Monocyte isolation using serum dextrose 5% with autologous plasma

E. Beiranvand, MSc [1] S. Abediankenari, PhD [2] B. Beiranvand, MSc [3] H. Hasannia, MSc [4]

MSc of Microbiology [1] , Associate Professor Department of Immunology [2] , MSc of Immunology [4] , Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.
General Practioner [3] , Ahvaz Jondiahapour University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

(Received 1 Jun, 2011 Accepted 23 Apr, 2012)

ABSTRACT

Introduction: Mammalian cells culture is an important method for producing recombinant proteins, monoclonal antibody, and hormones application. One of the common methods in the monocyte isolation is using flask adherent cell culture in RPMI-1640 medium. We aimed, in this study, cell culture medium using dextrose 5% with autologous plasma to produce inexpensive medium for isolation of monocytes.

Methods: In this experimental study, we isolated peripheral blood mononuclear cells from 40 healthy volunteers, the isolated cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% fetal calf serum and in the media supplemented serum dexterous 5%containing autologous plasma under 37°C and 5% CO2 in a cell incubator. Then, count, viability and morphological cells were surveyed by trypan blue and invert microscope.

Results: We isolated 1.8- 2× 10^6 cells /ml of RPMI culture media and 2- 2.2×10^6 /ml macrophage of serum dexterous 5% containing autologous plasma. There was not a significant difference between two methods (P>0.05). Also, we did not see any morphological variation in two culture media.

Conclusion: Our results showed that dextrose 5% can be used in monocyte isolation from peripheral blood mononuclear cells.

Correspondence:
A. Abedian Konari, PhD.
Department of Immunology, Mazandaran University of Medical Sciences.
Sari, Iran
Tel:+98 912 198 5667
Email:
abedianlab@yahoo.co.uk

Key words: Cell Culture – Serum – Monocytes

استفاده از سرم دکستروز ۵٪ حاوی پلاسمای خودی جهت جداسازی مونوسیتها

الهام بیرانوند [۱] دکتر سعید عابدیان کناری [۲] بهنوش بیرانوند [۳] هادی حسن‌نیا [۴]

[۱] کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی، [۲] دانشیار گروه ایمنی شناسی، [۴] کارشناسی ارشد ایمنی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران [۳] پزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز

مجله پزشکی هرمزگان سال شانزدهم شماره ششم بهمن و اسفند ۹۱ صفحات ۴۹۴-۳۸۹

چکیده

مقدمه: *کشت سلولهای پستانداران یکی از روشهای مهم و با اهمیت است که در زمینه‌های مختلف از جمله تولید پروتئین های نوترکیب، آنتی بادی مونوکلونال و هورمونها کاربرد دارد. مونوسیت‌ها و ماکروفاژها، از سلولهای مؤثر در پاسخ‌های ایمنی در مقابل آنتی ژن های بیگانه هستند. جداسازی این سلولها از سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی با روشهای مختلفی صورت می‌گیرد، یکی از روشهای متداول در جداسازی مونوسیتها از سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی استفاده از فلاسک کشت سلولی حاوی محیط RPMI 1640 است. هدف از این مطالعه طراحی محیط کشت سلولی با استفاده از دکستروز ۵ درصد همراه با پلاسمای اتولوگ به منظور تولید محیط کشت ارزان و در دسترس برای جداسازی مونوسیتها بوده است.*

روش کار: *در این مطالعه‌ای تجربی، از ۴۰ داوطلب، سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی جدا شده و در شرایط یکسانی در محیط‌های RPMI 1640 و سرم دکستروز۵ درصد حاوی پلاسمای اتولوگ (autologous plasma) تحت شرایط دمای ۳۷ درجه و ۵٪ دی اکسید کربن کشت داده شد. سپس تعداد، میزان زنده بودن و مرفولوژی سلولها، با استفاده از رنگ تریپان بلو و میکروسکوپ Invert مورد بررسی قرار گرفت.*

نتایج: *۱/۸×۱۰۶-۲ سلول از محیط کشت RPMI و ۲/۲×۱۰۶-۲ سلول از سرم دکستروز ۵٪ حاوی پلاسمای خودی جدا شد که از نظر آماری بین دو روش تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. همچنین تفاوت مورفولوژیکی بین دو محیط مشاهده نشد.*

نتیجه‌گیری: *نتایج ما نشان داد که از سرم دکستروز ۵٪ می‌توان در جداسازی مونوسیتها از سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی استفاده کرد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این روش یکی از تکنیک‌های ساده برای جداسازی مونوسیتها است.*

کلیدواژه‌ها: *کشت سلولی – سرم – مونوسیت‌ها*

نویسنده مسئول:
دکتر سعید عابدیان کناری
گروه ایمنی‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی مازندران
ساری - ایران
تلفن: ۵۶۶۷ ۱۹۸ ۹۱۲ ۹۸+
پست الکترونیکی:
abdeianlab@yahoo.co.uk

دریافت مقاله: ۹۰/۳/۱۱ اصلاح نهایی: ۹۱/۱/۲۵ پذیرش مقاله: ۹۱/۲/۴

مقدمه:

سلولهای عرضه‌کننده آنتی‌ژن شامل مونوسیتها و ماکروفاژها نقش اساسی و مهمی در پاسخ‌های ایمنی در مقابل آنتی‌ژن‌های بیگانه و عوامل خارجی دارند، لذا در شروع پاسخ‌های ایمنی از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (۱).

کشت سلولهای پستانداران یکی از روشهای مهم و با اهمیت است که در زمینه‌های مختلف از جمله تولید پروتئین‌های نوترکیب، ساخت واکسن‌های ویروسی، آنتی‌بادی مونوکلونال، هورمون‌ها و داروها کاربرد دارد (۲). در تکثیر و تمایز سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی، محیطهای مختلفی از جمله RPMI 1640 به کار می‌رود، که به صورت روتین برای کشت و جداسازی این سلولها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳). همچنین در تهیه محیطهای کشت، استفاده از مواد و ترکیبات بکار رفته بایستی بر این اساس تنظیم شده باشند که سبب تکثیر حد اکثر سلولها شوند (۴۵). در تهیه محیطهای کشت، سرم به عنوان یک مکمل رایج و معمول است که حاوی ماکرومولکولهایی مثل لیپید و عناصر ضروری و فاکتورهای رشد و مولکولهای غذایی با وزن پایین است که معمولاً از Fetal bovine serum (FBS%10) استفاده می‌شود (۶)، که در این عصاره جنینی با منشأ حیوانی احتمال آلودگی با ویروسها و باکتریهای پاتوژن وجود دارد. از مهمترین باکتریهایی که به طور رایج آلوده‌کننده محیط کشت می‌باشند، می‌توان به مایکوپلاسما با قطری در حدود ۲۵۰-۱۲۵ نانومتر اشاره کرد (۷). همچنین آلودگی محیطهای کشت با ویروسهای انکوژنیکی مثل رتروویروسها می‌تواند موجب پرولیفراسیون سلولی و تغییر شرایط طبیعی تکثیر و تمایز سلولها شود (۸). لذا وجود هر گونه آلودگی، منجر

به ایجاد متابولیسم اگزوژنی شده که متابولیسم اندوژن سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۹). امروزه در سیستم‌های کشت سلولی به منظور غنی‌سازی محیط‌های کشت از سرم‌های ویژه با عنوان Serum Free به عنوان ماده مغذی جایگزین سرم گوساله استفاده می‌شود. که در این راستا استفاده از Fetal bovin serum کم کم جای خود را به پلاسمای اتولوگ جهت مشابه سازی شرایط کشت با محیط بدن داده است (۱۰). با توجه به این که رعایت استانداردهای محیط‌های کشت از اهداف اساسی و مهم در تهیه محیط کشت مناسب (Good GCCP cell culture practice) محسوب می‌شود (۱۱) و پایه و اساس کشت سلول و یا بافت، مشابه‌سازی محیط Invitro با محیط Invivo است (۴،۵). لذا هدف از این مطالعه طراحی محیط کشت سلولی با استفاده از دکستروز ۵ درصد همراه با پلاسمای اتولوگ به منظور تولید محیط کشت مناسب برای جداسازی مونوسیتها و تولید سلولهای ماکروفاژ و مقایسه آن با محیط کلاسیک RPMI1640 به عنوان جایگزینی مناسب بوده است.

روش کار:

در این مطالعه تجربی، از ۴۰ داوطلب به صورت غیرانتخابی با میانگین سنی ۳۰/۵۲ (۲۵ مرد و ۱۵ زن) پس از رضایت آگاهانه و معاینات بالینی دقیق، ۲۰ سی سی نمونه خون محیطی در ۲۰۰ میکرولیتر ماده ضد انعقاد EDTA گرفته شده است، سپس نمونه خون بدست آمده را به دو قسمت مساوی تقسیم کرده و سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) آنها را با استفاده از شیب گرادیانت فایکول 1.077 (USA و Sigma) به روش زیر جدا نمودیم.

جدا کردن سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی (peripheral blood mononuclear cells):

– نمونه‌ها در دور ۲۰۰۰ (g ۴۰۰) به مدت ۵ دقیقه جهت جداسازی پلاسما سانتریفوژ شدند و سپس هم حجم گلبولهای متراکم، PBS افزوده تا رقیق شود.

– در یک لوله استریل به میزان نصف نمونه رقیق شده محلول فایکول ۱/۰۷۷ در شرایط کاملاً استریل ریخته شد.

– نمونه به آرامی با استفاده از یک پیپت پاستور بر روی فایکول اضافه و سپس در g۴۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه به منظور جدا کردن سلولهای تک هسته‌ای سانتریفوژ شدند.

– پس از سانتریفوژ از ۴ لایه ایجاد شده، لایه سلولهای تک هسته‌ای که بین فایکول ۱/۰۷۷ در زیر و PBS در بالا قرار داشت را جدا کردیم.

– سلولهای تک هسته‌ای را دو بار با PBS شسته و پس از آخرین شستشو به حجم یک میلی‌لیتر رسانده سپس یک قطره از آن را جهت شمارش استفاده کردیم (۱۲،۱۳). سپس سوسپانسیون سلولی را به دو فلاسک کشت ۲۵ سانتی‌متر مکعبی (Nunc,USA) اضافه کردیم، یکی از فلاسک‌ها، حاوی ۴ تا ۶ سی سی RPMI 1640 (همراه با۱۰ درصدFetal bovin serum و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول پنی سیلین–استرپتومایسین) و دیگری دارای ۴ تا ۶ سی سی سرم دکسترز ٪۵ (همراه با یک سی سی ۲۰ درصد) پلاسمای خود شخص و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول پنی سیلین–استرپتومایسین) بوده است. این سلولها در شرایط کاملاً استریل در زیر هود بیولوژیک کلاس B کشت داده شده و پس از ۳ ساعت و سی دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه و حضور ۵ درصد CO2 (۱۴)، مونوسیتها به کف فلاسک چسبیده و پس از برداشتن مایع رویی، با cell scraper مونوسیتها را از کف فلاسک به آرامی جدا کرده سپس سلولها را به نسبت ۱به ۵ با تریپان بلو رقیق کرده و با استفاده از لام نئوبار از نظر مورفولوژی و تعداد، بررسی شدند.

بررسی وضعیت مورفولوژی و حیات سلولی:

در فواصل ۱، ۲ و ۳ ساعت پس از کشت سلولی، مورفولوژی سلولها مورد بررسی و مقایسه قرا گرفت و تغییرات سلولی با مشاهده میکروسکوپی با استفاده از میکروسکوپ اینورت مورد بررسی قرار گرفتند. به علاوه تعداد سلولهای کشت داده شده در دو محیط کشت با استفاده از ماده رنگی تریپان بلو شمارش و میزان حیات سلولی مورد بررسی قرار گرفت.

میزان زنده بودن سلولهای بدست آمده با روش تریپان بلو:

پس از تهیه سوسپانسیون سلولی ۲۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون را با ۲۰ میکرولیتر تریپان بلو مخلوط کرده، سپس بر روی لام نئوبار قرار دادیم. در طی یک تا دو دقیقه سلولهای زنده (سلولهایی که رنگ به داخل آنها نفوذ نکرده بود) در قسمت ۲۵ خانه‌ای لام نئوبار شمارش گردید. تعداد سلولهای زنده در هر میلی‌لیتر و میزان زنده بودن سلولها به با استفاده از روش زیر محاسبه گردید:

میزان زنده بودن سلول = تعداد سلولهای زنده ×۱۰۰ تقسیم بر تعداد کل سلولهای شمارش شده.

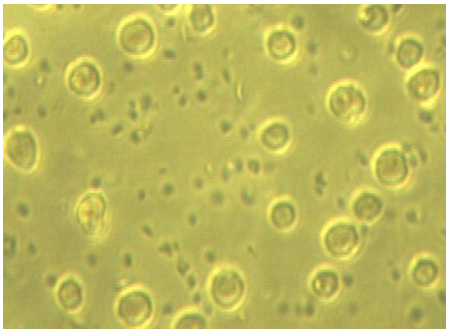
پس از شمارش سلولها و لگاریتم گیری، با استفاده از آزمون t زوجی و استفاده از نرم‌افزار SPSS، داده‌های بدست آمده تحلیل گردید. P-value کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

نتایج:

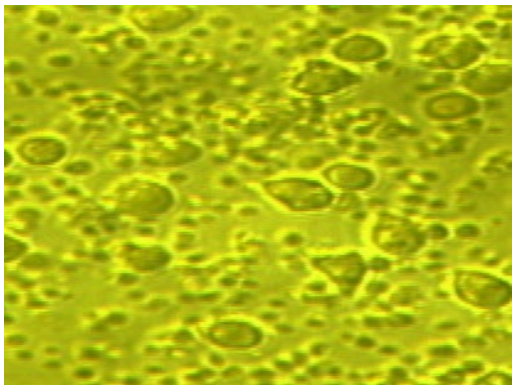
سلولهای جدا شده از هر دو محیط کشت، از نظر تعداد، مورفولوژی و حیات سلولی (Viability test) مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج حاصل از تست حیات سلولی نشان می‌دهد که بیش از ۹۵ درصد سلولها در دو محیط زنده بودند و اختلاف آنها از لحاظ آماری معنی‌دار نبوده است ($P<۰/۰۵$). به علاوه شمارش سلولهای کشت داده شده در دو محیط نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین دو محیط از نظر تعداد (جدول شماره ۱) و مورفولوژی سلولها (شکل ۲ و ۱) وجود ندارد ($P=۰/۷۱۱$).

جدول شماره ۱-تعداد سلولهای جدا شده از محیط دکستروز و محیط کشت RPMI

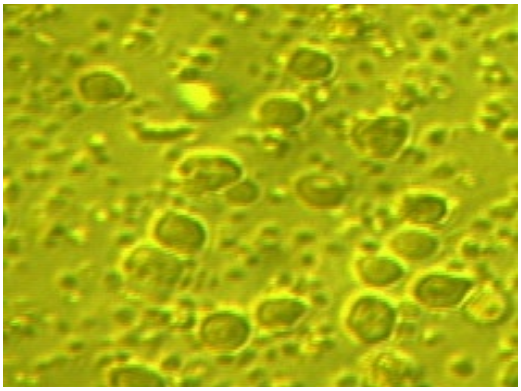
نوع محیط کشت	تعداد سلولهای جدا شده	P-value
سرم دکستروز ۵ درصد	$۲-۲/۲\times۱۰^{۶}$	P=۰/۷۱۱
RPMI 1640	$۱/۲-۸\times۱۰^{۵}$	



شکل ۱-سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی پس از جدا سازی با استفاده از فایکول ۱/۰۷۷در محیط های سرم دکستروز٪۵ و RPMI 1640 کشت داده شد. این تصویر مور فولوژی خاص سلولهای مونوسیت را در ابتدای شروع کشت سلولی نشان داده است(بزرگ نمایی×۴۰)



دکستروز ۵٪



RPMI

شکل ۲-بررسی مورفولوژی سلولها در محیط کشت سرم دکستروز ۵٪(۱) و RPMI (۲) پس از ۳ ساعت انکوباسیون و در زمان شروع تولید مایکروفاژ (بزرگ نمایی×۴۰)

بحث و نتیجه‌گیری:

در این مطالعه استفاده از سرم دکستروز ۵ درصد به عنوان محیط قابل دسترس و مناسب همراه با پلاسمای خودی، به عنوان محیطی مناسب جهت جداسازی سلولهای مونوسیت از گلبولهای سفید خون محیطی در مقایسه با محیط کلاسیک RPMI 1640 استفاده شده است. استفاده از محیطهای جایگزین و ارزان و قابل دسترس سبب سهولت انجام تحقیقات کاربردی و لذا باعث ارتقا سطح دانش کشت سلولی می‌گردد. از اساسی‌ترین مواردی که در سیستمهای کشت بافت و یا سلول باید رعایت شود، مشابه‌سازی محیط Invitro با محیط In vivo و فراهم کردن شرایطی که سلولها بتوانند حداکثر تکثیر را داشته باشند (۴۵). با توجه به این که استفاده از روشهای آزمایشگاهی کشت سلولی پیشرفت قابل توجهی داشته است (۱۵) و بکارگیری سرم

با منشأ حیوانات آزمایشگاهی با محدودیت‌های قابل توجهی مواجه است (۱۷،۱۶)، لذا رعایت استانداردهای محیط‌های کشت سلولی از اهداف مهم و اساسی در ایجاد محیط کشت مناسب (GCCP) محسوب می‌شود (۱۱). با توجه به این که در تهیه محیطهای کشت سلول از جمله RPMI 1640 استفاده از سرم با منشأ حیوانی، به عنوان یک مکمل و تأمین‌کننده نیازهای تغذیه‌ی سلولها، رایج و معمول است (۶) و احتمال آلودگی این عصاره جنینی با منشأ حیوانی با ویروسها و باکتریهای پاتوژن از جمله مایکوپلاسما و ویروس‌های انکوژنیک مانند رترو ویروسها وجود دارد (۷،۸). بنابراین، هر گونه آلودگی اگزوژن می‌تواند متابولیسم داخل سلولی را تغییر دهد (۹). همچنین امروزه در سیستم‌های کشت سلولی استفاده از پلاسمای اتولوگ، جایگزین سرم‌های کلاسیک از جمله Fetal bovin serum جهت مشابه‌سازی شرایط کشت با محیط بدن شده است (۲۰-۱۸). لذا در این مطالعه با توجه به محدودیتهای موجود، جهت نیل به کاهش مواد مداخله‌گر، ازسرم دکستروز ۵ درصد همراه با پلاسمای اتولوگ پس از چندین بار آزمایش (Optimization)، در این تحقیق استفاده شد. مطالعات قبلی ما نشان می‌دهد که استفاده از محیط کشت سلولی RPMI همراه با سایتوکاینهای مناسب توانایی تولید سلولهای دندریتیک از مونوسیتهای خون محیطی را دارا می‌باشد و تغییر در عوامل مکمل در بهینه‌سازی محیطهای کشت سلولی بسیار مؤثر است (۲۱). با توجه به این که جداسازی مونوسیتهای خون محیطی با استفاده از مولکولهای آنتی بادی مونوکلونال (۲۲)، Elispot (۲۳) و Magnetic activated cell sorter (۲۴) بسیار پرهزینه می‌باشد، در این مطالعه سعی شده با بکارگیری سرم دکستروز ۵٪ حاوی پلاسمای خود شخص (autologous plasma) احتمال آلودگی با عوامل پاتوژن خارجی حذف شود. لذا می‌توان از محیط یاد شده همراه با پلاسمای خودی به عنوان پایه اصلی در کشت سلولی استفاده کرد. هر چند استفاده از محیط کشت RPMI 1640 از جایگاه مناسب و قوی در تولید سلول و نیز تمایز سلولی برخوردار است، اما بهره‌گیری از محیطهای جایگزینی مناسب می‌توانند سبب ارتقاء دانش کشت سلولی و تکرارپذیری تحقیقات بنیادین شود. لذا در این تحقیق با توجه به نتایج بدست آمده بین دو محیط تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری وجود ندارد، بنابراین سرم دکستروز ۵ درصد حاوی پلاسمای خود شخص (autologous plasma) می‌تواند جایگزین مناسبی برای محیط RPMI 1640 در جداسازی مونوسیتها باشد.

References منابع

1. Theurl I, Fritsche G, Ludwiczek S, Garimorth K, Bellman N, Weiler R, Weiss G. The macrophage: A cellular factory at the interphase between iron and immunity for the control of infections. *BioMetals*. 2005;18:359-367.
2. Ruckenstuhl C, Buttner S, Carmona-Gutierrez D, Eisenberg T, Kroemer G, Sigrist SJ, et al. The Warburg effect suppresses oxidative stress induced apoptosis in a yeast model for cancer. *Plos One*. 2009;2:1-6.
3. Mahbod AA, Pishbin Sh, Mosavi SR. Serology and blood bank, 2nd ed. Tehran: Mire Press; 2006;180-181. [Persian]
4. van der Valk J, Brunner D, De Smet K, Fex Svenningsen A, Honegger P, Knudsen LE, et al. Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol in Vitro*. 2010;24:1053-1063.
5. Davis JM. Basic Cell Culture. A Practical Approach. 2nd ed. London: Oxford University Press; 2002.
6. Gstraunthaler G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *Altex*. 2003;20:275-281.
7. Erickson GA, Bolin SR, Landgraf JG. Viral contamination of fetal bovine serum used for tissue culture: Risks and concerns. *Dev Biol Stand*. 1991;75:173-175.
8. Nicklas W, Kraft V, Meyer B. Contamination of transplantable tumours, cell lines an monoclonalantibodies with rodent viruses. *Lab Anim Sci*. 1993;43:296-300.

9. Cuperlović-Culf M, Barnett DA, Culf AS, Chute I. Cell culture metabolomics: applications and future directions. *Drug Discov Toduy*. 2010;15:610-621.

10. Tallheden T, van der Lee J, Brantsing C, Mansson JE, Sjögren-Jansson E, Lindahl. A Human serum for culture of articular chondrocytes. *Cell Transplant*. 2005;14:469-479.

11. Hartung T, Balls M, Bardouille C, Blanck O, Coecke S, Gstraunthaler G, et al. Good cell culture practice. Ecvam Good Cell Culture Practice Task Force Report. *Altern Lab Anim*. 2002;30:407-414.

12. Heimdal JH, Aarstad HJ, Aakvaag A, Olofsson J. In vitro T-lymphocyte function in head and neck cancer patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 1997; 254:318–322.

13. Boyum A. Isolation of human blood monocytes with Nycodenz, a new non-ionic iodinated gradient medium. *Scand J Immunol* .1983;17:429–436.

14. Elkord E, Williams PE, Kynaston H, Rowbottom AW. Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells. *Immunology*. 2005;114:204-212.

15. Balls M, Goldberg AM, Fentem JH, Feutem JH, Broadhead CL, Burch RL, et al. The three Rs: the way forward The report and recommendations of ECVAM Workshop11. *Altern Lab Anim*. 1995;23:838-866.

16. Faser MJ. The baculovirus-infected insect cell as a eukaryotic gene expression system. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1992;158:131-172.

17. Jarvis DL. Baculovirus expression vectors. A review and update. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1991;646:240-247.

18. Badrul AH, Aminuddin BS, Sharaf I, Samsudin OC, Munirah S, Ruszymah BH. The effects of autologous human serum on the growth of tissue engineered human articular cartilage. *Med J Malaysia*. 2004;59:11-12.

19. Kamil SH, Kojima K, Vacanti MP, Zaporojan V, Vacanti CA, Eavey RD. Tissue engineered cartilage: utilization of autologous serum and serum-free media for chondrocyte culture. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2007;71:71-75.

20. Chua KH, Aminuddin BS, Fuzina NH, Ruszymah BH. Basic fibroblast growth factor with human serum supplementation: enhancement of human chondrocyte proliferation and promotion of cartilage regeneration. *Singapore Med J*. 2007;48:324-332.

21. Abediankenari S, Ghasemi M.Generation of Immune inhibitory dendritic cell and CD4+ Regulatory T cells Inducing by TGF-β. *Iranian Jornal of Allergy Asthma Immunol*. 2009;8:25-30.

22. Haringman JJ, Gerlag DM, Smeets TJ, Baeten D, Bosch FVD, Bresnihan B, et al. A randomized controlled trial with an Anti-CCL2 (Anti–Monocyte Chemotactic Protein 1) monoclonal antibody in patients with rheumatoid Arthritis. *Arthritis*. 2006;54:2387-392.

23. Aung H, Sherman J, Tary-Lehman M, Toossi Z. Analysis of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) expression in human monocytes infected with Mycobacterium avium at a single cell level by ELISPOT assay. *J Immunol Methods*. 2002;259:25-32.

24. Kuhara M, Takeyama H, Tanaka T, Matsunaga T. Magnetic cell separation using antibody binding with protein A expressed on bacterial magnetic particles. *Anal Chem*. 2004;76:6207-6213.