

Laktat i hjernen – uten å surne

Sammendrag

Hjernens energimetabolisme blir betraktet som fullstendig aerob med glukose som det viktigste energisubstratet for nevroner både i hvile og under aktivering. I den senere tid er dette synet blitt noe endret, og andre energimetabolitter viser seg å ha en større betydning i hjernens energimetabolisme enn tidligere antatt.

Under hjernens utvikling blir både laktat og ketonlegemer brukt som energisubstrat. Ved sult, hypoglykemi og diabetes er også laktat og ketonlegemer vist å være viktige energimetabolitter. Ved intens fysisk aktivitet benytter hjernen laktat fra blodbanen. Laktat og andre monokarboksylylater trenger gjennom cellemembranen ved hjelp av spesifikke proteiner, monokarboksylylattransportører (MCT). Disse transportørene er transmembrane proteiner som katalyserer kotransport av et monokarboksylation sammen med et proton. Hvorvidt transporten går ut eller inn av en hjernecelle, bestemmes av konsentrasjonsgradienten for monokarboksylylatene og av pH-gradienten.

Frem til i dag er tre forskjellige monokarboksylylattransportører vist å være uttrykt i hjernen: MCT1, MCT2 og MCT4. MCT1 er konsentrert i kapillarenes endotelceller. MCT2 er konsentrert i nevroner, mens MCT4 først og fremst finnes i astrocytter. Nevroner blir sett på som laktatkonsumenter, mens astrocytter blir ansett som laktatprodusenter. Laktat kan være et viktig energisubstrat for nevroner, for eksempel ved iskemi.

Engelsk sammendrag finnes i artikkelen på www.tidsskriftet.no

Oppgitte interessekonflikter: Ingen

Linda Hildegard Bergersen

l.h.bergersen@medisin.uio.no
Anatomisk institutt og Senter for molekylærbiologi og nevrovitenskap
Universitetet i Oslo
Postboks 1105 Blindern
0317 Oslo

De fleste nordmenn kjenner til melkesyre gjennom idrettslig utfoldelse og begrensningen som sure muskler kan gi. Monokarboksylylater slik som ketonlegemer, pyruvat og laktat (melkesyrens anion) ser ut til å spille en viktig rolle ikke bare i skjelettmuskulaturen, men også i hjernens energimetabolisme. Forståelsen av virkningen er ufullstendig, særlig gjelder dette laktat som inntil nylig er blitt sett på som et avfallsprodukt som må fjernes via sirkulasjonen for ikke å være toksisk for hjernen. Glukose er hjernens energisubstrat nummer en, men i det siste tiåret har også monokarboksylylatene vist seg å være viktige energisubstrater for de forskjellige celler i hjernen og dermed viktige for å opprettholde hjernens funksjon (1, 2). Transportørene for laktat og andre monokarboksylylater, monokarboksylylattransportørene, styrer omsetningen av disse substratene og er derfor av stor interesse. Vi er bare i begynnelsen av å kartlegge og forstå hvordan monokarboksylylatene og deres transportører påvirker synaptisk transmisjon og nervecelleenes trivsel. Under følger en oversikt over dette forskningsfeltet.

Laktat som energisubstrat

Monokarboksylylater er særlig viktige energisubstrater under utviklingen av hjernen. Et forhøyet laktatnivå er målt i blodet hos nyfødte, og laktat er et viktig energisubstrat rett etter fødselen. Monokarboksylylatene acetoacetat og β -hydroksybutyrat dannes ved at leveren oksiderer fettsyrer fra morsmelk. De representerer viktige energisubstrater for utvikling av hjernen i dieperioden (3). Hjernen forbruker også monokarboksylylater under forskjellige patofysiologiske forhold som sult, diabetes, hypoglykemi og iskemi (4, 5).

Hjernen tar laktat fra blodet

Under normale fysiologiske forhold er det vist at hjernen benytter laktat fra blod ved intens fysisk aktivitet, som er en tilstand der mengden sirkulerende laktat øker (6). En slik rolle for blodbåret laktat ble vist både

ved måling av de arteriovenøse forskjellene og ved positronemisjonstomografisk fremstilling av fluorodeoksyglukoseopptak. Man kunne da se en reduksjon i cerebralt glukoseopptak når laktat var tilgjengelig. Også studier med magnetisk resonansspektroskopi viser at laktat oksideres omgående i hjernen etter å ha passert blod-hjerne-barrieren (7).

Nevroner liker laktat

Nevroner kan effektivt bruke monokarboksylylater som energisubstrat. Laktat blir oksidert i flere forskjellige nervepreparater, slik som i hjerneskliver, i nevroner i kultur og i synaptosomer (avrevne nerveender). Det ble funnet at laktat ble oksidert til CO₂ raskere i synaptosomer enn i astrocytter, og nevroner i kultur foretrakk laktat fremfor glukose som substrat for oksidasjon (8).

Astrocytter lager laktat

Astrocytter produserer store mengder laktat, og de representerer sannsynligvis den største kilden for laktat blant hjernecellene. Under bestemte forhold kan astrocytter bruke noe laktat som energisubstrat, men i mye mindre grad enn nevroner og oligodendrocytter. Astrocyttene kan også bruke laktat som et råstoff for glukoneogenese og glykogensyntese. Imidlertid er mengden som kan forbrukes i disse reaksjonene, liten sammenliknet med den store kapasiteten for laktatproduksjon. Laktatfrigjøring fra astrocyttene fremmes av glutamat i ekstracellulærvæsken (9). Glykogenmobilisering og frigjøring av laktat er essensielle mekanismer for å opprettholde aksjonspotensialer i aksoner i hvit substans (10).

Disse dataene understreker at laktat og andre monokarboksylylater blir brukt som energisubstrat av hjerneceller og først og

! Hovedbudskap

- Laktat er et viktig energisubstrat rett etter fødselen
- Hjernen benytter laktat fra blodbanen ved intens fysisk aktivitet
- Egne transportører for laktat finnes i hjernen
- Gliaceller produserer store mengder laktat
- Nevroner konsumerer laktat

fremst nevroner. Det finnes flere holdepunkter for at laktat kan opprettholde nevronal aktivitet ved glukosemangel (11), selv om det er en del uoverensstemmelser når det gjelder hvor effektivt laktat egentlig er til å gjøre dette (12). Hvis man erstatter ekstracellulær glukose med laktat eller pyruvat, kan synaptisk transmisjon opprettholdes, etter forbigående stans. Laktat er rapportert å ha en nevroprotektiv effekt under iskemiske forhold og andre forhold der glutamat opphopes ekstracellulært og gir eksitotoksisk celledskade (11, 13).

Skjelettmusklene leverer laktat til både hjertet og hjernen

Ved hjelp av monokarboksyilattransportørene kan laktat som produseres i én celle fraktes ut av denne cellen for å bli tatt opp i og forbrukt av nabocellen. Slik trafikkering mellom ulike celletyper er godt dokumentert i skjelettmuskel: glykolytiske muskelceller produserer og eksporterer laktat. Dette laktatet kan enten bli tatt opp av oksidative nabomuskelceller som oksiderer laktatet, eller fraktes med blodbanen til annen oksidativ muskulatur. For eksempel foretrekker hjertet laktat: 60% av hjertets energi kommer fra laktat via blodbanen.

For at blodbåren laktat eller andre monokarboksylater skal nå hjernen, må disse stoffene krysse blod-hjerne-barrieren (14).

Proteiner frakter laktat gjennom cellemembranen

Monokarboksylater er hydrofile substanser som vanskelig kan trenge igjennom cellemembraner. Monokarboksyilattransportørene utgjør transportsystemet som er nødvendig for å bringe dem igjennom blod-hjerne-barrieren og igjennom de enkelte hjernecellers plasmamembraner (fig 1). Tidligere trodde man at monokarboksylatene passerte cellemembranen ved fri diffusjon. Det var først etter at det ble demonstrert at α -cyano-4-hydroksycinnamat hemmet opptak av laktat og pyruvat i erytrocytter, at en spesifikk monokarboksyilattransportørmekanisme ble fastslått (15). Etter hvert ble det klart at det eksisterer en hel familie av monokarboksyilattransportører. I dag er det molekylært identifisert 14 medlemmer (16). Det er likevel kun de fire første (MCT1–MCT4) som er blitt funksjonelt karakterisert, og det er kun disse som hittil har vist transport av monokarboksylater (15, 16).

Disse fire monokarboksyilattransportørene er avhengige av protoner for normal transportaktivitet. De kotransporterer et monokarboksylation med et proton. De kvantitativt viktigste substratene laktat og pyruvat, men også ketonlegemene acetoacetat og β -hydroksybutyrat kan under visse forhold transporteres i stor utstrekning. Hver subtype av disse transportørene har sin distinkte affinitet for hver av de forannevnte substratene. MCT2 har den høyeste affiniteten med $K_m \sim 1$ mmol/l for laktat, mens MCT4 har en lav affinitet med $K_m \sim 40$ mmol/l. MCT1 og

MCT3 har affiniteter mellom disse ytterpunktene (K_m hhv. ~ 4 mmol/l og ~ 6 mmol/l) (16). Som skissert for hjernen i figur 1 svarer monokarboksylatenes affinitet for laktat med den spesifikke vevsdistribusjonen deres. MCT2 finnes i celler som hovedsakelig tar opp laktat (nevroner og leverceller) (17, 18). MCT4 finnes i glykolytiske celler som hovedsakelig produserer og eksporterer laktat, slik som astrocytter og raskt kontraherende muskelceller (18–20). MCT1 er uttrykt både i celler som produserer laktat (erytrocytter, astrocytter) og som konsumerer laktat (hjerteceller, oksydative langsomt kontraherende muskelceller) (20, 21), og i celler der laktat er i transit (endotelceller, ependymceller). MCT3 finnes kun i pigmentepitelet i retina. I hjernen er MCT1, MCT2 og MCT4 påvist både på cellulært og subcellulært nivå (17, 19, 22). De viktigste funnene av monokarboksyilattransportører i hjernen blir omtalt under.

MCT1

MCT1 er uttrykt i hele hjernen hos mus og rotter både på mRNA- og proteinnivå. I unge og voksne dyr er MCT1-proteinet uttrykt i endotelceller som kler kapillarer og i ependymceller som kler ventriklene. Ved hjelp av metoden elektronmikroskopisk immunogull

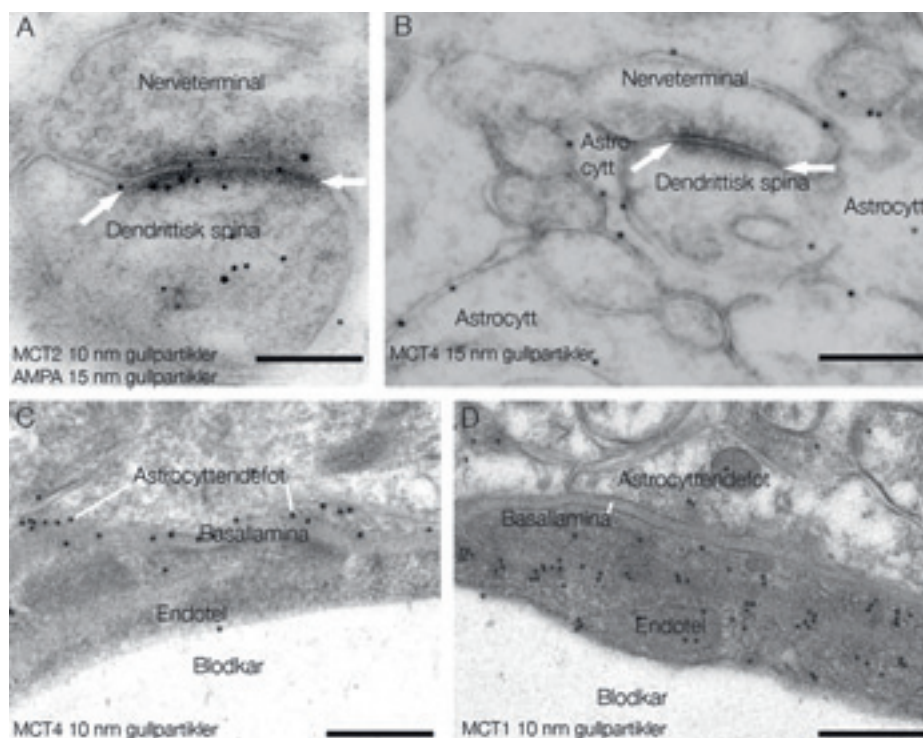
har jeg funnet at MCT1 kun finnes i kapillarendotelet (fig 1D, 2). MCT1 er ikke påvist i nevroner i intakt hjerne hos voksne dyr, men er påvist i nevronkulturer (23).

MCT2

MCT2-proteinet og dets mRNA er utbredt i nevroner i hjernen (cerebellum, hippocampus og cortex) (8, 17, 18, 22). Den ultrastrukturelle fordelingen av MCT2 ble første gang påvist med elektronmikroskopisk immunogull-teknikk (17). Det viste seg at MCT2 har en svært uvanlig lokalisering til et transportprotein å være, nemlig i den postsynaptiske tettheten til eksitatoriske synapser (fig 1A, 2). Den postsynaptiske lokaliseringen til MCT2 ser ut til å være et generelt trekk ved glutamaterge synapser, men tettheten av MCT2 varierer mellom forskjellige glutamaterge synapser (17, 19, 22).

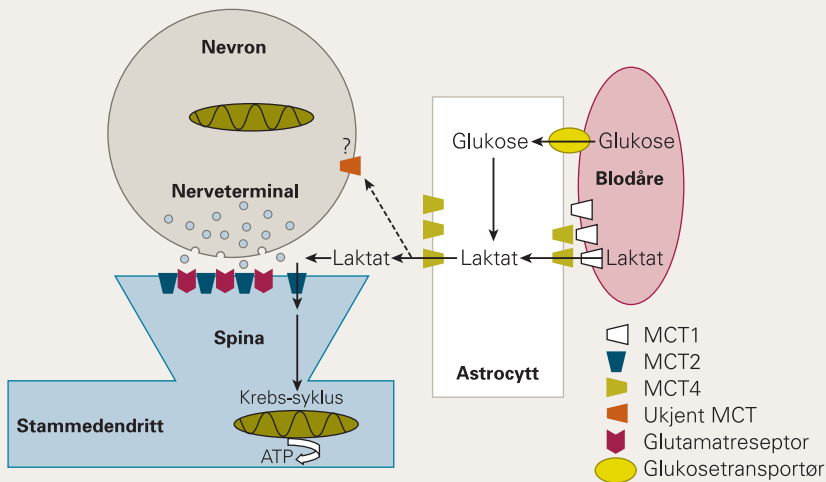
MCT4

Få studier omfatter MCT4-distribusjonen i hjernen. Vi har påvist MCT4 i cellemembraner til astrocytter (17) i voksne dyr, både rundt synapsene og i endeføttene omkring blodkar (fig 1B, 1C, 2). Inntil sju dager etter fødselen er det lite MCT4 å finne i hjernen. Når rottene er 14 dager gamle, har MCT4 steget til et nivå som ses hos voksne. Øknin-



Figur 1 Ved den såkalte postembedding immunogull-metoden kan man identifisere proteiner på elektronmikroskopisk nivå. A) Gullmerking av både glutamatreseptorer (AMPA) (store gullpartikler 15 nm) og monokarboksyilattransportører (MCT2) (små gullpartikler 10 nm) i en glutamaterg synapse fra lillehjernen. Glutamatreseptorene og MCT2 er kolokalisert i synapsmembranen på en dendrittisk spina, og i vesikulære organeller (som har med frakting av proteinene til og fra plasmamembranen å gjøre). B) 10 nm gullpartikler som representerer MCT4 i Bergmann-glia (astrocytter) som omkranser en glutamaterg synapse i lillehjernen. De hvite pilene angir den postsynaptiske tettheten. C) 10 nm gullpartikler som representerer MCT4 i astrocytendeføten i kontakt med basallamina i et blodkar fra hippocampus (hjernens læringsentral). D) Fra samme område som bilde C. MCT1 sitter i endotelet (mellom basallamina og karlumen), hvor det er lokalisert også over intracellulære organeller (transportvesikler). Målestokk 150 nm i A og B, 200 nm i C og D

Figur 2



Forenklet tegning av trafikkering av laktat mellom ulike hjerneceller. Nervenceller mottar «ferdigforðøyd» substrat i form av laktat til sin energiproduksjon fra astrocytter. Dette laktatet stammer fra glykolytisk nedbryting av glukose og glykogen i astrocyttene. Under visse forhold, for eksempel rett etter fødselen og under hard fysisk aktivitet, skjer laktatimport i større grad direkte fra blodbanen. Dette skjer via MCT1 i endotelet (fig 1D). MCT4 i gliacellemembranen og MCT2 på nevronenes dendritter er viktige i denne laktattrafikkeringen mellom gliaceller og nevroner. Astrocyttene inneholder få mitokondrier og er i likhet med raske muskelfibre glykolytiske (laktatproduserende). Astrocyttene omkranser nervecellene med sine lange og tynne utløpere samtidig som andre utløpere fra samme astrocytt kontakter blodbanen. Begge disse ulike delene av astrocytten inneholder MCT4. I den perivaskulære delen av astrocytten (endefoten, fig 1C) fungerer MCT4 sannsynligvis som en laktatimportør. I de lange og tynne utløperne av astrocyttene som omkranser synapser (fig 1B) fungerer MCT4 sannsynligvis som en laktateksportør. MCT2 frakter dette laktatet inn i postsynaptiske dendritter (fig 1A), som har mange mitokondrier og er oksidative (laktatkonsumerende). Nerveterminalene har et meget stort energibehov under synaptisk aktivitet og forventes også å ha en monokarboksylattransportør i celledemembranen. Denne er foreløpig ikke identifisert.

gen sammenfaller i tid med økningen i antall synapser. Under hele utviklingen er MCT4 lokalisert i astrocytter (18).

Funksjonelle roller

Laktat kan virke som energisubstrat for hjernen enten ved at det tas opp fra blodbanen eller ved at hjernen selv produserer laktat. Astrocytter er hjernens laktatprodusenter. De har en høy glykolytisk kapasitet og det antas at deres laktatproduksjon tiltar ved økt nevronal aktivitet (12, 19). Oppdagelsen av at forskjellige monokarboksylattransportører finnes i forskjellige celletyper i hjernen, har gitt ny forståelse av hvordan laktat kan frigjøres fra astrocytter og tas opp i nabonevroner (fig 1, 2). Som nevnt over har de enkelte monokarboksylattransportørene forskjellig kinetikk: MCT2 (lav Km) passer godt til å ta opp monokarboksylater fra ekstracellulærrummet, mens MCT4 (høy Km) kan passe til å slippe laktat ut av astrocyttene for opptak i nevroner. Det er essensielt at laktat må ut av en glykolytisk celle for å sikre fortsatt høy glykolytisk rate. Hvis laktat akkumuleres inne i cellen, vil glykolyse stoppe opp. Laktat som produseres og frigis fra astrocyttene, blir tilgjengelig som et ekstra energisubstrat for aktiverte nevroner via opptak gjennom MCT2, som er konsen-

trert i spinae i glutamaterge synapser (17, 19) (fig 1, 2). Dette passer med observasjonen at laktat, i likhet med glukose, kan bidra til å opprettholde nevronal aktivitet, slik som synaptisk aktivitet og aksjonspotensialutførelse (10, 24).

Laktat kan beskytte mot celledøde

Observasjoner tyder på at et økt monokarboksylatopptak kan ha en neuroprotektiv effekt. MCT2 overuttrykt i nevronkulturer gir neuroproteksjon mot eksitotoksisitet. Modulering av monokarboksylattransportører vil være med på å regulere tilgjengeligheten av laktat som energikilde (8, 25). Hemming av laktattransport (med den reversible kompetitive hemmeren α -cyano-4-hydroksycinnamat) eller blokkering av glukoseforbruk (med 2-deoksyglukose) fører til celledød i hjerneskiver in vitro. Celledøden kan i begge tilfeller hindres ved tilførsel av laktat i mediet (13).

Interessant i denne sammenhengen er at hyperglykemi øker hjerneskaden ved slag, og at laktat er blitt sett på som det stoffet som forårsaker denne skaden. Imidlertid er det holdpunkter for at det er acidose sammen med en høy glukosekonsentrasjon, og ikke høye laktatnivåer, som forsterker hjerneskaden under iskemi (26).

Transportkapasiteten reguleres etter behov

Monokarboksylattransportører finnes i de fleste vevstyper og deres ekspresjon er regulert etter vevets fysiologiske behov. MCT1 og MCT4 i muskulatur blir oppregulert ved fysisk trening (27). Ved reinnervasjonsforsøk er det vist at impulsaktiviteten bestemmer både cellens fysiologiske egenskaper og hvilke monokarboksylattransportører de skal uttrykke (20). MCT1 blir oppregulert i den friske delen av hjertet når hjertet blir utsatt for iskemi (21). MCT1 som finnes i blodårenes endotelceller tillater monokarboksylater i blodet å krysse blod-hjernebarrieren og bli tilgjengelige som energisubstrat for hjernen. Dette vil være spesielt viktig under forhold hvor glukosetilgjengeligheten er redusert. Eksempel er hypoglykemi eller fysiske anstrengelser hvor laktatkonsentrasjonen kan bli meget høy. Ved diabetes er glukosetilgjengeligheten redusert, mens monokarboksylatene stiger og blir viktige energisubstrater (14).

Laktat har en spesiell rolle ved eksitatoriske synapser

MCT2 er uttrykt i den postsynaptiske tettheten i glutamaterge synapser, men ikke i GABAerge (undersøkt i hippocampus og cerebellum) (17, 19). Man kan stille seg spørsmålet om denne postsynaptiske lokaliseringen av MCT2 er nødvendig under eksitasjon for å sikre nødvendig energisubstrat til spinae i de eksitatoriske synapsene. Beregninger viser at de postsynaptiske ionestrømmene står for en meget stor del av energiforbruket i hjernen (24). Det er mulig at ekspresjonen av MCT2 blir regulert etter energibehovet. Dette ville være i samsvar med at MCT2 i likhet med AMPA-reseptorer (en type glutamatreseptorer) er lokalisert i intracellulære organeller i spinae (fig 1A). Dette tyder på at MCT2, på samme måte som AMPA-reseptorene, kan settes inn i/tas ut av plasmamembranen og derved regulere synapsenes følsomhet (19). Hvis denne hypotesen viser seg å være riktig, gir det en elegant kobling mellom synaptisk transmisjon og energimetabolisme.

Konklusjon

Laktat er et viktig substrat for energiproduksjon i hjernen. Det forbrukes hovedsakelig av nevroner og produseres av astrocytter. Hjernen kan brenne laktat som er produsert i skjelettmuskulatur og fraktet via blodet. Laktat kan også beskytte mot celledøde i hjernen.

Manuskriptet ble godkjent 30.5. 2006. Medisinsk redaktør Jens Bjørheim.

>>>

Litteratur

1. Aubert A, Costalat R, Magistretti PJ et al. Brain lactate kinetics: modeling evidence for neuronal lactate uptake upon activation. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102: 16448–53.
2. Pellerin L, Bergersen LH, Halestrap A P et al. Cellular and subcellular distribution of monocarboxylate transporters in cultured brain cells and in the adult brain. *J Neurosci Res* 2005; 79: 55–64.
3. Cremer JE. Substrate utilization and brain development. *J Cereb Blood Flow Metab* 1982; 2: 394–407.
4. Schurr A, Payne RS, Tseng MT et al. The glucose paradox in cerebral ischemia. New insights. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 893: 386–90.
5. Schurr A, Payne RS, Miller JJ et al. Blockade of lactate transport exacerbates delayed neuronal damage in a rat model of cerebral ischemia. *Brain Res* 2001; 895: 268–72.
6. Dalsgaard MK, Quistorff B, Danielsen ER et al. A reduced cerebral metabolic ratio in exercise reflects metabolism and not accumulation of lactate within the human brain. *J Physiol* 2003; 554: 571–8.
7. Hassel B, Brathe A. Cerebral metabolism of lactate in vivo: evidence for neuronal pyruvate carboxylation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20: 327–36.
8. Pellerin L, Pellegrini G, Martin JL et al. Expression of monocarboxylate transporter mRNAs in mouse brain: support for a distinct role of lactate as an energy substrate for the neonatal vs. adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3990–5.
9. Pellerin L, Magistretti PJ. Food for thought: challenging the dogmas. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23: 1282–6.
10. Brown AM, Wender R, Ransom BR. Metabolic substrates other than glucose support axon function in central white matter. *J Neurosci Res* 2001; 66: 839–43.
11. Cater HL, Chandratheva A, Benham CD et al. Lactate and glucose as energy substrates during, and after, oxygen deprivation in rat hippocampal acute and cultured slices. *J Neurochem* 2003; 87: 1381–90.
12. Allen NJ, Karadottir R, Attwell D. A preferential role for glycolysis in preventing the anoxic depolarization of rat hippocampal area CA1 pyramidal cells. *J Neurosci* 2005; 26: 848–59.
13. Cater HL, Benham CD, Sundstrom LE. Neuroprotective role of monocarboxylate transport during glucose deprivation in slice cultures of rat hippocampus. *J Physiol* 2001; 531: 459–66.
14. Gladden LB. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *J Physiol* 2004; 558: 5–30.
15. Poole RC, Halestrap AP. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol* 1993; 264: C761–82.
16. Halestrap AP, Meredith D. The SLC16 gene family – from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch* 2004; 447: 619–28.
17. Bergersen L, Wærhaug O, Helm J et al. A novel postsynaptic density protein: the monocarboxylate transporter MCT2 is colocalized with δ 2 glutamate receptors in postsynaptic densities of parallel fiber-Purkinje cell synapses. *Exp Brain Res* 2001; 136: 523–34.
18. Rafiki A, Boulland JL, Halestrap AP et al. Highly differential expression of the monocarboxylate transporters MCT2 and MCT4 in the developing rat brain. *Neuroscience* 2003; 122: 677–88.
19. Bergersen LH, Magistretti PJ, Pellerin L. Selective postsynaptic co-localization of MCT2 with AMPA receptor GluR2/3 subunits at excitatory synapses exhibiting AMPA receptor trafficking. *Cereb Cortex* 2005; 15: 361–70.
20. Bergersen LH, Thomas M, Johannsson E et al. Cross-reinnervation changes the expression patterns of the monocarboxylate transporters MCT1 and MCT4: an experimental study in slow and fast rat skeletal muscle. *Neuroscience* 2006; 138: 1005–13.
21. Johannsson E, Lunde PK, Hedde C et al. Upregulation of the cardiac monocarboxylate transporter MCT1 in a rat model of congestive heart failure. *Circulation* 2001; 104: 729–34.
22. Bergersen L, Rafiki A, Ottersen OP. Immunogold cytochemistry identifies specialized membrane domains for monocarboxylate transport in the central nervous system. *Neurochem Res* 2002; 27: 89–96.
23. Pierre K, Pellerin L. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem* 2005; 94: 1–14.
24. Attwell D, Laughlin SB. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 1133–45.
25. Bliss TM, Sapolsky RM. Interactions among glucose, lactate and adenosine regulate energy substrate utilization in hippocampal cultures. *Brain Res* 2001; 899: 134–41.
26. Cronberg T, Rytter A, Asztely F et al. Glucose but not lactate in combination with acidosis aggravates ischemic neuronal death in vitro. *Stroke* 2004; 35: 753–7.
27. Pilegaard H, Terzis G, Halestrap A et al. Distribution of the lactate/H⁺ transporter isoforms MCT1 and MCT4 in human skeletal muscle. *Am J Physiol* 1999; 276: 843–8.