

# PhD disszertáció tézisei

## Iszkémia/reperfúzió indukálta miokardium károsodás: mechanizmus és prevenció

Pataki Tünde



2001

Témavezető: Prof. Dr. Tószaki Árpád

Programvezető: Prof. Dr. Gergely Lajos

Debreceni Egyetem  
Orvos- és Egészségtudományi Centrum  
Gyógyszerhatástani Tanszék

## Tartalomjegyzék

	oldal
Bevezetés .....	3
Metodikák .....	4
Eredmények .....	7
Eredmények I. ....	7
Eredmények II. ....	7
Eredmények III. ....	9
Megbeszélés .....	9
Megbeszélés I. ....	9
Megbeszélés II. ....	10
Megbeszélés III. ....	10
Következtetések .....	11
Ábrák .....	12-23
Táblázat .....	24
Irodalom .....	25
A disszertációban felhasznált publikációk .....	33

## Bevezetés

A hirtelen szívhalál kiváltó okaként a legtöbb esetben ischaemia vagy ischaemiát követő reperfúzió indukálta kamrafibrilláció húzódik meg (1-2). A reperfúzió indukálta kamrafibrilláció farmakológiai befolyásolhatóságának kutatása különösen lendületet vett, mikor fény derült arra, hogy hasonló aritmiák jöhetnek létre különböző patológiai és klinikai állapotokban, mint például a koronária spazmus spontán oldódását követően (3). A folyamat hátterében feltételezett mechanizmusok és a folyamatban feltételezetten szerepet játszó faktorok és tényezők nagy száma igen bonyolulttá teszi a képet (4-5). Azonban két olyan mechanizmust említeni érdemes, melyek általánosan elfogadottak a reperfúzió indukálta károsodás és a kamrafibrilláció kialakulásának magyarázatára: (i) a  $Ca^{++}$  túltöltés (overload), és (ii) a szabadgyök képződés (6). Sok humán betegség a szabadgyökök túltermelésével jár, mely a sejtkárosodás potenciális lehetőségét hordozza magában. Az oxidatív stresszel összefüggésben álló betegségek közül példaként említhetjük a reperfúziós károsodást, amely szöveti iszkémia vagy stroke után fordul elő, de példaként hozhatjuk fel a gyulladássos megbetegedéseket, amilyen az arthritis is (7-8). A hem biliverdinné és szénmonoxidá (CO) történő oxidatív degradációjában sebesség meghatározó lépés a hemoxigenáz (HO) enzim aktivitása (9). A HO enzimnek két izoenzimét fedezték fel és klónozásuk is megtörtént; a HO-1 indukálható, míg a HO-2 a konstitutív forma (10-11). Kísérletek bizonyítják, hogy a HO-1 enzimet indukálják olyan beavatkozások, melyek oxidatív stresszt hoznak létre, többek között az UV besugárzás, a hipoxia és az iszkémia (7, 12-15). Korábbi kísérletünkben a HO-1 enzim aktivitásának és mRNS expressziójának csökkenését észleltük az iszkémia/reperfúzióval létrehozott szívizom fibrillációban, mely a nem fibrilláló izolált szíveknél nem volt tapasztalható (16). Ezért a témát más szemszögből közelítettük meg. A fent említett jelenségről feltételeztük, hogy a HO-1 enzim aktivitása és mRNS expressziója akkor is lecsökken, ha nem iszkémiás, de elektromosan fibrillálásra ösztökélt szíveket vizsgálunk. Ha ezen feltételezésünket igazolni tudjuk, úgy kísérletes bizonyítékát adjuk annak, hogy a HO-1 enzim mRNS „downregulációja” fontos szerepet a reperfúzió indukálta kamrafibrilláció kialakulásában. Kísérleteink arra is választ adhatnak, hogy a HO-1 enzim aktivitása és mRNS expressziójának változása elindítója lehet-e a reperfúzió indukálta kamrafibrillációnak.

Sok mechanizmus létezik az aritmiák okának és kialakulásának magyarázatára, tudomásunk szerint azonban olyan kísérletet még senki sem végzett, mely tisztázná a kamrafibrilláció mechanizmusát az iszkémia/reperfúzió után átesett szívek esetében a gén expresszió változás szintjén.

A disszertáció második felében górcső alá vontuk az oxidatív stressz szerepét spontán hipertenzív patkányok (SHR) miokardiumai esetén. Keveset tudunk a szuperoxid dizmutáz (SOD) és kataláz szerepéről és expressziójáról a reaktív oxigén szabadgyökök által indukált oxidatív stressz kialakulása során SHR miokardiumok esetén. Ezen kérdés megválaszolására SHR és Wistar-Kyoto (WKY) patkányokból származó miokardiumokat kezeltünk hidrogén peroxiddal ( $H_2O_2$ ) és vizsgáltuk a szuperoxid dizmutáz (SOD), a kataláz és glutation peroxidáz (GPx) aktivitását és génexpresszióját. A SOD és a kataláz e paramétereinek meghatározásával a cél az volt, hogy molekuláris szinten kapjunk információt az SHR miokardiumok dilatatív kardiomiopátiában kialakuló stressz válaszában alakulásáról.

A disszertáció harmadik részében az iszkémia/reperfúzió alakulását vizsgáltuk a természetes szabadgyök csapdák hatására, mint amilyen a szőlőmag extraktum. Fordított összefüggést találtunk a mérsékelt alkoholfogyasztás és a szívbetegségek kialakulásának rizikója között, melyet már több tanulmány is hangsúlyoz (17-19). A flavonoidok, melyek a sejtek és szövetek antioxidáns kapacitását befolyásolják (20-22), valószínűleg felelősek a vörösbor antioxidáns tulajdonságáért és ennek következményeképpen a vörösbor ivók körében a kardiovaszkuláris betegségek vagy a koronária betegségének következtében bekövetkező

halál incidenciája lényegesen kisebb (23). Így a vörösbor jótékony hatása a benne található antioxidánsoknak köszönhető, mint amilyen a resveratrol, a catechin és a proanthocyanidin.

## Metodikák

### *Kísérleti állatok*

Hím Sprague-Dawley patkányokat (320-350 g) használtunk.

### *Izolált szív készítése*

A patkányokon altatást követően torakotómiát hajtottunk végre és a szíveket kivágtuk. Az aortát kanüláltuk és a szíveket Langendorff módszere szerint perfundáltuk. Öt perces kimosást követően a Langendorff szívet dolgozó szív üzemmódra állítottuk Tósaki és Braquet (25) módszerének megfelelően. Rotaméterrel mértük az aorta átáramlást, míg a koronária átáramlást a koronária perfuzátum gyűjtésével határoztuk meg.

### *A szív működés és az aritmiák vizsgálata a HO expresszió tanulmányozásában*

A kamrafibrilláció előfordulásának vizsgálatára EKG-t készítettünk. Az iszkémia előtt és alatt (minden csoportban 6 állattal) mértük a szívfrekvenciát (HR), a koronária átáramlást (CF) és az aorta átáramlást (AF). Regisztráltuk továbbá a bal kamrai nyomást (LVDP) és annak első deriváltját ( $LVdp/dt_{max}$ ). Meghatároztuk az iszkémia/reperfúzió átesett miokardiumokból a HO-1 enzim aktivitását és mRNS expresszióját a miokardium 120 perces reperfúziójának végét követően. Kiegészítő vizsgálatokat végeztünk, melyben az iszkémia/reperfúzió protokollja helyett az izolált szíveket (n=6-12) elektromos ingerléssel fibrillációba vittük modellezendő a 10 perces irreverzibilis ventrikuláris fibrillációt. A szívek defibrillálása után dolgozó szív üzemmódba kapcsoltuk és perfundáltuk. A HO-1 enzim aktivitásának és mRNS expressziójának meghatározására a 120 perces perfúziót követően került sor.

### *RNS izolálás*

A szívekben található összes RNS izolálását 100 mg szívizom szövetből 1 ml TRIzol reagens jelenlétében végeztük (guanidin tiocianát módszer) (26).

### *RT-PCR (Reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció)*

Mindegyik minta teljes RNS-ét (2 $\mu$ g) felhasználtuk a random módon indított első-lánc cDNS szintézishez (reverz transzkripció) a 40  $\mu$ l térfogatú reakcióelegyben, melynek összetétele (mM-ban): 50 Tris-HCl, 75 KCl, 3 MgCl<sub>2</sub>, 10 DTT, 1 d NTP (mindegyik fajta), 0,005 hexamer (random), 0,5 IU/ $\mu$ l Mo-Mu-LV reverz transzkriptáz. Az így létrejött első-lánc cDNS szolgált templátul a polimeráz láncreakcióhoz (PCR). A primér szekvenciája a következő volt: HO-1 sense: 5'-AAG GAG GTG CAC ATC CGT GCA-3'; HO-1 antisense: 5'-ATG TTG AGC AGG AAG GCG GTC-3'; HO-2 sense: 5'-ATG GCA GAC CTT TCT GAG CTC-3'; HO-2 antisense (27): 5'-CTT CAT ACT CAG GTC CAA GGC-3'; GAPDH sense: 5'-TCC TGC ACC ACC AAC TGC TTA GCC-3'; GAPDH antisense (28): 5'-TAG CCC AGG ATG CCC TTT AGT GGG-3'. A reakció elegy tartalmazott 1x PCR puffert [20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl], 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M dNTP's (mindegyik fajta), 100  $\mu$ M primért és 0,025 U/ $\mu$ l Taq polimerázt. A szaporított termékeket (amplification products) 2% agaróz gélen tettük láthatóvá ethidium bromid segítségével, majd hosszuk alapján azonosítottuk őket. A HO-1 fragment 568-nak, a HO-2 554-nek és a GAPDH 377 bázisnak adódott.

### *Northern blot*

A teljes RNS-ből 30 µg nylon membránra vittünk és a további műveleteket Sambrook és mtsai (29) szerint végeztük.

### *HO aktivitás esszé*

A szövetek 100 mg-ját 10 ml 200 mM-os foszfát pufferben homogenizáltuk és 19000 g-vel centrifugáltuk 4 °C-on 10 percig. A szupernatánst újra lecentrifugáltuk 100000 g-vel 4 °C-on 60 percig. A pelletet 2 ml 100 mM-os kálium foszfát pufferben szuszpendáltuk. A biliverdin reduktázt Tenhuen és mtsai (30) módszere szerint tisztítottuk. A HO aktivitást Yoshida és mtsai (31) módszere szerint mértük. A mikroszómális frakció fehérje tartalmát Lowry és mtsai. (32) módszere alapján határoztuk meg.

### *Vizsgálatok spontán hipertenzív patkányok szívein*

Hím SHR és korban megfelelő nem hipertenzív WKY patkányokat használtunk 18 hónapos korukban. Reguláris pufferben 15 percig ekvilibrálódott szíveket 30 perces 25 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tartalmú pufferrel perfundáltuk, majd 30 perces kimosási periódus következett. Egyes kísérletekben 15 perces ekvilibrációs periódust követően, a szíveket 30 perces globális iszkémiának vetettük alá, amit 30 perc reperfüzió követett. A kontroll szíveket 60 perces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mentes perfúzióknak vetettük alá.

### *Szívfunkciók mérése H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vel kezelt és nem kezelt szíveken*

A szívfunkciókat a következő időpontokban regisztráltuk: a 15 perces ekvilibrációs periódus után, közvetlenül a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelést követően és a 30 perces kimosási periódus után. A koronária átfolyást (CF) a jobb pitvart elhagyó időegység alatt mért effluens mennyiségével határoztuk meg. Az aorta átfolyás (AF) mérését rotameterrel végeztük. A szívfrekvenciát és a bal kamrai végdiasztolést nyomást (LVEDP) a bal kamrából elvezetett nyomásgörbéből határoztuk meg. A bal kamrai nyomást (LVDP) a szisztolés csúcnyomás és az LVEDP különbségéből számoltuk. A bal kamrai nyomásgörbe első deriváltjának minimumát és maximumát szintén regisztráltuk (+LVdp/dt<sub>max</sub>, -LVdp/dt<sub>max</sub>).

### *Polimeráz láncreakció MnSOD-ra és ZnSOD-ra*

A reverz transzkriptáz polimeráz láncreakcióhoz a teljes RNS (2 µg) került felhasználásra a random módon indított első-lánc cDNS szintézishez (reverz transzkripció) a 40 µl térfogatú reakcióelegyben, melynek összetétele (mM-ban): 50 Tris-HCl, 75 KCl, 3 MgCl<sub>2</sub>, 10 DTT, 1 dNTP (mindegyik fajta), 50 ng hexamer (random), 0,5 IU/µl Mo-Mu-LV reverz transzkriptáz. Az így kialakult első-lánc cDNSt használtuk PCR erősítésre. Belső kontrollként a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz cDNS-t használtuk. A primer szekvenciái a következők voltak: Zn- és MnSOD sense, 5'-GAC AAA CCT GAG CCC TAA GGG-3'; MnSOD antisense, 5'-CTT CTT GCA AAC TAT G-3' (33); GAPDH sense, 5'-TCC TGC ACC ACC AAC TGC TTA GCC-3'; GAPDH antisense, 5'-TAG CCC AGG ATG CCC TTT AGT GGG-3' (28). A kapott szaporított termékeket 2 %-os agaróz gélen tettük láthatóvá, ami etidium bromidot tartalmazott.

### *Northern blot és dot blot kataláz cDNS kimutatására normotenzív és spontán hipertenzív állatok esetén*

Northern blothoz egyenként 30 µg RNS-t futtatunk agaróz gél elektroforézissel glioxál jelenlétében, amelyet nylon membránra vittünk át Sambrook és mtsai (29) módszere szerint. A patkány kataláz cDNS plazmid, a pRCA38 Dr. S. Furuta (Nagano, Japan), míg a GAPDH minta Dr. E. Zádortól (Szeged, Hungary) kaptuk.

### Kataláz, MnSOD, ZnSOD enzimaktivitás mérése

A kataláz aktivitást (E.C.1.11.1.6.) a  $k$  értékkel fejeztük ki, ami  $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$  fehérjére vonatkozik (első rendű sebesség konstansa a reakciónak). A GPx (E.C.1.11.1.9) és a SOD (E.C.1.15.1.1.) aktivitásait Randox kitekkel (RS 506 és SD 125) határoztuk meg. Az MnSOD aktivitását 1 mM KCN hozzáadásával határoztuk meg, ami specifikusan gátolja a CuZnSOD működését. A fehérjéket fehérje esszé kitekkel határoztuk meg.

### *A szőlőmag proantocianidinek hatásának vizsgálata az idő függvényében*

Három héttel az izolált szív preparátum készítése előtt az állatoknak orálisan 50 vagy 100 mg/kg/nap dózisban szőlőmag proantocianidint kaptak. Ez a kezelés korábban effektívnek szív protektánsnak bizonyult patkányokban (35). A mindenki számára hozzáférhető IH636 szőlőmag proantocianidin extraktumát (ActiVin, InterHealth Nutraceuticals, Benecia, CA, USA) használtuk kísérleteinkben. A szőlőmag proantocianidint 2 ml 1%-os metilcellulóz oldatban homogenizáltuk, majd 0,9 %-os NaCl oldattal 10 ml-re hígítottuk és 10 ml/kg végső térfogatban adagoltuk az állatoknak minden nap orálisan. A kezelési periódus végén az állatokat 60 mg/kg i.p. adott pentobarbitállal elaltattuk és heparint adtunk i.v. A szíveket kimetszettük és perfundáltuk hatóanyag mentes pufferrel Langendorff szerint 10 percig 100 vízcentiméteres (10 kPa) állandó perfúziós nyomással. A 10 perces kimosási periódus alatt megkanuláltuk a pulmonális vénát és a Langendorff preparátumot átkapcsoltuk dolgozó szív preparátumra és további 5 percig perfundáltuk a korábban leírtaknak megfelelően (25). Kísérleteink célja kettős volt: első, hogy a proantocianidin előkezelés képes-e csökkenteni a reperfúzió indukálta kamrai fibrillációt/tachikardiát és javítja-e a posztisztkémiás szív funkcióit. A másik cél, hogy a proantocianidinek képesek-e csökkenteni az oxigén szabadgyökök képződését melyet elektron spin rezonanciával (ESR) követünk nyomon iszkémiás és reperfundált szíveken ( $n = 6$  minden csoportban). Mértük a proantocianidin két különböző dózisének (50 és 100 mg/kg p.o.) hatását a szabadgyök képződésre a 30 perces iszkémiát követő reperfúzió eredményeként. Az ESR vizsgálatokra a reperfúzió 3-dik percét követően vettünk mintákat az effluensből, mivel ez az időpont adja a legnagyobb szabadgyök jelintenzitást az általunk használt modellben (36).

### *Elektron spin rezonancia vizsgálatok (ESR)*

A spin csapda vizsgálatokhoz 5,5-dimetil-pirrolin-N-oxid (DMPO) spin csapdát infundáltuk a szív perfúziós kanül proximális végéhez közeli oldalágon keresztül. Az ESR spektrumot Bruker (Karlsruhe, Németország) ECS106 spektrométerrel vettük fel 9,3 MHz-es sávban 100 kHz-es modulációs frekvencia mellett. A mikrohullám energiáját 10 mW körül tartottuk így elkerültük a szaturáció kialakulását. A „scan time” 2 perc volt, míg a „response time” 300 ms. A csatolási konstansokat direkt módon a „field scan”-ből határoztuk meg  $\text{Mn}^{2+}$ , mint kalibrációs marker használatával.

### *Statisztika*

A következő paraméterek számtani átlaga és a középérték standard hibája ( $X \pm \text{SEM}$ ) került megadásra a disszertációban: HR, CF, AF, LVDP, mRNS expresszió, enzim aktivitás, DMPO-OH adductum jelintenzitása. Egy utas ANOVA alkalmazása volt szükséges azon esetekben, ahol több csoportot hasonlítottunk össze. Szignifikáns eltérés esetén a vegyülettől mentes kontroll csoporthoz hasonlítottunk minden kezelt csoportot és a statisztikai valószínűséget Bonferroni módszere szerint állapítottuk meg (37). A diszkrét változók eloszlását, mint amilyen a kamrafibrilláció és a kamrai tachikardia előfordulása nem parametrikus  $\chi^2$  próbával hasonlítottuk össze. Minden esetben a különbséget szignifikánsnak ítéltük, ha  $P < 0,05$ -nél.

## Eredmények

### Eredmények I.

Az 1. ábra a HO-1 enzim mRNA Northern blot hibridizációját mutatja. A HO-1 mRNA expressziója négyszeresére emelkedett iszkémiás/reperfúzióknak kitett, de nem fibrilláló miokardiumok esetén (második oszlop, illetve sáv), ha nem iszkémiás kontroll szívekkel hasonlítjuk össze (első oszlop, illetve sáv). Azokban a szívekben amelyeket 30 perces iszkémiának, majd két órás reperfúzióknak vetettük alá és kialakult a kamrafibrilláció a HO-1 mRNA expressziójának növekedése nem volt tapasztalható (harmadik oszlop, illetve sáv) nem iszkémiás kontroll miokardiumokkal összehasonlítva. Más szavakkal a HO-1 mRNA expressziója szignifikánsan csökkent iszkémiás és reperfundált fibrilláló miokardiumokon (harmadik oszlop, illetve sáv), összehasonlítva iszkémiás reperfundált, de nem fibrilláló miokardiumokkal. További kísérletekben a szíveket elektromos ingerléssel vittük fibrillációba annak elkerülése érdekében, hogy kiküszöböljük az iszkémia/reperfúzió protokollját és vizsgáltuk az előzőeknek megfelelően a HO-1 mRNA expresszióját. Az elektromosan fibrillációba vitt szívek esetén nem tapasztaltunk HO-1 mRNA változást (negyedik oszlop, illetve sáv). A kapott értékek az iszkémia/reperfúziót követő fibrilláció esetén tapasztalt HO-1 mRNA (harmadik oszlop, illetve sáv) változáshoz hasonló.

A 2. ábra a HO-1 mRNA RT-PCR erősítés eredményeit mutatja, mely megerősíti a Northern blottal kapott eredményeket. Így a nem fibrilláló iszkémiás reperfundált miokardiumok esetén szignifikáns emelkedés látható az RT-PCR jelintenzitásában (2. ábra, második oszlop, illetve sáv), ha a nem iszkémiás kontroll értékekkel hasonlítjuk össze (2. ábra, első oszlop, illetve sáv). Más szavakkal szignifikáns RT-PCR jelintenzitás csökkenés figyelhető meg iszkémiás reperfundált fibrilláló miokardiumok esetén (2. ábra, harmadik oszlop, illetve sáv). Az elektromosan fibrillációra kényszerített szívek hasonló RT-PCR jelintenzitással rendelkeztek (2. ábra, negyedik oszlop, illetve sáv), mint ahogy iszkémiás és reperfundált fibrilláló szívek esetén volt (2. ábra, harmadik oszlop, illetve sáv).

A 3. ábra mutatja a hem oxigenáz aktivitás változását iszkémia, reperfúzió, fibrilláció és pace-elés hatására. Azokban a szívekben amelyeket 30 perces iszkémiának tettünk ki valamint azt követően 120 percen keresztül reperfundáltuk és reperfúzió indukálta kamrafibrilláció nem alakult ki, a HO aktivitás a nem iszkémiás kontroll szintről ( $385 \pm 20$  pmol bilirubin/mg/óra) (3. ábra, első oszlop) több mint felére ( $162 \pm 18$  pmol bilirubin/mg/óra) lecsökkent (3. ábra, harmadik oszlop). Hasonló eredményeket kaptunk azon szívek esetén amelyeknél elektromos ingerléssel váltottuk ki a kamrafibrillációt (3. ábra, negyedik oszlop). Azonban az elektromosan indukált kamrafibrilláció 60 %-os csökkenést eredményezett a hem oxigenáz aktivitásban (3. ábra, negyedik oszlop), hogyha a nem iszkémiás kontroll csoporthoz hasonlítjuk (3. ábra, első oszlop). Az iszkémia/reperfúzió szignifikáns csökkenését eredményezte a CF, AF és az LVDP értékek posztiszkémiás visszatérését azokban a szívekben amelyekben kamrafibrilláció fejlődött ki összehasonlítva az iszkémia/reperfúzióban részesült nem fibrilláló szívekkel (1. táblázat). Az iszkémia/reperfúzió protokolljának elhagyásával az elektromosan fibrillációba vitt szívek a poszt-fibrillációs visszatérés szignifikánsan javult összehasonlítva az iszkémiás és reperfundált fibrilláló miokardiumokkal (1. táblázat).

### Eredmények II

*A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatása a szív funkciókra izolált SHR és WKY patkányok szívein*

Kezeletlen kontroll körülmények között a spontán hipertenzív patkányok (SHR) szívfunkciói alacsonyabbak, mint a WKY patkányoké: AF,  $18.2 \pm 1.9$  vs.  $26.2 \pm 2.2$  ml/min; +LVdp/dt<sub>max</sub>,

375 ± 15 vs. 602 ± 24 kPa/s; -LVdp/dt<sub>max</sub>, 157 ± 12 vs. 267 ± 22 kPa/s; LVDP, 7.4 ± 0.6 vs. 11.8 ± 0.6 kPa; LVEDP, 7.4 ± 0.5 vs. 6.4 ± 0.4 kPa (p<0.05). Harminc perces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> perfúziót követően a WKY patkányok csoportjában szignifikáns csökkenés volt észlelhető a szívfunkciókban: AF 16.0 ± 2.8 ml/min-ra, +LVdp/dt<sub>max</sub> 521 ± 22 kPa/s-ra, -LVdp/dt<sub>max</sub> 2011 ± 21 kPa/s és az LVDP 10.4 ± 0.6 kPa-ra csökkentek (p<0.05). Szignifikáns csökkenés egyáltalán nem, hanem némi emelkedés volt tapasztalható az SHR csoport kardiális funkcióiban H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés alatt. AF, 20.7 ± 2.2 ml/min; +LVdp/dt<sub>max</sub>, 399 ± 14 kPa/s; -LVdp/dt<sub>max</sub>, 169 ± 15 kPa/s; LVDP, 8.4 ± 0.7 kPa; LVEDP, 7.7 ± 0.5 kPa. A 30 perces kimosási periódust követően a szív funkciói változatlanok maradtak mindkét csoport esetén. Más szignifikáns eltérés nem volt tapasztalható (az LVdp/dt<sub>max</sub>-ot és az LVDP-t kivéve) a két csoport között a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> perfúzió alatt és után. A szívfrekvencia és a koronária átáramlás nem mutatott különbséget a két csoport között a kísérlet teljes időtartama alatt (4. ábra). A 4. ábra mutatja a szív funkciók (AF, +LVdp/dt<sub>max</sub>, -LVdp/dt<sub>max</sub>, LVDP, CF, LVEDP) relatív változását %-ban kifejezve a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> perfúzió előtti értékekhez viszonyítva.

#### *Antioxidatív védő enzimek az SHR és a WKY patkányok miokardiumaiban – a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatása*

SH patkányok szíveiben az antioxidáns védő enzimek (GPx, SOD) aktivitása nagyobb normál körül mények között, mint WKY patkányok szíveiben. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelést követően a kataláz aktivitása szignifikánsan emelkedett (2,46 ± 0,22 k min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein) SH patkányokban, ha összehasonlítjuk a WKY patkányokban mért értékekkel (1,59 ± 0,14 k min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein), vagy az SH patkányok H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelést megelőző értékeivel (1,56 ± 0,29 k min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein). Szignifikánsan magasabb miokardiális GPx aktivitást észleltünk SH patkányokban összehasonlítva a WKY patkányok H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelést megelőző és azt követő értékeihez viszonyítva. Másrészt az MnSOD és a CuZnSOD magasabb enzimaktivitási értékei a kezeletlen SHR miokardiumok esetében összehasonlítva a kezeletlen WKY szívekkel nem volt tapasztalható a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> infúziója után. A CuZnSOD aktivitás lecsökkent a kezelt SHR csoportban összehasonlítva a megfelelő WKY csoporttal (5. ábra). Azokban a szívekben, melyek 30 perces iszkémiának és az azt követő 30 perces reperfúzióknak voltak kitéve, hasonló enzimaktivitás változások voltak észlelhetők mind a WKY, mind az SHR csoportban.

#### *A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatása a kataláz expressziójára SHR és WKY patkányok izolált szíveiben*

A kataláz enzim mRNS szintje szignifikánsan emelkedett a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> infúzióját követően az SHR csoportban a megfelelő WKY csoporthoz képest (303,3 ± 17,9 vs. 105,9 ± 15,5 arbitrális egység; 7a. és 7b. ábra, bal oldali paneljai). A mRNS emelkedése az enzim működésének növekedését jelzi (5. ábra). A GAPDH enzim expressziója, mely konstituális enzim és belső kontrollként szolgált, nem mutatott szignifikáns eltérést (7a. és 7b. ábra, jobb oldali paneljai) a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés előtt és azt követően.

#### *A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatása a MnSOD expressziójára SHR és WKY patkányok izolált szíveiben*

Az MnSOD mRNS expressziója kis mértékben, de mégis szignifikánsan csökkent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelést követően összehasonlítva a kezelést megelőző értékekkel (92.2 ± 3.6 vs. 77.9 ± 3.9 arbitrális egység, 8A és 8B ábra, bal panelok). A WKY patkányok szíveiben az MnSOD mRNS koncentráció változatlan maradt (85.3 ± 3.3 vs. 85.9 ± 4.7 arbitrális egység; 8A és 8B, ábra, bal panelok), ami a mért enzimaktivitásoknak megfelel (5. ábra). A GAPDH nem mutatott szignifikáns változást H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelést követően sem a WKY sem az SHR törzsek esetén (8A. és 8B. ábra, jobb oldali panelok).



### **Eredmények III.**

A proantocianidin 50 és 100 mg/kg-os dózisa (9. ábra, felső panel) dózisfüggő módon csökkentette a szabadgyök képződést. A 100 mg/kg-os dózis esetén az oxigén szabadgyökök termelése (a DMPO-OH adductum ESR jeléből számolva) 75 %-kal csökkent a vegyülettől mentes iszkémia/reperfúzió után átesett kontroll csoporthoz viszonyítva (9. ábra, B spektrum). A 9. ábra alsó panelje mutatja a kvantitatív ESR eredményeket, melyek csoportonként 6 állatból származnak. A DMPO-OH jel intenzitásának csökkenése jelzi a reperfúzió indukálta kamrafibrilláció és kamrai tachikardia incidenciájának drasztikus csökkenését (10. ábra). Az eredmények mutatják, hogy a proantocianidinek nem változtatják meg szignifikánsan a szívfrekvenciát (11A. ábra). Érdekes azonban, hogy a proantocianidinnel kezelt patkányok szíveiben szignifikáns mértékű visszatérés volt látható a CF (11B. ábra), az AF (11C. ábra) és az LVDP (11D. ábra) értékeiben.

## **Megbeszélés**

### **Megbeszélés I**

Fiziológiai körülmények között a HO-1 enzim minden szervben megtalálható alacsony koncentrációban. Újabban feltételezik, hogy a HO-1 mRNS indukció szerepet játszik az iszkémia-reperfúzió okozta károsodásban. Az enzim szintézisét számos faktor indukálhatja, amelyek általánosan képesek az oxidatív stressz létrehozására. A HO-1 expresszió gyorsan nő, nemcsak különféle patofiziológiai körülmények hatására, mint amilyen az iszkémia/reperfúzió és a sejt transzformáció (38-39), hanem különböző exogen molekulák hatására (7). Korábban kimutattuk (16), hogy a hem oxigenáz mRNS expresszió, különösképp a hem oxigenáz-1, fontos szerepet játszhat a reperfúzió indukálta kamrafibrilláció kialakulásában. A hem oxigenáz enzim a sebesség meghatározó lépést katalizálja a hem lebontásában, a b-típusú hem oxidatív bontásában, melynek során vas, CO és biliverdin keletkezik (40). A disszertáció e részében megpróbáltunk jól körülhatárolt eredményekhez jutni a HO-1 szerepére vonatkozóan a reperfúzió indukálta kamrafibrilláció kialakulásában. Ha a HO-1 szerepet játszik a sejtkárosodásban, ami elektrofiziológiai abnormalitáshoz és kamrafibrillációhoz vezet, érdemes feltenni a kérdést, hogy hol és hogyan működik a HO-1 gén és hogyan fejt ki hatását. A HO-1 gén expressziója vagy „downregulációja” és különböző transzkripciós faktorok összefüggését vizsgálva Alam és mtsai (40) alapvető bizonyítékot szolgáltatott az Nrf2M (nukleáris faktor-eritroid relációs faktor) fokozott expressziójára vonatkozóan, amely gátolja a hem, cink, kadmium és arzenit okozta HO-1 mRNS akkumulációt.

Az iszkémia/reperfúzió és különböző pro-oxidáns anyagok által indukált HO-1 mRNS transzkripciós utak bizonyítékok arra, hogy ez a tulajdonság összefüggésben van a HO-1 antioxidáns aktivitásával és az enzimmel a képességével, hogy szénmonoxidot képes produkálni. Számos vizsgálat bizonyítja, hogy fiziológiai körülmények között, hogy az értónus és a vérátáramlás szabályozása részben az enzimatis útton keletkező szénmonoxidnak tudható be (42). Következtetésünk, hogy az általunk kapott eredmények bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy a HO-1 mRNS expresszió és enzim aktivitás gátlás alá kerül kamrafibrilláció esetén függetlenül attól, hogy iszkémia/reperfúzióval vagy elektromos ingerléssel váltottuk ki azt. Kísérleteink továbbá azt is bizonyítják, hogy a HO-1 mRNS expresszió és enzim aktivitás megemelkedett azokban a miokardiumokban amelyekben az iszkémia/reperfúzió nem hozott létre fibrillációt. E jelenség értelmezhető úgy is, hogy az olyan beavatkozások, melyek a HO-1 mRNS expresszióját és enzim aktivitását növelik megvédnek az iszkémia/reperfúzió kiváltotta kamrafibrillációtól.

## Megbeszélés II.

Antioxidáns anyagok alkalmazása védelmet nyújthat a szív számára a szabad gyökök által létrehozott károsodással szemben (43-44). Az antioxidáns enzimek aktivitása csökkent lehet, különösen akkor, ha az oxidatív terhelés túllépi a védekező mechanizmusok kapacitását (45). Másrészt enyhe szabadgyök behatás, mint stresszor potenciálhatja a védekező mechanizmusokat a megfelelő enzim expressziójának növelésével (46). A disszertáció ezen részében a  $H_2O_2$  által kiváltott oxidatív stressz hatását vizsgáltuk az antioxidáns védő enzimek expressziójának változására már dekompenzálódott (47) 18 hónapos SH patkányokon. Az SH patkányok nagyobb antioxidáns kapacitást mutattak megnövekedett GPx és SOD aktivitással, mint a WKY patkányok. Az SH patkányok szívének funkcióját nem befolyásolta a  $H_2O_2$  kezelés, valószínűleg az emelkedett GPx aktivitás következtében. Ezen szívek GPx általi  $H_2O_2$  metabolizáló képessége magasabb, mint a WKY törzsű patkányok esetében. Leírták, hogy a GPx expressziója nagy mértékű  $H_2O_2$  koncentrációval fokozható (48), amelyet vagy a SOD aktivitás vagy különböző eredetű oxidatív stressz válthat ki (49). Mindkét SOD (MnSOD, CuZnSOD) csak az SH patkányok szíveiben található fokozott mennyiségben. Habár ezen SOD által produkált  $H_2O_2$  nem tudja kimeríteni az endogén kataláz és GPx kapacitását, azaz az általunk használt koncentrációja a  $H_2O_2$  infúciónak nem okozott romlást az SH patkányok szívfunkcióiban.  $H_2O_2$  infúzió alatt és után a GPx aktivitás magasabb maradt az SH patkányok szívei esetében, mint a WKY patkányoknál, utalva arra, hogy az SH patkányok jelentősebb antioxidatív védekező mechanizmussal rendelkeznek. Ezzel ellentétben a teljes SOD aktivitás lecsökkent az SHR csoportban a  $H_2O_2$  infúziót követően, legfőképp az erősen leesett CuZnSOD aktivitás következtében. A CuZnSOD inaktiválódik  $H_2O_2$  hatására (50) és így valószínűleg kimerül az általunk használt kísérleti feltételek mellett. Az MnSOD mRNS szintje kissé csökkent, ami arra utal, hogy az enzim expressziója csökkent mértékű. Hipertóniás perfúzió esetén azt találták, hogy az SH patkányok szívei sokkal érzékenyebbek voltak az iszkémia/reperfúzióra és sokkal több reaktív gyök keletkezett a perfúzió alatt, mint WKY állatok esetén normál nyomású perfúziót alkalmazva (51). Másrészt az általunk kapott eredmények egybe csengenek az irodalomban olvasottakkal (52-53), ahol az található, hogy a hipertrófiás SH patkányok szíveinek prekondicionálása javította a nagy energiájú foszfátok és a miokardium funkciójának posztisztkémias „recovery”-jét. Kísérleti eredményeink bizonyítják, hogy az oxidatív stressz egy kicsi, de mégis fontos komponens a kardiális hipertrófia és a szabadgyökökkel szembeni védőmechanizmusok kialakulásában és így különös jelentősége van a dekompenzálódott miokardium megvédésében.

## Megbeszélés III.

Az oxigén szabadgyökök károsító hatásával szembeni megnövekedett posztisztkémias fogékonyság, ami az iszkémia alatt kialakuló erősen redukáló környezet miatt és a csökkent antioxidáns védekező kapacitás miatt jön létre. A celluláris sejtkárosodás mechanizmusa magában foglalja a molekuláris oxigén lépésenkénti redukcióját relatíve inaktív szuperoxid és hidrogén peroxidra, és a következményesen kialakuló nagy reakcióképességű fém ion által katalizált hidroxil gyökök képződését, melyek igen erős szöveti mérgek (54). Terápiás próbálkozások történtek a szabadgyök indukálta károsodás csökkentésére vagy a szabadgyökök képződésének meggátlásával vagy a már kialakult szabadgyökök csapdába ejtésével. Különböző fokú védelmet lehetett elérni (i) hidroxil gyök csapdákkal (43, 55), (ii) vas és réz kelátképzőkkel (56,57), (iii) antioxidáns enzimekkel, mint amilyen a SOD és a kataláz (43), és (iv) a cink redox-fém kicserélésével (58). Epidemiológiai bizonyítékok

vannak arra, hogy a vörösbor fogyasztás jótékony hatású a koronária megbetegedések megelőzésében (59). Ez a jótékony hatás a vörösbor polifenol frakciójában található antioxidánsnak köszönhető (24). Kísérleteket végeztünk hogy a szőlőmag proantocianidin hogyan hat az ESR-rel mérhető hidroxil szabadgyökök képződésére, az aritmiák incidenciájára és az iszkémia/reperfúzió átesett kardiális funkcióra. A disszertáció ezen részében leírtuk, hogy a proantocianidinnel kezelt állatok miokardiuma sokkal rezisztensebb volt az iszkémia/reperfúzió okozta károsodással szemben, mint a nem kezelt kontroll állatok.

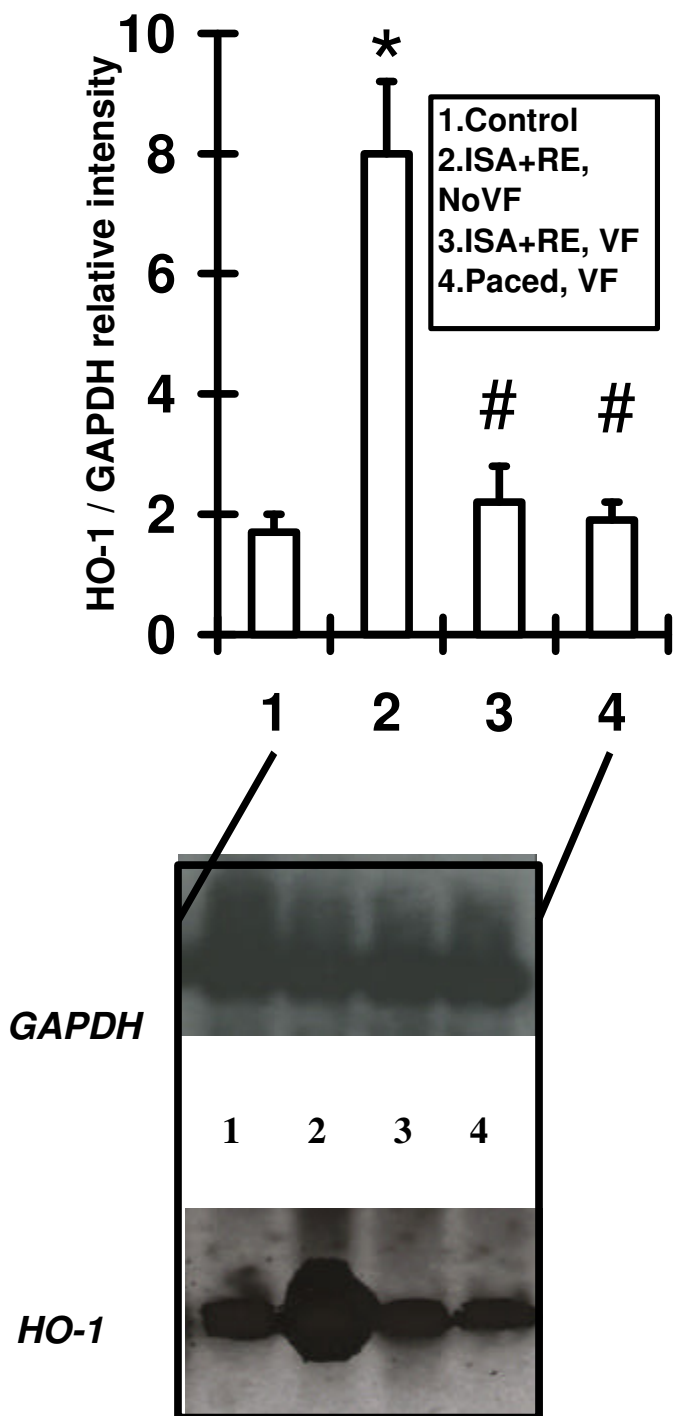
A proantocianidinek egy csoportját képezik a polifenol bioflavonoidoknak, mely általánosan megtalálható különböző gyümölcsökben és zöldségekben. Ezért a proantocianidinek hatása az intracelluláris  $Ca^{++}$  koncentrációra és az extraktum más komponenseinek lehetséges biológiai hatása megérdemel néhány szót. A flavonoidok valószínűleg interakcióba lépnek az intracelluláris  $Ca^{++}$ -mal, amely az intracelluláris ionizált  $Ca^{++}$  koncentrációnak csökkenéséhez vezet. Növeli a szubsztrát kötési affinitását, és javítja az elektrontranszfer hatékonyságát a NADPH-citokróm P-450 és a P-450 enzim között (60), ami hozzájárul a reperfúzió okozta  $Ca^{++}$  túltöltődés elleni védelemhez. Feng és mtsai (61) leírták, hogy a vörös és fehér bor hosszútávú fogyasztása csökkenti az intima megvastagodását ballon-katéter sérülés után koleszterinnel táplált nyulak esetén. Lehetséges, hogy a vörösborban a fenolos antioxidáns hatása mellett jótékony hatást fejt ki az alkohol tartalom is.

## Következtetések

Összefoglalva, adataink bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy a reperfúzió indukálta kamrafibrilláció gátolja a HO-1 mRNS expresszióját és az enzim aktivitását mind az elektromos úton létrehozott, mind az iszkémia/reperfúzió módszerével létrehozott miokardium fibrilláció esetén. Az eredmények tisztán mutatják, hogy a HO-1 mRNS expresszió és enzim aktivitás megnövekedett volt iszkémia/reperfúzió után, ahol nem jött létre miokardium fibrilláció. Ez azt jelenti, hogy olyan beavatkozás, ami képes növelni a HO-1 mRNS expresszióját és enzim aktivitását védelmet nyújthat a kamrafibrilláció kialakulásával szemben.

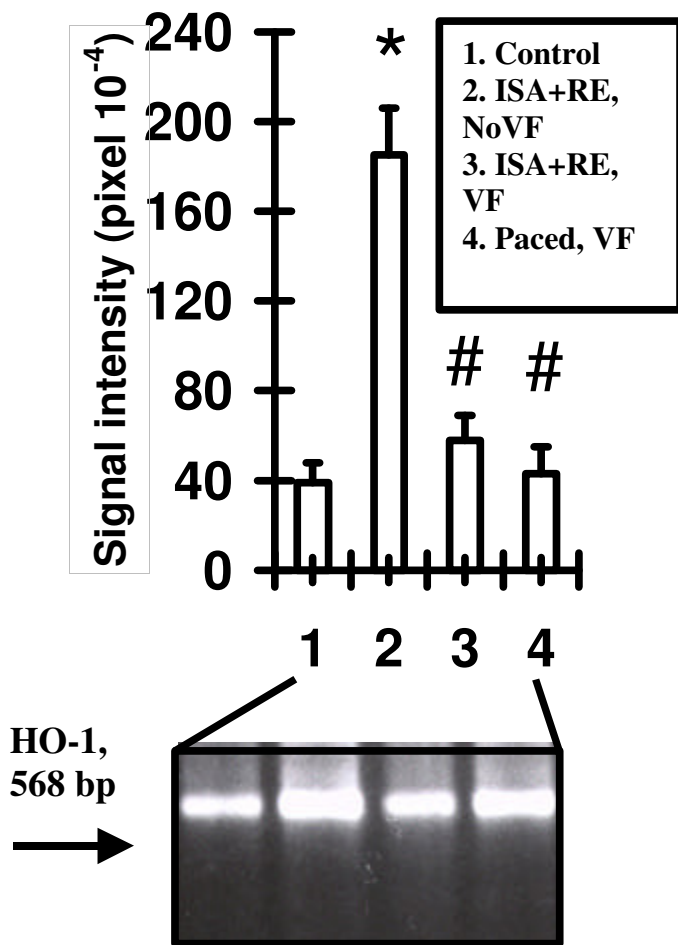
Kísérleteinkben, melyeket a disszertációban prezentáltam, vizsgáltuk a szuperoxid dizmutáz (SOD), a kataláz és a glutation peroxidáz (GPx) működését 18 hónapos SH patkányok izolált perfundált szíveiben valamint a megfelelő korú normotenzív kontroll Wistar-Kyoto (WKY) patkányokban 25  $\mu$ M  $H_2O_2$  perfúziója előtt és utána 30 perccel. Az iszkémia/reperfúzió átesett szíveken kapott eredmények azonos enzim aktivitás változást mutattak, mint ami a  $H_2O_2$  perfúziója esetén volt tapasztalható. Magasabb kataláz aktivitás figyelhető meg, ha emelkedett a kataláz mRNS szintézise. Az SH patkányok kardiomiopátiás szíveiben az antioxidatív rendszer indukált állapotban van, valószínűleg a dekompenzáció kialakulása alatt bekövetkező oxidatív stressz epizódok következtében.

Kísérleteink utolsó részében az 50 illetve 100 mg/kg szőlőmag proantocianidinnel kezelt patkányok esetében a reperfúzió indukálta kamrafibrilláció incidenciája lecsökkent a 92 %-os kontroll értékről 42 ( $p < 0,05$ ) illetve 25 %-ra ( $p < 0,05$ ) a két dózisonak megfelelően. A ventrikuláris tachikardia (VT) előfordulása hasonló csökkenést mutatott. ESR vizsgálatok bizonyították, hogy a proantocianidinek szignifikánsan gátolták az oxigén szabadgyökök keletkezését. A 100 mg/kg proantocianidinnel kezelt patkányok esetén a szabadgyök intenzitás  $75 \pm 7$  %-kal csökkent ( $p < 0,05$ ), összehasonlítva a vegyülettől mentes csoporttal. A szőlőmag proantocianidineknek kardioprotektív hatásuk van a reperfúzió indukálta sérüléssel szemben azon képességüknél fogva, hogy képesek csökkenteni vagy eliminálni, közvetlen vagy indirekten a szabadgyököket melyek az iszkémia/reperfúzió során alakulnak ki a miokardiumban.

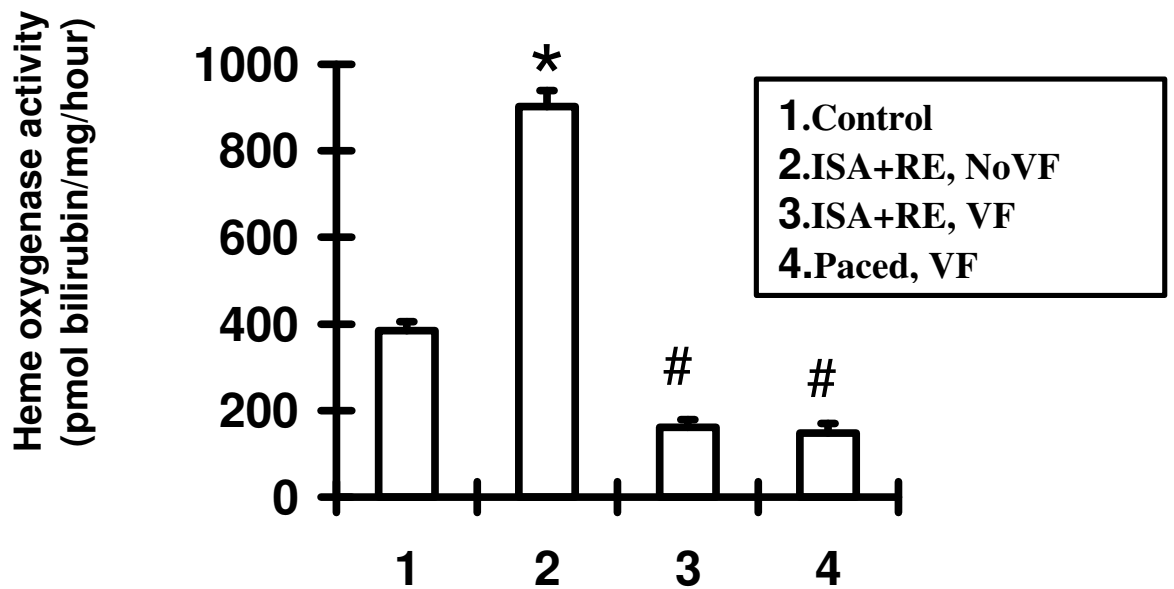


1. ábra: HO-1 mRNA expresszió fibrilláló és nem fibrilláló szívekben. A Northern blot (reprezentatív)  $^{32}\text{P}$ -HO-1-gyel, majd ugyanaz a blot  $^{32}\text{P}$ -GAPDH cDNS-sel készült. A nemiszkémiás kontroll miokardiumokban (első oszlop, illetve sáv) a HO-1 megjelent. A második oszlop, illetve sáv mutatja a 30 perc iszkémiát követő 120 perces reperfúzió hatását, mikor kamrafibrilláció nem jött létre, valamint a harmadik oszlop, illetve sáv jelöli ha ugyanez kamrafibrillációval járt együtt. Az elektromosan fibrillációba vitt szívek HO-1 mRNA mennyiségét mutatja a negyedik oszlop, illetve sáv. Az oszlopokon feltüntetett értékek a HO-1 és a GAPDH mRNA arányát mutatják csoportonként 6 szív átlagából számolva. \* $p < 0,05$  jelenti a nem iszkémiás kontroll csoporthoz (első csoport) viszonyított szignifikancia szintet, míg a # $p < 0,05$  jelöli az iszkémia/reperfúzió után átesett nem fibrilláló szívek történetét

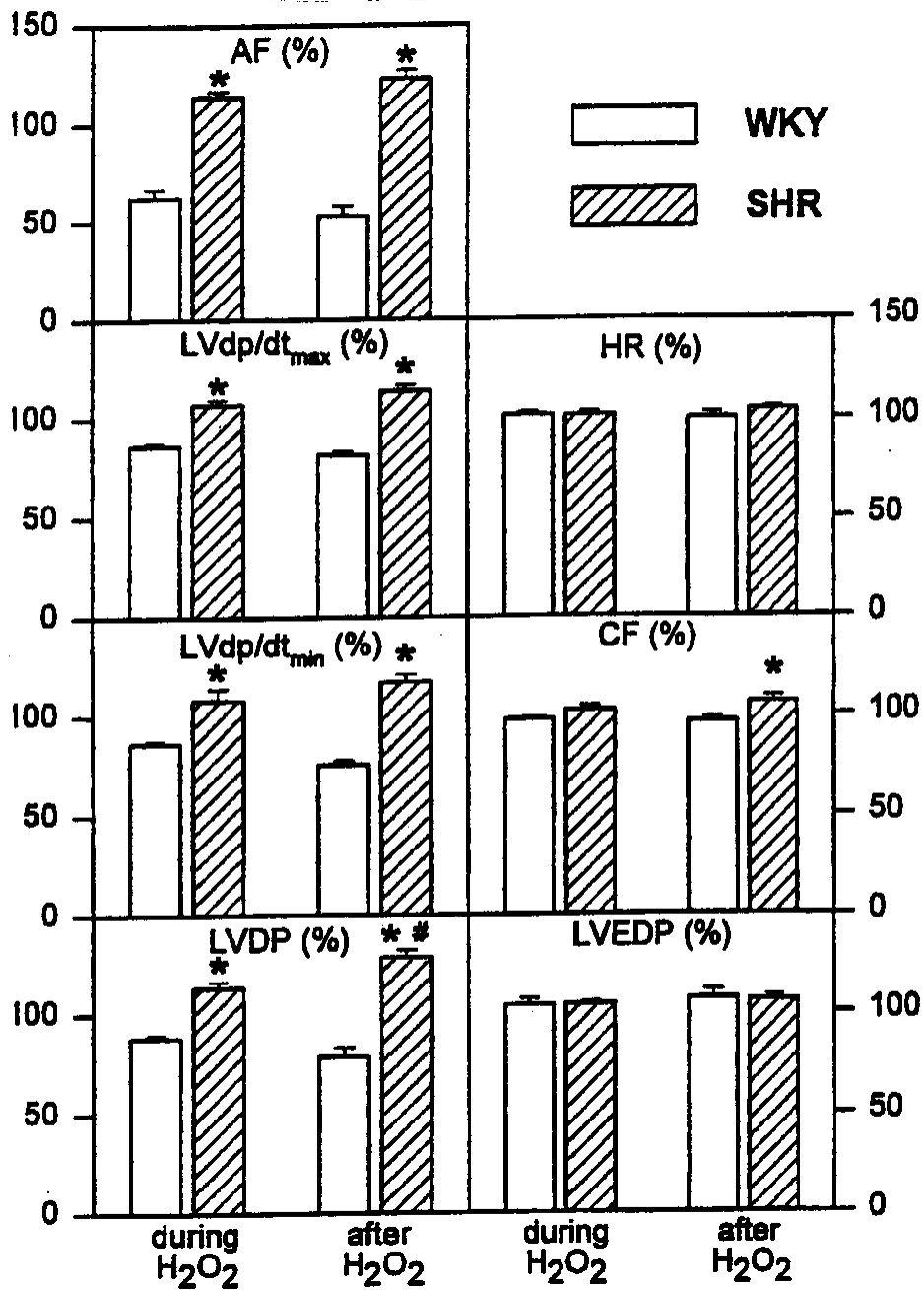
hasonlítást (második csoport). Iszkémia (ISA), Reperfúzió (RE), Kamrafibrilláció (VF), Kamrafibrilláció nélkül (NoVF).



2. ábra: A HO-1 mRNS jel reverz transzkriptáz PCR erősítése. Az alikvotok 28 ciklus után kerültek vizsgálatra. Ateljes RNS 2 % agaróz gélen került elválasztásra és etidium bromiddal került megfestésre. A sávok (representatív) a HO-1 primer erősítésének eredményét mutatják. Az oszlopok a csoportonkénti 6 szív átlagának kvantitatív eredményeit mutatják,  $x \pm SEM$ . \* $p < 0,05$  jelenti a nem iszkémiás kontroll csoporthoz (első csoport) viszonyított szignifikancia szintet, míg a # $p < 0,05$  jelöli az iszkémia/reperfúzió átesett nem fibrilláló szívek történt hasonlítását (második csoport). Iszkémia (ISA), Reperfúzió (RE), Kamrafibrilláció (VF), Kamrafibrilláció nélkül (NoVF).

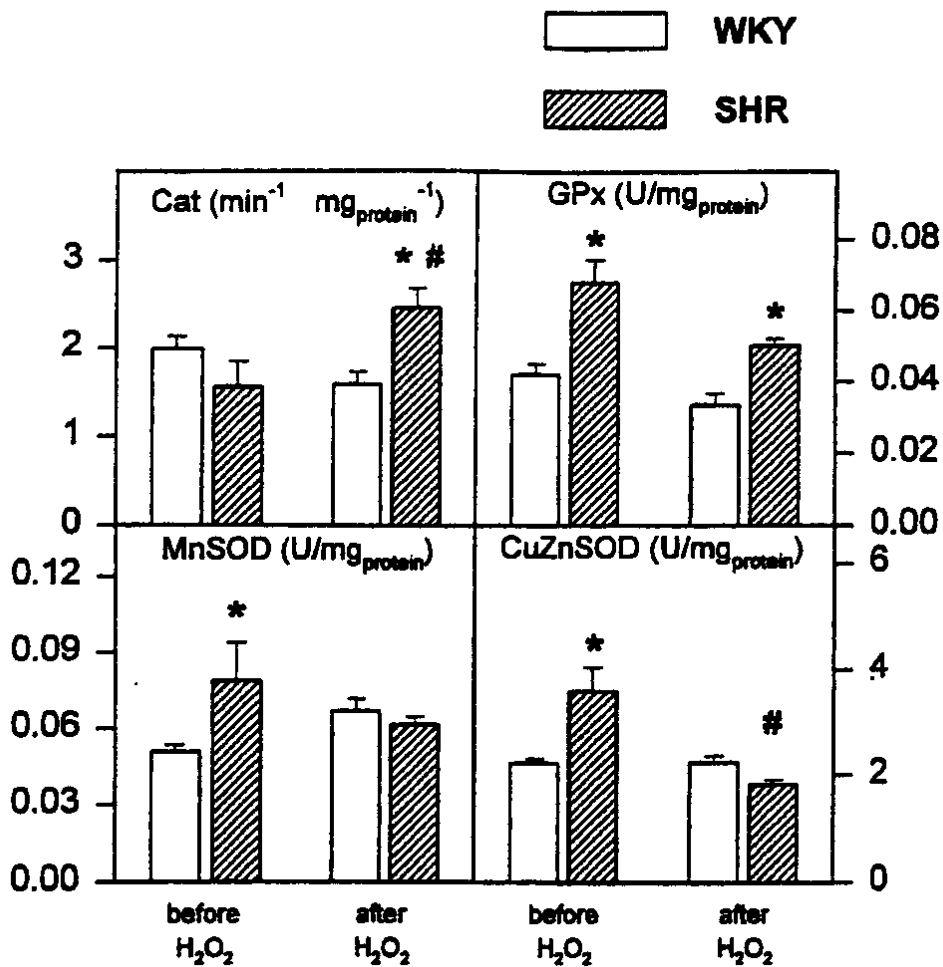


3. ábra: Reperfúzióval és elektromos ingerléssel kiváltott kamrafibrilláció hatása a hem oxigenáz aktivitásra. Első oszlop: aerob módon perfundált nem iszkémiás kontroll. Második oszlop: 30 perces iszkémiát követő 120 perces reperfúzió hatása a hem oxigenáz aktivitásra, melyet nem követett kamrafibrilláció a reperfúzió ideje alatt. Harmadik oszlop: 30 perces iszkémiát követő 120 perces reperfúzió és következményes kamrafibrilláció hatása a hem oxigenáz aktivitásra. Negyedik oszlop: 10 perces elektromos úton kiváltott fibrilláció és az azt követő 110 perces reperfúzió hatása a hem oxigenáz aktivitásra. Az adatok oszloponként 6 állatot reprezentálnak.  $X \pm SEM$ . \* $p < 0,05$  jelenti a nem iszkémiás kontroll csoporthoz (első csoport) viszonyított szignifikancia szintet, míg a # $p < 0,05$  jelöli az iszkémia/reperfúzió átesett nem fibrilláló szívek történet hasonlítását (második csoport). Iszkémia (ISA), Reperfúzió (RE), Kamrafibrilláció (VF), Kamrafibrilláció nélkül (NoVF).

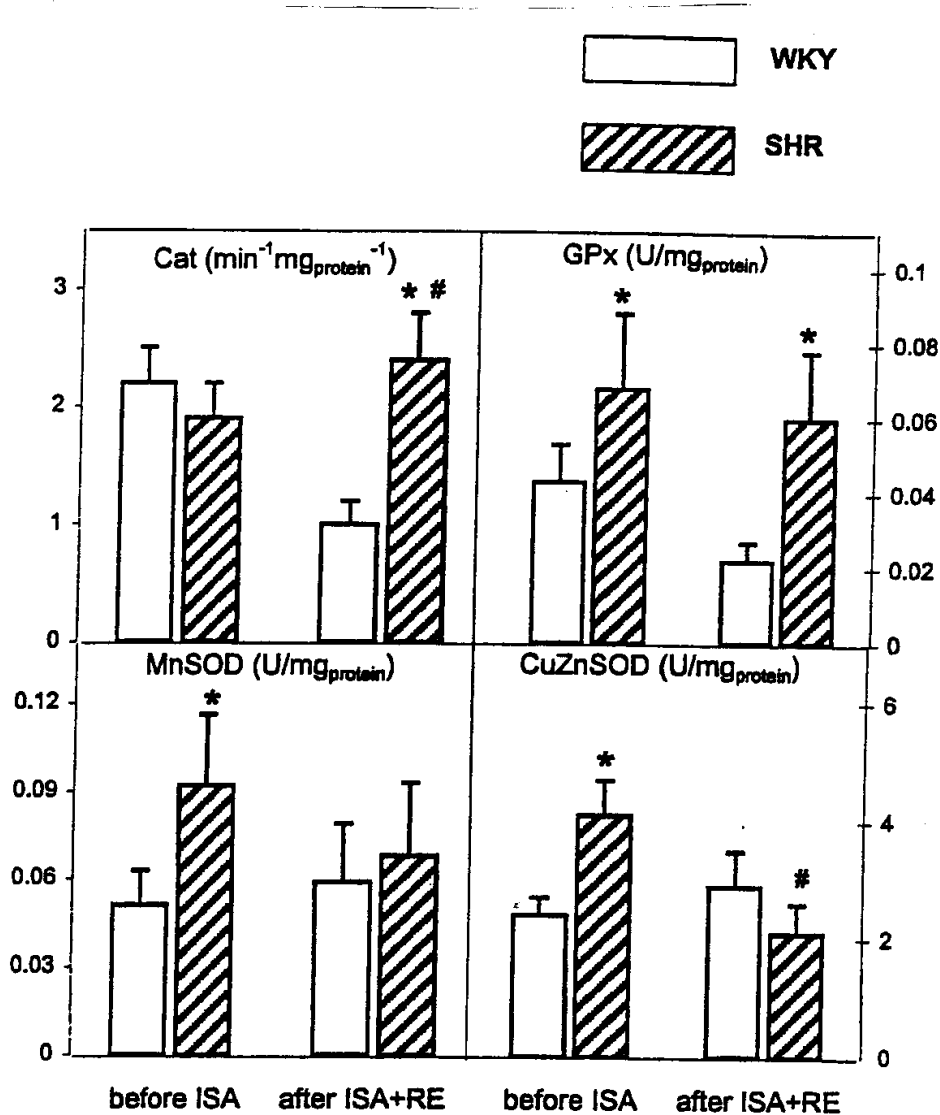


4. ábra: 18 hónapos SHR és WKY patkány izolált szíveinek funkciója 30 perces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> perfúzió alatt és az utána következő 30 perces kimosási periódus alatt. Az adatok %-ban kerültek kifejezésre. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés előtti állapotot vettük kontrollnak és 100 %-nak. X ± SEM. \*p<0,05 jelenti a megfelelő korú WKY patkányokhoz mért szignifikancia szintet. #p<0,05 jelöli a megfelelő csoporthoz viszonyított szignifikancia szintet H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> perfúzió után. Aorta átáramlás (AF), a bal kamrai (LV) nyomás első deriváltjának maximuma +LVdp/dt<sub>max</sub>, az LV nyomás első deriváltjának minimuma -LVdp/dt<sub>min</sub>, bal kamrai kifejlődő nyomás (LVDP), szívfrekvencia (HR), koronária átáramlás (CF), bal kamrai végdiasztolés nyomás (LVEDP).

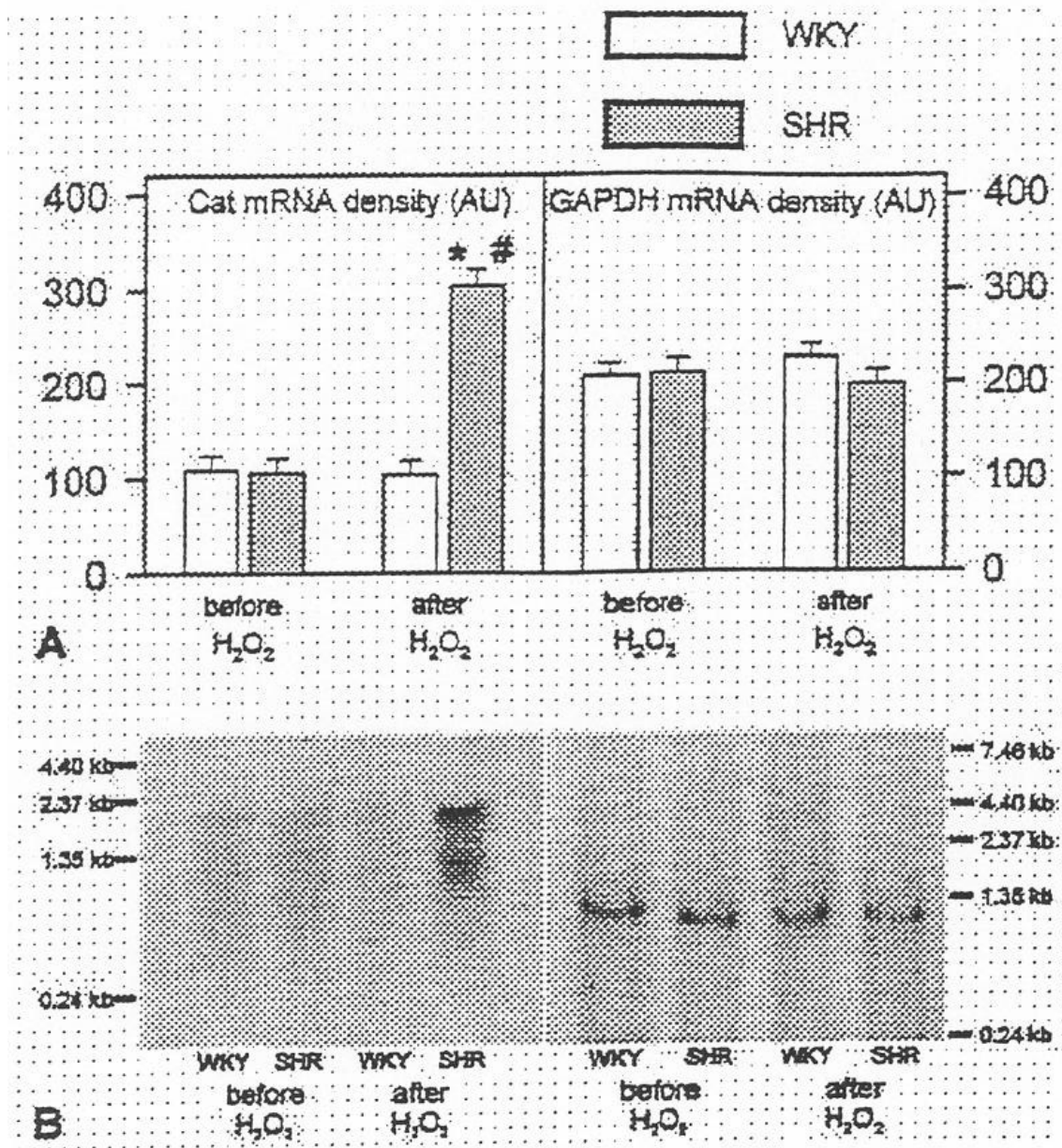




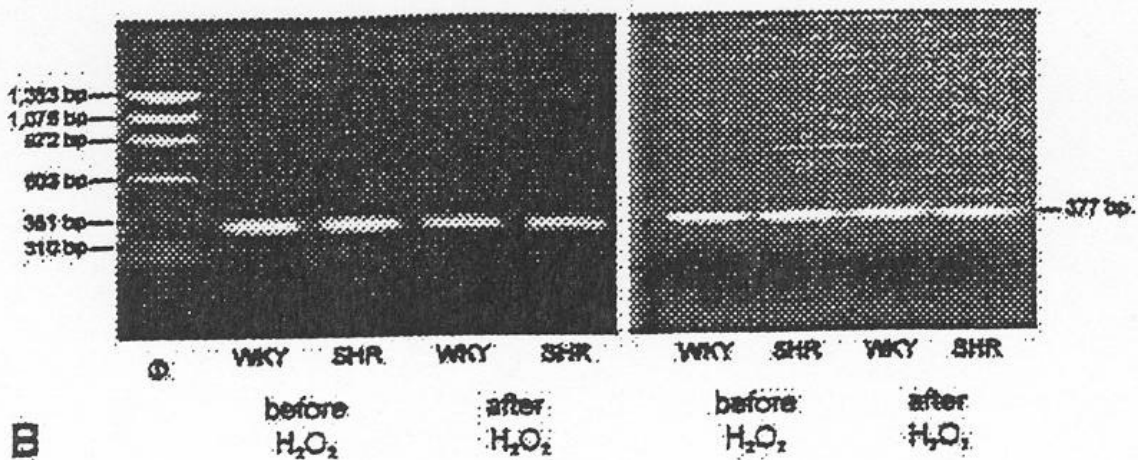
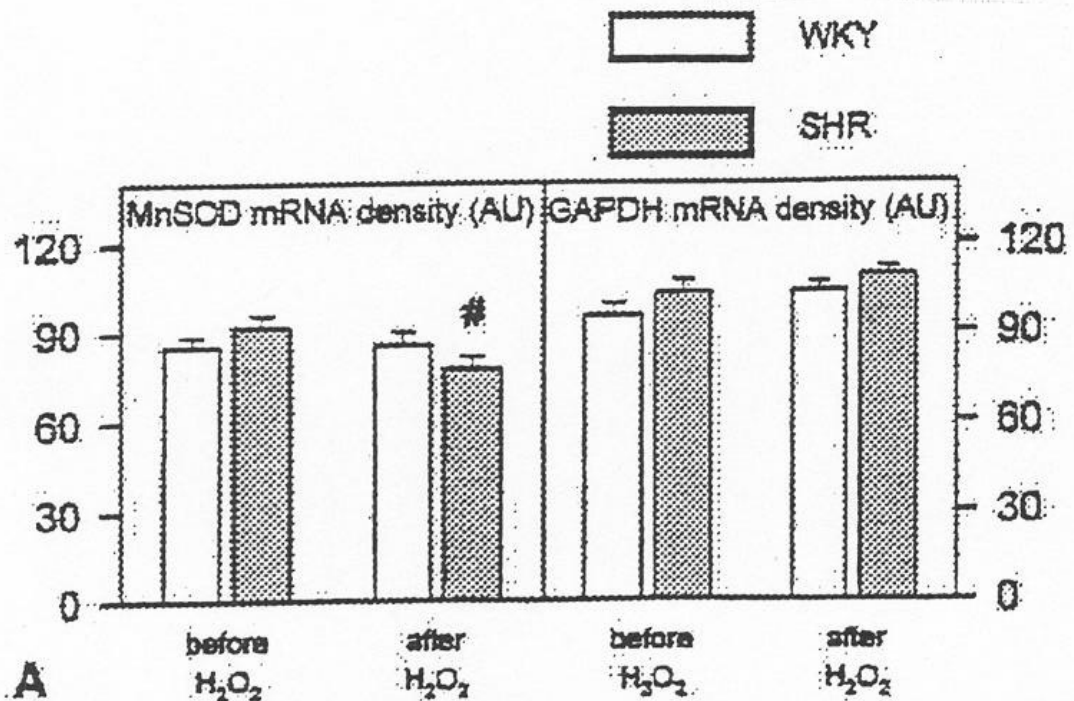
5. ábra: Kataláz (Cat), glutation peroxidáz (GPx), Mn- és Cu,Zn-szuperoxid dizmutáz (MnSOD, CuZnSOD) aktivitás a 18 hónapos SHR és WKY patkányok miokardiumaiban 30 perces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> perfúzió előtt és az azt követő 30 perces kimosási periódus alatt.  $\bar{X} \pm \text{SEM}$ , n=6 minden csoportban. \*p<0,05 jelenti a megfelelő korú WKY patkányokhoz mért szignifikancia szintet. #p<0,05 jelöli a megfelelő csoporthoz viszonyított szignifikancia szintet H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> perfúzió előtt.



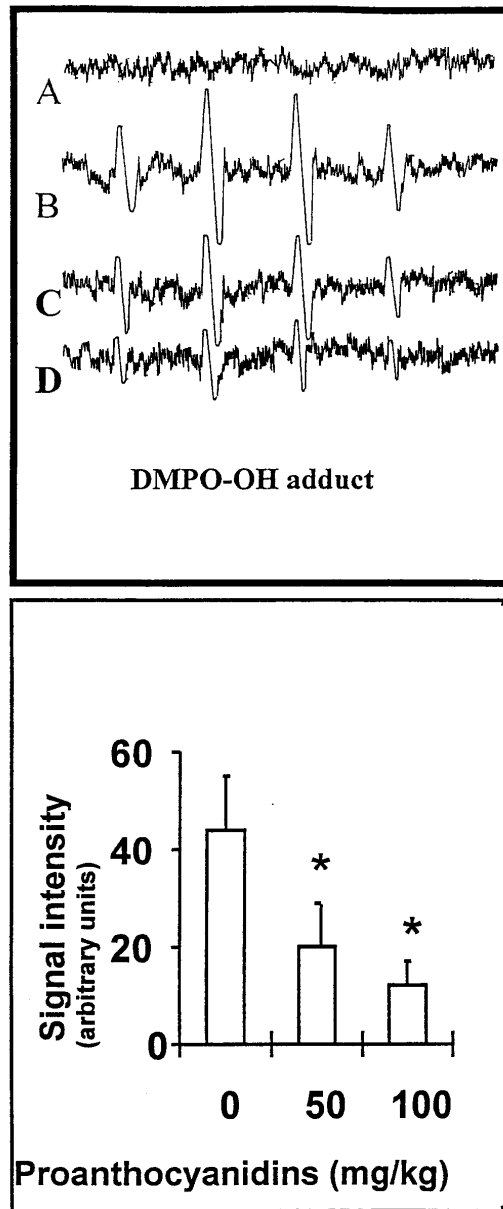
6. ábra: Kataláz (Cat), glutation peroxidáz (GPx), Mn- és Cu,Zn-szuperoxid dizmutáz (MnSOD, CuZnSOD) aktivitás a 18 hónapos SHR és WKY patkányok miokardiumaiban, 30 perces iszkémia (ISA) indukció előtt és az azt követő 30 perces reperfúzió (RE) alatt.  $X \pm \text{SEM}$ ,  $n=6$  minden csoportban. \* $p<0,05$  jelenti a megfelelő korú WKY patkányokhoz mért szignifikancia szintet. # $p<0,05$  jelöli a megfelelő csoporthoz viszonyított szignifikancia szintet ISA indukció előtt.



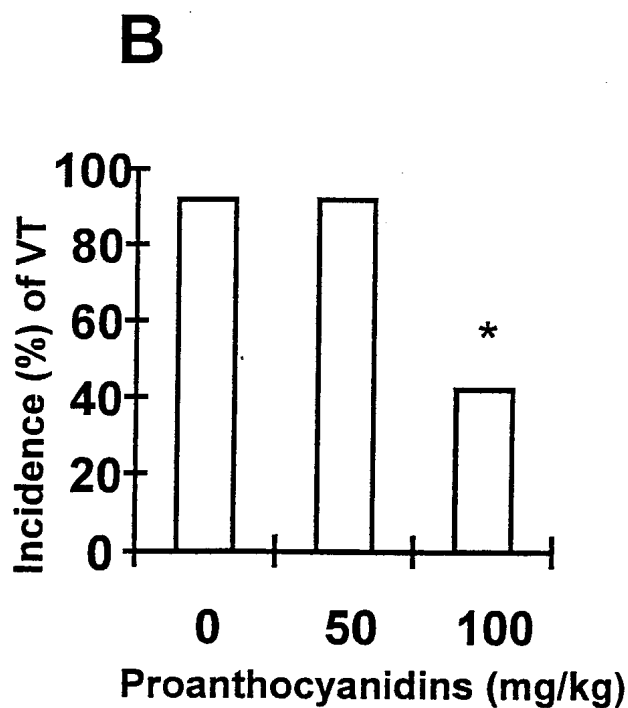
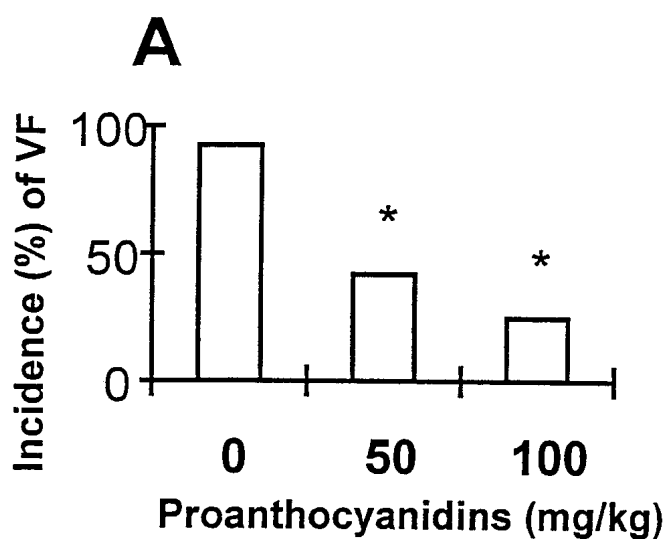
7. ábra: (A) Kataláz mRNS (Cat mRNA) mérése dot blottal 18 hónapos SHR és WKY patkányok miokardiumaiban H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> infúzió előtt és az azt követő 30 perces kimosási periódus után összehasonlítva gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) mRNS szintjével.  $\bar{X} \pm \text{SEM}$ , n=6 minden csoportban. \*p<0,05 jelenti a megfelelő korú WKY patkányokhoz mért szignifikancia szintet H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés után. #p<0,05 jelöli az SHR csoporthoz viszonyított szignifikancia szintet infúzió előtt. (B) Kataláz mRNS Northern blot (bal oldali panel) és GAPDH mRNS (jobb oldali panel) 30 perces infúziós periódust megelőző és azt követő 30 perces kimosási periódus után feldolgozott miokardiumokból. Molekuláris standardokat parallel futtatunk a mintákkal. Nagyságukat kilobázisban (kb) adtuk meg. Cat mRNS 1,2 kb, a GAPDH mRNS pedig 2,3 kb.



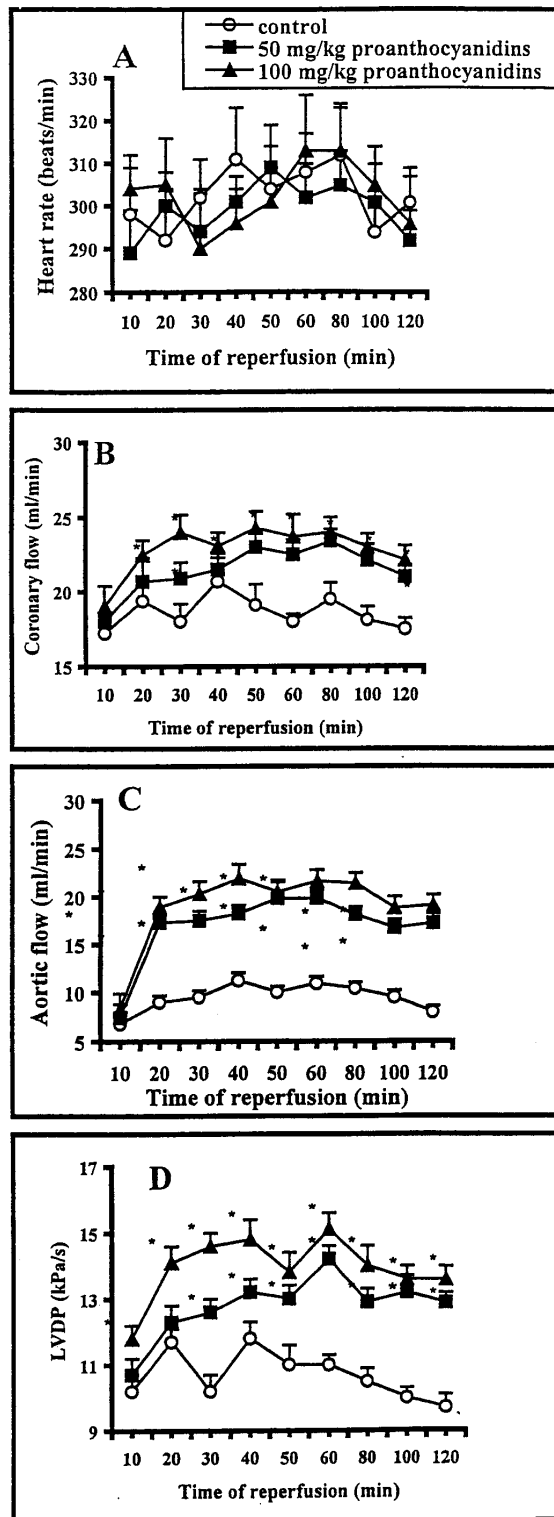
8. ábra: (A) Mangán szuperoxid dizmutáz (MnSOD) mérése reverz transzkriptáz PCR segítségével. A 18 hónapos SHR és WKY patkányok miokardiumait vizsgáltuk a 30 perces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> infúzió előtt, és az azt követő 30 perces kimosási periódus után.  $\bar{X} \pm \text{SEM}$ ,  $n=6$  minden csoportban. # $p<0,05$  jelöli az SHR csoporthoz viszonyított szignifikancia szintet infúzió előtt. (B) MnSOD mRNS (bal panel, 361 bp) és GAPDH mRNS (jobb panel, 377 bp) reverz transzkriptáz PCR vizsgálata infúzió előtt és a 30 perces kimosási periódus után.  $\bar{O}$ =molekula méret standard bázis párokban (bp).



9. ábra: Reprezentatív ESR spektrum (felső panel) a OH gyökök képződésének demonstrálására kezeletlen és proantocianidinnel kezelt iszkémia/reperfúzió átesett szívek esetén. Az első 3 percen DMPO került infundálásra, majd az effluenseket összegyűjtöttük és lefagyasztottuk későbbi analízis céljából vagy frissen elvégeztük az ESR analízist. Az ESR spektrumokat 9,3 MHz mellett 100 kHz-es modulációs frekvenciával vettük föl. A scan time 2 perc volt, míg a response time 300 ms. A: A nem iszkémiás szíven átperfundált puffer tipikus spektrális jele. B: Koronária effluensből származó jel, melyet 30 perces iszkémia és 3 perces reperfúziót követően gyűjtöttünk nem kezelt szívekből. C és D: Koronária effluensből származó jel, melyet 30 perces iszkémia és 3 perces reperfúziót követően gyűjtöttünk 50 mg/kg illetve 100 mg/kg proantocianidinnel kezelt szívekből. Az alsó panel az arbitrális egységben kifejezett DMPO-OH adduktum proantocianidin hatást mutatja a reperfúzió 3. percében. A DMPO a reperfúzió kezdetekor került infundálásra.  $\bar{X} \pm \text{SEM}$ ,  $n=6$  minden csoportban. \* $p<0,05$  jelenti a nem kezelt (0 mg/kg proantocianidin) kontroll csoporthoz viszonyított szignifikancia szintet.



10. ábra: Proantocianidin dózis-hatás vizsgálata a reperfüzió indukálta aritmiák kialakulásának gátlásában. A patkányokat (csoportonként 12-t) naponta kezeltük 0, 50 vagy 100 mg/kg proantocianidinnel 3 héten keresztül, majd a szíveket eltávolítottuk és 30 perces globális iszkémia után 2 óra reperfüziónak vetettük alá. A: a kamrafibrilláció incidenciája %-ban kifejezve. B: a ventrikuláris tachikardia incidenciája %-ban kifejezve. \* $p < 0,05$  jelenti a nem kezelt (0 mg/kg proantocianidin) kontroll csoporthoz viszonyított szignifikancia szintet.



11. ábra: Kezeletlen és proantocianidinnel kezelt szívek funkciós paramétereit 30 perces iszkémiát követő 120 perces reperfüzió hatására. A: Posziszkiás szívfrekvencia változás. B: Koronária áramlás változás. C: Aorta áramlás változás. D: LVDP változás. n=12 minden csoportban.  $\bar{X} \pm \text{SEM}$ , \* $p < 0,05$ .

**1. táblázat: Szívfunkciók iszkémia/reperfúzió után átesett nem fibrilláló és fibrilláló, valamint elektromos ingerléssel fibrillációba vitt miokardiumok esetén..**

Csoportok	Iszkémia előtti értékek (fibrilláció előtt)				Reperfúzió után 60 perccel				Reperfúzió után 120 perccel			
	HR	CF	AF	LVDP	HR	CF	AF	LVDP	HR	CF	AF	LVDP
Időarányos kontroll perfúzió	309±7	27.0±1.1	52.0±1.5	17.4±0.4	305±8	5.0±1.3	50.2±2.0	17.0±0.3	302±9	25.5±1.0	48.1±1.5	16.1±0.4
ISA/RE nem fibrilláló	316±8	26.8±0.8	51.3±2.0	18.0±0.5	291±9	20.2±1.0	22.3±1.1	14.9±0.4	300±6	19.8±1.1	19.6±2.0	14.4±0.5
ISA/RE Fibrilláló	312±9	26.3±0.9	50.9±1.4	17.6±0.3	297±7	17.5±0.7*	11.4±0.6*	10.5±0.4*	294±8	16.9±0.8*	10.2±0.7*	9.8±0.6*
Elektromos úton kiváltott fibrilláció	308±9	28.1±1.2	49.8±2.1	17.5±0.4	300±8	19.8±1.1 <sup>#</sup>	23.1±1.0 <sup>#</sup>	15.2±0.3 <sup>#</sup>	296±8	20.7±1.3 <sup>#</sup>	21.8±2.2 <sup>#</sup>	15.0±0.4 <sup>#</sup>

n=6 minden csoportban, X ± SEM, \*p<0.05 jelenti az ISA/RE nemfibrilláló csoporttal való összehasonlítást, <sup>#</sup>p<0.05 jelenti az ISA/RE fibrilláló csoporttal való összehasonlítást. HR: szívfrekvencia (beütés/perc), CF: koronária átfolyás (ml/min), AF: aorta átfolyás (ml/min), LVDP: bal kamrai kialakuló nyomás, ISA: iszkémia, RE: reperfúzió.



## Irodalom

1. Gray RA, Pertsov AM, and Jalife J. Spatial and temporal organization during cardiac fibrillation. *Nature* 392: 75-78, 1998.
2. Witkowski FX, Leon LJ, Penkoske PA, Giles WR, Spano ML, Ditto WL, and Winfree AT. Spatiotemporal evolution of ventricular fibrillation. *Nature* 392: 78-82, 1998.
3. Tzivoni D, Keren A, Granot H, Gottlieb S, Benhorin J, and Stern S. Ventricular fibrillation caused by myocardial reperfusion in Prinzmetal's angina. *Am Heart J* 105: 323-325, 1983.
4. Curtis MJ, Pugsley MK, and Walker MJA. Endogenous chemical mediators of ventricular arrhythmias in ischemic heart diseases. *Cardiovasc Res* 27: 703-719, 1993.
5. Hearse DJ. Reperfusion-induced injury: a possible role for oxidant stress and its manipulation. *Cardiovasc Drugs Ther* 5: 225-236, 1991.
6. Opie LH. Role of calcium and other ions in reperfusion injury. *Cardiovasc Drugs Ther* 5: 237-248, 1991.
7. Maines MD, Raju VS, and Panahian N. Spin trap (N-t-butyl- $\alpha$ -phenylnitron)-mediated supra-induction of heme oxygenase-1 in kidney ischemia/reperfusion model: role of the oxygenase in protection against oxidative injury. *J Pharmacol Exp Ther* 291: 911-919, 1999.
8. Salvemini D, Wang ZQ, Zweier JL, Samouilov A, Macarthur H, Misko TP, Currie MG, Cuzzocrea S, Sikorski JA, and Riley DP. A nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity in rats. *Science* 286: 304-306, 1999.
9. Tyrrell R. Redox regulation and oxidant activation of heme oxygenase-1. *Free Rad Res* 31: 335-340, 1999.
10. Caudill TK, Resta TC, Kanagy NL, and Walker BR. Role of endothelial carbon monoxide in attenuated vasoreactivity following chronic hypoxia. *Am J Physiol* 275: R1025-R1030, 1998.
11. Trakshel GM, and Maines MD. Multiplicity of heme oxygenase isozymes: HO-1 and HO-2 are different molecular species in rat and rabbit. *J Biol Chem* 264: 1323-1328, 1989.
12. Katayose D, Isoyama S, Fujita H, and Shibahara S. Separate regulation of heme oxygenase and heat shock protein 70 mRNA expression in the rat heart by hemodynamic stress. *Biochem Biophys Res Commun* 191: 587-594, 1993.

13. Lee PJ, Jiang BH, Chin BY, Iyer NV, Alam J, Semenza GL, and Choi AMK. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem* 272: 5375-5381, 1997.
14. Otterbein LE, Lee PJ, Chin BY, Petrache I, Camhi SL, Alam J, and Choi AM. Protective effects of heme oxygenase-1 in acute lung injury. *Chest* 116: S61-S63, 1999.
15. Vile GF, and Tyrell RM. Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase of ferritin. *J Biol Chem* 268:14678-14681, 1993.
16. Csonka C, Varga E, Kovacs P, Ferdinandy P, Blasig IE, Szilvassy Z, and Tosaki A. Heme oxygenase and cardiac function in ischemic/reperfused rat hearts. *Free Rad Biol Med* 27: 119-126, 1999.
17. Keating MT, and Sanguinetti MC. Molecular genetic insights into cardiovascular disease. *Science* 272: 681-685, 1996.
18. Priori SG, Barhanin J, Hauer RNW, Hawerkamp W, Jongsma HJ, Kleber AG, McKenna WJ, Roden DM, Rudy Y, Schwartz K, Schwartz PJ, Towbin JA, and Wilde A. Genetic and molecular basis of cardiac arrhythmias: impact on clinical management. *Eur Heart J* 20: 174-195, 1999.
19. Rosen MR. Long QT syndrome patients with gene mutations. *Circulation* 92: 3373-3375, 1995.
20. Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, De Jager T, Schwartz PJ, Towbin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD, and Keating MT. Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nature Gen* 12: 17-23, 1996.
21. Blasig, I.E.; Grune, T.; Schönheit, K.; Rohde, E.; Jackstadt, M.; Haseloff, R.F.; Siems, W.G. 4-Hydroxynonenal, a novel indicator of lipid peroxidation for reperfusion injury of the myocardium. *Am. J. Physiol.* 269:H14-H22; 1995.
22. Bing, O.H.; Brooks, W.W.; Robinson, K.G.; Slawsky, M.T.; Hayes, J.A.; Litwin, S.E.; Sen, S.; Conrad, C.H. The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27:383-396; 1995.
23. Li, Z.; Bing, O.H.; Long, X.; Robinson, K.G.; Lakatta, E.G. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am. Heart J.* 272:H2313-H2319; 1997.

24. Wallukat, G.; Blasig, I.E.; Morwinski, R.; Herrmann, H.J.; Rohde, E. The sera of spontaneously hypertensive rats contain agonistic autoantibodies against the  $\beta_1$ -adrenoceptor. *J. Hypertension* 13:1031-1036; 1995.
25. Walford, G.D.; Spurgeon, H.A.; Lakatta, E.G. Diminished cardiac hypertrophy and muscle performance in older compared with younger adult rats with chronic atrioventricular block. *Circ Res.* 63:502-511; 1988.
26. Conrad, C.H.; Brooks, W.W.; Robinson, K.G.; Bing, O.H. Impaired myocardial function in spontaneously hypertensive rats with heart failure. *Am. J. Physiol.* 260:H136-H145; 1991.
27. Conrad, C.H.; Brooks, W.W.; Hayes, J.A.; Sen, S.; Robinson, K.G.; Bing, O.H.L. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation* 91:161-170; 1995.
28. Bing, O.H. Hypothesis: apoptosis may be a mechanism for the transition to heart failure with chronic pressure overload. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 26:943-948; 1994.
29. Liu P, Hock CE, Nagele R, Wong PY. Formation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol* 1997; 272: H2327-H2336.
30. McHugh NA, Merrill GF, Powell SR. Estrogen diminishes postischemic hydroxyl radical production. *Am J Physiol* 1998; 274: H1950-H1954.
31. Garlick PB, Davies MJ, Hearse DJ, Slater TF. Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy. *Circ Res* 1987; 61: 757-760.
32. Zweier JL. Measurement of superoxide/derived free radical mechanism of reperfusion injury. *J Biol Chem* 1988; 263: 1353-1357.
33. Renaud S, de Rolgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the Franch paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992; 339: 1523-1526.
34. Gaziano JM, Buring JE, Breslow JL, Goldhaber SZ, Rosner B, Van Denburgh M et al. Moderate alcohol intake, increased levels of high density lipoprotein and its subfractions, and decreased risk of myocardial infarction. *N Eng J Med* 1993; 329: 1829-1834.
35. Camargo CA, Hennekens CH, Gaziano M, Glynn RJ, Manson JE, Stampfer MJ. Prospective study of moderate alcohol consumption and mortality in US male physicians. *Arch Intern Med* 1997; 157: 79-85.

36. Feng AN, Chen YL, Chen YT, Ding YZ, Lin SJ. Red wine inhibits monocyte chemotactic protein-1 expression and modestly reduces neointimal hyperplasia after balloon injury in cholesterol-fed rabbits. *Circulation* 1999; 100: 2254-2259.
37. Demrow HS, Slane PR, Folts JD. Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. *Circulation* 1995; 91: 1182-1188.
38. Ray PS, Maulik G, Cordis GA, Bertelli AAE, Bertelli A, Das DK. The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury. *Free Rad Biol Med* 1999; 27: 160-169.
39. Sato M, Maulik G, Ray PS, Bagchi D, Das DK. Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidin against ischemic reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 1289-1297.
40. Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, Joshi SS, Pruess HG. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 2000; 148: 187-197.
41. Hollman PC, Hertog MG, Katan MB. Role of dietary flavonoids in protection against malignancy and coronary heart disease. *Biochem Soc Trans* 1996; 24: 785-789.
42. Lairon D, Amiot MJ. Flavonoids in food and natural antioxidants in wine. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10: 23-28.
43. Klatsky AL, Armstrong MA. Alcoholic beverage choice and risk of coronary artery disease mortality: do red wine drinkers fare best? *Am J Cardiol* 1993; 71: 467-469.
44. Hertog MGL, Feskens EJM, Kromhout D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet* 1997; 349: 699.
45. Tosaki A, and Braquet P. DMPO and reperfusion injury: arrhythmia, heart function, electron spin resonance, and nuclear magnetic resonance studies in isolated working guinea pig hearts. *Am Heart J* 120: 819-830, 1990.
46. Chomczynski P, and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987.
47. Kutty RK, Kutty G, Wiggert B, Chader GJ, Darrow RM, and Organisciak DT. Induction of heme oxygenase 1 in retina by intense visible light: Suppression by the antioxidant dimethylthiourea. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1177-1181, 1995.
48. Zador E, Mendler L, Ver-Heyen M, Dux L, and Wuytack F. Changes in mRNA levels of the sarcoplasmic/endoplasmic-reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase isoforms in the rat soleus muscle regenerating from notexin-induced necrosis. *Biochem J* 320: 107-113, 1996.

49. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, second edition, Plainview, New York, 1989.
50. Tenhunen R, Ross ME, Harver HS, and Schmid R. Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate dependent biliverdin reductase: partial purification and characterization. *Biochemistry* 9: 298-308, 1970.
51. Yoshida T, Takahashi S, and Kikuchi G. Partial purification and reconstitution of the heme oxygenase system from pig spleen microsomes. *J Biochem* 75: 1187-1191, 1974.
52. Morita T, Perella MA, Lee ME, and Kourembanas S. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1475-1479, 1995.
53. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
54. Ho, Y.S.; Howard, A.J.; Crapo, J.D. Molecular structure of a functional rat gene for manganese-containing superoxide dismutase. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 4:278-286; 1991.
55. Furuta, S.; Hayashi, H. Purification and properties of recombinant rat catalase produced in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 107:708-713; 1990.
56. Tosaki A, Pali T, Droy-Lefix MT. Effects of *Ginkgo biloba* extract and preconditioning on the diabetic rat myocardium. *Diabetologia* 1996; 39: 1255-1262.
57. Walker MJA, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RWF, Janse MJ, Yellon DM, Cobbe SM, Coker SJ, Harness JB, Harron DWG, Higgins AJ, Julian DJ, Lab MJ, Manning AS, Northover BJ, Parratt JR, Riemersma RA, Riva E, Russel DC, Sheridan DJ, Winslow E, Woodward B. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischemia, infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1988; 22: 447-455.
58. Wallenstein S, Zucker CL, and Fleiss JL. Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res* 47; 1-9, 1980.
59. Tosaki A, Bagchi D, Pali T, Cordis GA, Das DK. Comparison of ESR and HPLC methods for the detection of OH<sup>•</sup> radicals in ischemic/reperfused hearts. *Biochem Pharmacol* 1993; 45: 961-969.
60. Goodman AI, Choudhury M, da Silva JL, Schwartzman ML, and Abraham NG. Overexpression of heme oxygenase gene in renal cell carcinoma. *Proc Soc Exp Biol Med* 214, 54-61, 1997.

61. Maines MD, and Abrahamson PA. Expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in human prostate: normal, hyperplastic and tumor tissue distribution. *Urology* 47: 727-733, 1996.
62. Alam J, Stewart D, Touchard C, Boinapally S, Choi AMK, and Cook JL. Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem* 274: 26071-26078, 1999.
63. Choi AMK, and Alam J. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15: 9-19, 1996.
64. Christodoulides N, Durante W, Kroll MH, and Schafer AI. Vascular smooth muscle cell heme oxygenase generate guanylyl cyclase-stimulatory carbon monoxide. *Circulation* 91: 2306-2309, 1995.
65. Ogawa S, Gerlach H, Esposito C, Pasagian-Macaulay A, Brett J, and Stern D. Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium. Increased monolayer permeability and induction of procoagulant J *Clin Invest* 85: 1090-1098, 1990.
66. Bernier, M.; Hearse, D.J.; Manning, A.S. Reperfusion-induced arrhythmias and oxygen-derived free radicals: Studies with "anti-free radical" interventions and a free radical generating system in the isolated perfused rat heart. *Circ. Res.* 58:331-349; 1986.
67. Ek, B.; Hallberg, C.; Sjogren, K.G.; Hjalmarson, A. Reoxygenation-induced cell damage of isolated neonatal rat ventricular myocytes can be reduced by chain-breaking antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.* 16:117-121; 1994.
68. Maier, K.L.; Hinze, H.; Meyer, B.; Lenz, A.G. Metal-catalysed inactivation of bovine glucose-6-phosphate dehydrogenase - role of thiols. *FEBS Lett.* 396:95-98; 1996.
69. Vogt, M.; Bauer, M.K.; Ferrari, D.; Schulze-Osthoff, K. Oxidative stress and hypoxia/reoxygenation trigger CD95 (APO-1/Fas) ligand expression in microglial cells *FEBS Lett.* 429:67-72; 1998.
70. Erden, M.; Bor, N.M. Changes of reduced glutathion, glutathion reductase, and glutathion peroxidase after radiation in guinea pigs. *Biochem. Med.* 31:217-227; 1984.
71. Arduini, A.; Mezzetti, A.; Porreca, E.; Lapenna, D.; DeJulia, J.; Marzio, L.; Polidoro, G.; Cucurullo, F. Effect of ischemia and reperfusion on antioxidant enzymes and mitochondrial inner membrane proteins in perfused rat heart. *Biochem. Biophys. Acta* 970:113-121; 1988.

72. Sinet, P.M.; Garber, P. Inactivation of the human CuZn superoxide dismutase during exposure to  $O_2^-$  and  $H_2O_2$ . *Arch. Biochem. Biophys.* 212:411-416; 1981.
73. Röhrdanz, E.; Kahl, R. Alterations of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* 24:27-38; 1998.
74. Maulik, N.; Sato, M.; Privce, B.D.; Das, D.K. An essential role of NF $\kappa$ B in tyrosine kinase signaling of p38 MAP kinase regulation of myocardial adaptation to ischemia. *FEBS Lett.* 429:365-369; 1998.
75. Kondo, T.; Kinouchi, H.; Kawase, M.; Yoshimoto, T. Differential response in the release of  $H_2O_2$  between astroglial cells and endothelial cells following hypoxia/reoxygenation. *Neurosci. Lett.* 215:103-106; 1996.
76. Dalton, G.R.; Jones, J.V.; Evans, S.J.; Levi, A.J. Wall stress-induced arrhythmias in the working rat heart as left ventricular hypertrophy regress during captopril treatment. *Cardiovasc. Res.* 33:561-572; 1997.
77. Yucel, D.; Aydogdu, S.; Cehreli, S.; Saydam, G.; Canatan, H.; Senes, M.; Cigdem Topkaya, B.; Nebioglu, S. Increased oxidative stress in dilated cardiomyopathic heart failure. *Clin. Chem.* 44:148-154; 1998.
78. Giugliano, D.; Ceriello, A.; Paolisso, G. Diabetes mellitus, hypertension, and cardiovascular disease: which role for oxidative stress? *Metabolism* 44:363-368; 1995.
79. Boutros, A.; Wang, J. Ischemic preconditioning, adenosine and bethanechol protect spontaneously hypertensive isolated rat hearts. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275:1148-1156; 1995.
80. Nakagawa, C.; Asayama, J.; Katamura, M.; Matoba, S.; Keira, N.; Kawahara, A.; Tsuruyama, K.; Tanaka, T.; Kobara, M.; Akashi, K.; Ohta, B.; Tatsumi, T.; Nakagawa, M. Myocardial stretch induced by increased left ventricular diastolic pressure preconditions isolated perfused hearts of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Basic Res. Cardiol.* 92:410-416; 1997.
81. Frohlich, E.D.; Apstein, C.; Chobanian, A.V.; Devereux, R.B.; Dustan, H.P.; Dzau V.; Fauad-Tarazi, F.; Horan, M.J.; Marcus, M.; Massie, B. The heart in hypertension. *N. Engl. J. Med.* 327:998-1008; 1992.
82. Gelvan D, Saltman P, Powell SR. Cardiac reperfusion damage prevented by a nitroxide free radical. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 4680-4684.
83. Galinanes M, Qiu Y, Ezrin A, Hearse DJ. PEG-SOD and myocardial protection: studies in the blood- and crystalloid-perfused rabbit and rat hearts. *Circulation* 1992; 86: 672-682.

84. Woodward B, Zakaria MNM. Effects of some free radical scavengers on reperfusion-induced arrhythmias in the isolated rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1985; 17: 485-493.
85. Ambrosio G, Zweier JL, Jacobus WE, Weisfeldt ML, Flaherty JT. Improvement of postischemic myocardial function and metabolism induced by administration of deferoxamine at the time of reflow: the role of iron in the pathogenesis of reperfusion injury. *Circulation* 1987; 76: 906-915.
86. Ferdinandy P, Appelbaum Y, Tosaki A. Role of nitric oxide and TPEN, a potent metal chelator, in ischemic and reperfused rat isolated hearts. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1998; 25: 496-502.
87. Powell SR, Saltman P, Uretzky G, Chevion M. The effect of zinc on reperfusion arrhythmias in the isolated perfused rat heart. *Free Rad Biol Med* 1990; 8: 33-46.
88. Rimm EB, Giovannucci EL, Willett WC, Colditz GA, Archerio A, Rosner B et al. Prospective study of alcohol consumption and risk of coronary disease in men. *Lancet* 1991; 338: 464-486.
89. Johnson EF, Schwab GE, Vickery LE. Positive effectors of the binding of an active site-directed amino steroid to rabbit cytochrome P-450 3c. *J Biol Chem* 1988; 263: 17672-17677.
90. Cestaro B, Simonetti P, Cervato G, Brusamolino A, Gatti P, Testolin G. Red wine effects on peroxidation indexes of rat plasma and erythrocytes. *Int J Food Sci Nutr* 1996; 47: 181-189.
91. Roig R, Cascon E, Arola L, Blade C, Salvado MJ. Moderate red wine consumption protects the rat against oxidation in vivo. *Life Sci* 1999; 64: 1517-1524.
92. Ferns GAA, Forster R, Stewart-Lee A, Konneh M, Nourooz-Zadeh J, Anggard EE. Probucol inhibits neointimal thickening and macrophage accumulation after balloon injury in the cholesterol-fed rabbit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11312-11316.
93. Tardif JC, Cote G, Lesperance J, Bourassa M, Lambert J, Doucet S et al. for the Multivitamins and Probucol Study Group. Probucol and multivitamins in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1997; 337: 365-372.



## **A disszertációban felhasznált publikációk**

### *Absztraktok*

**1.** T. Pataki, P. Kovács, P. Ferdinándy, I. E. Blasig.  
The control of cardiac function and nitric oxide production by the extract of Ginkgo biloba in ischemic/reperfused rat hearts European society of Cardiology, Barcelona, Spain 1999

**2.** T. Pataki, P. Kovács, Z. Szilvássy, I. E. Blasig, A Tosaki.  
Gene expression related to fibrillation in ischemic-reperfused isolated rat hearts. Fundamental and Clinical Pharmacol, 13: 224s 1999

**3.** T. Pataki, P. Kovács, Z. Szilvássy, D. K. Das, A Tosaki.  
Expression of cytochrome oxidase B subunit III. Related to ventricular fibrillation in ischaemic-reperfused hearts.  
Journal of Physiology, London, p 526, 2000

### *„Peer reviewed” közlemények*

**1.** Cs. Csonka, T. Pataki, P. Kovacs, Sebastian L. Müller, Matthias L. Schroeter, A. Tosaki and I. E. Blasig. Effect of Oxidative stress on the expression of antioxidative defense enzymes in spontaneously hypertensive rat hearts  
Free Radical Biology & Medicine, 29: 612-619, 2000. IF: 4,079

**2.** T. Pataki, I. Bak, Cs. Csonka, P. Kovacs, E. Varga, Ingolf E. Blasig, A. Tosaki.  
Regulation of ventricular fibrillation by heme oxygenase in ischemic/reperfused hearts. Antioxidants and Redox Signaling 3:125-134, 2001.  
This is a new journal, the IF is due in the year of 2002.

**3.** T. Pataki, I. Bak, P. Kovacs, D. Bagchi, D.K. Das, A Tosaki. Grape seed proanthocyanidins reduced ischemia/reperfusion-induced injury in isolated rat hearts. Am J Clin Nutrition, 2001 in press, IF: 3,958