STZ 誘発糖尿病犬心筋の筋小胞体異常

今永一成* 上原 明* 亀川陽次郎* 松村 健**

STZ 誘発糖尿病犬の摘出心筋標本において筋小胞体 (SR) 機能異常について検討した。糖尿病犬 (DM) では正常心 (N) に比べ、等尺性単収縮の収縮高及び最大収縮速度の減少、弛緩時間の延長がみられた。post-rest contraction の最大値は、N では rest interval 1 分に、DM では 30 秒に得られ、その大きさは N に比べ減少を示した。post-rest contraction の rest decay は DM では N に比べ大きく、低温 (20°C)、低 Na⁺ 液及び ouabain による rest decay 抑制効果は減弱を示した。rapid cooling contracture は DM では N に比べて小さく、その rest decay は大きかった。SR の ryanodine 受容体への ryanodine 結合の K_d, B_{max} は共に DM において N に比べ低値を示した。

以上のことから、DM の SR では、Ca²⁺ の自然漏出亢進に起因する SR 内 Ca²⁺ 量の減少及び ryanodine 受容体数の減少が示唆された。

(心電図 17: No. 4, 348~357, 1997)

I. はじめに

糖尿病では心筋細胞内の慢性的 Ca²⁺-overload がみられ、これが cardiomyopathy の一因になっている可能性が指摘されている^{1),2)}。糖尿病心筋にお

けるこの Ca²⁺-overload には幾つかの誘因があげられる。

(1) Ca²⁺ channel activator として働く long chain acylcarnitine (palmitoyl carnitine など) による細胞膜を介しての Ca²⁺ 流入増加^{3),4)}。(2) Na⁺i- Ca²⁺o exchange (細胞膜 Na⁺-K⁺ ATPase 活性低下^{5)~10)} により惹起される細胞内 Na⁺ 増加に基づく) による Ca²⁺ の細胞内流入増加。(3) 細胞膜の Ca/Mg-ATPase, Ca-ATPase 活性低下^{11),12)} による Ca-pump 機能低下。(4) 筋小胞体膜の Ca/Mg-ATPase, Ca-ATPase, Mg-ATPase 活性の低下^{13)~16)}, calmodulin-phospholamban 系を介する

Key Words

- STZ-diabetic heart
- sarcoplasmic reticulum
- post-rest contraction
- rapid cooling contracture
- ryanodine receptor

* 福岡大学医学部生理学第一

(〒814-80 福岡市城南区七隈7丁目45番1号)

** 同 麻酔科

Abnormalities of cardiac sarcoplasmic reticulum in STZ-induced diabetic dog.
Issei Imanaga, Akira Uehara, Yojiro Kamegawa, Ken Matsumura

磷酸化の障害¹⁷⁾ 及び long chain acylcarnitine¹⁸⁾ による筋小胞体への Ca^{2+} -reuptake 機能の低下があげられる。筋小胞体からの Ca^{2+} の自然放出^{19)~23)} 或いは、自然漏出(leak)^{24),25)} が正常心筋でもみられていることから、その他の要因として(5)筋小胞体からの Ca^{2+} 漏出亢進があるかも知れない。

(4)と(5)は Ca^{2+} -overload と共に、糖尿病心筋に共通してみられる²⁾ 収縮力低下と弛緩延長に深く関与していることが考えられる。

本研究はこれらを鑑み、糖尿病心筋の筋小胞体(SR)機能異常、特に(5)の可能性と、筋小胞体からの Ca^{2+} 放出機能異常について検討した。この内容の一部は既に発表した^{26),27)}。

II. 方 法

1. 糖尿病動物の作製

3~5 kg 雑種雄犬に絶食後、streptozotocin 50

mg/kg (0.1 M citrate 緩衝液, pH 4.5 に溶解) を前肢静脈内に投与した。3週間後、空腹時血糖 250 mg/dl 以上(314.6 ± 21.1 mg/dl, $p < 0.01$ 対照との比較)及び IVGTT の K 値が 0.95 以下を糖尿病犬²⁸⁾ として実験に供した(糖尿病心)(DM)。尿ケトン体は陰性。心室重量/体重は $6.43 \pm 0.17 \times 10^{-3}$ ($p < 0.01$ 対照との比較)。尚ある犬には、STZ 投与直前に 3-0-methyl-D-glucose (Sigma, Lot. No. 60 F-01071) (2 mg/kg) を前肢静脈に投与した。対照として、年齢対照犬を用いた(正常心)(N) (血糖値 118.3 ± 10.5 mg/dl; 心室重量/体重 $6.08 \pm 0.19 \times 10^{-3}$)。

2. 実験方法

(1) 標本摘出及び固定

動物を pentobarbital-Na (30 mg/kg) の前肢静注により麻酔を行い、眼瞼反射消失後気管内挿管し、人工呼吸下を開胸、直ちに心臓を摘出した。37°C、

図1 恒温灌流槽及び実験系の模式図

97%O₂+3%CO₂ 飽和の St. Thomas 液 (NaCl, 109.9; KCl, 16.2; NaHCO₃, 11.9; NaH₂PO₄, 0.8; MgCl₂, 16.0; CaCl₂, 2.0; glucose 10.0 mM) 20 ml を圧をかけ大動脈より逆行性に 2~3 回注入し, 冠動脈内及び組織内血液の排出を行った. St. Thomas 液中で右心壁より肉柱 (直径 1 mm 以下, 長さ 5~7 mm) を摘出した.

摘出標本を恒温 (37°C) 灌流槽に固定し, 3 部に隔絶した (図 1). 中間室 (幅 1 mm) を等張蔗糖液 (5 μ M CaCl₂ 含む) で灌流し, 一方の室を等張性 KCl で満たした. 他方の室 (0.4 ml) を 97%O₂+3%CO₂ 飽和の正常 Tyrode 液 (NaCl, 136.9; KCl, 2.7; NaHCO₃, 11.9; NaH₂PO₄, 0.3; MgCl₂, 0.49; CaCl₂, 1.8; glucose 5.5 mM)

(pH 7.4) (37°C) 及び試験液を 5 ml/分で灌流し, 標本を表面灌流した.

左右両室に Ag-AgCl 電極を置き, 電気刺激を行った (0.5 Hz, 閾値 $\times$ 2 の強度). Tyrode 液中の標本より, 等尺性収縮及び 3 MKCl 充填ガラス微小電極で膜電位を記録した. 単収縮, 静止電位及び活動電位が定常状態に達した後, 実験を開始した.

(2) Post-rest contraction (PRC)

0.5 Hz で電気刺激中, 刺激を中止し, ある時間経過後 (rest interval) 刺激を再開した. 刺激再開時, 最初の単収縮 (最大収縮力) の刺激中止前の単収縮 (最大収縮力) に対する比 (相対値) を PRC の指標とした.

DT : developed tension

dT/dt : maximum rate of development of tension

TPT : time to peak tension

TCR : time to complete relaxation

図 2 犬摘出右心室肉柱の 0.5 Hz 刺激における等尺性単収縮波形の各相について正常心と糖尿病心とを比較した模式図

上段は正常心の, 下段は糖尿病心の値を示す. Mean $\pm$ SEM, *p < 0.01 (正常心との比較, Student's t-test).

(3) Rapid cooling contracture (RCC)

0.5 Hz 刺激中, 刺激を中止し, ある時間経過後 (rest interval), 0°Cに冷却した Tyrode 液を灌流ポンプにより加圧しつつ, 急速に灌流した (標本部温度 0~2°C). 拘縮の最大値の刺激中止前の単収縮に対する比 (相対値) を RCC の指標とした.

(4) 試験液及び試薬

低 Na⁺ Tyrode 液では, NaCl 80.7 mM とし, 除去した NaCl と等モルの N-methyl-D-glucamine (Sigma, Lot. No. 50H0221) (97%O₂ + 3%CO₂ 飽和後 pH 7.4 になる様に HCl で調整) で置換した. ryanodine (Merck, Lot. No. 501, 708-000Z008) (1 μM), ouabain (Sigma, Lot. No. 88F-0493) (0.5 μM) を最終濃度になるように Tyrode 液に溶解し, 標本を灌流した.

(5) 筋小胞体膜の ryanodine 結合

心室筋から Jones らの方法²⁹⁾ により筋小胞体膜を分画し, [³H]-rynaodine binding assay を行い³⁰⁾, Scatchard plot から ryanodine 受容体への ryanodine 結合の K_d, B_{max} を算出した.

(6) 統計処理には Student's t-test と Anova で検定を行い, Mean±SEM で示し, 夫々 p<0.01 を有意とした.

III. 結 果

1. 等尺性単収縮

図 2 に, 0.5 Hz 刺激中の単収縮波形の最大収縮高 (DT), 最大収縮速度 (dT/dt), 最大収縮までの時間 (TPT) 及び弛緩時間 (TRC) について, N と DM との比較を示した.

DM において DT, 及び dT/dt の有意な減少と TCR の有意な延長がみられた. TPT には有意な変化はみられなかった.

2. Post-rest contraction (PRC)

(1) rest interval と PRC との関係

0.5 Hz で刺激中, 刺激を中止し, rest interval を 10 秒から 10 分まで延長させたときの PRC の変化を, 環境温 37°C, 20°C で N と DM とを比較した (図 3).

環境温 37°C では PRC の最大値は N で rest inter-

図 3 Post-rest contraction (PRC) と rest interval との関係について 37°C と 20°C で正常心 (Normal) と糖尿病心 (Diabetic) とを比較したもの

PRC は rest 前の値に対する比 (相対値) を示す (挿図参照). 基本刺激は 0.5 Hz. 各点は Mean±SEM, *p<0.01 (37°C との比較, Student's t-test), **p<0.01 (糖尿病心 との比較, Anova).

val 1分で 1.56 ± 0.10 を, DMで30秒で 1.20 ± 0.08 を示した。PRCはrest intervalの延長と共に減少し, Nでrest interval 10分で 0.66 ± 0.10 , DMで 0.23 ± 0.06 を示した (rest decay)¹⁹⁾。Nに比べDMのrest decayは大きかった。

環境温 20°Cのとき, PRCの最大値はNではrest interval 1分で 1.30 ± 0.09 , DMでは30秒で

1.10 ± 0.09 を示した。低温下でも, rest decayがみられるが, Nでは低温によってrest decayは軽減される (rest interval 10分で 0.90 ± 0.10) が, 一方DMでは, 低温によってもrest decayは軽減されなかった (0.20 ± 0.08)。尚, 20°Cでは, 刺激中止前の収縮は増強しているため, PRCの最大値 (相対値) が37°Cに比べ小さくなっている。

図4 Post-rest contraction (PRC) のrest decayに対する低Na⁺とouabainの効果について37°C (上パネル) と20°C (下パネル) で正常心(Normal) (白柱)と糖尿病心(Diabetic) (黒柱)とを比較したもの

基本刺激は0.5 Hz, rest intervalは10分, PRCは相対値を示す。Mean ± SEM, *p<0.01 (Anova)。

(2) Post-rest contraction の rest decay に対する低 Na^+ 及び ouabain の影響

0.5 Hz で刺激中、刺激を中止し、rest interval 10 分の PRC への低 Na^+ (80.7 mM) と ouabain (0.5 μM) の影響を 37°C, 20°C で、N と DM とを比較した (図 4)。

37°C のとき、N では標準 Na^+ (149.1 mM) 灌流液中、10 分の rest interval で PRC は 0.66 ± 0.10 であったものが、低 Na^+ 液中によって 1.05 ± 0.12 に、ouabain によって 1.23 ± 0.13 に夫々増加した。一方、DM では、標準 Na^+ 液中の 0.23 ± 0.10 に対し、低 Na^+ によって 0.50 ± 0.10 、ouabain によって

0.46 ± 0.10 に夫々増加した。N に比べ DM では、夫々の増加効果は有意に減弱を示した。

20°C のとき、N では標準 Na^+ 液中、10 分の rest interval で 0.90 ± 0.10 であったものが、低 Na^+ 液によって 1.30 ± 0.10 、ouabain によって 1.25 ± 0.10 に夫々増加した。一方 DM では、標準 Na^+ 液中の 0.20 ± 0.10 に対し、低 Na^+ 液中によって 0.65 ± 0.16 、ouabain によって 0.50 ± 0.10 に増加した。低温下でも、N に比べ DM では夫々の増加効果は有意に減弱を示した。

(3) Rapid cooling contracture (RCC)

0.5 Hz で刺激中、刺激中止し、rest interval 1

図 5 Rapid cooling contracture (RCC) の rest interval 1 分及び 10 分について正常心 (Normal) と糖尿病心 (DM, Diabetic) とを比較したもの

上パネルは実際の記録。下パネルは多数例で、正常心 (白柱)、糖尿病心 (黒柱) の rest 前に対する比 (相対値) を示す。基本刺激は 0.5 Hz。Mean $\pm$ SEM, * $p < 0.01$ (Anova)。

分と10分のRCCをNとDMで比較した。図5の上段には実録を、下段にRCCの最大値(相対値)の多数例を示した(Na^+ は標準濃度)。

Nでは、rest interval 1分で 2.2 ± 0.3 、10分で 1.2 ± 0.2 を示し、DMでは、rest interval 1分で 1.1 ± 0.2 、10分で 0.5 ± 0.23 を示した。RCCはrest interval 延長と共に減少(rest decayに相当する現象)するが、Nに比べDMでは、この減少は有意に大きかった。

4. 筋小胞体の ryanodine 受容体

筋小胞体 ryanodine 受容体への ryanodine 結合を Scatchard plot で検討した。NのKd, Bmaxは夫々3.83 nM, 14.77 pmol/mg. ptを、DMのそれらは2.45 nM, 7.19 pmol/mg. ptを示した。

5. 3-O-methyl-D-glucose 処置

STZ投与前の3-O-methyl-D-glucose処置動物において、単収縮のパラメーター及びPRC, RCCにNとの有意な差はみられなかった。

IV. 考 察

糖尿病動物心筋(主にラット)では、収縮力と収縮速度の低下と弛緩の延長が共通にみられている²⁾。私共も、STZ誘発糖尿病犬心室筋においてもこれらの現象を認めた^{26), 27)}。これらの収縮過程の変化にはICa (Slow inward current), Ca-induced Ca release, SR内 Ca^{2+} 量及び収縮蛋白の Ca^{2+} 感受性を考慮に入れる必要がある。

短期間(2~4週間)のSTZ誘発糖尿病ラット心室筋では、膜電位依存性ICaに変化はみられないという^{31), 32)}。また $[\text{^3H}]$ PN 200-110の結合実験により、糖尿病心ではvoltage-sensitive Ca channel活性はむしろ促進していることが報告されている³³⁾。一方Ca-channel activatorとして働くpalmitoyl carnitineの様なlong-chain acylcarnitine⁴⁾が糖尿病心筋細胞内への蓄積が認められている^{3), 34)}。これらをみると、今回の研究に用いた2~3週間の糖尿病心筋では、ICaの減少というよりも不変かむしろ増加している可能性がある。

慢性的糖尿病心筋ではmyofibrillar Ca^{2+} -stimulated ATPase活性低下^{35), 36)}, actomyosin Ca^{2+} -stimulated ATPase活性低下^{37)~39)}, myosin Ca^{2+} -stimulated ATPase活性低下^{37), 38), 40)}が報告されている。また3~6ヶ月経過の糖尿病心では収縮蛋白の Ca^{2+} に対する感受性も低下しているという⁴¹⁾。しかし、3~4週間という短期間経過のものでは、むしろ感受性は増加しているという⁴²⁾。今回用いた3週間程度の経過の糖尿病犬心筋においては、収縮蛋白に関する酵素活性、 Ca^{2+} 感受性にそれ程強い変化は招来していないものと考えられる。

SR内の Ca^{2+} 量の低下には、一つには Ca^{2+} -reuptakeの障害があげられる。糖尿病心筋ではSR膜のCa/Mg-ATPase, Ca-ATPase, Mg-ATPase活性低下^{13)~16)}やcalmodulin-phospholamban系による磷酸化障害¹⁷⁾が報告されている。また糖尿病心筋で蓄積されるlong chain acylcarnitine³⁴⁾がSRへの Ca^{2+} -reuptakeを阻害する¹⁸⁾という。これらはSRへの Ca^{2+} -reuptake機能を低下させ、弛緩時間の延長を招来させるであろう。他の要因としてSRからの Ca^{2+} 漏出或いは自然放出が考えられる。

心筋では、一定頻度刺激による定常状態収縮において、刺激を中止し、ある時間経過(rest interval)後、刺激を再開するとき、最初の収縮力はそれに続く収縮よりも大きく、かつrest intervalが比較的短時間のときには刺激中止前のそれより大きくなる。この現象はpost-rest contraction (PRC) 或いはpost-rest potentiationとして知られ、Woodworth⁴³⁾以来多くの研究が行われており、種々の動物で認められている。PRCはryanodine^{27), 44)}やcaffeine^{45), 46)}などのSRの Ca^{2+} -depletorやSRの Ca^{2+} -release inhibitor⁴⁷⁾によって、環境温度が37°Cでも20°C²⁷⁾においても完全に抑制される。これらのことからPRCはSRからの Ca^{2+} 放出と密接な関係がある。PRCの機序はrest intervalの期間に Na^+ - Ca^{2+} exchange活性(細胞外 Na^+ と細胞内 Ca^{2+} との交換による Ca^{2+} 排出機構)が低下し、細胞内 Ca^{2+} がSRへ蓄積されるものと考えられ

ている⁴⁸⁾。これは PRC が低 Na^+ 液^{27), 48), 49)} や ouabain²⁷⁾ で増強される (本研究でも認めた) ことでも支持されよう。PRC は, ICa や収縮蛋白の Ca^{2+} 感受性に変化がなければ, SR から放出される Ca^{2+} 量を反映していることになるだろう。

PRC には, rest interval の延長に伴って減少する “rest decay”^{19), 25)} という現象がみられる。この rest decay は SR から Ca^{2+} の自然漏出 (leak) に起因するものと考えられている^{19), 24), 25)}。環境温度 20°C 前後で PRC が増強されること, rest decay が軽減されること²⁷⁾ を本研究でも認めた。これは 20°C 前後の低温では, SR からの Ca^{2+} の自然放出が抑制されること⁵⁰⁾, SR の Ca^{2+} release channel の閉鎖⁵¹⁾ に基づくものと考えられる。

PRC が糖尿病ラット心筋で減少していることが報告⁵²⁾ されているが, 前回²⁷⁾ 及び今回の研究で糖尿病犬心筋で同様の結果を得た。さらに糖尿病心では PRC の rest decay も大きく, 低温 (20°C), 低 Na^+ 液, ouabain による rest decay 抑制効果の障害もみられた。これらのことは, 糖尿病心筋では SR 内への Ca^{2+} uptake の障害と SR からの漏出亢進により, SR 内の Ca^{2+} 量は減少していることを示唆する。

心筋標本を急速に極めて低温 ($0 \sim 2^\circ\text{C}$) 環境に暴露するとき強い拘縮がみられる。これは rapid cooling contraction (RCC) として知られており, SR の Ca^{2+} 放出 channel が開孔し, 細胞質内へ大量の Ca^{2+} が放出されることに基づく^{49), 53)}。RCC も rest interval の延長によって減少すること (rest decay) がモルモット心室筋⁵⁴⁾ と同様, 犬の心室筋でも認められた。

糖尿病心では, RCC は正常心に比べて小さく, その rest decay は大きかった。RCC が SR の Ca 量の指標となり得る^{25), 55)} からには, 糖尿病心では SR の Ca 量は減少していることが示唆される。

PRC 及び RCC の結果からみると, 糖尿病心では SR の Ca^{2+} -reuptake 機能低下に加え, SR からの Ca^{2+} の漏出 (leak) が亢進していることが示唆される。SR からの Ca^{2+} の自然放出或いは漏出亢進に

よって細胞質内 Ca^{2+} が増加するとき, 正常であれば, この Ca^{2+} は Ca-pump や $\text{Na}^+_{\text{o}}\text{-Ca}^{2+}_{\text{i}}$ exchange で細胞外に排出されたり, SR へ再び uptake されるであろう。しかし糖尿病心では, Ca-pump の障害^{11), 12)}, $\text{Na}^+_{\text{o}}\text{-Ca}^{2+}_{\text{i}}$ exchange の障害 ($\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase 活性低下⁵⁾⁻¹⁰⁾ で考えられる), SR への Ca-reuptake の障害¹³⁾⁻¹⁷⁾ が発生しており, さらに palmitoyl carnitine などの要因 (Ca-channel activator⁴⁾, Ca^{2+} の SR への reuptake 抑制¹⁸⁾) により, 糖尿病心筋細胞には SR 内 Ca^{2+} 貯蔵量の減少と Ca-over load が誘発されるものと考えられる。

SR の ryanodine 受容体に対する ryanodine binding assay により糖尿病心で Kd 及び Bmax の低下を認めた。これは ryanodine 受容体の数の減少を意味する。ICa にも収縮蛋白の Ca^{2+} 感受性にも変化のない時期の糖尿病心でも, 収縮力の低下, 収縮速度の低下がみられた。この現象は, SR 内の Ca^{2+} 量の減少に加え, SR の Ca release channel (ryanodine sensitive) の減少による Ca-induced Ca release 機能の低下に起因するものと考えられる。

【文 献】

- 1) Afzal N, Ganguly PK, Dhalla KS, Pierce GN, Singal PK, Dhalla NS: Beneficial effects of verapamil in diabetic cardiomyopathy. Diabetes 37: 936, 1988
- 2) Dhalla NS, Pierce GN, Innes IR, Beamish RE: Pathogenesis of cardiac dysfunction in diabetes mellitus. Can J Cardiol 1: 263, 1985
- 3) Pieper GM, Murray WJ: In vivo and in vitro intervention with L-carnitine prevents abnormal energy metabolism in isolated diabetic rat heart: chemical and phosphorus-31 NMR evidence. Biochem Med Metabol Biol 38: 111, 1987
- 4) Inoue D, Pappano AJ: L-Palmitoylcarnitine and calcium ions acts similarly on excitatory ionic currents in avian ventricular muscle. Circ Res 52: 625, 1983
- 5) Imanaga I, Kamei R, Kuroiwa M, Uehara A: Effect of insulin on diabetic mammalian cardiac muscle (Abstract). J Mol Cell Cardiol 13: Suppl. 2, 40, 1981

- 6) Imanaga I, Kamegawa Y : Mechanisms of low sarcolemmal $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase activity in diabetic myocardium (Abstract). *J Mol Cell Cardiol* 22 : Suppl. II, S38, 1990
- 7) Imanaga I, Kamegawa Y, Kamei R, Kuroiwa M : Cardiac sarcolemmal $\text{Na}^+\text{-K}^+$ adenosine triphosphatase (ATPase) activity in diabetic dog. In *The Diabetic Heart*, ed by Nagano M, Dhalla NS, Raven Press, New York, 1991, 237
- 8) Ku DD : Decreased sodium pump activity in heart and thoracic aorta of streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. *Pharmacologist* 22 : 288, 1980
- 9) Onji T, Liu MS : Effects of alloxan-diabetes on the sodium-potassium adenosine triphosphatase enzyme system in dog hearts. *Biochem Biophys Res Commun* 96 : 799, 1980
- 10) Pierce GN, Dhalla NS : Sarcolemmal $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase activity in diabetic rat heart. *Am J Physiol* 245 : C241, 1983
- 11) Heyliger CE, Prakash A, McNeill JH : Alterations in cardiac sarcolemmal Ca^{2+} pump activity during diabetes mellitus. *Am J Physiol* 252 : H540, 1987
- 12) Makino N, Dhalla KS, Elimban V, Dhalla NS : Sarcolemmal Ca^{2+} transport in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy in rats. *Am J Physiol* 253 : E202, 1987
- 13) Ganguly PK, Pierce GN, Dhalla KS, Dhalla NS : Defective sarcoplasmic reticular calcium transport in diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol* 244 : E528, 1983
- 14) Lopaschuk GD, Katz S, McNeill JH : The effect of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes on calcium transport in rat cardiac sarcoplasmic reticulum. The possible involvement of long chain acylcarnitines. *Can J Physiol Pharmacol* 61 : 439, 1983
- 15) Lopaschuk GD, Eibschutz B, Katz S, McNeill JH : Depression of calcium transport in sarcoplasmic reticulum from diabetic rats : Lack of involvement by specific regulatory mediators. *Gen Pharmacol* 15 : 1, 1984
- 16) Penpargkul S, Fein FS, Sonnenblick EH, Scheuer J : Depressed cardiac sarcoplasmic reticular function from diabetic rats. *J Mol Cell Cardiol* 13 : 303, 1981
- 17) Kawamura M, Suzuki H : Altered Ca^{2+} transport in diabetic myocardium. In *The Diabetic Heart*, ed by Nagano M, Dhalla NS, Raven Press, New York, 1991, 209
- 18) Pitts B Jr, Tate CA, Van Winkle B, Wood RM, Entman ML : Palmitylcarnitine inhibition of the calcium pump in cardiac sarcoplasmic reticulum : a possible role in myocardial ischemia. *Life Sci* 23 : 391, 1978
- 19) Allen DG, Jewell BR, Wood EH : Studies of the contractility of mammalian myocardium at low rates of stimulation. *J Physiol* 254 : 1, 1976
- 20) Bose D, Kobayashi T, Bouchard RA, Hryshko LV : Scattered light intensity fluctuation in the canine ventricular myocardium : correlation with inotropic drug effect. *Can J Physiol Pharmacol* 66 : 1232, 1988
- 21) Capogrossi MC, Stern MD, Spurgeon HA, Lakatta EG : Spontaneous Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum limits Ca^{2+} -dependent twitch potentiation in individual cardiac myocytes. A mechanisms for maximum inotropy in the myocardium. *J Gen Physiol* 91 : 133, 1988
- 22) Kort AA, Lakatta EG : Spontaneous sarcoplasmic reticulum calcium release in rat and rabbit cardiac muscle : Relation to transient and rested-state twitch tension. *Circ Res* 63 : 969, 1988
- 23) Stern MD, Capogrossi MC, Lakatta EG : Spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum in myocardial cells : mechanisms and consequences. *Cell Calcium* 9 : 247, 1988
- 24) Bers DM, Bridge JHB : Effect of acetylstrophanthidin on twitches, microscopic tension fluctuations and cooling contractures in rabbit ventricle. *J Physiol* 404 : 53, 1988
- 25) Hryshko LV, Stiffel V, Bers DM : Rapid cooling contractures as an index of sarcoplasmic reticulum calcium content in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol* 257 : H1369, 1989
- 26) Kamegawa Y, Imanaga I : Deteriorative function of sarcoplasmic reticulum in diabetic heart muscle (Abstract). *J Mol Cell Cardiol* 23 : Suppl. II, S46, 1991
- 27) Imanaga I, Kamegawa Y : Dysfunction of cardiac sarcoplasmic reticulum in the diabetic dog. In *The Cardiomyopathic Heart*, ed by Nagano M, Takeda N, Dhalla NS, Raven Press, New York, 1994, 419
- 28) Lundbeak K : Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetic mellitus. *Brit Med J* 1 : 1507, 1962
- 29) Jones LR, Besch HR, Fleming JW, McConnaughey MM, Watanabe AM : Separation of vesicles of cardiac sarcolemma from vesicles of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 254 : 530, 1979
- 30) Uehara A, Yasukochi M, Imanaga I : Modulation of ryanodine binding to the cardiac Ca^{2+} release chan-

- nel by arachidonic acid. *J Mol Cell Cardiol* 28 : 43, 1996
- 31) Jourdon P, Feuvray D : Calcium and potassium currents in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. *J Physiol* 470 : 411, 1993
 - 32) Tamada A, Hattori, Y, Yamada Y, Sakuma I, Kitabatake A, Kanno M : β -adrenoreceptor-mediated actions on contractions, $[Ca^{2+}]_i$ and Ca^{2+} current in cardiomyocytes from diabetic rat. *J Mol Cell Cardiol* 28 : A338, 1996
 - 33) Kashiwagi A, Nisio Y, Ogawa T, Tanaka S, Kodama M, Asahina T, Ikebuchi M, Shigeta Y : Increase in voltage-sensitive calcium channel of cardiac and skeletal muscle in streptozotocin-induced diabetic rats. In *Cardiovascular Disease in Diabetes*, ed by Nagano M, Mochizuki S, Dhalla NS, Kluwer Academic Publishers, Boston, 1992, 173
 - 34) Feuvray D, Idell-Wenger JA, Neely JR : Effects of ischemia on rat myocardial function and metabolism in diabetes. *Circ Res* 44 : 322, 1979
 - 35) Pierce GN, Dhalla NS : Cardiac myofibrillar ATPase activity in diabetic rats. *J Mol Cell Cardiol* 13 : 1063, 1981
 - 36) Pierce GN, Dhalla NS : Mechanisms of the defect in cardiac myofibrillar function during diabetes. *Am J Physiol* 248 : E170, 1985
 - 37) Dillmann WH : Diabetes mellitus induces changes in cardiac myosin of the rat. *Diabetes* 29 : 597, 1980
 - 38) Malhotra A, Penpargkul S, Fein FS, Sonnenblick EH, Scheuer J : The effect of streptozotocin-induced diabetes in rats on cardiac contractile proteins. *Circ Res* 49 : 1243, 1981
 - 39) Malhotra A : Cardiac contractile proteins in diabetic cardiomyopathy. In *The Diabetic Heart*, ed by Nagano M, Dhalla NS, Raven Press, New York, 1991, 281
 - 40) Garber DW, Neely JR : Decreased myocardial function and myosin ATPase in hearts from diabetic rats. *Am J Physiol* 244 : H586, 1983
 - 41) Akella AB, Ding XL, Cheng R, Gulati J : Diminished Ca^{2+} sensitivity of skinned cardiac muscle contractility coincident with troponin T-Band shift in the diabetic rat. *Circ Res* 76 : 600, 1995
 - 42) Khandoudi N, Guo AC, Chesnais M, Feuvray D : Skinned cardiac fibers of diabetic rats : contractile activation and effects of 2, 3-butanedione monoxime (BDM) and caffeine. *Cardiovasc Res* 27 : 447, 1993
 - 43) Woodworth RS : Maximal contraction, "staircase" contraction, refractory period, and compensatory pause, of the heart. *Am J Physiol* 8 : 213, 1902
 - 44) Hansford RG, Lakatta EG : Ryanodine releases calcium from sarcoplasmic reticulum in calcium-tolerant rat cardiac myocytes. *J Physiol* 390 : 453, 1987
 - 45) Blayney LH, Muir TJ, Henderson A : Action of caffeine on calcium transport by isolated fractions of myofibrils, mitochondria and sarcoplasmic reticulum from rabbit heart. *Circ Res* 43 : 520, 1978
 - 46) Fabiato A, Fabiato F : Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol* 249 : 469, 1975
 - 47) Sutko JL, Kenyon JL : Ryanodine modification of cardiac muscle responses to potassium free solutions : evidence for inhibition of sarcoplasmic reticulum calcium release. *J Gen Physiol* 82 : 385, 1983
 - 48) Sutko JL, Bers DM, Reeves JP : Postrest inotropy in rabbit ventricle : Na^+ - Ca^{2+} exchange determines sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content. *Am J Physiol* 250 : H654, 1986
 - 49) Bridge JH : Relationships between the sarcoplasmic reticulum and sarcolemmal Ca transport revealed by rapidly cooling rabbit ventricular muscle. *J Gen Physiol* 88 : 437, 1986
 - 50) Asayama J, Tatsumi T, Yamahara Y, Miyazaki H, Inoue M, Omori I, Inoue D, Nakagawa M : Spontaneous cyclic Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum in the absence and presence of free Ca^{2+} sufficient to overload sarcoplasmic reticulum. *Jpn J Appl Physiol* 22 : 1, 1992
 - 51) Sitsapesan R, Montgomery RAP, MacLeod KT, Williams AJ : Sheep cardiac sarcoplasmic reticulum calcium-release channels : modification of conductance and gating by temperature. *J Physiol* 434 : 469, 1991
 - 52) Bouchard RA, Bose D : Influence of experimental diabetes on sarcoplasmic reticulum function in rat ventricular muscle. *Am J Physiol* 260 : H341, 1991
 - 53) Kurihara S, Sakai T : Effects of rapid cooling on mechanical and electrical responses in ventricular muscle of guinea-pig. *J Physiol* 361 : 361, 1985
 - 54) Bers DM, Bridge JH, Spitzer KW : Intracellular Ca^{2+} transients during rapid cooling contractures in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 417 : 537, 1989
 - 55) Bers DM : SR Ca loading in cardiac muscle preparations based on rapid-cooling contractures. *Am J Physiol* 256 : C109, 1989