритием биологически активные N-фениллепидиниевые соли и способ их получения. Патент РФ № 2442776 от 20.02. 2012 г.
13. Щепина Н.Е., Аврорин В.В., Александрова Г.А., Бадун Г.А., Бойко И.И., Шуруп С.Н. Изучение реакции фенилирования метилзамещенных хинолинов с помощью меченных тритием нуклеогенных фенил-катионов // Химия гетероциклических соединений. — 2013. — Т. 543, № 3. — С. 461–467.
14. Щепина Н.Е., Аврорин В.В., Бадун Г.А., Александрова Г.А., Уханов С.Е., Федосеев В.М., Льюис С.Б., Бойко И.И. Получение меченных тритием N-фенилзамещенных производных хинолиния в результате ядерно-химического синтеза // Химия гетероциклических соединений. — 2009. — № 7. — С. 1008–1014.
15. Щепина Н.Е., Бойко И.И., Александрова Г.А. Синтез и противомикробная активность четвертичных производных N-арил[5,6]-бензохинальдиния // Химико-фармацевтический журнал. — 2011. — Т. 45, № 3. — С. 30–32.

Ссылки 16–25 см. в References (с. 370). See References for numbers 16–25 at p. 370.

Infekciã i immunitet (Infection and Immunity)
2013, vol. 3, no. 4, pp. 365–370

SHORT COMMUNICATIONS

INVESTIGATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF QUINOLINIUM DERIVATIVES

Alexandrova G.A.^a, Shchepina N.Y.^a, Balandina S.Y.^a, Boiko I.I.^b, Agafonova I.M.^a

^a Natural Sciences Institute of Perm State University, Perm, Russian Federation

^b Technolog Co. Ltd., Pereslavl-Zalessky, Russian Federation

Abstract. Antifungal activity (*Candida albicans*, *Candida krusei*) of some substituted quinolinium derivatives has been investigated. It was established that the most perspective compound for detail investigation of antifungal activity by labeled biomarkers method was N-phenylbenzoquinaldinium tetrafluoroborate.

Key words: quinolinium derivatives, antifungal activity, *Candida albicans*, *Candida krusei*, benzoquinolinium salts, tritium labeled biomarkers.

Authors:

Alexandrova G.A., Senior Researcher, Laboratory "Bactericide", Natural Sciences Institute of Perm State University, Perm, Russian Federation;

Shchepina N.Y. ✉, PhD (Chemistry), Senior Researcher, Head of the Laboratory of Radiochemistry, Natural Sciences Institute of Perm State University.

614990, Russian Federation, Perm, Genkelya str., 4, Natural Sciences Institute of Perm State University.

Phone: +7 (342) 239-67-21 (office). Fax: +7 (342) 237-14-80.

E-mail: neshchepina@mail.ru

Balandina S.Y., Junior Researcher, Laboratory "Bactericide", Natural Sciences Institute of Perm State University, Perm, Russian Federation;

Boiko I.I., PhD (Chemistry), Director, Technolog Co. Ltd., Pereslavl-Zalessky, Russian Federation;

Agafonova I.M., Post-Graduate Student, Laboratory of Radiochemistry, Natural Sciences Institute of Perm State University, Perm, Russian Federation.

References

1. Antibakterial'nye preparaty: sb. nauch. tr. VNIHFI (Pod red. Padeyskoy E.N.) [Antibacterial preparations. Collection of Scientific Papers of VNIHFI (Ed. Padeyskaya E.N.)]. Moscow: VNIHFI, 1984. 158 p.
2. Araviyskiy R.A., Klimko N.N., Vasil'eva N.V. Diagnostika mikofov [Diagnostics of Mycoses]. SPb.: SPbMAPO, 2004. 186 p.
3. Zvezdina E.A., Zhdanova M.P., Nechayuk I.I., Barchan I.A., Simkina Yu.N., Buchnaya T.A. Issledovanie farmakologicheskikh svoystv soley piridiniya, pirazolinov i pirazolov [Investigation of pharmacological properties of pyridinium salts, pyrazolines, and pyrazoles]. *Himiko-farmatsevticheskii zhurnal — Pharm. Chem. J.*, 1986, vol. 20, no. 11, pp. 1328–1331.

4. Karaev Z.O., Lebedeva T.N. Patogenez kandidoza i allergii k gribam roda Candida [Pathogenesis of Candidosis and allergies to fungus of genus Candida]. *Baku: Izdatelstvo "Tebib", 2007. 215 p.*
5. Kogan E.SH., Ardashev V.I. 1-fenillepidiniy perklorat [1-Phenyllepidinium perchlorate]. *Metody polucheniya khimicheskikh reaktivov i preparatov — Methods of Preparation of Chemical Reagents and Chemicals, 1964, no. 11, pp. 99–101.*
6. Kulaga V.V., Romanenko I.M., Chernomordik A.B. Kandidozy i ikh lechenie [Candidiasis and its treatment]. *Kiev: Zdorov'ya, 1985. 128 p.*
7. Kulaga V.V., Romanenko I.M., Afonin S.L., Kulaga S.M. Allergiya i gribkovye bolezni [Allergy and fungal diseases]. *Lugansk: Elton-2, 2005. 519 p.*
8. Lebedeva T.N. Immunitet pri kandidoze (obzor) [Immunity at candidiasis (review)]. *Problemy meditsinskoj mikologii — Problems of medical mycology, 2004, vol. 6, no. 4, pp. 8–16.*
9. Padeyskaya E.N. Hinolony v pediatricheskoj praktike i pri beremennosti. Obosnovannost' ikh primeneniya [Quinolones in pediatric practice and during pregnancy. Validity of their usage]. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya — Clin. Microbiol. Antimicrob. Chemother., 2004, vol. 6, no. 4, pp. 377–393.*
10. Pilyugin G.T., Opanasenko E.P. Sintez iodfenilata β -naftokhinal'dina i nekotorye ego prevrashcheniya [Synthesis of iodophenylate β -naphthoquinaldine and some of its reactions]. *Ukrainskiy khimicheskij zhurnal — Ukr. Khim. Zh., 1952, vol. 18, no. 6, pp. 625–630.*
11. Sidorchuk I.I., Stadniychuk R.F., Tishchenko E.I., Bordyakovskaya L.T. Antimikrobnaya aktivnost' chetvertichnykh soley khinoliniya [Antimicrobial activity of quaternary quinolinium salts]. *Himiko-farmatsevticheskij zhurnal — Pharm. Chem. J., 1978, vol. 12, no. 7, pp. 78–80.*
12. Shchepina N.E., Avrorin V.V., Aleksandrova G.A., Badun G.A. *Mechennye tritiem biologicheski aktivnye N-fenillepidinievye soli i sposob ikh polucheniya* [Biologically active tritium labeled N-phenyllepidinium salts and method of its preparation]. Patent RF, No. 2442776, 20.02.2012.
13. Shchepina N.E., Avrorin V.V., Aleksandrova G.A., Badun G.A., Boyko I.I., Shurov S.N. Izuchenie reaktsii fenilirovaniya metilzameshchennykh khinolinov s pomoshch'yu mechennykh tritiem nukleogennykh fenil-kationov [Study of phenylation of methyl-substituted quinolines by nucleogenic phenyl cations labeled with tritium]. *Himiya geterotsiklicheskih soedineniy — Chem. Heterocycl. Compd., 2013, vol. 543, no. 3, pp. 461–467.*
14. Shchepina N.E., Avrorin V.V., Badun G.A., Aleksandrova G.A., Ukhanov S.E., Fedoseev V.M., L'yuis S.B., Boyko I.I. Poluchenie mechennykh tritiem N-fenilzameshchennykh proizvodnykh khinoliniya v rezul'tate yaderno-khimicheskogo sinteza [Preparation of tritium labeled N-phenyl substituted quinolinium derivatives by radiochemical synthesis]. *Himiya geterotsiklicheskih soedineniy — Chem. Heterocycl. Compd., 2009, no. 7, pp. 1008–1014.*
15. Shchepina N.E., Boyko I.I., Aleksandrova G.A. Sintez i protivomikrobnaya aktivnost' chetvertichnykh proizvodnykh N-aril[5,6]-benzokhinal'diniya [Synthesis and antimicrobial activity of quaternary N-aryl-5,6-benzoquinolinium derivatives]. *Himiko-farmatsevticheskij zhurnal — Pharm. Chem. J., 2011, vol. 45, no. 3, pp. 30–32.*
16. Carey J.S., Laffan D., Thomson C., Williams M.T. Analysis of the reactions used for the preparation of drug candidate molecules. *Org. Biomol. Chem., 2006, vol. 4, no. 12, pp. 2337–2347.*
17. Docherty K., Kulpa C.F. Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids. *Green Chem., 2005, vol. 7, pp. 185–189.*
18. Kontoyiannis D.C., Reddy B.T., Torres H.A., Luna M., Lewis R.E., Tarrand J., Bodey G.P., Raad I.I. Pulmonary candidiasis in patients with cancer: an autopsy study. *Clin. Inf. Dis., 2002, vol. 34, pp. 400–403.*
19. Kumar V., Malhotra S.V. Ionic liquids as pharmaceutical salts: a historical perspective. *ACS Symposium Series, 2010, vol. 1038, ch. 1, pp. 1–12.*
20. Laufer R., Bathori M., Cserrery T., Petroiani G., Kuca K., Toth N., Kalasz H. TLC Determination of hydrophilicity parameter of some pyridinium aldoximes. *J. Liq. Chrom. Relat. Tech., 2007, vol. 30, no. 15, pp. 2337–2344.*
21. Marr K.A., Koudadoust M., Black M., Balajee S.A. Early events in macrophage killing of *Aspergillus fumigatus* conidia: new flow cytometric viability assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol., 2001, vol. 8, no. 6, pp. 1240–1247.*
22. Perlroth J., Choi B., Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Medical Mycology, 2007, vol. 45, pp. 321–346.*
23. Pina-Vaz C., Sansonetti F., Rodrigues A.G., Costa-Oliveira S., Tavares C., Martinez-de-Oliveira J. Cytometric approach for a rapid evaluation of susceptibility of *Candida* strains to antifungals. *Clin. Microbiol. Infect., 2001, vol. 7, no. 11, pp. 609–618.*
24. Pozharskii A. F., Soldatenkov A. T., Katritzky A. R. *Heterocycles in Life and Society*, NY: Wiley, 1997. 301 p.
25. Zhao T., Sun G. Hydrophobicity and antimicrobial activities of quaternary pyridinium salts. *J. Appl. Microbiol., 2008, vol. 104, pp. 824–830.*