

Increased resistance of diabetic mitochondria to ischemia-reperfusion myocardial injury

Mitochondrie v akútne diabetickom myokarde vykazujú zvýšenú odolnosť proti ischemicko-reperfúznemu poškodeniu

Muráriková M¹, Ferko M¹, Barteková M¹, Waczulíková I², Ledvényiová V¹, Ziegelhoffer A¹

Ústav pre výskum srdca SAV, Bratislava, Slovenská republika

Murarikova M, Ferko M, Bartekova M, Waczulikova I, Ledvenyiova V, Ziegelhoffer A. **Increased resistance of diabetic mitochondria to ischemia-reperfusion myocardial injury.** Cardiology Lett. 2013;22(3):249–261

Abstract. Ischemic heart disease is a leading cause of mortality. To study this disease ischemia – reepfusion injury (IRI) models are widely used inasmuch as they mimic the process of transient blockade and subsequent recovery of coronary blood supply. Diabetes mellitus (DM) is known as a risk factor of ischemic heart disease. Nevertheless, experimental studies have revealed that myocardium is capable of partial adaptation to the mentioned noxa, at least in its acute phase, and this adaptation becomes manifested in enhanced resistance of the heart to IRI-induced arrhythmias. Insufficient oxidative energy production in the heart mitochondria (MIT) is a direct consequence of DM. The resulting energy deficiency may become manifested in abnormal contractility and rhythmicity of heart function. Thus, deficient energy production, originating from alterations on the level of heart MIT represents the point in which DM and IRI meet. The aim of the present study was to reveal the changes induced in heart MIT by adaptation to DM and elucidate the relationship between these changes and the enhanced resistance of diabetic myocardium to IRI.

The authors focused on investigation of changes in membrane fluidity (MF) of the MIT heart and correlation changes in MF with activity MIT Mg^{2+} -ATPase, which occurs when the heart with acute DM undergoes a further IRI. Wistar rats, male, 10 to 12 weeks, 280 ± 20 g, $n = 18$ control hearts (KS), 18 DS, 12/12 h light regime, water and pellets ad libitum, 8-day DM induced by a single i.p. administration of 65 mg.kg⁻¹ streptozotocin. Diabetic condition was controlled by increase of: glucose, cholesterol, triglycerides, glycohemoglobin ($p < 0.01$) and by decrease of insulin ($p < 0.01$). Excision of heart 8th day after streptozotocin. Isolated perfused hearts (Langendorff). Functional and hemodynamic parameters: heart rate (HR), coronary flow (CF), left ventricular systolic pressure (LVSP), left ventricular diastolic pressure (LVDiP), left ventricular developed pressure (LVDP), maximum speed of the rise and decline of left ventricular pressure ($+dP/dt_{max}$; $-dP/dt_{max}$). Experimental protocol: 15 min stabilized perfusion (SP), 30 min global ischemia, 40 min post ischemic reperfusion.

Isolation MIT: differential centrifugation. Determinations: current and total activity of MIT Mg^{2+} -ATPase stimulated by 2,4-dinitrophenol, MF - fluorescence anisotropy DPH. Initial functional and hemodynamic parameters after SP in DS showed lower HR values and higher values of $+dP/dt_{max}$ and $-dP/dt_{max}$ than in KS. Statistical significance was absent everywhere. The default values for SP were in the same DS and KS. Reperfusion in DS showed a significant increase ($p < 0.05$) in LVDP, $+dP/dt_{max}$ and $-dP/dt_{max}$ compared with KS. Ischemia caused decreased activity of Mg^{2+} -ATPase in both groups at approximately the same numerical value. Reperfusion of KS caused a further decrease of enzyme activity, in DS the other hand, enzyme activity increased ($p < 0.05$), even slightly above the baseline after SP. This demonstrates the greater ability of recovery in DS. The default value for SP showed that mitochondrial membrane of DS were more fluid than membranes of KS. Ischemia caused a statistically significant increase of fluorescence anisotropy ($p < 0.05$) thus, the MF decline in both groups at approximately the same numerical value. Reperfusion caused a further

Z Ústavu pre výskum srdca SAV, Centrum excelentnosti NOREG v Bratislave
a ²Katedry jadrovej fyziky a biofyziky, Fakulta matematiky, fyziky a informatiky, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovenská republika

Do redakcie prišlo dňa 30. augusta 2012; prijaté dňa 31. októbra 2012

Adresa pre korešpondenciu: Ing. Miroslav Ferko, PhD., Ústav pre výskum srdca SAV, Dúbravská cesta 9, P.O.Box 104, 840 05 Bratislava 45, Slovenská republika, e-mail: usrdmife@savba.sk

decrease in MF in KS, whereas in the DS, the value of MF did not change. In the diabetic group, the cardiac functional parameters, the membrane fluidity of heart mitochondria and activity of MIT Mg^{2+} -ATPase, during post ischemic reperfusion significantly improved ($p < 0.05$), while in the hearts of the control group post ischemic reperfusion examined parameters did not improve. Our findings confirm the positive contributions of endogenous protective mechanisms, which caused the partial adaptation of diabetic hearts to ischemia – reperfusion injury. Fig. 8, Tab. 4, Ref. 28, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Key words: heart mitochondria – ischemia/reperfusion damage – diabetes mellitus – endogenous protective mechanisms

Muráriková M, Ferko M, Barteková M, Waczulíková I, Ledvényiová V, Ziegelhöffer A. **Mitochondrie v akútne diabetickom myokarde vykazujú zvýšenú odolnosť proti ischemicko-reperúznemu poškodeniu.** Cardiology Lett. 2013;22(3):249–261

Abstrakt. Ischemická choroba srdca sa zaraďuje medzi vedúce príčiny mortality. Na štúdium tohto ochorenia sa často využívajú modely ischemicko-reperúzneho poškodenia (IRI), lebo simulujú prechodnú blokádu a následnú obnovu prívodu krvi do koronárneho riečiska. Diabetes mellitus (DM) sa považuje za rizikový faktor ischemickej choroby srdca, avšak experimentálne štúdie preukázali, že myokard má schopnosť čiastočnej adaptácie na túto noxu, čo sa prinajmenšom v akútnej fáze ochorenia prejavuje vo zvýšenej rezistencii diabetického srdca proti arytmiám vyvolaným akútnym IRI. Priamym dôsledkom DM je nedostatočnosť oxidačnej produkcie energie v srdcových mitochondriách (MIT), a tá sa môže odzrkadliť v abnormalitách v kontraktilite a rytmičke činnosti srdca. Bodom, ktorý spája DM a IRI, je teda energetická nedostatočnosť, ktorá tkvie v zmenách na úrovni srdcových MIT. Cieľom práce bolo odhaliť, aké zmeny vyvolá adaptácia buniek myokardu na DM na úrovni srdcových MIT a objasniť vzťah medzi týmito zmenami a zvýšenou rezistenciou diabetického myokardu proti IRI.

Zamerali sme sa na zmeny membránovej fluidity (MF) srdcových MIT a súvislosť zmien MF s aktivitou MIT Mg^{2+} -ATPázy, ku ktorým dochádza, ak srdce s akútnym DM podrobíme aj ďalšiemu IRI. Potkany Wistar, samce, 10 – 12 týždňov, 280 ± 20 g, $n = 18$ kontrolné srdcia (KS), 18 diabetické srdcia (DS), 12/12 h svetelný režim, voda, pelety *ad libitum*, osemďňový DM vyvolaný jednorazovým i.p. podaním $65 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ streptozotocínu. Diabetický stav kontrolovaný zvýšením glukózy, cholesterolu, triacylglycerolov, glykohemoglobínu ($p < 0,01$), poklesom inzulínu ($p < 0,01$). Kardektómia 8. deň po streptozotocíne. Izolované perfundované srdce (Langendorff). Funkčné a hemodynamické parametre: frekvencia činnosti srdca (HR), koronárny prietok (CF), ľavokomorový systolický tlak (LVSP), ľavokomorový diastolický tlak (LVDiP), tlak vyvinutý v ľavej komore srdca (LVDP), maximálna rýchlosť vzostupu a poklesu ľavokomorového tlaku ($+dP/dt_{\max}$; $-dP/dt_{\max}$). Experimentálny protokol: 15 minút stabilizovaná perfúzia (SP), 30 minút globálna ischemia, 40 minút postischemická reperfúzia. Izolácia MIT: diferenciálna centrifugácia. Stanovenia: aktivita aktuálnej a totálnej 2,4- dinitrofenolom stimulovanej MIT Mg^{2+} -ATPázy, MF – fluorescenčná anizotropia DPH. Východiskové funkčné a hemodynamické parametre po SP ukázali pri DS nižšie hodnoty HR a vyššie hodnoty $+dP/dt_{\max}$ a $-dP/dt_{\max}$ ako v KS. Štatistická významnosť všade absentovala. Východiskové hodnoty po SP boli pri DS aj KS rovnaké. Reperfúzia ukázala pri DS signifikantné zvýšenie ($p < 0,05$) u LVDP, $+dP/dt_{\max}$ a $-dP/dt_{\max}$ v porovnaní s KS. Ischemia vyvolala pokles aktivity Mg^{2+} -ATPázy v oboch skupinách na približne rovnakú číselnú hodnotu. Reperfúzia v KS vyvolala ďalší pokles aktivity enzýmu, pri DS sa naopak aktivita enzýmu zvýšila ($p < 0,05$), dokonca mierne nad úroveň východiskovej hodnoty po SP. Poukazuje to na väčšiu schopnosť zotavovania pri DS. Východiskové hodnoty po SP ukázali, že mitochondriové membrány z DS boli fluidnejšie ako membrány z KS. Ischemia spôsobila štatisticky významné zvýšenie fluorescenčnej anizotropie ($p < 0,05$), čiže pokles MF v oboch skupinách na približne rovnakú číselnú hodnotu. Reperfúzia spôsobila ďalší pokles MF v KS, kým pri DS sa hodnota MF už nezmenila. V diabetickej skupine sa funkčné parametre srdca, membránová fluidita srdcových mitochondrií, ako aj aktivita MIT Mg^{2+} -ATPázy počas postischemickej reperfúzie významne zlepšovali ($p < 0,05$), kým v skupine kontrolných srdc postischemická reperfúzia skúmané parametre nezlepšovala. Naše nálezy potvrdili pozitívnu účasť endogénnych ochranných mechanizmov, ktoré vyvolali v diabetických srdciach čiastkovú adaptáciu na ischemicko-reperúzne poškodenie. Obr. 8, Tab. 4, Lit. 28, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Kľúčové slová: srdcové mitochondrie – ischemicko-reperúzne poškodenie – diabetes mellitus – endogénne ochranné mechanizmy

Ischemická choroba srdca a diabetes mellitus sú príčinou vysokého percenta ochorení. Ischemia je vždy spojená s nedostatkom kyslíka a práve tento bod spája ischemiu myokardu s diabetes mellitus, i keď v posledne menovanom nedostatok kyslíka nie je zapríčinený jeho absenciou, ale narušenou schopnosťou mitochondrií diabetického srdca utilizovať kyslík (1).

Ischemia spolu s reperúziou, rovnako ako diabetes mellitus, vedú v myokarde aj k jeho preťaženiu vnútrobuníkovým Ca^{2+} . Okrem účinkov nedostatku kyslíka a preťaženia vápnikom sú diabetické a postischemicky reperfundované srdcia vystavené aj účinkom voľných radikálov, ale všetky tieto patologické impulzy súčasne indukujú aj endogénne ochranné mechanizmy, ktoré sa podieľajú na zachovaní

funkcie srdca (2). Na základe toho možno predpokladať, že diabetické srdcia sa správajú tak, akoby trvalo prekonávali ischemicko-reperfúzne poškodenie, na ktoré sa čiastočne adaptujú, a preto je pravdepodobné, že diabetické srdcia budú rezistentnejšie proti ischemicko-reperfúznemu poškodeniu ako srdcia zo zdravých kontrolných zvierat.

Procesy v diabetických srdciach vystavených ischemicko-reperfúznemu poškodeniu boli predmetom skúmania početných štúdií, a to aj zo zorného uhla subcelulárnych membránových systémov a organel, z ktorých prekvapujúco azda najmenej boli skúmané mitochondrie a v rámci nich zmeny vo vlastnostiach mitochondriovej membrány a funkcie do nej zabudovanej Mg^{2+} -ATPázy. V situáciách charakterizovaných preťažením kardiomyocytov vápnikom sa v mitochondriových membránach dokázalo zvýšené vytváranie energie transportujúcich pórov (3).

S týmto procesom súvisí aj zmena morfológie mitochondriovej membrány (4, 5).

Cieľom štúdie bolo vyšetriť zmeny membránovej fluidity srdcových mitochondrií a súvislosť zmien fluidity s aktivitou mitochondriovej Mg^{2+} -ATPázy, ku ktorým dochádza, ak srdce s akútnym diabetes mellitus podrobíme aj ďalšiemu ischemicko-reperfúznemu poškodeniu.

Legalita experimentov

Všetky experimenty boli vykonané v súlade s požiadavkami stanovenými Štátnou veterinárnou a potravinovou správou Slovenskej republiky, podľa zbierky zákona 289/2003 o veterinárnej starostlivosti na ochranu zvierat používaných na pokusné alebo iné vedecké účely a tiež boli schválené Etickou komisiou Ústavu pre výskum srdca SAV, kde boli experimenty následne vykonané.

Experimentálne zvieratá

Na experimenty sme použili samce potkana laboratórneho (*Rattus norvegicus*) kmeňa Wistar z chovnej stanice Dobrá voda, Slovenská republika. Potkany boli vo veku 10 – 12 týždňov s hmotnosťou od 280 ± 20 g. Zvieratá boli chované skupinovo v klietkach (max. 5 zvierat v jednej klietke) v podmienkach s prirodzeným svetelným režimom (12 h svetlo, 12 h tma) pri teplote 22 °C. Kŕmené boli štandardnou peletovou potravou a s prístupom k vode *ad libitum*.

Metódy

Vyvolanie akútneho diabetes

Akútny diabetes mellitus (DM) bol u potkanov vyvolaný jednorázovým intraperitoneálnym podaním streptozotocínu

(STZ) v dávke $65 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ktorý bol rozpustený v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ citrátového tlmivého roztoku, pH = 4,0. Vývoj ochorenia sme denne kontrolovali sledovaním glykémie pomocou GLU-KOPHAN prúžkov (Pliva-Lachema, Brno, Česká republika).

Meranie systolického krvného tlaku a frekvencie srdca

Niekoľko dní pred koncom experimentu sme merali u kontrolnej, ako i streptozotocínom ovplyvnenej experimentálnej skupiny na chvostovej artérii potkanov systolický krvný tlak a frekvenciu srdca. Na meranie týchto parametrov sme použili metódu neinvazívnej pletysmografie (PowerLab 4/30; ADInstruments, Spechbach, Germany).

Anestéza

Pred uskutočnením každého experimentu boli všetky zvieratá anestézované roztokom tiopentalu v dávke 50 – 60 mg/kg, ktorý sa podával intraperitoneálne spolu s heparínom (500 IU i.p.; Léčivá, Česká republika), aby sa zabránilo vzniku krvných zrazenín.

Určenie metabolického stavu zvierat

Na určenie metabolického stavu zvierat sme nalačno odoberali na stanovenie glukózy, inzulínu, cholesterolu, triacylglycerolov a glykohemoglobínu krv z chvostovej vény pred začatím pokusu. Jednotlivé hladiny metabolických parametrov boli stanovené s použitím komerčných kitov.

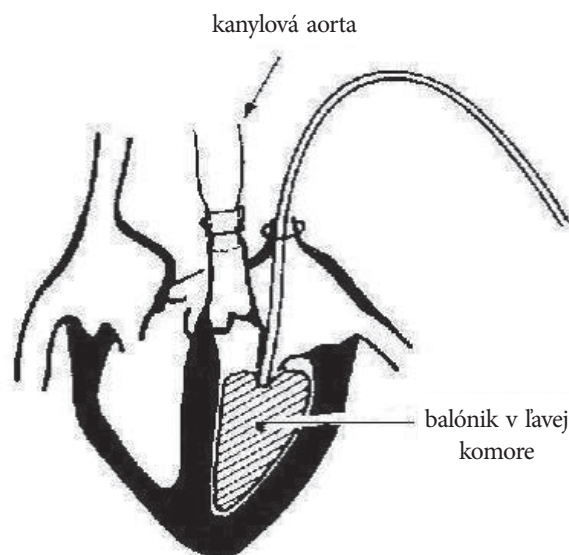
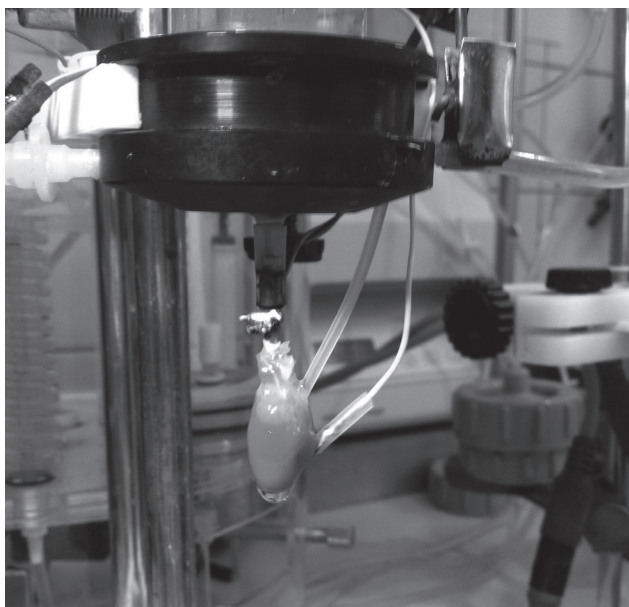
Model izolovane perfundovaného srdca potkana (podľa Langendorffa)

V experimentoch sa použila metóda retrográdnej perfúzie srdca potkana podľa Langendorffa, ktorá prebiehala v špeciálnej aparatúre, kde boli srdcia kanylované a perfundované cez vypreparovanú aortu pri konštantnom tlaku 75 mmHg a teplote 37 °C (obrázok 1) (6).

Experimentálny protokol

Samce potkanov s hmotnosťou 280 ± 20 g boli rozdelené do šiestich experimentálnych skupín s počtom šesť zvierat v každej skupine:

1. **Kontrolná skupina (K1)** – 15-minútová stabilizovaná perfúzia izolovaného srdca
2. **Kontrolná skupina (K2)** – 15-minútová stabilizovaná perfúzia izolovaného srdca a 30-minútová globálna ischemia
3. **Kontrolná skupina (K3)** – 15-minútová stabilizovaná perfúzia izolovaného srdca, 30-minútová globálna ischemia a následná 40 minútová reperfúzia



Obrázok 1 Model izolovaného perfundovaného srdca potkana (podľa Langendorffa)

Figure 1 Model of isolated perfused rat heart (according to Langendorff)

Vľavo: Znáznornenie umiestnenia srdca do perfúzneho zariadenia, zavedenie balónika. Na hrot srdca sme zaviedli malú elektródu, ktorá nám slúžila na meranie elektrickej aktivity srdca. (Left: Location of the heart in the perfusion device, introduction of the balloon. To the apex of the heart, fixation of a small electrode that serves for monitoring the electric activity of the heart). Vpravo: Schematické znázornenie zavedenia kanyly a balónika do izolovaného perfundovaného srdca potkana. Srdcia boli kanylované a perfundované roztokom Krebs-Henseleitom (37 °C), ktorý obsahoval glukózu, O_2 , CO_2 a všetky nevyhnutné ióny. Do ľavej komory sme na meranie tlaku zaviedli poddajný balónik, ktorý bol naplnený vodou, (upravené podľa 6). [Right: Schematic presentation of introduction of the aortic cannula and a balloon into the isolated perfused rat heart. Cannulated hearts were perfused with Krebs-Henseleit solution (37 °C), containing glucose and all necessary ions and were gassed with O_2 , CO_2 . Into the left ventricle was placed a flexible water filled balloon for measuring the developed pressure (modified according to 6)].

4. **Skupina s akútnym streptozotocínovým (STZ1) diabetes mellitus** – 15-minútová stabilizovaná perfúzia izolovaného srdca
5. **Skupina s (STZ2) diabetes mellitus** – 15-minútová stabilizovaná perfúzia izolovaného srdca a 30-minútová globálna ischémia
6. **Skupina s (STZ3) diabetes mellitus** – 15-minútová stabilizovaná perfúzia izolovaného srdca, 30-minútová globálna ischémia a následná 40-minútová reperfúzia

Izolácia srdcových mitochondrií

Po ostrihaní veľkých ciev, perikardu a všetkých tukových častíc vložíme srdce do kadičky, do ktorej prikvapkáme malé množstvo izolačného roztoku 1 (Izo 1= roztok obsahuje 180 mmol . l⁻¹ KCl, 4 mmol.l⁻¹ EDTA a 1 % hovädzieho albumínového séra, pH 7,4). Srdce striháme nožnicami na malé kúsky, kým nevznikne kašovitá hmota. Následne pridáme 20 ml ľadového izolačného roztoku 1 a proteázu v množstve 2,5 mg . g⁻¹ tkaniva (Sigma P-6141). Mitochondrie ďalej izolujeme diferenciálnou centrifugáciou. Na začiatku sa odcentrifuguje hrubá mitochondriová frakcia dvoma za sebou idúcimi 10-minútovými centrifugáciami pri otáčkach

3 500 xg. Nasleduje 15-minútová centrifugácia pri otáčkach 8 500 xg, ktorou vyizolujeme samotné mitochondrie. Na záver mitochondrie opätovne centrifugujeme 15 minút pri otáčkach 8 500 xg s izolačným roztokom 2 (Izo 2 = roztok už neobsahuje albumín, obsahuje len 180 mmol.l⁻¹ KCl, 4 mmol.l⁻¹ EDTA).

Biochemické a biofyzikálne stanovenia

Aktivita mitochondriovej Mg^{2+} -ATPázy sa merala na základe množstva Pi uvoľneného štiepením ATP spektrofotometricky pri 700 nm.

Na stanovenie bielkovín sme použili metódu podľa (7).

Fluidita lipidovej vrstvy mitochondriovej membrány bola stanovená počas merania fluorescenčnej anizotropie lipofilnou fluorescenčnou sondou 1,6-difenyl-1,3,5-hexatriénu (DPH, Aldrich), alebo jeho kationového derivátu (1-[4(trimetylamino)fenyl]-6-fenyl-1,3,5- hexatrién (TMA-DPH, Aldrich). Sonda sa automaticky začleňuje do vnútornej membrány MIT. Závisí od fluidity lipidovej vrstvy a pohyb je spojený s poklesom fluorescenčného signálu. Membránová fluidita je vyjadrená ako recipročná hodnota fluorescenčnej anizotropie.

Štatistická analýza

Rozdiely medzi jednotlivými skupinami sme porovnávali a vyhodnocovali nepárovým štatistickým Studentovým t-testom. Hodnoty sme zaznamenávali ako priemerné hodnoty $\pm$ stredná chyba priemeru (S.E.M.), alebo ako $\pm$ smerodajná odchýlka (S.D.) Za signifikantne významnú sme považovali hodnotu * $p < 0,05$ a # $p < 0,01$.

Výsledky

Metabolické parametre experimentálnych zvierat

Metabolické vyšetrenie potkanov ukázalo zmenené hodnoty diabetických zvierat oproti kontrolným. Diabetický stav

experimentálnych zvierat bol potvrdený 250 %-ným zvýšením hladiny glukózy a 58 %-ným zvýšením obsahu glykohemoglobínu v krvi, ako aj 281 %-ným nárastom koncentrácie triacylglycerolov a 57 %-ným nárastom koncentrácie cholesterolu v sére oproti kontrolným zvieratám. Hladina inzulínu v sére naopak klesla o 53 % (tabuľka 1).

Hemodynamické parametre izolovaného srdca potkana

Frekvencia srdca sa postupne zvyšovala od 5. minúty začatia reperfúzie, až do 30. minúty jej priebehu, kde nárast predstavoval 67,3 % a v ďalšom sa udržiaval približne na rovnakej úrovni. Koronárny prietok javil po jeho zvýšení na začiatku reperfúzie klesajúcu tendenciu s maximálnym poklesom v 40. min o 26,9 %. Počas reperfúzie postupne klesal

Tabuľka 1 Metabolické parametre experimentálnych zvierat

Table 1 Metabolic parameters of experimental animals

	Zdravé kontrolné potkany (K) (Healthy control rats)	Diabetické potkany (DIA) (Diabetic rats)	Signifikancia (Significance)
Glukóza (glucose) (mmol/l)	5,23 $\pm$ 0,14	18,28 $\pm$ 0,91**	$p < 0,01$
Triacylglyceroly (triglycerides) (g/l)	1,23 $\pm$ 0,11	4,69 $\pm$ 0,33**	$p < 0,01$
Cholesterol (g/l)	1,74 $\pm$ 0,12	2,74 $\pm$ 0,11**	$p < 0,01$
Glykohemoglobín (glycohaemoglobin) (%Hb)	4,9 $\pm$ 0,13	7,74 $\pm$ 1,04**	$p < 0,01$
Inzulín (insulin) (ng/ml)	1,04 $\pm$ 0,15	0,49 $\pm$ 0,09**	$p < 0,01$

Výsledky sú udávané ako priemerné hodnoty $\pm$ S.E.M. Signifikancia bola určená Studentovým t-testom (** $p < 0,01$), $n = 18$. Tento stav sprevádzala zvýšená glykozúria, ktorá dosahovala hodnotu 20 – 25 mol. l⁻¹. Z týchto výsledkov vyplýva, že po jednorázovom podaní STZ bol experimentálny diabetes na 8. deň u potkanov už úplne rozvinutý. [Results are means $\pm$ S.E.M. Significances were determined by Student's t-test (** $p < 0.01$), $n = 18$. Diabetic state was accompanied by increased glycosuria reaching 20 to 25 mol.l⁻¹. Results indicated that on the 8th day after administration of a single doses of STZ the diabetes became fully developed].

Tabuľka 2 Charakteristický časový priebeh typického experimentu izolovaného perfundovaného srdca zdravého potkana

Table 2 Characteristic time course of a typical experiment with isolated perfused healthy rat heart

Parameter	Stab. perf.	ISCH	Reperfúzia [čas (min)] Reperfusion [time (min)]							
			5	10	15	20	25	30	35	40
HR (b/min)	319,9	–	146,2	145,1	224,6	236,2	241,7	244,6	245	241,3
CF (ml/min)	7,3	–	10,4	8,6	7,9	7,8	7,7	7,8	7,6	7,6
LVSP (mmHg)	81,2	–	106,8	101,9	96,4	93,0	89,4	90,7	87,8	87,8
LVDiP (mmHg)	4,7	–	92,8	87,3	77,3	73,7	71,4	70,1	69,0	68,0
LVDp (mmHg)	72,2	–	10	12,12	13,59	13,55	13,2	15,1	16,7	17,9
+(dP/dt) _{max} (mmHg/s)	2045	–	281	190	300	377,8	437	481,4	510,1	541,0
-(dP/dt) _{max} (mmHg/s)	1342	–	179	148,3	210	251,2	277,6	305	323	333,5

Výsledky predstavujú reálne namerané hodnoty sledovaných parametrov v jednom vybranom experimente. HR – srdcová frekvencia (b/min); CF – koronárny prietok (ml/min); LVSP – systolický tlak v ľavej komore (mmHg); LVDp – tlak vyvinutý v ľavej komore srdca (LVSP – LVDiP, mmHg); LVDiP – diastolický tlak v ľavej komore (mmHg); $\pm$ (dP/dt)_{max} – maximálna rýchlosť vzostupu a poklesu tlaku v ľavej komore (index kontrakcie/relaxácie, mmHg/s). Stab. Perf. – hodnoty namerané v poslednej 15. minúte stabilizačnej perfúzie. ISCH – hodnoty namerané počas globálnej ischémie. Reperfúzia – hodnoty namerané počas postischemickej reperfúzie v 5-minútových intervaloch. [Results represent actual values monitored in a typical experiment. HR – heart rate (b/min); CF – coronary flow (ml/min); LVSP – left ventricular systolic pressure (mmHg); LVDiP – left ventricular diastolic pressure (mmHg), LVDp – left ventricular developed pressure, (LVSP – LVDiP, mmHg); $\pm$ (dP/dt)_{max} – the maximal velocity of increase and decrease of the left ventricle pressure (an index of contraction/relaxation in mmHg/s). Stab. Perf. – values monitored in the 15th minute of stabilized perfusion. ISCH. – values monitored during 30 min of global ischemia. Reperfusion – values monitored in 5-minute intervals during 40 min of post-ischemic reperfusion].

aj LVSP a ku koncu priebehu predstavoval pokles 17,8 % hodnoty nameranej v 5. min reperfúzie. Podobne sa správal aj LVDiP, ktorý klesol do 40. min o 24,8 mmHg. Tlak vyvinutý v ľavej komore srdca počas reperfúzie postupne stúpala a na konci experimentu dosiahol 79 %-né zvýšenie oproti hodnote nameranej v 5. min reperfúzie. Hodnoty $+dP/dt_{\max}$, aj hodnoty $-dP/dt_{\max}$ taktiež postupne narastali počas celej reperfúznej časti experimentu a po 40. min reperfúzie predstavoval nárast $+dP/dt_{\max}$ o 92 % a $-dP/dt_{\max}$ sa zvýšil o 86 % z hodnoty nameranej v 5 min reperfúzie (**tabuľka 2**).

Frekvencia srdca diabetického potkana postupne stúpala od 5. minúty začatia reperfúzie, až do 40. minúty jej priebehu, kde nárast predstavoval 36,3 %. Koronárny prietok po začiatočnom zvýšení javil počas celej reperfúzie klesajúcu tendenciu s maximálnym poklesom v 35. min o 31,2 % a v ďalšom sa udržiaval približne na rovnakej úrovni. Počas reperfúzie postupne klesal aj LVSP a ku koncu priebehu dosiahol maximálny pokles 5,5 % z hodnoty nameranej v 5. minúte reperfúzie. Hodnota LVDiP v diabetickom srdci mala počas reperfúzie taktiež klesajúcu tendenciu a v 40. min klesla o 27,3 mmHg v porovnaní s 5. min reperfúzie. Tlak vyvinutý v ľavej komore srdca počas reperfúzie postupne stúpala od 5. minúty začatia reperfúzie, až do 35. minúty jej priebehu, kde nárast predstavoval 80,4 % a v ďalšom sa udržiaval približne na rovnakej úrovni. Hodnota $+dP/dt_{\max}$ u diabetických potkanov už 5 minút po reperfúzii výrazne prevyšovala hodnotu tohto parametra u kontrolných zvie-

rat (1842 vs. 281 mmHg). Počas reperfúzie hodnota tohto parametra sa postupne zvyšovala a v 40. minúte predstavovala nárast o 38,6 % v porovnaní s hodnotou 5 minút po reperfúzii. Aj hodnota $-dP/dt_{\max}$ u diabetických potkanov už v 5. minúte po reperfúzii výrazne prevyšovala hodnotu tohto parametra u kontrolných zvierat (1164 vs. 179 mmHg/s). Hodnota tohto parametra v priebehu reperfúzie narastala a ku koncu reperfúzie sa ustálila na hodnote 1623 mmHg, t. j. nárast o 39,4 % z hodnoty nameranej v 5. minúte reperfúzie (**tabuľka 3**).

Funkčné parametre izolovaných perfundovaných srdc sme sledovali v kontrolných a diabetických skupinách experimentálnych zvierat po 15 minútach stabilizačnej perfúzie. Hodnoty parametrov nameraných v tomto čase predstavovali východiskové hodnoty. Medzi jednotlivými experimentálnymi skupinami zvierat sa nejavili žiadne signifikantné rozdiely (**tabuľka 4**).

Po stabilizačnej perfúzii srdc nasledovala 30-minútová globálna ischemia (GI), počas ktorej srdce nepracovalo. Po 30. minúte GI nasledovala bezprostredne 40-minútová reperfúzia, počas ktorej sme zvolené funkčné parametre opäť registrovali. Priemerné hodnoty LVSP u kontrolných aj diabetických zvierat sa po 40-minútovej postischemickej reperfúzii ustálili na úrovni východiskových hodnôt po stabilizačnej perfúzii. Odchýlky od týchto hodnôt nepresahovali 2 %. Z tohto hľadiska sme rozdiely medzi srdcami z diabetických a kontrolných zvierat nepozorovali (**tabuľka 4**).

Tabuľka 3 Charakteristický časový priebeh typického experimentu izolovaného perfundovaného srdca diabetického potkana

Table 3 Characteristic time course of a typical experiment with isolated perfused diabetic rat heart

Parameter	Stab. perf.	ISCH	Reperfúzia [čas (min)] Reperfusion [time (min)]							
			5	10	15	20	25	30	35	40
HR (b/min)	341,9	–	264,2	279,5	391,9	368,8	355,9	313,2	363,7	360,0
CF (ml/min)	12,4	–	18	15,2	14,4	13,2	12,4	12	11,6	11,6
LVSP (mmHg)	71,6	–	86,8	86,7	85,0	83,8	82,5	82,4	82,3	82,0
LVDiP (mmHg)	7,4	–	58,8	59,6	56,7	54,4	53,0	33,3	32,3	31,5
LVDP (mmHg)	64,2	–	28,0	27,1	28,3	29,4	29,5	49,1	50,0	50,5
$+ (dP/dt)_{\max}$ (mmHg/s)	2101	–	1842	1945	2057	2168	2243	2356	2475	2553
$- (dP/dt)_{\max}$ (mmHg/s)	1498	–	1164	1246	1339	1340	1457	1522	1588	1623

Výsledky predstavujú reálne namerané hodnoty sledovaných parametrov v jednom vybranom experimente. HR – srdcová frekvencia (b/min); CF – koronárny prietok (ml/min); LVSP – systolický tlak v ľavej komore (mmHg); LVDP – tlak vyvinutý v ľavej komore srdca (mmHg); LVDiP – diastolický tlak v ľavej komore (mmHg); $\pm (dP/dt)_{\max}$ – maximálna rýchlosť vzostupu a poklesu tlaku v ľavej komore (mmHg/s), stab. perf. – hodnoty namerané v poslednej 15. minúte stabilizačnej perfúzie, ISCH – hodnoty namerané počas globálnej ischemie, reperfúzia – hodnoty namerané počas postischemickej reperfúzie v 5-minútových intervaloch. [Results represent actual values monitored in a typical experiment. HR – heart rate (b/min); CF – coronary flow (ml/min); LVSP – left ventricular systolic pressure (mmHg), LVDiP – left ventricular diastolic pressure (mmHg), LVDP – left ventricular developed pressure, (LVSP – LVDiP, mmHg), $\pm (dP/dt)_{\max}$ – maximal velocity of increase and decrease in the left ventricle pressure (an index of contraction/relaxation in mmHg/s), stab. perf. – values monitored in the 15th minute of stabilized perfusion. ISCH – values monitored during 30 min of global ischemia. reperfusion – values monitored in 5-minute intervals during 40 min of post-ischemic reperfusion].

Tabuľka 4 Funkčné parametre izolovaných perfundovaných srdíc pred ischémiou**Table 4** Functional parameters of isolated perfused hearts prior to ischemia

Skupina (Group)	HR b/min	CF ml/min	LVSP mmHg	LVDiP mmHg	LVDP mmHg	$+(dP/dt)_{\max}$ mmHg/s	$-(dP/dt)_{\max}$ mmHg/s
Kontrolná skupina (Control group)	306,6 ± 15,5	7,5 ± 0,5	81,0 ± 2,4	4,8 ± 0,5	78,9 ± 2,6	2079,0 ± 136,1	1354,6 ± 68,7
Diabetická skupina (Diabetic group)	270,8 ± 19,0	7,8 ± 0,9	83 ± 6,4	5,3 ± 0,9	79,4 ± 7,0	2245,2 ± 145,5	1417,7 ± 140,6

Výsledky sú uvádzané ako priemerné hodnoty ± S.E.M., HR – frekvencia srdca (b/min); CF – koronárny prietok (ml/min); LVSP – systolický tlak v ľavej komore (mmHg); LVDiP – diastolický tlak v ľavej komore (mmHg); LVDP – tlak vyvinutý v ľavej komore (systolicko-diastolický rozdiel ľavokomorového tlaku) (mmHg); $\pm(dP/dt)_{\max}$ – max. rýchlosť vzostupu a poklesu tlaku v ľavej komore (index kontrakcie/relaxácie, mmHg/s); n = 18. [Results are means ± S.E.M., HR – heart rate (b/min); CF – coronary flow (ml/min); LVSP – left ventricular systolic pressure (mmHg); LVDiP – left ventricular diastolic pressure (mmHg); LVDP – left ventricular developed pressure, (LVSP – LVDiP, mmHg); $\pm(dP/dt)_{\max}$ – maximal velocity of increase and decrease of the left ventricle pressure (an index of contraction/relaxation in mmHg/s); n=18].

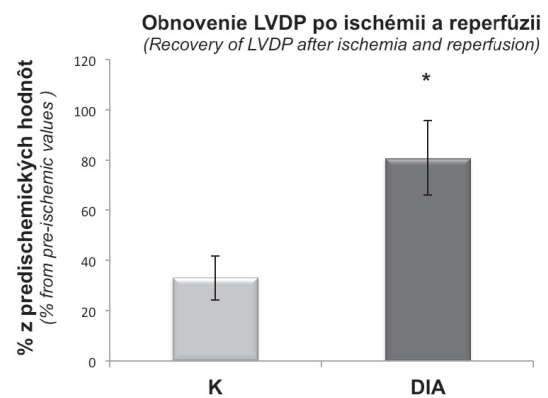
Postischemická reperfúzia ukázala významný pokles priemerných hodnôt LVDP v porovnaní s východiskovými hodnotami. Tento pokles dosiahol v kontrolnej skupine 54 zvierat hodnotu 67 %, kým v skupine diabetických zvierat iba 19 %. Rozdiel medzi kontrolnou a diabetickou skupinou zvierat svedčí o štatisticky významnom ($p < 0,05$) obnovení funkčného parametru LVDP, ktoré dosiahlo $33 \pm 8,7$ %, z východiskových hodnôt pri kontrolách v porovnaní s 81 ± 15 % v diabetickej skupine (obrázok 2).

Obnova koronárneho prietoku a frekvencie činnosti srdca po postischemickej reperfúzii u kontrolných a diabetických zvierat nevykazovala žiadne významné rozdiely (tabuľka 4). Na rozdiel od týchto dvoch parametrov však ukazovatele kontrakcie a relaxácie $+dP/dt_{\max}$ a $-dP/dt_{\max}$ ukázali významné rozdiely. Počas 30 minút GI srdca stáli. Po obnove perfúzie došlo k obnoveniu $+dP/dt_{\max}$ u diabetických zvierat na 81 ± 16 % z východiskových predischemických hodnôt. V skupine kontrolných srdc sa tento parameter obnovil iba na 34 ± 12 % z východiskových hodnôt (obrázok 3 A). Rozdiel medzi obnovou $+dP/dt_{\max}$ v oboch skupinách zvierat bol signifikantne vyšší v prospech diabetických zvierat ($p < 0,05$).

Pri parametre $-dP/dt_{\max}$ sme v skupine kontrolných zvierat pozorovali obnovu na 33 ± 11 % z východiskových hodnôt. U diabetických zvierat sa tento parameter obnovil na hodnotu 78 ± 16 % z východiskovej hodnoty pred ischémiou, t. j. po stabilizovanej perfúzii (obrázok 3 B). Rozdiel medzi obnovou $-dP/dt_{\max}$ u kontrolných a diabetických zvierat bol signifikantne vyšší v prospech diabetických zvierat ($p < 0,05$).

Aktivita mitochondriovej Mg^{2+} -ATPázy

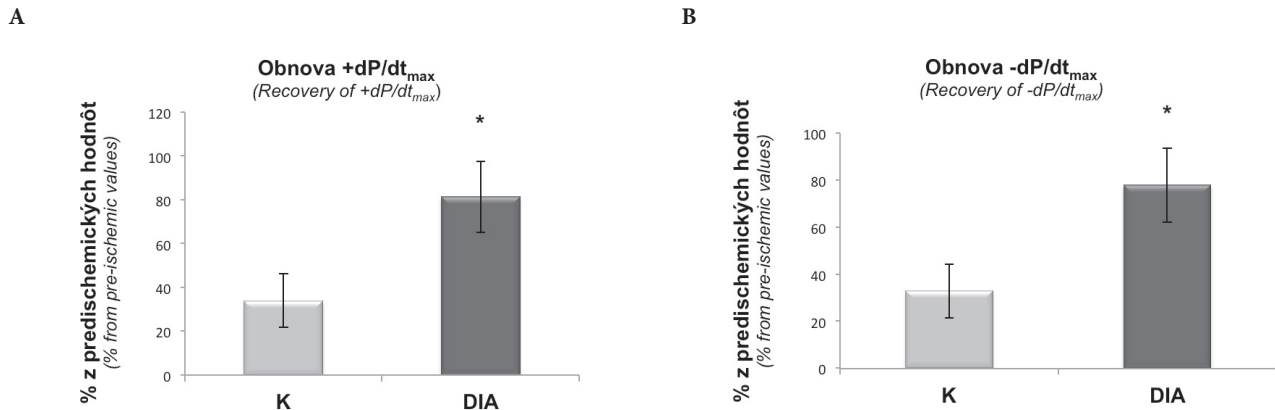
Výsledky ukázali, že u kontrolných zvierat dochádza po 30-minútovnej GI k signifikantnému poklesu ($p < 0,01$) aktivity mitochondriovej Mg^{2+} -ATPázy. Tento pokles predstavuje 20,4 % a prejavuje sa približne rovnako v aktuálnej aj totálnej aktivite enzýmu (obrázok 4).

**Obrázok 2 Obnovenie LVDP po postischemickej reperfúzii vyjadrené v percentách z východiskových predischemických hodnôt****Figure 2** Recovery of LVDP after post-ischemic reperfusion expressed in percentage of the pre-ischemic baseline values

Výsledky predstavujú aritmetický piemer ± S.E.M., LVDP – tlak vyvinutý v ľavej komore, K – kontrolná skupina zvierat, DIA – diabetická skupina zvierat. Signifikancia bola určená Studentovým t-testom (* $p < 0,05$ K vs. DIA), n = 18. [Results represent means ± S.E.M., LVDP – left ventricular developed pressure, K – group of control animals, DIA – group of diabetic animals. Significances were determined by Student's t-test (* $p < 0,05$ K vs. DIA), n=18].

Nález naznačuje, že fragilita MIT membrán v preparáte nevykazuje počas celého experimentu významnejšie zmeny. Postischemická reperfúzia nediabetických srdc viedla oproti východiskovej hodnote po stabilizovanej perfúzii k poklesu aktivity MIT Mg^{2+} -ATPázy so signifikanciou $p < 0,01$. Avšak vzhľadom na hodnotu po ischémií už nepriniesla žiadne významnejšie zmeny v aktivite enzýmu.

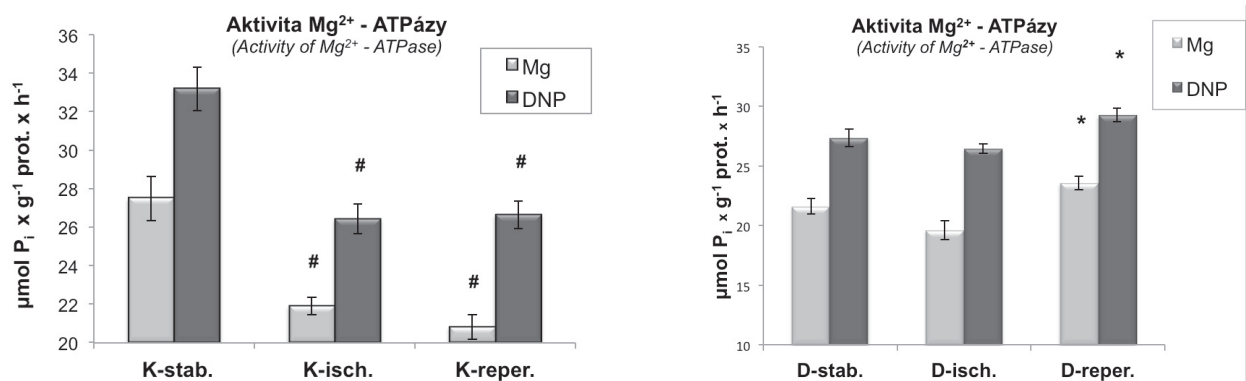
Pri diabetických srdciach, ktoré mali po stabilizačnej perfúzii nižšie východiskové hodnoty aktivity Mg^{2+} -ATPázy, spôsobila 30-minútová ischémiia iba nesignifikantný pokles v aktivite enzýmu, čo predstavovalo 3,34 %. Reperfúzia naopak



Obrázok 3 Obnovenie $+dP/dt_{\max}$ (A) a $-dP/dt_{\max}$ (B) po postischemickej reperfúzii vyjadrené v percentách z východiskových predischemických hodnôt

Figure 3 Recovery $+dP/dt_{\max}$ (A) and $-dP/dt_{\max}$ (B) after a postischemic reperfusion expressed in percentage of pre-ischemic baseline values were determined by Student's *t*-test (* $p < 0.05$ K vs. DIA), $n = 18$].

Výsledky predstavujú aritmetický piemer $\pm$ S.E.M., $+dP/dt_{\max}$ – maximálna rýchlosť zvýšenia tlaku v ľavej komore, $-dP/dt_{\max}$ – maximálna rýchlosť zníženia tlaku v ľavej komore, K – kontrolná skupina, DIA – diabetická skupina. Signifikancia bola určená Studentovým *t*-testom (* $p < 0,05$ K vs. DIA), $n = 18$. [Results represent means $\pm$ S.E.M., $+dP/dt_{\max}$ – maximum speed of pressure-development in the left ventricle, $-dP/dt_{\max}$ – maximum speed of decrease in the left ventricular pressure, K – control group, DIA – diabetic group. Significances were determined by Student's *t*-test (* $p < 0.05$ K vs. DIA), $n = 18$].



Obrázok 4 Zmeny aktuálnej a totálnej aktivity Mg^{2+} -ATPázy (DNP stimulovanej aktivity Mg^{2+} -ATPázy) v mitochondriách zo srdc zdravých kontrolných potkanov po 15-minútovej stabilizovanej perfúzii, 30-minútovej globálnej ischémii a 40-minútovej reperfúzii

Figure 4 Changes in actual and total activities Mg^{2+} -ATPase (DNP-stimulated Mg^{2+} -ATPase) in mitochondria from hearts of normal control rats after 15 min. of stabilized perfusion, after 30 minutes of global ischemia and after 40 minutes of reperfusion

Výsledky sú vyjadrené ako priemerné hodnoty $\pm$ S.E.M.; K-stab. – kontrolné hodnoty zvierat po stabilizačnej perfúzii; K-isch. – kontrolné hodnoty zvierat po 30-minútovej globálnej ischémii; K-reper. – kontrolné hodnoty zvierat po 40-minútovej reperfúzii, Mg – aktuálna aktivita Mg^{2+} -ATPázy, DNPtotálna, dinitrofenolom stimulovaná aktivita Mg^{2+} -ATPázy. Signifikancia bola určená Studentovým *t*-testom; # $p < 0,01$ (K-stab. vs K-isch.; K-stab. vs K-reper.); $n = 6$.

[Results are means $\pm$ S.E.M., K-stab. – control values after stabilized perfusion, K-isch. – control values after 30 minutes of global ischemia, K-reper. – control values after 40 minutes of reperfusion, Mg – the actual activity of Mg^{2+} -ATPase, DNP-total, activity of the dinitrophenol-stimulated Mg^{2+} -ATPase. Significances were determined by Student's *t*-test, # $p < 0.01$ (K-stab. vs K-isch.; K-stab. vs K-reper.); $n = 6$].

Obrázok 5 Zmeny aktuálnej a totálnej aktivity Mg^{2+} -ATPázy (DNP stimulovanej aktivity Mg^{2+} -ATPázy) v mitochondriách zo srdc akútne diabetických potkanov po 15-minútovej stabilizačnej perfúzii, 30-minútovej globálnej ischémii a 40-minútovej postischemickej reperfúzii

Figure 5 Changes in actual and total activity of Mg^{2+} -ATPase (DNP-stimulated activity of Mg^{2+} -ATPase) in mitochondria from the hearts of acutely diabetic rats after 15 min. stabilized perfusion, after 30 min. global ischemia and after 40 min. postischemic reperfusion

Výsledky sú udávané ako priemerné hodnoty $\pm$ S.E.M. D-stab. – hodnoty po 15-minútovej stabilizačnej perfúzii srdc diabetických potkanov, D-isch. – hodnoty po 30-minútovej globálnej ischémii srdc diabetických potkanov, D-reper. – hodnoty po 40-minútovej postischemickej reperfúzii srdc diabetických potkanov. Signifikancia bola určená Studentovým *t*-testom, * $p < 0,05$ (D-stab. vs. D-reper.), $n = 6$. [Results are means $\pm$ S.E.M., D-stab. – values after 15 min. stabilized perfusion of the hearts of diabetic rats, D-isch. – value after 30 min. global ischemia of diabetic rat hearts, D-reper. – value after 40 min. post-ischemic reperfusion of diabetic rat hearts. Significances were determined by Student's *t*-test, * $p < 0.05$ (D-stab. vs. D-reper.), $n = 6$].

signifikantne vylepšuje ($p < 0,05$) aktivitu obidvomi spôsobmi stanovenej MIT Mg^{2+} -ATPázy (**obrázok 5**). Išlo najmä o 6,9 %-ný nárast totálnej aktivity Mg^{2+} -ATPázy.

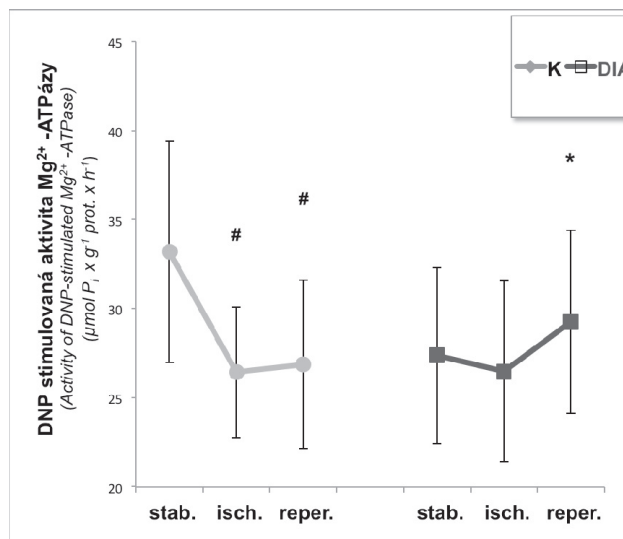
Vzhľadom na vyššie špecifické hodnoty, a teda aj na presnejšie meranie sme usúdili, že ďalej je výhodnejšie hodnotiť aktivitu totálnej Mg^{2+} -ATPázy, ktorá nie je zaťažovaná možnými malými rozdielmi vo fragilitě MIT membrán v jednotlivých preparátoch. Predchádzajúce závislosti ešte názornejšie demonštruje **obrázok 6**.

Membránová fluidita mitochondrií

Fluidita MIT membrány je vyjadrená ako recipročná hodnota fluorescenčnej anizotropie DPH. Tento fyzikálny parameter odzrkadľuje stupeň usporiadania acylových reťazcov fosfolipidov v membráne. To znamená, že čím sú menej acylové reťazce fosfolipidov paralelne postláčané, tým viac sa DPH sonda ponorí do lipidovej vrstvy. Tým je lipidová vrstva membrány fluidnejšia a tým je fluorescenčný signál menej intenzívny. Získané výsledky sú uvedené na **obrázku 7 A** a **7 B** a vyplýva z nich, že v priebehu experimentu sme pozorovali signifikantný nárast fluorescenčnej anizotropie (teda pokles fluidity MIT membrány), a to tak v skupine kontrolných, ako aj v skupine diabetických zvierat.

Z **obrázku 7 A** taktiež vyplýva, že zistené zvýšenie anizotropie v kontrolnej skupine vyvolané ischemiou signifikantne prevyšovalo ($p = 0,05$) východiskové hodnoty tohto parametra stanovené po stabilizačnej perfúzii, t. j. na začiatku pokusu. Postischemická reperfúzia viedla k ďalšiemu poklesu membránovej fluidity so signifikanciou $p < 0,01$ oproti východiskovej hodnote po stabilizačnej perfúzii. Avšak vzhľadom na hodnotu po ischemii tento vzostup už nedosahoval štatistickú významnosť.

Podobný nárast anizotropie sme pozorovali aj v membránach MIT u skupiny diabetických zvierat, pričom aj v tomto prípade išlo o zmeny štatisticky významné ($p < 0,05$). To poukazuje na skutočnosť, že ischemia s postischemickou reperfúziou vedú k štatisticky významnému poklesu fluidity lipidovej dvojvrstvy aj v membránach MIT z diabetických srdiec. Pri určovaní aktivity MIT Mg^{2+} -ATPázy sme pozorovali, že u nediabetických zvierat bola východisková hodnota aktivity enzýmu po stabilizačnej perfúzii signifikantne vyššia ($p < 0,01$) ako u diabetických zvierat (**obrázok 4**). Z tohto hľadiska bolo zaujímavé zistiť, či aj východiskové hodnoty DPH anizotropie sa budú pohybovať podobným spôsobom. Naše nálezy ale na **obrázku 8** ukázali, že východiskové hodnoty fluorescenčnej anizotropie mitochondriovej membrány diabetických potkanov boli nižšie (teda fluidita bola vyššia), ako u kontrolných potkanov, napriek tomu bola ich Mg^{2+} -ATPázová aktivita nižšia. To poukazuje na skutočnosť, že vzťah medzi fluiditou lipidovej vrstvy MIT membrány a aktivitou MIT Mg^{2+} -ATPázy je špecifický. Túto špecifitu



Obrázok 6 Zmeny aktivity DNP stimulovanej Mg^{2+} -ATPázy v mitochondriách zo srdiec zdravých kontrolných a diabetických potkanov

Figure 6 Changes in DNP-stimulated Mg^{2+} -ATPase activity of mitochondria from healthy control and diabetic rat hearts

K – kontrolná skupina zdravých potkanov; DIA – skupina potkanov paralelne držaných s akútnym diabetes mellitus; stab. – hodnoty po 15-minútovej stabilizačnej perfúzii; isch. – hodnoty po 30-minútovej globalnej ischemii; reper. – hodnoty po 40-minútovej reperfúzii globalnej ischemických srdiec potkanov. Výsledky sú udávané ako priemerné hodnoty $\pm$ S.D. Signifikancia bola určená Studentovým t-testom; * $p < 0,05$; # $p < 0,01$; $n = 6$. [K – control group of healthy rats; DIA – group of parallel running rats with acute diabetes mellitus; stab. – values after 15 min. stabilized perfusion; isch. – values after 30 min. global ischemia; reper. – values after 40 min. reperfusion of global-ischemic rat hearts. Results are means $\pm$ S.D. Significances were determined by Student's t-test, * $p < 0,05$; # $p < 0,01$; $n = 6$].

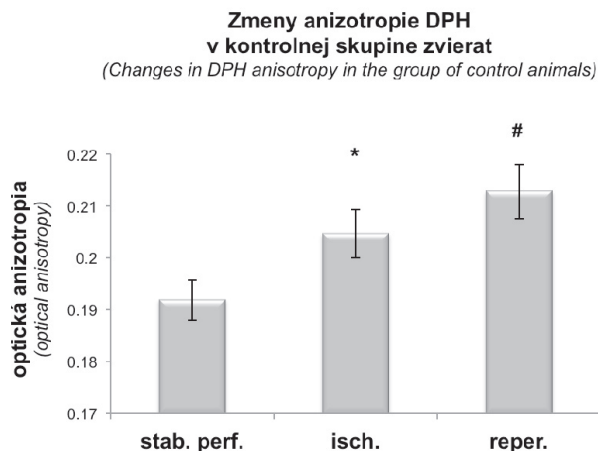
môžu spôsobovať jednak rozdielnosti v skladbe fosfolipidov v membráne, rôznosť aj intenzita patofyziologických podnetov, prípadne vplyv farmák.

Diskusia

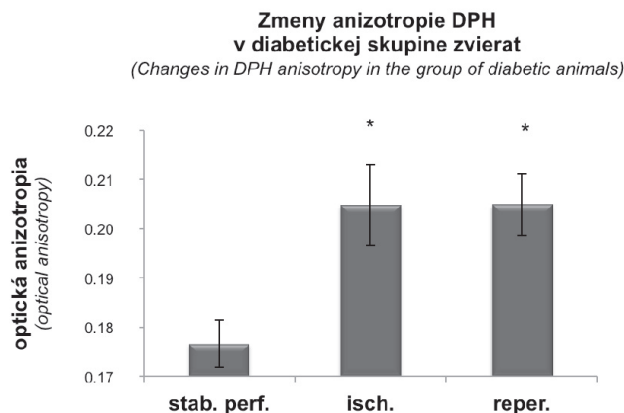
Kontrolu diabetického stavu experimentálnych zvierat sme uskutočnili stanovením základných metabolitov v krvi a krvnom sére. Osobitne charakteristickým sa nám javil 249,52 %-ný nárast glukózy, takmer 60 %-ný nárast obsahu glykohemoglobínu a viac ako 50 %-ný pokles hladiny inzulínu v krvi. Z hľadiska možného zvýšeného zabudovávania do lipidovej dvojvrstvy MIT membrán sa javil dôležitým aj takmer 60 %-ný nárast cholesterolu v krvnom sére.

Sledovanie funkčných a hemodynamických parametrov srdca počas postischemickej reperfúzie ukázalo, že parametre sa nevyvíjali ani uniformne, ani rovnakou dynamikou. Pokiaľ sú tieto zmeny vyjadrené priemernými hodnotami, tak sa charakter ich výkyvu splošňuje. Kvôli lepšej výraznosti zmien,

A



B

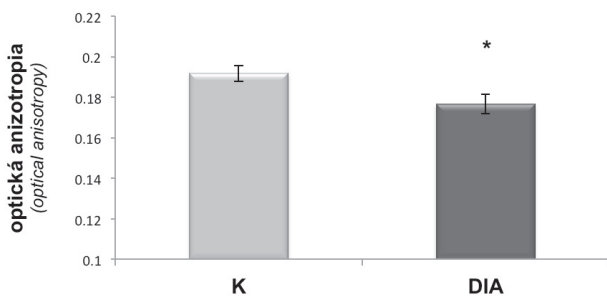


Obrázok 7 Zmeny anizotropie 1,6-difenyl-1,3,5-hexatriénu (DPH) v membráne MIT v kontrolnej skupiny zvierat, panel A a v skupine zvierat STZ indukovaným diabetes mellitus, panel B

Figure 7 Changes in 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) anisotropy in membranes of MIT in the group of healthy animals – panel A, and in the group of animals with STZ-induced diabetes mellitus – panel B

Stab. perf. – východiskové hodnoty po 15-minútovej normoxicky stabilizačnej perfúzii izolovaného srdca; isch. – hodnoty po 30-minútovej globálnej ischémii, ktorá nasledovala bezprostredne po stabilizačnej perfúzii; reper. – hodnoty po 40-minútovej reperfúzii globálne ischemických srdiec potkanov; Výsledky sú udávané ako priemerné hodnoty $\pm$ S.E.M. Štatistická významnosť bola určená Studentovým t-testom, * $p < 0,05$; * $p = 0,05$; # $p < 0,01$ voči východiskovej hodnote po stabilizačnej perfúzii; $n = 6$. (Stab. perf. – baseline values after 15 min. of normoxic stabilized perfusion of isolated hearts; isch. – values after 30 min. of global ischemia following the stabilized perfusion; reper. – values after 40 minutes reperfusion of ischemic rat hearts; results are means $\pm$ S.E.M. Statistical significance was determined by Student's t-test, * $p < 0.05$; * $p = 0.05$; # $p < 0.01$ baseline values following stabilized perfusion; $n = 6$).

Východiskové hodnoty fluorescenčnej anizotropie
(Baseline values of fluorescence anisotropy)



Obrázok 8 Porovnanie východiskových hodnôt DPH anizotropie lipidového sloja MIT membrány v zdravých kontrolných srdciach potkanov a v srdciach s akútnym experimentálnym diabetes mellitus

Figure 8 Baseline values of DPH anisotropy in lipid layers of mitochondrial membranes in healthy control hearts compared to hearts of rats with acute experimental diabetes mellitus

K – skupina zdravých kontrolných zvierat; DIA – skupina diabetickej skupiny zvierat. Výsledky sú udávané ako priemerné hodnoty $\pm$ S.E.M.; * $p < 0,05$; $n = 6$. (K – group of healthy control animals; DIA – group of diabetic animals. Results are means $\pm$ S.E.M.; * $p < 0.05$; $n = 6$).

s kontrolným a diabetickým srdcom (tabuľky 2, 3), pri ktorých sa dal názorne vyhodnotiť charakteristický časový priebeh experimentu. Keďže išlo o vzorové experimenty, namerané hodnoty jednotlivých parametrov sa číselne odlišujú od priemerných hodnôt vypočítaných zo všetkých experimentov. Porovnaním údajov z demonštrovaného experimentu s kontrolným a diabetickým srdcom vyplynulo, že v priebehu reperfúzie v oboch prípadoch sa zvýšila frekvencia činnosti srdca, pričom nárast hodnôt tohto parametra bol explicitne vyšší pri kontrolných srdciach, ako pri diabetickej skupine. Lavokomorový systolický tlak, LVSP klesli počas reperfúzie pri kontrolnom, ako aj pri diabetickej srdci, väčšou mierou však pri kontrolnom srdci. Lavokomorový diastolický tlak sa v diabetickej srdci v porovnaní s kontrolným srdcom počas reperfúzie znižoval a tlak vyvinutý v ľavej komore srdca, LVDP sa v porovnaní s kontrolným srdcom pri diabetickej srdci zvyšoval. Hodnoty $\pm dP/dt_{\max}$ sa v oboch prípadoch zvyšovali, a to približne rovnakou mierou. Avšak východiskové hodnoty týchto parametrov v čase 5 minút od začatia reperfúzie boli výrazne vyššie pri diabetickej srdci ako pri kontrolnom srdci. Priemerné východiskové hemodynamické parametre po stabilizačnej perfúzii ukázali v diabetickej srdci nižšie hodnoty frekvencie srdcovej činnosti a vyššie hodnoty $+dP/dt_{\max}$ a $-dP/dt_{\max}$ ako v zdravých kontrolných srdciach, avšak ani pri týchto, ani pri ostatných hemodynamických parametroch sme žiadnu štatistickú významnosť

ku ktorým dochádzalo v srdciach počas ischemicko-reperfúzneho poškodenia, sme vybrali po jednom experimente

nezistili. Poukazuje to na skutočnosť, že východiskové hodnoty pred začiatkom ischémie a reperfúzie boli u oboch skupín podobné (**tabuľka 4**). Po vyvolaní globálnej ischémie srdce po niekoľkých sekundách zastalo, čiže v tomto úseku experimentu sme žiadne hemodynamické údaje nemohli registrovať. Reperfúzia ukázala signifikantné zvýšenie ($p < 0,05$) u LVDP, $+dP/dt_{\max}$ a $-dP/dt_{\max}$ v diabetických srdciach v porovnaní s kontrolnou skupinou.

Ischémia s následnou reperfúziou vedú k zvýšenému vstupu vápnika do myokardu (8). To isté bolo pozorované aj v diabetickom myokarde (9, 10). Proti nadbytku vstupujúceho Ca^{2+} sa myokard dokáže brániť dvoma spôsobmi. Jednak zvýšením príjmu Ca^{2+} do MIT, jednak zmenami v mitochondriovej membráne, ktoré vedú k jej štrukturálnej reorganizácii a k tvorbe mitochondriových energetických transportných pórov, mtPTP. Tvorba týchto mtPTP umožňuje väčšiu a rýchlejšiu dodávku ATP z MIT do cytoplazmy. Tým sa zmierňuje energetický deficit, ktorý zvýšená vnútrobunková hladina iónov vápnika vyvolá stimuláciou systémov využívajúcich ATP na proces kontrakcie a relaxácie svalových vlákien (11).

Na základe experimentálnych meraní bola vypracovaná hypotéza o mechanizme vápnikom stimulovanej tvorby energií prenášajúcich pórov v MIT membránach (3). Jestvuje dôvod predpokladať, že práve tvorba týchto mtPTP, ktoré morfológovia volajú tiež kontaktné miesta, vedie k zvýšeniu fluidity MIT membrány (12). Uvedená hypotéza zostáva zatiaľ v platnosti. Nebola síce jednoznačne potvrdená, ale nebola ani vyvrátená. Pozoruhodné je, že diabetický myokard sa na pretrvávajúce preťaženie Ca^{2+} (10) adaptuje dvojakým spôsobom: a) znížením fluidity bunkovej membrány, čo zabráňuje masívnemu vstupu extracelulárneho Ca^{2+} do bunky a paralelne, b) znížením kontrakčných parametrov myokardu, čím sa šetrí energia vo forme ATP, ktoré je na vnútrobunkový pohyb Ca^{2+} a svalovú kontrakciu esenciálne potrebné. Mitochondrie, osobitne diabetické, sa teda správajú dvojako: jednak ako výlevka pre Ca^{2+} (11) a ako zvýšení dodávateľa ATP cez vysokokapacitné mtPTP. Z uvedeného vyplýva, že funkčná remodelácia a adaptácia MIT môžu súčasne prebiehať na tých istých vnútrobunkových membránových systémoch rôznymi mechanizmami. Ako sme už upozornili, ischémia a reperfúzia, rovnako ako diabetes mellitus, spôsobujú preťaženie buniek srdca Ca^{2+} . Kým ischémia/reperfúzia môžu byť jednorázové, napríklad pri akútnej oklúzii niektorej vencovitej cievy a následnom uvoľnení oklúzie, pri diabete ide o zmeny pretrvávajúce, pri ktorých pôvodné kompenzačné mechanizmy prejdú do adaptácie. Diabetický myokard je teda čiastočne adaptovaný na preťaženie vápnikom a ako sa ukázalo, táto adaptácia zvyšuje toleranciu diabetického srdca proti zmenám spôsobeným akútnou ischémiou a reperfúziou (8).

Štrukturálny a funkčný podklad adaptácie sa často označuje ako remodelácia. Je to teda súbor odchýlok od normálneho stavu, ktorý je vyvolaný patologickými podnetmi. Zistilo sa

(10, 4), že nie všetky odchýlky od normálneho stavu, ktoré sú vyvolané patologickým podnetom, sú jednoznačne škodlivé. Niektoré môžu indukovať endogénne ochranné mechanizmy (EOM) a predstavujú kompenzačné alebo dokonca adaptačné zmeny zmierňujúce dopad patológie (13). V časti výsledkov (**obrázok 6**) sme získali zaujímavý nález, že po ischémií klesla aktivita Mg^{2+} -ATPázy v MIT oboch skupín zvierat na približne rovnakú číselnú hodnotu. Čiže, ischémiou vyvolaný pokles aktivity enzýmu bol u diabetických zvierat menší, čo poukazuje na to, že tieto zvieratá boli rezistentnejšie proti ischémií ako kontrolné zvieratá. Ešte výraznejšie sa táto rezistencia prejavila po postischemickej reperfúzii, kedy sa aktivita MIT Mg^{2+} -ATPázy zvýšila až nad východiskovú úroveň po stabilizačnej perfúzii. Pozorovaný nárast aktivity Mg^{2+} -ATPázy tiež prispieva k stabilizácii spojenia medzi oxidáciou a fosforyláciou.

Ako je uvedené pri **obrázku 8**, fluorescenčná anizotropia u MIT zo zdravých kontrolných srdiec signifikantne prevyšovala ($p < 0,05$) fluorescenčnú anizotropiu u MIT zo srdiec z diabetických potkanov. Z toho vyplýva, že mitochondriové membrány z diabetických potkanov sú fluidnejšie ako membrány z kontrolných zvierat. Ischémia spôsobila v oboch prípadoch nárast fluorescenčnej anizotropie (**obrázky 7 A a 7B**), ktorý sa javí opticky väčší u MIT zo srdiec z diabetických potkanov (**obrázok 7 B**), ako u MIT zo zdravých kontrolných srdiec (**obrázok 7 A**). Avšak, číselná hodnota, na ktorú optická denzita narástla, je v oboch prípadoch takmer rovnaká. To poukazuje na skutočnosť, že reperfúzia vychádza tak v kontrolnej, ako aj v diabetickej skupine z podobných hodnôt fluorescenčnej anizotropie.

V priebehu postischemickej reperfúzie sa už výrazne prejavil účinok EOM. V MIT zo srdiec potkanov adaptovaných na diabetes fluorescenčná anizotropia už ďalej nenarastala, t. j. fluidita MIT sa už ďalej nemenila. Kým v MIT srdiec v zdravej kontrolnej skupine optická anizotropia ďalej narastala, čiže membránová fluidita naďalej klesala ($p = 0,05$). Absencia ďalšieho rastu anizotropie, čiže poklesu fluidity MIT membrány ako prejav EOM, demonštrovaná na **obrázku 7 B**, bola sprevádzaná výrazným zvýšením aktivity Mg^{2+} -ATPázy v MIT srdca. Tento nález možno posúdiť ako dôkaz zvýšenej rezistencie MIT diabetických srdiec proti ischemicko-reperfúznemu poškodeniu.

Z literatúry je všeobecne známe, že na ischemicko-reperfúznom poškodení myokardu a aj na poškodení myokardu vyvolanom diabetes mellitus sa podieľajú aj reaktívne formy kyslíka, ktoré atakujú ultraštruktúru kardiomyocytov (14), konkrétne subcelulárne membránové systémy, sarkolému, SR a taktiež MIT a v nich zabudované receptory a ióny transportujúce mechanizmy (15 – 21). Početné práce preukázali, že mieru poškodenia ischémiou a reperfúziou a aj diabetom možno zmierniť, nie však mu zabrániť, aplikáciou lapačov radikálov a rôznych antioxidantov (18, 22 – 24). Zmeny vyvolané ROS viedli k poškodeniu respirácie srdcových MIT na úrovni komplexov respiračného

reťazca a produkciu ATP v srdcových MIT, popisovali (25, 21). V diabetickom myokarde potvrdili tento nález (26, 27), pričom ukázali, že akútny STZ diabetes mellitus zvyšuje stupeň oxidácie ubiquinónu v MIT zo srdca potkanov o 14 – 17 %. Či je to málo, alebo veľa, je problematické určiť, lebo MIT *in situ* sa správajú inak ako izolované MIT (28). Stanovovanie konjugovaných diénov v tých istých pokusoch navyše odhalilo, že akútnym diabetom vyvolaná radikálová oxidácia lipidového sloja srdcových MIT nedosahuje úroveň štatistickej signifikancie (5).

Záver

Na experimentálnom modeli ischemicko-reperfúzneho poškodenia sme zistili, že izolované perfundované srdcia potkanov s akútnym (osemdňovým) streptozotocínovým diabetes mellitus sa pri postischemickej reperfúzii zotavovali lepšie ako srdcia zo zdravých kontrolných zvierat. Lepšie zotavovanie sa prejavovalo v menej prudkom náraste frekvencie činnosti srdca, v náraste LVDP, $+dP/dt_{\max}$ a $-dP/dt_{\max}$ a v poklese ľavokomorového diastolického tlaku. Uvedené výsledky svedčia o vyššej ischemickej tolerancii diabetického myokardu, čo môže byť v súlade s literatúrou pripísané rozvinutým mechanizmom endogénnej ochrany.

Ischémiá vyvolala pokles aktivity MIT Mg^{2+} -ATPázy v diabetických srdciach, ktorý bol signifikantne menší ($p < 0,05$) ako v srdciach zo zdravých kontrolných srdc. V zdravých kontrolných srdciach pokračoval pokles aktivity MIT Mg^{2+} -ATPázy aj počas postischemickej reperfúzie. Na rozdiel od toho, v diabetických srdciach postischemická reperfúzia zvyšovala aktivitu MIT Mg^{2+} -ATPázy ($p < 0,05$), a to dokonca mierne nad úroveň východiskovej hodnoty po stabilizačnej perfúzii, t. j. na začiatku experimentu. Nárast aktivity MIT Mg^{2+} -ATPázy v diabetických srdciach môže prispievať k lepšiemu spojeniu oxidácie s fosforyláciou a možno ho interpretovať ako dôsledok účasti mechanizmov endogénnej ochrany.

Ischémiá spôsobila nárast ($p < 0,05$) fluorescenčnej anizotropie (pokles membránovej fluidity) na približne rovnakú hodnotu, a to tak v srdciach kontrolných, ako aj v srdciach diabetických potkanov. V kontrolnej skupine zvierat tento vývoj pokračoval takmer rovnakou intenzitou aj počas postischemickej reperfúzie. V MIT zo srdc diabetických potkanov nielenže nárast fluorescenčnej anizotropie nepokračoval, ale ukázal sa dokonca istý trend poklesu optickej anizotropie, čiže náznak zvýšenia fluidity mitochondriovej membrány. Nález, že v akútne diabetickom myokarde nedochádza k významnejšej oxidácii membránových fosfolipidov radikálmi, nielenže potvrdil údaje z literatúry, ale ich rozšíril o poznatok, že ani postischemická reperfúzia diabetického myokardu nevedie k zníženiu fluidity membrán. Ide zrejme o výsledok endogénnej ochrany so zatiaľ neobjasneným mechanizmom.

Voľné radikály, zmeny v spektre fosfolipidov, najmä cholesterolu, ako aj efekt substancií exogénneho pôvodu, môžu

mať významný modulačný vplyv na fluiditu membrány. Z toho vyplýva, že aj keď všeobecne platí, že vyššia fluidita umožňuje väčšiu mobilitu, a tým aj vyššiu aktivitu enzýmov zabudovaných do membrány, kombinovaný vplyv modulátorov robí vzťah medzi fluiditou membrány a aktivitou zabudovaného enzýmu pre jednotlivé prípady a určitý rozsah fluidity špecifický. Pre skupinu MIT z kontrolných srdc platil vzťah, že zvýšenie fluorescenčnej anizotropie, čiže zníženie fluidity MIT membrány platí pre celý rozsah ischemicko-reperfúzneho experimentu. V skupine diabetických srdc fluidita MIT membrány a aktivita Mg^{2+} -ATPázy klesali súbežne iba v ischemickej fáze experimentu. V priebehu postischemickej reperfúzie sa fluidita MIT membrány naopak mierne zvýšila, ale aktivita Mg^{2+} -ATPázy sa zvýšila neočakávane výrazne. Úkaz, že počas reperfúzie nárast aktivity enzýmu sa spája s neúmerne vysokým zvýšením fluidity MIT membrány, je teda výsledkom takej kombinácie vplyvu modulátorov a endogénnych ochranných mechanizmov (napríklad tvorba a množstvo mitochondriových energetických transportných pórov), ktorá je špecifická pre MIT v diabetickom myokarde.

Na základe našich nálezov môžeme konštatovať, že v diabetickej skupine sa funkčné parametre srdca, membránová fluidita srdcových mitochondrií, ako aj aktivita MIT Mg^{2+} -ATPázy počas postischemickej reperfúzie významne zlepšovali ($p > 0,05$), kým v skupine kontrolných srdc postischemická reperfúzia skúmané parametre nezlepšovala. Naše nálezy potvrdili pozitívnu účasť endogénnych ochranných mechanizmov, ktoré vyvolali v diabetických srdciach čiastkovú adaptáciu na ischemicko-reperfúzne poškodenie.

S podporou Grantov: VEGA: 2/0101/12, 2/0054/11, APVV-0102-11

Literatúra

1. Ziegelhöffer A, Waczulíková I, Ferko M, Šikurová E, Mujkošová J, Ravingerová T. Involvement of membrane fluidity in exogenous protective processes running in subcellular membrane systems of the rat heart. *Physiol Res* 2012a;61:(Suppl. 2).
2. Ziegelhöffer A, Mujkošová J, Uličná O, Waczulíková I, Ferko M, Vrbjar N, Ziegelhöffer B, Ravingerová T. Dual influence of spontaneous hypertension on membrane properties and ATP production in heart and kidney mitochondria in rat: effect of captopril and nifedipine, adaptation and dysadaptation. *Can J Physiol Pharmacol* Epub 2012b;90(9):1311-1323.
3. Ziegelhöffer-Mihalovičová B, Ziegelhöffer A, Ravingerová T, Kolář F, Jacob W, Tribulová N. Regulation of mitochondrial contact sites in neonatal, juvenile and diabetic hearts. *Mol Cell Biochem* 2002;6:37-44.
4. Ziegelhöffer A, Ravingerová T, Waczulíková I, Čársky J, Neckář J, Ziegelhöffer-Mihalovičová B, Styk J. Energy transfer in acute diabetic rat hearts. Adaptation to increased energy demands due to augmented calcium transients. *Ann Y Acad Sci* 2002;967:463-468.

5. Ziegelhöffer A. Endogenous protective mechanisms in the heart triggered by acute streptozotocin – diabetes. In: Bachárová L, Kyselovič J, Slezák J. (Eds) *Experimental hypertension and ischemic heart disease*. VEDA: Bratislava; 2005:193-208.
6. Döring HJ, Dehnert H. The isolated perfused warm-blooded heart according to Langendorff. *Bioesstechnik-Verlag March GmbH*, D - 7806 March, 1988:143; ISBN 1-54662-1200-1.
7. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
8. Ravingerová T, Styk J, Pancza D, Tribulová N, Šeboková J, Volkovová K, Ziegelhöffer A, Slezák J. Diabetic cardiomyopathy in rats: alleviation of myocardial dysfunction caused by Ca^{2+} overload. *Diabetes Res Clin Pr* 1996;31:S105-S112.
9. Ziegelhöffer A, Ravingerová T, Styk J, Tribulová N, Volkovová K, Šeboková J, Breier A. Diabetic cardiomyopathy in rats: biochemical mechanisms of increased tolerance to calcium overload. *Diabetes Res Clin Pract* 1996;31:S93-103.
10. Ziegelhöffer A, Ravingerová T, Styk J, Šeboková J, Waczulíková I, Breier A, Džurba A, Volkovová K, Čársky J, Turecký L. Mechanisms that may be involved in calcium tolerance of the diabetic heart. *Mol Cell Biochem* 1997;176(1-2):191-198.
11. Dhalla NS, Ziegelhöffer A, Harrow JAC. Regulatory role of membrane systems in heart function. *Can J Physiol Pharmacol* 1977;55:1211-1234.
12. Waczulíková I, Habodášová D, Cagalinec M, Ferko M, Uličná O, Mateášik A, Sikurová L, Ziegelhöffer A. Mitochondrial membrane fluidity, potential, and calcium transients in the myocardium from acute diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2007;85:372-381.
13. Waczulíková I, Ziegelhöffer A, Országhová Z, Čársky J. Fluidising effect of resorcylic acid aminoguanidine on sarcolemmal membranes in streptozotocin-diabetic rats: blunted adaptation of diabetic myocardium to Ca^{2+} overload. *J Physiol Pharmacol* 2002;53:727-739.
14. Slezák J, Tribulová N, Ravingerová T, Singal PK. Myocardial heterogeneity and regional variations in response to injury. *Lab Invest* 1992;3:322-330.
15. Ravingerová T, Džurba A, Vrbjar N, Tribulová N, Ziegelhöffer A, Slezák J. Free oxygen radicals-induced impairment of heart function: the role of Na,K-ATPase . *Life Sci Advances (Pharmacology)* 1994;13:133-140.
16. Ravingerová T, Slezák J, Tribulová N, Džurba A, Uhrík B, Ziegelhöffer A. Free oxygen radicals contribute to high incidence of reperfusion-induced arrhythmias in isolated rat heart. *Life Sci* 1999;18/19:1927-1930.
17. Goldhaber JJ, Qayyum MS. Oxygen free radicals and excitation-contraction coupling. *Antioxid Redox Sign* 2000;2:55-62.
18. Fisher UM, Cox CS Jr, Allen SJ, Steward RH, Mehlhorn U, Laine GA. The antioxidant N-acetylcysteine preserves myocardial function and diminishes oxidative stress after cardioplegic arrest. *J Thorac Cardiovasc Sur* 2003;125:1483-1488.
19. Kaplan P, Babušíková E, Lehotský J, Dobrota D. Free radical-induced protein modification and inhibition of Ca^{2+} -ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Mol Cell Biochem* 2003;248:41-47.
20. Babušíková E, Kaplan P, Lehotský J, Jesenák M, Dobrota D. Oxidative modification of rat cardiac mitochondrial membranes and myofibrils by hydroxyl radicals. *Gen Physiol Biophys* 2004;23:327-35.
21. Temsah RM, Netticadan T, Chapman D, Takeda S, Mochizuki S, Dhalla NS. Alterations in sarcoplasmic reticulum function and gene expression in ischemic-reperfused rat heart. *Am J Physiol* 1999;277:H584-H594.
22. Hoffman JW Jr, Gilbert TB, Poston RS, Silldorff EP. Myocardial reperfusion injury: etiology, mechanisms, and therapies. *J Extra-Corp Technol* 2004;36:391-411.
23. Szarszoi O, Asemu G, Vanecek J, Ošťadál B, Kolar F. Effects of melatonin on ischemia and reperfusion injury of the rat heart. *Cardiovasc Drug Ther* 2001;15:251-257.
24. Važan R, Pancza D, Béder I, Styk J. Ischemia-reperfusion injury antiarrhythmic effect of melatonin associated with reduced recovering of contractility. *Gen Physiol Biophys* 2005;24:355-359.
25. Makazan Z, Saini HK, Dhalla NS. Role of oxidative stress in alterations of mitochondrial function in ischemic-reperfused hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:H1986-H1994.
26. Ferko M, Gvozďjaková A, Kucharská J, Mujkošová J, Waczulíková I, Styk J, Ravingerová T, Ziegelhöffer-Mihalovičová B, Ziegelhöffer A. Functional remodeling of heart mitochondria in acute diabetes: interrelationship between damage, endogenous protection and adaptation. *Gen Physiol Biophys* 2006;25:397-413.
27. Ferko M, Habodášová D, Waczulíková I, Mujkošová J, Kucharská J, Šikurová L, Ziegelhöffer B, Styk J, Ziegelhöffer A. Endogenous protective mechanisms in remodeling of rat heart mitochondrial membranes in the acute phase of streptozotocin-induced diabetes. *Physiol Res* 2008;57:S67-S73.
28. Tretter I, Adam-Vizi V. Mechanisms for endogenous production and elimination of reactive oxygen species in mitochondria. *Febs J* 2004;271(Suppl. 1):198(S4.10-05).