

Superoxide Dismutase'ın izole Köpek Kalbinde İskemi ve Reperfüzyon Etkisiyle Oluşan Elektrofizyolojik Değişiklikler Üzerine Etkisi

Doç.Dr.Kıymet SALBAŞ, Prof.Dr.Ahmet SONEL,
Doç.Dr.Hakkı AKALIN *: Yarıtl.Doç.Dr.Ürmit ÖZYURÜA *

A.Ü.Tıp. Fakültesi Kardiyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi ve *Kardiyovasküler Cerrahi Bilim Dalı, ANKARA

ÖZET

Superoxide radikalini metabolize eden enzim superoxide dismutase'ın (SOD), 30 dakikalık left anterior descending koroner arteri (LAD) oklüzyonu ve 60 dakikalık reperfüzyon sonucu ortaya çıkan elektrofizyolojik değişiklikler üzerine etkisi, izole köpek kalbinde incelenmiştir. Preparatlar Langendorff tekniği ile perfüze edilmişlerdir. Çalışma 2 grup kalb üzerinde yapılmıştır (kontrol ve SOD grubu). Kontrol grubu preparatları Krebs-Henseleit solüsyonu ile perfüze edilmişlerdir. SOD grubu perfüzyon solüsyonu ise Krebs-Henseleit solüsyonun SOD (SOD m solüsyon içindeki konsantrasyonu 1.8/M dür) dir. Her iki grup da aynı deney protokoluna tabi tutulmuşlardır. 60 dakikalık stabilizasyon periyodunu 30 dakikalık LAD oklüzyonu ve 60 dakikalık reperfüzyon izlemiştir.

Mikroelektrot tekniği ile yapılan dinlenim membran potansiyeli, aksiyon potansiyeli amplitüdü, maksimum depolarizasyon hızı, aksiyon potansiyeli süresi ve efektif refrakter periyot ölçümlerinin SOD grubu değerlerinin kontrol grubu değerleriyle karşılaştırılması, SOD un iskemi ve reperfüzyonda bu parametreler üzerinde önemli koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir. Bu sonuç, superoxide radikalının iskemi ve reperfüzyon esnasındaki hücre membranı harabiyetinde önemli rol oynayabileceği hipotezini desteklemektedir.

Anahtar kelimeler: İskemi, reperfüzyon, superoxide radikali, superoxide dismutase

SUMMARY

EFFECT OF SUPEROXIDE DISMUTASE ON ELECTROPHYSIOLOGICAL CHANGES INDUCED BY ISCHEMIA AND REPERFUSION IN ISOLATED CANINE HEART

The effect of superoxide dismutase (SOD), the scavenger of superoxide radical, on the cellular electrophysiological alterations induced by 30 min left anterior descending coronary artery (LAD) occlusion and 60 min reperfusion was investigated in isolated canine heart. The hearts were perfused by Langendorff technique. 2 groups were studied (control and SOD groups). Control group was perfused with Krebs-Henseleit solution. The perfusate of the SOD group was Krebs-Henseleit solution plus SOD (final concentration of SOD in the solution was 1.8µM). Both groups were subjected to the same experimental protocol. After 60 min of equilibration, both groups underwent 30 min LAD occlusion and this was followed by 60 min reperfusion.

The comparison of micro electrode recordings of resting membrane potential, action potential amplitude, maximum rate of depolarization, action potential duration and effective refractory period of SOD group with those of control group, revealed that, SOD provided significant protection in these parameters during ischemia and reperfusion. This result supports the hypothesis that superoxide radical may play an important role in membrane damage during ischemia and reperfusion.

Key words: Ischemia, reperfusion, superoxide radical, superoxide dismutase

Geliş Tarihi: 12.4.1988 Kabul Tarihi: 13.4.1988

Yazışma adresi: Doç.Dr.Kıymet SALBAŞ

A.Ü.Tıp Fak. Kardiyoloji Araştırma
ve Uygulama Merkezi, Cebeci-ANKARA

İskemi ve reperfüzyondaki kalb kası hücre harabiyetinde, xanthine oxidase reaksiyonu sonucu ortaya çıkan, superoxide anyonu (O_2^-), hydroxy! radikali (OH) ve hydrogen peroxide (H_2O_2) gibi sitotoksik serbest oksijen radikallerinin önemli rol oynayabile-

ceği ileri sürülmektedir (14). Normal koşullarda hücre kendisini serbest oksijen radikallerinin toksik etkisinden çeşitli yollarla koruyabilmektedir (5,6). örneğin superoxide dismutase en/imi (SOD), sitotoksik superoxide anyonunun hydrogen peroxide'e hydrogen peroxide'in de moleküler oksijene dönüşümünü katalize etmektedir (6,7).

İskemi ve reperfüzyonda xanthine oxidase reaksiyonu ile serbest oksijen radikali oluşumu artmakta, bu artma hücrenin serbest oksijen radikallerini temizleme mekanizmalarını aşırı zorlayarak (1), hücre harabiyetine yol açabilmektedir (7).

Superoxide dismutase'ın deneysel iskemi ve reperfüzyonda miyokard harabiyeti üzerine etkilerinin incelendiği çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır (7-11). Bu çalışmaların hemen hepsi superoxide dismutase'ın, iskemi ve reperfüzyonda infarkt alanı ve miyokardın mekanik performans bozuklukları üzerine etkilerinin incelenmesine yöneliktir. Biz, sunulan çalışmada, superoxide dismutase'ın, iskemi ve reperfüzyonda ortaya çıkan kalb kası hücresi elektrofizyolojik parametrelerindeki değişiklikler üzerine etkilerini inceledik.

MATERYAL VE METOD

Çalışmada 15-25 kg ağırlığındaki köpeklerden izole edilmiş kalbler kullanılmıştır. Kalb deney sistemine takılarak, Langendorff usulüyle, aortadan retrograd olarak 100 mmHg basınçta, Krebs-Henseleit solüsyonu ile perfüze edilmiştir. Krebs-Henseleit solüsyonunun kompozisyonu (mM olarak): NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 24.9, glucose 11.1. Solüsyonun sıcaklığı 37°C da sabit tutulmuş ve %95 O₂-%5 CO₂ karışımı ile gazlanmıştır (pH: 7.4). Bölgesel iskemi oluşturmak üzere, left anterior descending koroner arter (LAD) etrafına orijinine yakın bir noktada ipek iplik geçirilerek, istendiğinde sıkılmak üzere gevşek bir ilimik yapılmıştır. Sinüs düğümü tahrir edildikten sonra, kalb, Grass SMD 9 stimülatörden gelen 6V şiddetinde ve 2 ms süreli dikdörtgen pulslarla, 2 Hz lik frekansta yüzeysel elektrotlar aracılığıyla uyarılmıştır. Her bir deneyin başlangıcında preparat 60 dakikalık bir stabilizasyon işlemine tabi tutulmuştur.

Deneyler iki grup preparat üzerinde yapılmıştır: Kontrol grubu (N:7) preparatları 60 dakikalık stabilizasyon, 30 dakikalık LAD oklüzyonu (iskemi) ve 60 dakikalık reperfüzyon dönemlerinde Krebs-Henseleit solüsyonu ile perfüze edilmişlerdir.

Superoxide dismutase (SOD) grubu(N:7) preparatları 60 dakikalık stabilizasyon, 30 dakikalık LAD oklüzyonu ve 60 dakikalık reperfüzyon dönemlerinde 1.8yı M SOD ihtiva eden Krebs-Henseleit solüsyonu ile perfüze edilmişlerdir.

Superoxide dismutase(SigmaChem. Co.,St Louis.) Krebs-Henseleit solüsyonu içine, son konsantrasyonu 150,000 ünit/L olacak şekilde ilave edilmiştir. SOD'ın spesifik aktivitesi 2,600 ünit/mg, yaklaşık moleküler ağırlığı 32,000 dir. Bu durumda, SOD içindeki hesaplanan konsantrasyonu 1.8/; M dur(12).

Transmembran potansiyelleri standart cam mikroelektrotlar aracılığıyla ölçülmüştür (13). Elektrotlar laboratuvarımızda, Narishige Model PP-83 cam mikroelektrot çekicisiyle çekilmiş, içleri 3M KCl solüsyonu ile doldurulmuştur. Elektrotların uç direnci 10-20 megaohmdur. Elektrotlar, Grass Model P15 yüksek empedans preamplifikatörü aracılığıyla osiloskoba (dual beam, storage oscilloscope) bağlanmışlardır.

Her iki grup da aynı deney protokoluna tabi tutulmuştur. 60 dakikalık stabilizasyon periyodu bitiminde LAD de oklüzyon yapılacak yerin altındaki bölgeden, Narishige Model MD-4 mikromanipulatör ile manipule edilen cam mikroelektrotlar aracılığıyla kontrol transmembran potansiyelleri kaydedilmiştir. Bölgesel iskemi 30 dakikalık LAD oklüzyonu ile oluşturulmuş, bunu 60 dakika süren reperfüzyon izlemiştir. Transmembran aksiyon potansiyelleri oklüzyon yerinin altındaki bölgeden (iskemik bölge) 30 dakikalık oklüzyon ve 60 dakikalık reperfüzyon süresince kaydedilmiştir.

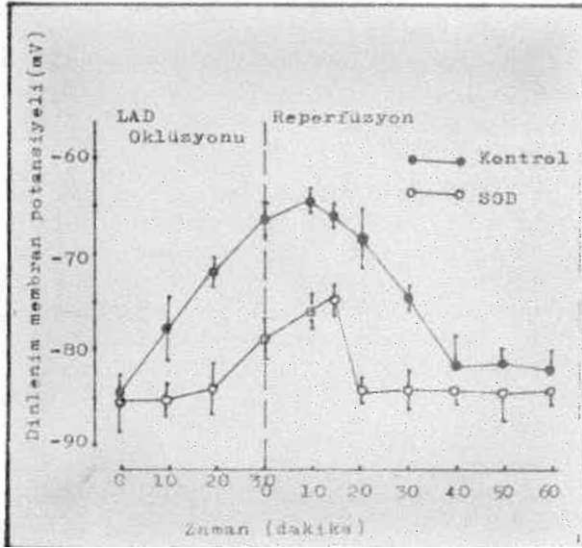
Şu elektrofizyolojik parametreler incelenmiştir: Dinlenim membran potansiyeli (DMP) (osiloskop ekranından doğrudan gözlemlenir ölçülmüştür), aksiyon potansiyeli amplitüdü (APA), maksimum depolarizasyon hızı (V), aksiyon potansiyeli süresi (APS₉₀ = aksiyon potansiyelinin başlama anı ile repolarizasyonunun %90 mm tamamlandığı an arasındaki süre olarak ölçülmüştür), efektif refrakter periyot(ERP=aksiyon potansiyeli oluşturabilen birbirine an yakın ard arda gelen iki stimulus arasındaki süre olarak ölçülmüştür).

Sonuçlar ortalama±standart hata olarak sunulmuş, istatistiksel anlamlılık Student t test kullanılarak tayin edilmiş vep<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

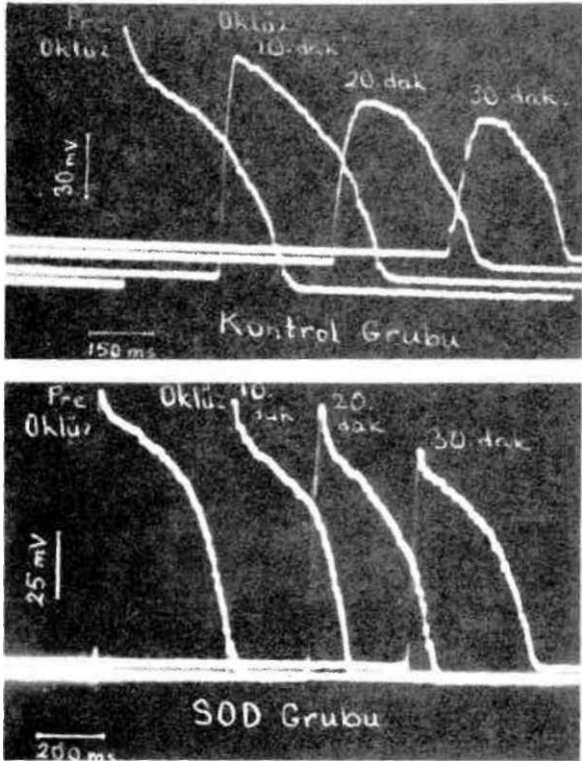
BULGULAR

Dinlenim Membran Potansiyeli (DMP): 30 dakikalık LAD oklüzyonu (iskemi) ve 60 dakikalık reperfüzyonun kontrol ve SOD gruplarında DMP üzerine etkileri Şekil 1 de görülmektedir. LAD oklüzyonu her iki grupta da DMP de yükselmeye (*) (parsiyel depolarizasyon) sebep olmuştur. Kontrol grubunun parsiyel depolarizasyon derecesi, SOD grubununkinden daha büyüktür (kontrol grubunda iskemik bölge-

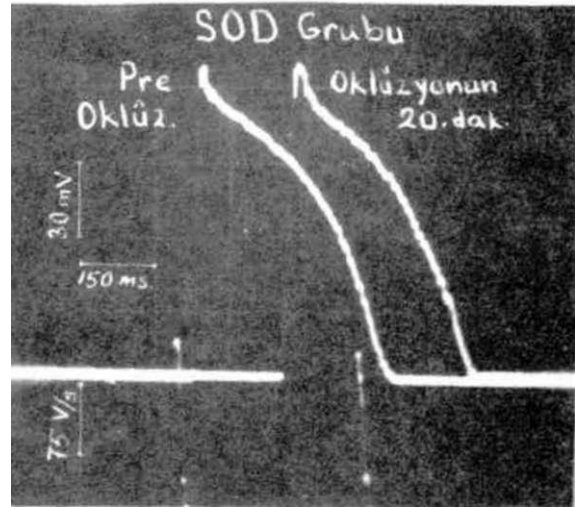
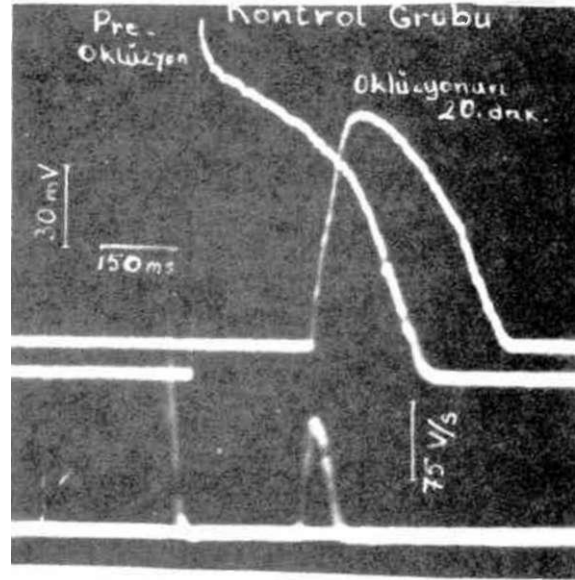
**Dinlenim membran potansiyeli mutlak değer olarak küçülmekte ama reel değer olarak büyümektedir (örneğin -65mV>-82 mV dır). Bu nedenle DMP deki değişme "yükselme" olarak ifade edilmiştir.*



Şekil-1. İzole köpek kalbinde 30 dakikalık LAD oklüzyonu ve 60 dakikalık reperfüzyonun kontrol ve SOD gruplarının dinlenim membran potansiyeli üzerine etkileri (her bir nokta 7 deney ortalaması*standart hata),

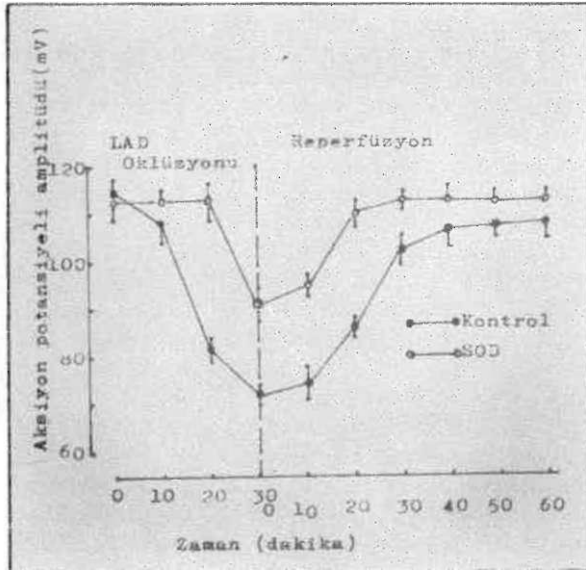


Şekil-2. Kontrol ve SOD gruplarından birer örnek deneyden cam mikroelektrotlar aracılığıyla kaydedilmiş transmembran aksiyon potansiyeli traseleri (fotoğraflar osiloskop ekranından çekilmiştir). Her iki fotoğrafta da soldaki ilk kayıt 60 dakikalık stabilizasyon periyodunda yapılmıştır. Diğer traseler LAD oklüzyonunun 10., 20. dakikalarında kaydedilmiştir.

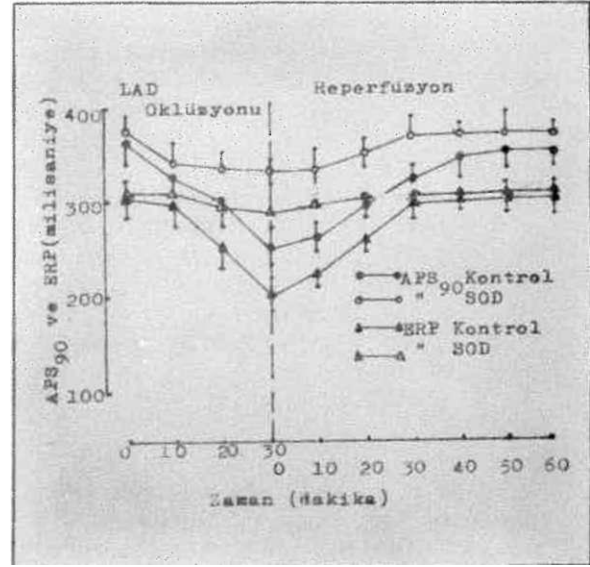


Şekil-3. Kontrol ve SOD gruplarından birer örnek deneyden kaydedilmiş transmembran aksiyon potansiyeli (üste) ve bunların 1. türev (V_{max} , alta) traseleri. Her iki fotoğrafta da soldaki kayıtlar 60 dakikalık stabilizasyon periyodu bitiminde kaydedilmiş aksiyon potansiyeli ve V_{max} kaseleridir. Sağdakiler LAD oklüzyonunun 20. dakikasında kaydedilmiştir.

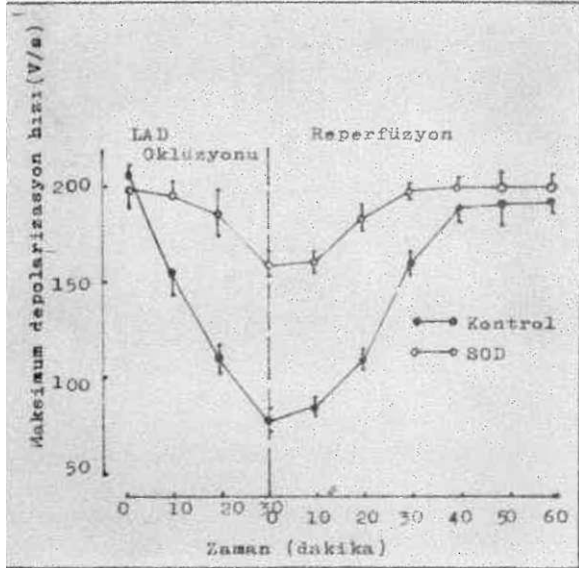
deki maksimum parsiyel depolarizasyon miktarı: 18.4 ± 1.8 mV, SOD grubunda: 6.4 ± 1.4 mV). Reperfüzyonda dinlenim membran potansiyelinin zamana göre değişimi, SOD grubunda kontrol grubuna göre önemli farklılıklar göstermektedir. Kontrol grubunda DMP reperfüzyonun ilk 10 ± 2.3 dakikası içinde yükselmekte ve reperfüzyon döneminin maksimum değeri olan -65 ± 1.8 mV a ulaşmaktadır. Bu yükselmeyi nisbeten yavaş seyreden bir repolarizasyon izlemekte ve membran potansiyeli reperfüzyonun yaklaşık 40. dakikasında -82 ± 1.2 mV a düşmektedir. DMP



Şekil-4. İzole köpek kalbinde 30 dakikalık LAD oklüzyonu ve 60 dakikalık reperfüzyonun, kontrol ve SOD gruplarında transmembran aksiyon potansiyeli amplitüdü üzerine etkileri (her bir nokta 7 deney ortalaması±standart hata).



Şekil-6. İzole perfüze köpek kalbinde 30 dakikalık LAD oklüzyonu ve 60 dakikalık reperfüzyonun, kontrol ve SOD gruplarında aksiyon potansiyeli süresi (APS₉₀) ve efektif refrakter periyot (ERP) üzerine etkileri (her bir nokta 7 deney ortalaması*standart hata).



Şekil-5. İzole köpek kalbinde 30 dakikalık LAD oklüzyonu ve 60 dakikalık reperfüzyonun, kontrol ve SOD gruplarında maksimum depolarizasyon hızı (V_{max}) üzerine etkileri (her bir nokta 7 deney ortalaması±standart hata).

reperfüzyonun geri kalan kısmında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermeyerek, bu değeri korumaktadır. SOD grubunda ise reperfüzyonun 15 + 3.6 dakikası içinde membran potansiyelinde yavaş bir yükselme (depolarizasyon) gözlenmekte ve maksimum değeri olan -75.6*3.1 mV'a ulaşmaktadır. Bunu

hızlı bir repolarizasyon izlemekte, membran potansiyeli reperfüzyonun 20. dakikası civarında orijinal değeri olan -85 ± 1.5 mV'a düşmekte ve reperfüzyonun geri kalan bölümünde bu değer civarında kalmaktadır.

Aksiyon Potansiyeli Amplitüdü (APA) ve Maksimum depolarizasyon hızı (V_{max}): Şekil 2 de kontrol ve SOD gruplarından 60 dakikalık stabilizasyon periyodu sonunda (pre-oklüzyon) ve LAD oklüzyonunun 10., 20., 30. dakikalarında kaydedilmiş miyokardial aksiyon potansiyelleri görülmektedir. Kayıtlar standart cam mikroelektrotlarla, oklüzyon yerinin 1.5 cm altındaki bölgeden yapılmıştır. Şekil 3 deki kayıtlar yine kontrol ve SOD gruplarından (Şekil 2 deki preparatlardan başka preparatlardan) iki örnek deneyi göstermektedir. Her iki fotoğrafta üstteki eğriler transmembran aksiyon potansiyeli eğrileri olup 60 dakikalık stabilizasyon periyodunun bitiminde (pre-oklüzyon) ve LAD oklüzyonunun 20. dakikasında, oklüzyon yerinin 1.5 cm altındaki bölgeden kaydedilmişlerdir. Altta eğriler ise, transmembran aksiyon potansiyeli eğrilerinin 1.türev eğrileridir ve maksimum depolarizasyon hızının değerini göstermektedirler, Şekil 4'de aksiyon potansiyeli amplitüdünün 30 dakikalık iskemi ve 60 dakikalık reperfüzyonda zamana göre değişimi görülmektedir. İskemi ve reperfüzyonun APA üzerindeki deprese edici etkisini SOD önemli ölçüde azaltmaktadır. Şekil 5 de iskemi ve reperfüzyonda V_{max} irt zamana bağımlı değişimi görülmektedir.

Aksiyon Potansiyeli Süresi (APS₉₀) ve Efektif Refrakter Peryot (ERP): Kontrol grubunda aksiyon potansiyeli süresi (APS₉₀) LAD oklüzyonunu izleyen birkaç dakika içinde kısalmaya başlamış, kısalma 30 dakikalık oklüzyon süresince devam etmiştir. LAD oklüzyonunun 30.dakikasında ölçülen APS₉₀, pre-oklüzyon değerinden %33.3±3.5 daha kısadır. SOD grubunda bu kısalma miktarı %10.4±2.8 dir. Reperfüzyonun APS₉₀ üzerine etkileri de SOD grubunda kontrol grubuna göre önemli farklılıklar göstermektedir. Şekil 6 da 30 dakikalık iske mi ve 60 dakikalık reperfüzyonda APS₉₀ ve ERP un zamana göre değişimleri görülmektedir.

TARTIŞMA

Bu çalışma, iske mi ve reperfüzyonda ortaya çıkan miyokard hücre membranı fonksiyon bozukluklarında, serbest oksijen radikallerinden superoxide anyonunun (.O⁻) etkisini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Bilindiği gibi xanthine oxidase, xanthine'in ürik asite çevrilmesi esnasında, superoxide anyonunu üretir (14).

Xanthine Xanthine Oxidase → Uric Acid + C₂O₄²⁻

Superoxide dismutase enzimi (SOD) normalde hücreyi .O₂ yığılımından, dolayısıyla .OJ nun zararlı etkisinden korur (5,14,15,).

•OJ* b, 2H⁺ → H₂O₂, O₂

İske mi esnasında ve moleküler oksijenin aniden bol miktarda hücreye girdiği reperfüzyon esnasında, hücrede serbest oksijen radikalleri üretimi artmaktadır (16). Bu durumda hücrenin serbest oksijen radikallerini metabolize eden doğal mekanizmaları zorlanmakta ve yetersiz kalmaktadır (1). Hızlı üretildikleri ve metabolize edilemedikleri iske mi ve reperfüzyon durumlarında aktif oksijen radikalleri hücreye yığılarak zararlı etkilerini göstermektedirler (16). Serbest oksijen radikallerinin kalb kasındaki en önemli sitotoksik etkisi, membranın lipid komponentleriyle reaksiyona girerek, lipid peroksidasyonuna sebep olmalarıdır (16,17). İske mi ve reperfüzyondaki miyokard harabiyetinin genesinde, membran lipidierinin peroksidasyonunun önemli olduğunu ileri süren çeşitli çalışmalar vardır (16—18). Zincirleme lipid peroksidasyonu reaksiyonları sonucu membranın iyon pompalama yeteneği, dolayısıyla iyonik homeostasis bozulmakta, bu da elektrofizyolojik değişikliklere sebep olmaktadır (8).

Akut miyokard iskemisinde ortaya çıkan iyonik ve elektriksel değişikliklerden bazıları: Ekstrasellüler potasyum artışı (19-21); dinlenim membran

potansiyelinde (DMP) yükselme (parsiyel depolarizasyon) (22-24); aksiyon potansiyeli amplitüdünde (APA) ve maksimum depolarizasyon hızında (V_{max}) düşme (22), aksiyon potansiyeli süresinde ve efektif refrakter peryotda kısalma (22,24) (aksiyon potansiyeli süresi purkinje liflerinde uzamaktadır (23)). Çalışmamızda bütün bu etkiler, transmembran potansiyelinin çeşitli fazları üzerine yansımalarıyla incelenmiştir. Çalışmamızda, SOD un iske mi ve reperfüzyonun, DMP üzerine olan etkilerini önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. 30 dakikalık oklüzyon esnasında SOD grubunda membran potansiyelindeki maksimum yükselme miktarı kontrol grubundakinden %66.7 ±4.4 daha azdır (p< 0.001). Miyokard hücrelerinden akut iske mi esnasında potasyum kaybettikleri uzun zamandan beri bilinmektedir (19). Hayvan modellerinde izole kalbler üzerinde koroner arter oklüzyonu ile yapılan denelerde, DMP deki yükselmenin, ekstrasellüler K⁺ konsantrasyonundaki artmaya paralel olduğu gösterilmiştir (20,21,25). Çalışmada SOD grubunda, DMP deki yükselmenin, kontrol grubuna göre %66.7±4.4 az oluşu, SOD un, membran K⁺ kaybetmesine yol açan mekanizmayı önemli ölçüde inhibe ettiğini gösterir niteliktedir.

Sonuçlarımız, iske mi ve reperfüzyon nedeniyle aksiyon potansiyeli amplitüdü (APA) ve maksimum depolarizasyon hızındaki (V_{max}) düşmelerin SOD grubunda kontrol grubuna göre önemli ölçüde az olduğunu göstermektedir. Örneğin LAD oklüzyonunun 20.dakikasında (Şekil 3) kontrol grubunda APA ndeki düşme %33.3±3.2, V_{max} daki yavaşlama %45.6±3.1 dir, aynı ölçümler SOD grubunda yapıldığında şu sonuçlar bulunmuştur: APA ndeki azalma %0, V_{max} daki yavaşlama %5.9±2.4.APA ve V_{max} üzerinde kontrol grubunda kaydedilen depresyonlar, iske mi esnasında, miyokard hücre membranında, hızlı kanallardan ekzitator akımın azaldığının göstergesidir (26,27), Hızlı kanallardan ekzitator akım, membran potansiyeline bağımlıdır (28). Akut iskemide membran potansiyelindeki yükselmeye (parsiyel depolarizasyon) bağlı olarak, ekzitator akımın azalması beklenen sonuçtur ve azalma APA nde düşme, V_{max} da yavaşlama olarak gözlenecektir. Çalışmamızda SOD un iskemide membran potansiyelindeki yükselmeyi önemli ölçüde azalttığını (p< 0.001) göstermiştik. SOD büyük olasılıkla bu yolla, yani membranın parsiyel depolarizasyonunu önleyerek, hızlı kanallardan ekzitator akımın depresyonunu önemli ölçüde azaltmaktadır.

Aksiyon potansiyeli süresi (APS₉₀) ve efektif refrakter peryot (ERP) iske mi nedeniyle kontrol grubunda kısalmıştır. Oklüzyonun 30.dakikasında APS₉₀ ndeki kısalma %33.3±3.5, ERP daki kısalma %27±2.3 dür. SOD grubunda yapılan ölçümlerde, oklüzyonun 30. dakikasında APS₉₀ ndeki kısalmanın %10.4±2.8, ERP daki kısalmanın ise %12.1 ±2.5 olduğu görülmüştür. SOD iske mi nedeniyle APS₉₀ ve ERP daki

kısalmaları sırasıyla %68.8 ve %55.2 oranında azaltmıştır. Bilindiği gibi iskemi miyokard hücrelerinin refrakter özelliklerinde anormalliklere sebep olmaktadır. Refrakter peryotlarda kısalmalar veya uzamalar görülebilir. İskemik hücrelerin çabuk repolarizasyonu sonucu refrakter peryotlar kısalmakta (29), çok fazla depolarize olmuş hücrelerde, hızlı kanalların rekaverindeki bir gecikme olduğunda da uzamaktadır (30). Çalışmamızda SOD un iskemi esnasında ERP daki kısaltmayı azalttığı görülmüştür. Reperfüzyonda, ERP'nin orijinal değerine dönmesi, kontrol grubuna göre çok daha kısa zamanda olmaktadır. SOD un reperfüzyon aritmileri üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalarda (8,31), SOD un reperfüzyon aritmi insidansını azalttığı gösterilmiştir. Sonuçlarımız bu etkinin mekanizmasına, bir ölçüde ışık tutabilecek niteliktedir. SOD, reperfüzyon esnasında ERP un rekaveri hızını artırarak, aritmilerin ortaya çıkmasını önleyebilir.

Sonuç olarak bu çalışmada, 30 dakikalık LAD oklüzyonu ve 60 dakikalık reperfüzyonun miyokard hücresi elektrofizyolojik parametreleri üzerine etkilerinin, superoksit radikali metabolize edici enzim olan SOD tarafından önemli ölçüde inhibe edildiği görülmüştür. SOD un etkilerinin incelendiği bu çalışmada elde edilen sonuçlar, iskemi ve reperfüzyonda superoksit anyonunun miyokard hücre membranı fonksiyon bozukluklarında etkili olabileceği hipotezini desteklemektedir.

KAYNAKLAR

1. McCord, JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Eng J Med* 312 (No.3): 159-163, 1985.
2. Manning AS, Hearse D J: Reperfusion-induced arrhythmias: Mechanism and prevention. *J Mol Cell Cardiol* 16:497-518,1984
3. Chambers D E, Parks D A , Patterson G , Roy R , McCord, J M , Yoshida S , et al: Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol*. 17: 145-152, 1985.
4. Guarnieri C Flamigni F ,Caldarera C M :Role of oxygen in the cellular damage induced by reoxygenation of hypoxic heart. *J Mol Cell Cardiol* 12:797-808, 1980.
5. Dormandy T L t Free-radical oxidation and antioxidants. *Lancet* 1:647-650, 1978
6. Halliwell B ; Free-radicals, oxygen toxicity and aging. In: *Age Pigments*, R.S, Sr-hab, (Ed.) pp. —1—62. Amsterdam: Elsevier North-Holland: Bio-r.edical Press, 1981: 1-62
7. Jolly S R, Kane W J , Bailie M B , Abrams G D , Lucchesi B R : Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circ Res* 54:277-285,1984.
8. 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* 58:331-346, 1986.
9. Burton K P , McCord J M , Ghai G*. Myocardial alterations due to free-radical geneaion. *Am J Physiol* 246: H776-H783, 1984
10. Werns W S , Shea M J , Driscoll E M , Cohen C , Abrams G D , Pitt B , et al: The independent effects of oxygen radical scavengers on canine infarct size. Reduction by superoxide dismutase but not catalase. *Circ Res*. 56:895-898, 1985.
11. Stewart J R , Gerhardt, E B , Wehr C J Shuman T Merrill W H Hammon W J et al; Free radical scavengers and myocardial preservation during transplantation. *Ann Thorac Surg* 42: 390-393, 1986.
12. Shlafer M , Kane P F Kirsh M M : superoxide dismutase plus catalase enhances the efficacy of hypothermic cardioplegia to protect the globally ischemic, reperfused heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 83:830-839,1982.
13. Schneider J A Sperelakis N : Slow Ca and Na responses induced by isoproterenol and methylxanthines in isolated perfused guinea pig heart exposed to elevated K J Moll Cell Cardiol 7:249-273, 1975.
14. Fridovich I : The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875-880, 1978.
15. Del Maestro R F : An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand Suppl* 492:153-168,1980.
16. Meerson F Z _ Kagan V 3 Kozlov Y P Belkina L M. Arkhipenko Y V ; The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and the antioxidant protection of the heart. *Basic Res Cardiol* 77:465-485,1982.
17. Rao P S Cohen M V Mueller H S: Production of free radicals and lipid peroxides in early experimental myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 15: 713-716, 1983.
18. Misra HP Weglicki B Abdulla R McCay P B: Identification of carbon centered free radical during reperfusion injury in ischemic rat heart (abstr). *Circulation (suppl. II)*: 260, 1984
19. Harris A S Bisteni A Russel R A Brigham J C Firestone J E : Excitatory factors in ventricular tachycardia resulting from myocardial ischemia: Potassium a major excitant *Science* 199:200-203, 1954.
20. Hill J L Gettes L S : Effect of acute coronary artery occlusion on local myocardial K activity in swine. *Circulation* 61: 768-778, 1980.

21. Hirche H J , Franz C , Bos, L , Bissing, R , Lang R , Schramm M: Myocardial extracellular K and H increase and noradrenaline release as possible cause of early arrhythmias following coronary artery occlusion in pigs. *J Mol Cell Cardiol* 12: 579-593, 1980.
22. Jans M J , Kleber A G : Electrophysiological changes and ventricular arrhythmias in the early phase of regional myocardial ischemia. *Circ Res* 49: 1069-1082, 1981.
23. Ferrier G R , Moffat M P , Lucas A: Possible mechanism of ventricular arrhythmias elicited by ischemia followed by reperfusion. Studies on isolated canine ventricular tissues. *Circ Res* 56: 184-194, 1985.
24. Northover B J: Electrical changes produced by injury to the rat myocardium in vitro and protective effects of certain antiarrhythmic drugs *Br J Pharmacol.* 90:131-138, 1987.
25. Kleber A G , Janse M J , van Capelle F J L , Durrer D. Mechanism and time course of S-T and T-0 segment changes during acute regional myocardial ischemia in the pig heart determined by intracellular and extracellular recordings. *Circ. Res* 42:603-613, 1978.
26. Lazzara R , Scherlag B J'- The role of the slow current in the generation of arrhythmias in ischemic myocardium. ImZipers, D.P., Bailey, J.C., Elharrar, V. eds. *The Slow Inward Current and Cardiac Arrhythmias.* The Hague: Martinus Nijhoff, 399-416, 1980.
27. El-Sherif N , Lazzara, R'. Reentrant ventricular arrhythmias in the late myocardial infarction period. 7.Effect of verapamil and D600 and the role of the "slow channel". *Circulation* 60:605-615 1979.
28. Lazzara R , Scherlag B J: Electrophysiological basis for arrhythmias in ischemic heart disease. *Am J Cardiol* 53: 1B-7B, 1984.
29. Woodward B , Zakaria M N M: The effects of free radical scavengers on reperfusion arrhythmias in the isolated rat heart. *Br J Pharmacol.* 80:628, 1983.
30. Lazzara R , El-Sherif N , Scherlag B J -. Disorders of the canine his bundle. *Circ Res* 36: 444-453, 1975.
31. Woodward B , Zakaria M: Effects of some free radical scavengers on reperfusion induced arrhythmias in the isolated rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 17:485-493, 1985.