

ХРОНОИНОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ ИЗОЛИРОВАННОГО ПО ЛАНГЕНДОРФУ СЕРДЦА КРЫСЫ

УДК 616.12.001.57–07

Поступила 1.02.2012 г.



А.В. Дворников, к.б.н., старший научный сотрудник ЦНИЛ НИИ ПФМ¹;
С.К. Чан, профессор, научный сотрудник лаборатории сложных систем²

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

²Институт физики, Академия Синика, Тайпей, Тайвань, Китайская народная республика, 11529, Academia Rd. Sec. 2, 127

Если здоровое сердце на ускорение ритма отвечает увеличением сократимости, то при сердечной недостаточности развивается отрицательная зависимость сила–частота. В экспериментальных условиях на изолированном сердце крысы можно получить как отрицательную, так и положительную хроноинотропную зависимость. Переходному процессу при переключении частот ранее не уделялось должного внимания, а зависимость сила–частота рассматривалась преимущественно с позиций стационарного состояния.

Цель исследования — изучить хроноинотропную зависимость на перфузируемом сердце крысы с точки зрения переходного процесса и изменений экспериментальных условий, выявить влияние концентрации кальция в перфузируемом растворе на динамику переходного процесса и, как следствие, на знак зависимости сила–частота.

Материалы и методы. На изолированных сердцах 15 самцов крыс линии Wistar, перфузируемых по Лангендорфу раствором Кребса–Хензелейта (КХ) с разной концентрацией кальция ($[Ca^{2+}]_o$), продемонстрировано влияние экспериментальных условий на зависимость сила–частота.

Результаты. Установлено, что переходный период при переключении частот стимуляции имеет двухфазную структуру, где выделяют первый (V_1) и экстремальный (V_{ex}) удары (сокращения). Переходный период при переключении частот может быть достаточно долгим (иногда более 180–300 с), поэтому длительность стимуляции часто имеет решающее значение. При перфузии раствором КХ для сердца крысы отрицательная хроноинотропия (для сократимости на 60-й секунде — V_{60c}) модулируется внешним $[Ca^{2+}]_o$, причем параметры сократимости во время переходного периода V_1 и V_{ex} более чувствительны к экспериментальным условиям. Увеличение уровня внутриклеточного Ca^{2+} с помощью убаина (50 мкмоль) не приводит к изменениям отношений сила–частота.

Заключение. В перфузируемом растворе в зависимости от концентрации кальция меняется динамика переходного процесса при переключении частот и, как следствие, знак частотно–силовых взаимоотношений. Внутриклеточный кальций незначительно влияет на частотно–силовые взаимоотношения.

Ключевые слова: сердечная сократимость, хроноинотропная зависимость, изолированное сердце, динамика переходного процесса.

English

Chronoinotropic effects in Langendorff perfused rat heart

A.V. Dvornikov, PhD, Senior Research Worker, Central Scientific Research Laboratory of Scientific Research Institute of Applied and Fundamental Medicine¹;

S.K. Chan, Professor, Research Fellow, Laboratory of Complexity²

¹Nizhny Novgorod State Medical Academy, Minin and Pozharsky Square, 10/1, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603005;

²Institute of Physics, Academia Sinica, Academia Rd. Sec. 2, 127, Taipei, Taiwan, Republic of China, 11529

Для контактов: Дворников Алексей Викторович, тел. раб. 8(831)465-43-33, факс 8(831)465-42-81, тел. моб. +7 950-352-82-51;
e-mail: alexey.dvor@gmail.com

If healthy heart responds by an increase of contractility to the acceleration of rhythm then negative force-frequency relationship (FFR) is developed in failed heart. In experimental conditions in perfused rat heart it is possible to obtain the positive as well as negative FFR. Transient force response has been poorly described in details, but FFR have been considered mostly as steady state phenomenon.

The aim of the investigation was to study FFR in whole rat heart under different experimental conditions using analysis of force transient response; to study the effect of different extracellular calcium concentrations on force transition dynamics, and hence the resulting sign of chrono-inotropic relation.

Materials and methods. On total of 15 Langendorff perfused hearts obtained from Wistar rats, we demonstrated different calcium concentrations ($[Ca^{2+}]_o$) in Krebs–Henseleit buffer to be able to affect FFR in these hearts.

Results. There was found that the transient responses have biphasic structure, where first beat (B_1) and extremum beat (B_{ex}) can be found. The transient response after step pacing period change can be rather long (sometimes more than 180–300 s); and one should be careful when choosing the duration of pacing protocols. The negative FFR (at 60 s — B_{60s}) is easily modulated by external $[Ca^{2+}]_o$ and the parameters of force transient response B_1 and B_{ex} are more sensitive (then B_{60s}) to experimental conditions. The increase of intracellular Ca^{2+} with the help of Ouabain (50 μ M) does not affect chrono-inotropic relations in perfused heart of rats.

Conclusion. Calcium concentration in perfusion solution was found to be able to affect the dynamics of force transient response after step change in pacing frequency and change the resulting sign of FFR. Intracellular calcium does not significantly change the sign of chrono-inotropic relations.

Keywords: cardiac contractility, force-frequency relationships, isolated heart, force transient response.

Здоровое сердце на увеличение частоты ритма отвечает увеличением силы сокращений, т.е. проявляет положительную зависимость сила–частота. При сердечной недостаточности увеличение ритма сокращений ведет к прогрессивному снижению сократимости — отрицательной зависимости сила–частота [1, 2]. В условиях физической нагрузки или эмоционального напряжения больное сердце не способно адекватно поддерживать высокий уровень насосной функции.

Положительная хроноинотропная зависимость, или так называемая лестница, была впервые продемонстрирована Боудичем в 1871 г. на сердце лягушки, а впоследствии показана на препаратах кролика, собаки, морской свинки. Препараты сердца крысы, наоборот, во многих экспериментальных работах проявляли отрицательную зависимость сила–частота [3, 4]. Есть мнение [5, 6], что сердца мелких млекопитающих в состоянии покоя демонстрируют высокий ритм вследствие присущей только им особенности циркуляции кальция. Неадекватная перфузия при высокой частоте стимуляции в эксперименте может приводить к ишемии тканей и отрицательной зависимости [7, 8]. В ряде работ на препаратах сердца крысы и на целом сердце получена положительная зависимость [9–12].

Внешний кальций сильно влияет на силу сокращений сердца и способен менять знак частотно-силовых взаимоотношений [4, 12]. Ряд авторов [13, 14] свидетельствуют о насыщении кальцием и даже о перегрузке сердечного ритма при высоком уровне внешнего Ca^{2+} (от 2,5 ммоль) и в результате — об отрицательной хроноинотропии. Другие авторы [4] получили доказательства повышения способности сердечного ритма к аккумуляции кальция при снижении $[Ca^{2+}]_o$.

Ответ сократимости сердца на изменение частоты стимуляции всегда сопровождается кратковременным колебанием как силы сокращений, так и концентрации внутриклеточного кальция, что отмечено во многих работах [5, 7, 12]. Однако самому переходному процессу никогда не уделялось должного внимания, а зависимость сила–частота рассматривалась преимущественно с позиций стационарного состояния.

Цель исследования — изучить хроноинотропную зависимость на перфузируемом сердце крысы с точки зрения переходного процесса и влияния изменений экспериментальных условий, выявить, как концентрация кальция в перфузируемом растворе меняет динамику переходного процесса и, как следствие, знак зависимости сила–частота.

Материалы и методы. Настоящее исследование выполнено в соответствии с нормами этических комитетов Нижегородской государственной медицинской академии (Россия) и Академии Синика (Тайвань), а также с Рекомендациями по работе с лабораторными животными Национального института здоровья США [15].

Установка Лангендорфа. 15 самцов крыс линии Wistar (250–300 г) были наркотизированы Золетилом (10 мг/кг, внутривенно), гепаринизированы (500 МЕ, внутривенно), сердца были быстро извлечены и помещены в холодный раствор (0°C) Кребса–Хензелейта (КХ). Раствор КХ содержал (в миллимолях): NaCl — 18; KCl — 4,7; $CaCl_2$ — 2,4; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 1,5; KH_2PO_4 — 1,2; $NaHCO_3$ — 20 и глюкозы — 10. Изолированные сердца перфузировались на установке Лангендорфа (Radnoti, США) оксигенированным (95% O_2 , 5% CO_2) раствором КХ при 37°C и pH=7,3–7,4. Осуществлялась гравитационная ретроградная перфузия под постоянным гидростатическим давлением 80 см вод. ст. Для снижения автоматии сердца предсердия (и синоатриальный узел) удаляли, а атриовентрикулярный узел разрушали инъекцией формалина (0,05 мл 10% раствора). Для воспроизведения кальциевой перегрузки [16] в экспериментах использовали убаин производства Sigma (США).

Запись внутрижелудочкового давления. Латексный баллончик, заполненный водой, помещали в полость левого желудочка, при этом конечно-диастолическое давление устанавливалось на уровне 10–20 мм рт. ст. Изменения внутрижелудочкового давления (LVP) при изоволюмическом режиме регистрировали при помощи датчика давления модели MPX5050D (Freescale, США). По кривой LVP подсчитывали максимальное

(систолическое) давление в левом желудочке (LVP_{max}), а по производной сигнала рассчитывали максимальную скорость сокращения левого желудочка ($+dP/dt_{max}$) как основной параметр сократимости изолированного сердца. Сигналы записывали на АЦП NI-6221 (National Instruments, USA) при помощи программы PowerGraph Professional (версия 3.3.7, Россия).

Стимуляция. Сердца стимулировали биполярными электродами-крючками из нержавеющей стали, размещенными на межжелудочковой перегородке со стороны эндокарда правого желудочка. Программируемую стимуляцию выполняли с помощью изолированного стимулятора модели 2100 (A-M Systems, США) и программного обеспечения IDL. Стимуляцию производили электрическими прямоугольными импульсами длительностью 1 мс и силой, в два-три раза превышающей пороговую. Для получения лестницы использовали повышающие и понижающие протоколы. В каждом цикле (обычно 60 с) период стимуляции (T) увеличивался или уменьшался с шагом 20 мс.

Обработка данных. Данные выражались как среднее \pm SEM. Сравнение групп велось с использованием теста ANOVA, для внутригрупповых сравнений применяли критерий Вилкоксона. Отличия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты.

Ответ сократимости на изменение ритма сердца (переходный период). Получено два противоположных ответа нормализованного давления в левом желудочке сердца на замедление и ускорение ритма стимуляции (рис. 1). При изменении периода стимуляции сократимость не сразу устанавливается на определенном уровне, всегда наблюдается двухфазный переходный период. Например, при увеличении периода сила первого сокращения B_1 после изменения частоты во всех случаях выше в сравнении с предшествующим уровнем B_0 . После усиленного первого удара наблюдается быстрое

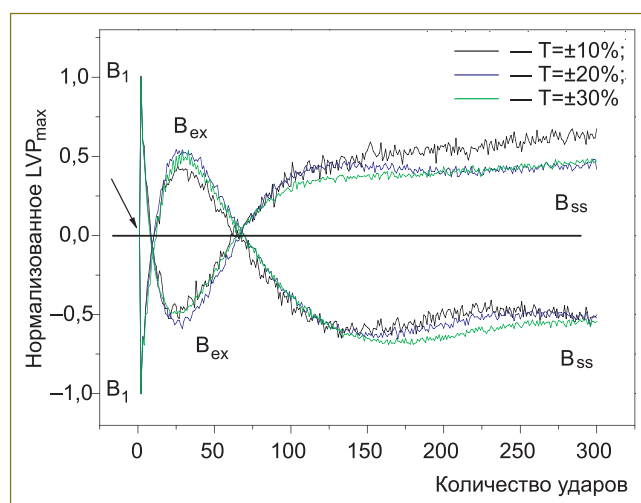


Рис. 1. Типичные примеры ответов сократимости изолированного сердца на переключение периодов стимуляции T ; $[Ca^{2+}]_o = 2,5$ ммоль. Нормализованное систолическое давление LVP_{max} относительно ударов; переключение со 150 мс на 10, 20 и 30% в обе стороны

уменьшение сократимости: LVP_{max} падает к некоторому минимальному (экстремальному) уровню (B_{ex}), который обычно ниже предшествующего B_0 и затем возрастает опять. Падение силы ниже предшествующего значения B_0 характеризует отрицательный овершут ($B_{ex} - B_0$). После переходного периода сократимость стремится к некоему стационарному уровню B_{ss} , характерному для нового периода стимуляции. Для укорочения периода стимуляции (ускорение) картина переходного периода симметрична вышеописанной (см. рис. 1).

Зависимость от длительности стимуляции. Для оценки влияния длительности стимуляции (t) на хроноинотропную зависимость мы провели ряд экспериментов при стимуляции сердца с разной длительностью протоколов (рис. 2). Установлено, что даже при стимуляции длительностью 180–300 с (5 мин) одной частотой при $[Ca^{2+}]_o = 1$ ммоль в сократимости наблюдается некий тренд. Если же переключать частоты каж-

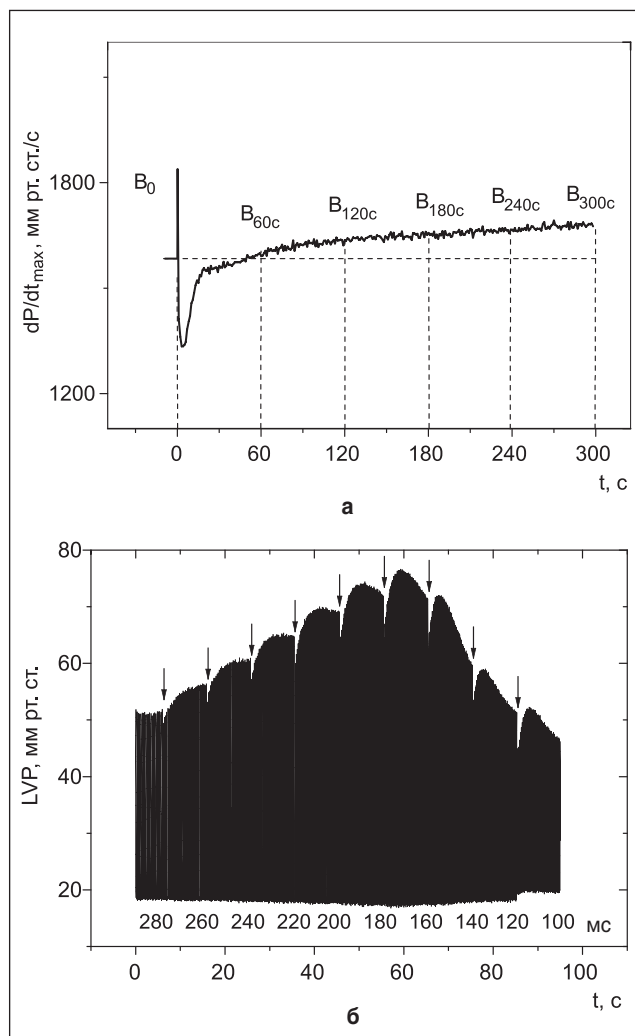


Рис. 2. Влияние длительности стимуляции t на сократимость: а — максимальная скорость сокращения в левом желудочке (dP/dt_{max}); переключение — 120–140 мс, длительность стимуляции — 300 с, $[Ca^{2+}]_o = 1$ ммоль; б — лестница левожелудочкового давления (LVP), переключения — 280–100 мс с шагом 20 мс каждые 10 с; стрелками показаны моменты переключений

дые 10 с, то каждое переключение будет совпадать с переходным периодом и результат может быть как положительным, так и отрицательным, в зависимости от частоты (рис. 2, а). Это наглядно демонстрирует рис. 2, б: при переключении периодов стимуляции в сторону ускорения очень легко получить лестницу положительной хроноинотропной зависимости в диапазоне 280–160 мс (шаг — 20 мс). При стимуляции с периодом 140–100 мс падение сократимости после V_{ex} становится быстрее, что приводит к отрицательной хроноинотропии. Если же посмотреть результаты 60-секундных протоколов, хроноинотропная зависимость будет отрицательной во всем диапазоне (рис. 3, а). Исходя из этого мы посчитали целесообразным использовать в качестве параметра сократимости не V_{ss} (стационарное состояние), а сократимость сердца на определенной секунде после смены периода стимуляции, например V_{60c} .

Влияние концентрации кальция в растворе. Для оценки влияния концентрации внеклеточного кальция на зависимость сила–частота мы использовали растворы КХ с разной концентрацией Ca^{2+} . Известно, что концентрация кальция в растворе КХ является зави-

шенной (2,5 ммоль), в плазме крови крыс она колеблется около 1 ммоль [17, 18]. Рис. 3, а демонстрирует результаты применения протоколов стимуляции в виде отрицательной хроноинотропной зависимости V_{60c} , которая не чувствительна к направлению изменения периода стимуляции. Следует отметить, что величина dP/dt_{max} изменяется почти линейно с изменением периода. Так, значение V_{60c} падало в сумме на 27% ($p < 0,001$) при уменьшении периода стимуляции с 180 до 100 мс. При увеличении периода со 100 до 180 мс (замедлении) сила сокращений повышалась и значение dP/dt_{max} возрастало на 48% ($p = 0,0002$). При использовании теста ANOVA не отмечено статистически значимых отличий между протоколами. В ходе анализа хроноинотропной зависимости изолированного сердца при перфузии стандартным раствором КХ во время переходного периода после изменения периода стимуляции, а именно первого удара V_1 и экстремального удара V_{ex} (рис. 3, б), выявлено, что для всех параметров сократимости сохраняется отрицательная зависимость сила–частота.

На рис. 3, в изображены хроноинотропные зависимости для раствора КХ, который содержит 1 ммоль

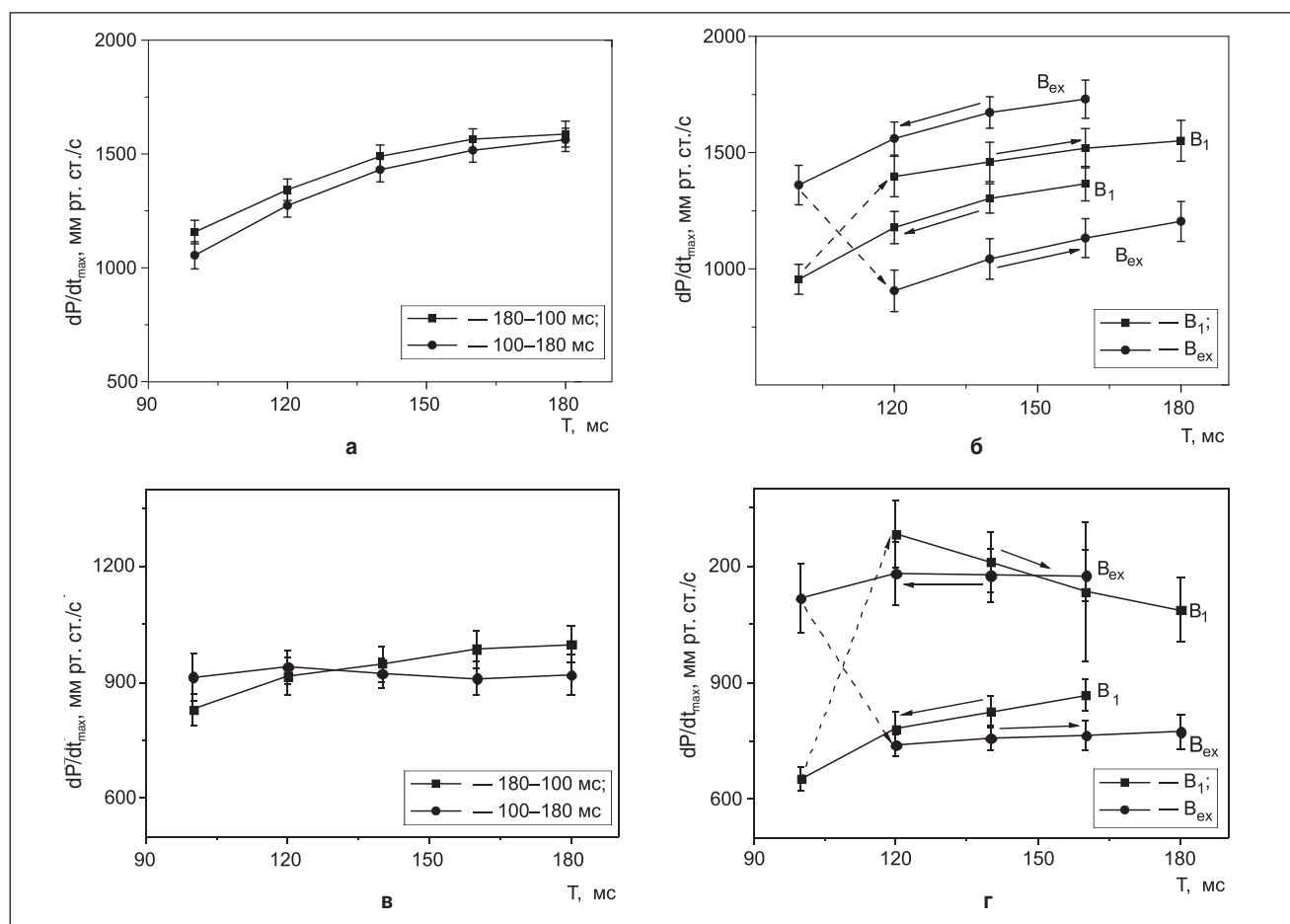


Рис. 3. Зависимость сила–период при перфузии изолированного сердца крысы стандартным раствором Кребса–Хензелейта с $[Ca^{2+}]_o = 2,5$ ммоль и 1 ммоль при изменении периодов стимуляции T в диапазоне 100–180 мс: а — сократимость (dP/dt_{max}) на 60-й секунде стимуляции (V_{60c}), $[Ca^{2+}]_o = 2,5$ ммоль; б — сократимость первого (V_1) и экстремального (V_{ex}) ударов, $[Ca^{2+}]_o = 2,5$ ммоль; в — сократимость (dP/dt_{max}) на 60-й секунде стимуляции, $[Ca^{2+}]_o = 1$ ммоль; г — сократимость первого (V_1) и экстремального (V_{ex}) ударов, $[Ca^{2+}]_o = 1$ ммоль; стрелками показаны направления изменения периодов

Ca^{2+} . Сердце на фоне сниженного уровня кальция в растворе развивает меньшую силу, что является вполне закономерным результатом. Например, значение сократимости V_{60c} снижено на 40% в сравнении с группой 2 ммоль Ca^{2+} при периоде стимуляции 180 мс ($p < 0,0001$). Хроноинотропная зависимость в данной серии экспериментов была близкой к нулю. В переходном периоде выявлена более сложная зависимость (рис. 3, г). При ускорении ритма (стрелка влево) хроноинотропная зависимость для V_{ex} близка к нулю, тогда как значение V_1 проявляет отрицательную зависимость. Во время замедления ритма величина V_{ex} проявляла независимость от периода стимуляции, а зависимость V_1 от него становилась положительной. Таким образом, параметры переходного периода являются более чувствительными к уровню внешнего кальция.

Влияние убаина. При перфузии сердца крысы раствором КХ с убаином (50 мкмоль) наблюдалась отрицательная зависимость сила–частота (рис. 4, а), как и в случае с обычным раствором КХ. Перфузия с убаином сопровождалась повышенной восприимчивостью сердца к желудочковым тахикардиям, что наблюдалось почти во всех препаратах в условиях электрической стимуляции. ANOVA-тест не выявил статистически значимых отличий параметров хроноинотропной зависимости для контрольного раствора КХ и перфузии с убаином. Однако, если рассмотреть переходный период в деталях (рис. 4, б), можно заметить, что убаин изменяет относительную величину овершута для обоих протоколов и замедляет сам переходный процесс.

Обсуждение. Несмотря на то, что открытие Бюджича было сделано более 140 лет назад, механизмы отрицательных частотно-силовых взаимоотношений до сих пор остаются предметом дискуссий. Наши эксперименты на изолированных сердцах крыс и перфузии по Лангендорфу показали, что при использовании стандартного раствора Кребса–Хензелейта с $[\text{Ca}^{2+}]_o = 2,5$ ммоль наблюдается отрицательная хроноинотропия (см. рис. 3, а). Изменение знака возможно при уменьшении содержания кальция в растворе (см. рис. 3, в), что согласуется с данными других авторов [4, 12].

Нами установлено, что при сниженном уровне кальция переходный период после переключения частоты может длиться 3–5 мин и более, в результате чего давление, развиваемое в левом желудочке, не достигает стационарного состояния к 120-й и даже к 180-й секунде (см. рис. 2, а). Другими авторами показано меньшее время для сердечных препаратов крыс и кроликов, соответственно 5–15 и 45 с [12]. Отсюда могут быть потенциальные ошибки, которые обусловлены выбором длительности стимуляции. Так, в работе Henry [9] переключение частот производилось каждые 10 с, результатом чего была положительная лестница в изолированном сердце крысы. Мы повторили этот эксперимент, получив также положительную

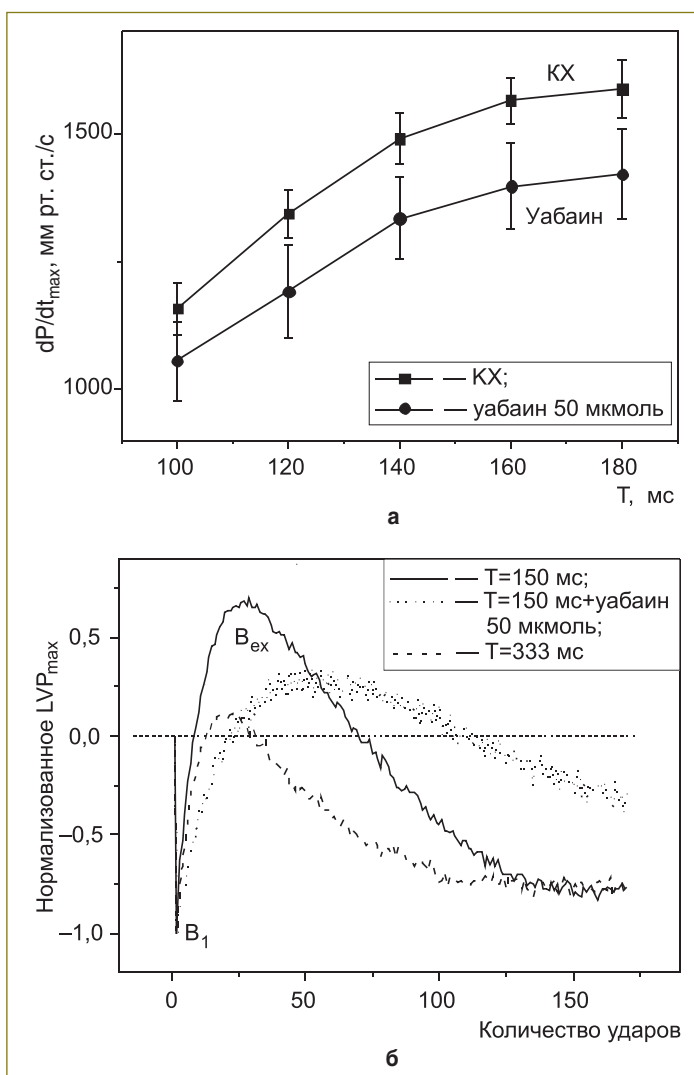


Рис. 4. Влияние перфузии с убаином (50 мкмоль): а — зависимость сила–частота для контрольного раствора Кребса–Хензелейта и раствора с убаином; б — давление в левом желудочке относительно количества ударов, показан переходный период при переключении 150–105 мс

лестницу (см. рис. 2, б), хотя при более длительной стимуляции (60 с) наблюдались отрицательные взаимоотношения. Важно отметить, что в нашей работе не происходило неадекватной перфузии и ишемии сердца, так как коронарный ток во время экспериментов находился в нормальном диапазоне — 8–15 мл/мин. Причем нестабильность параметров сократимости усиливалась при сниженном уровне кальция, а именно в таких условиях коронарный ток, наоборот, увеличивался (данные не представлены).

Классическое представление о хроноинотропной зависимости связано с поиском стационарного состояния при стимуляции. На наш взгляд, использование параметров сократимости, первого удара V_1 или экстремального удара V_{ex} может дать дополнительную информацию о регуляторных процессах в сердце. Нами впервые отмечено, что в случае перфузии стандартным раствором КХ изменение V_1 и V_{ex} подчиняется тем же закономерностям, что и «квазистационарная»

сократимость V_{60c} (см. рис. 3, б). Интересно заметить, что при сниженном уровне кальция в растворе КХ наблюдается разносторонняя динамика поведения сократимости в переходном периоде, а именно V_1 и V_{ex} . Например, V_1 начинает демонстрировать как положительную, так и отрицательную зависимость сила–частота при замедлении и ускорении, в то время как V_{ex} сохраняет независимость от периода стимуляции и направления изменения периода (см. рис. 3, г). Если при перфузии стандартным КХ $[Ca^{2+}]_o=2,5$ ммоль наблюдаются симметричные ответы на разносторонние изменения периодов (см. рис. 1), то при уменьшении концентрации Ca^{2+} до 1 ммоль переходный период отличается при разных протоколах стимуляции. Очевидно, системы, регулирующие гомеостаз кальция внутри клетки, связаны с внеклеточной $[Ca^{2+}]_o$, возможно через работу Na^+/Ca^{2+} -обменника, который чувствителен к концентрации $[Ca^{2+}]_o$ [19].

Наконец, мы предположили, что, увеличивая содержание кальция внутри клетки, можно также менять хроноинотропную зависимость. Однако эксперименты с убаином показали, что кальциевая перегрузка (о чем можно судить по увеличенной восприимчивости к желудочковым аритмиям [16]) не сопровождается статистически значимым изменением знака зависимости сила–частота (см. рис. 4, а). Таким образом, увеличение внутриклеточного кальция не оказывает существенного влияния на хроноинотропные эффекты.

Заключение. В перфузируемом растворе в зависимости от концентрации кальция меняется динамика переходного процесса при переключении частот и, как следствие, знак частотно-силовых взаимоотношений. Внутриклеточный кальций незначительно влияет на частотно-силовые взаимоотношения.

Источник финансирования: грант National Science Council of Taiwan.

Литература/References

1. Endoh M. Force-frequency relationship in intact mammalian ventricular myocardium: physiological and pathophysiological relevance. *European Journal of Pharmacology* 2004; 500(1–3): 73–86.
2. Palomeque J., Petroff M.V. et al. Multiple alterations in Ca^{2+} handling determine the negative staircase in a cellular heart failure model. *J Card Fail* 2007; 13(2): 143–154.
3. Hoffman B.F., Kelly J.J.Jr. Effects of rate and rhythm on contraction of rat papillary muscle. *Am J Physiol* 1959; 197: 1199–1204.
4. Bouchard R.A., Bose D. Analysis of the interval-force relationship in rat and canine ventricular myocardium. *Am J Physiol* 1989; 257(6 Pt 2): H2036–H2047.
5. Lewartowski B., Pytkowski B. Cellular mechanism of the relationship between myocardial force and frequency of contractions. *Prog Biophys Mol Biol* 1987; 50(2): 97–120.
6. Noble M.I.M., Seed W.A. Part II. The General Process. In: *The Interval-force relationship of the heart: Bowditch revisited*. New York: Cambridge University Press; 1992.
7. Colbert C.M. A circuit within a circuit? *The Journal of Physiology* 2007; 579(2): 289.
8. Janssen P.M., Periasamy M. Determinants of frequency-dependent contraction and relaxation of mammalian myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 43(5): 523–531.
9. Henry P.D. Positive staircase effect in the rat heart. *Am J Physiol* 1975; 228(2): 360–364.
10. Frampton J.E., Harrison S.M. et al. Ca^{2+} and Na^+ in rat myocytes showing different force-frequency relationships. *Am J Physiol* 1991; 261(5 Pt 1): C739–C750.
11. Frampton J.E., Orchard C.H. et al. Diastolic, systolic and sarcoplasmic reticulum $[Ca^{2+}]$ during inotropic interventions in isolated rat myocytes. *J Physiol* 1991; 437: 351–375.
12. Layland J., Kentish J.C. Positive force- and $[Ca^{2+}]_i$ -frequency relationships in rat ventricular trabeculae at physiological frequencies. *Am J Physiol* 1999; 276(1 Pt 2): H9–H18.
13. Fabiato A. Myoplasmic free calcium concentration reached during the twitch of an intact isolated cardiac cell and during calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned cardiac cell from the adult rat or rabbit ventricle. *J Gen Physiol* 1981; 78(5): 457–497.
14. Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 1983; 245(1): C1–C14.
15. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press; 2011.
16. Vassalle M., Lin C.I. Calcium overload and cardiac function. *J Biomed Sci* 2004; 11(5): 542–565.
17. Forester G.V., Mainwood G.W. Interval dependent inotropic effects in the rat myocardium and the effect of calcium. *Pflugers Arch* 1974; 352: 189–196.
18. Janssen P.M.L., Varian K.D. Frequency-dependent acceleration of relaxation involves decreased myofilament calcium sensitivity. *Am J Physiol-Heart Circul Physiol* 2007; 292: H2212–H2219.
19. Bers D.M. Sarcolemmal Na/Ca exchange and Ca pump. In: *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force*. Dordrecht, Boston: Kluwer Academic Publishers; 2001.