

研究论文

七氟醚预处理对大鼠海马脑片缺氧无糖损伤的保护作用： 线粒体 K_{ATP} 通道的作用

王志萍*, 张兆航, 曾因明, 江山, 汪曙葵, 王胜

徐州医学院附属医院麻醉科, 徐州医学院江苏省麻醉医学研究所, 徐州 221002

摘要: 利用离体海马脑片缺氧无糖(oxygen-glucose deprivation, OGD)损伤模型, 探讨七氟醚预处理对神经细胞的保护作用及该作用与线粒体内膜ATP敏感钾通道(mitochondrial ATP-sensitive potassium channels, $mitoK_{ATP}$ channels)的关系, 随机将脑片用2%、4%、6%七氟醚, 以及6%七氟醚复合 $mitoK_{ATP}$ 通道阻滞剂5-羟基羧酸盐(5-hydroxydecanoic acid, 5-HD)预处理30 min, 观察OGD损伤14 min 复氧1 h期间顺向群峰电位(orthodromic population spike, OPS)的变化, 并应用透射电镜观察细胞超微结构的改变。结果表明, 与单纯OGD组相比, 七氟醚预处理可使海马脑片OPS消失时间明显延长($P<0.01$), 使OPS明显恢复, 其中4%、6%七氟醚组的恢复率均为71.4% ($P<0.05$ vs OGD), 相应恢复程度为($61.0 \pm 42.3\%$)和($78.7 \pm 21.1\%$) ($P<0.01$), 而且6%七氟醚的保护作用可被5-HD取消。OGD组的海马CA1区锥体细胞明显水肿, 核膜皱缩、破裂, 染色质聚集, 线粒体肿胀畸形, 嵴断裂或消失, 而4%和6%七氟醚组仅见海马CA1区锥体细胞轻度水肿, 核膜皱缩不明显, 染色质均匀, 线粒体轻度肿胀。结果提示, 七氟醚预处理对大鼠海马脑片OGD损伤有一定的保护作用, 且七氟醚对神经细胞的保护作用与激活 $mitoK_{ATP}$ 通道有关。

关键词: 七氟醚; 脑损伤; 顺向群峰电位; 线粒体内膜ATP敏感钾通道

中图分类号: R614.2

Protective effect of sevoflurane preconditioning on oxygen-glucose deprivation injury in rat hippocampal slices: the role of mitochondrial K_{ATP} channels

WANG Zhi-Ping*, ZHANG Zhao-Hang, ZENG Yin-Ming, JIANG Shan, WANG Shu-Qu, WANG Sheng

Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Jiangsu Province Institute of Anesthesiology, Xuzhou 221002, China

Abstract: To investigate the neuroprotective effects of sevoflurane preconditioning on oxygen-glucose deprivation (OGD) injury and the role of mitochondrial K_{ATP} channels in rat, we established OGD injury model in rat hippocampal slices. The brain was rapidly removed, and the dissected hippocampus was sliced in cold artificial cerebrospinal fluid (ACSF) transversely to its longitudinal axis (400 μ m thick) with a Rotorslicer DTY-7700. Slices were placed on a nylon mesh in a recording chamber at 34 °C and humidified gas mixture (95% $O_2/5\%$ CO_2) was applied to the chamber at a flow rate of 200 ml/min. After 2 h of incubation, slices were randomly exposed to 2%, 4%, 6% sevoflurane or 6% sevoflurane combined with mitochondrial K_{ATP} channel blocker (5-hydroxydecanoic acid, 5-HD) under normal condition (95% $O_2/5\%$ CO_2) for 30 min. Fifteen minutes later, slices were exposed to 14-minute OGD followed by 1-hour reoxygenation, and the changes of orthodromic population spike (OPS) at the end of reoxygenation were measured. The changes of ultrastructure of CA1 area in the group of 14-minute OGD followed by 1-hour reoxygenation were detected with electron microscope. The results showed that sevoflurane preconditioning delayed the abolishing time of OPS ($P<0.01$) and significantly increased the recovery rate and the recovery amplitude of OPS compared with the OGD group. The recovery rate of OPS was 71.4% both in 4% and 6% sevoflurane preconditioning groups ($P<0.05$ vs OGD group), accordingly the recovery amplitude of OPS was ($61.0 \pm 42.3\%$) and ($78.7 \pm 21.1\%$) ($P<0.01$), respectively. The protective effect of 6% sevoflurane was blocked by 5-HD. Ultrastructural observation in the hippocampal CA1 region

Received 2005-08-22 Accepted 2006-02-22

This work was supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2002138).

*Corresponding author. Tel: +86-516-85802089; Fax: +86-516-85802018; E-mail: zhpsqxt@163.com

of the OGD group showed severe edema of the pyramidal cells, crimped or ruptured nucleus membranes, aggregation of chromatin, and swelling of mitochondria, whereas these changes were less prominent in 4% and 6% sevoflurane groups. These results suggest that sevoflurane preconditioning is capable to protect neurons from OGD injury *in vitro* and that the protective effect is related to the activation of mitochondrial K_{ATP} channels.

Key words: sevoflurane; cerebral injury; orthodromic population spike; mitochondrial ATP-sensitive potassium channels

临床上脑外伤、缺血性卒中、颈动脉内膜剥脱术麻醉管理期间可引起脑缺氧和/或缺血, 缺血性脑损伤机制的研究一直为国内外学者所关注, 至今仍缺乏理想的减轻脑缺血再灌注损伤的手段。吸入麻醉药具有起效快、作用强、可控性好的特点, 是外科手术常用的麻醉药物, 但由于扩张脑血管、增加颅内压, 有潜在脑缺血的危险, 长期以来对其脑保护作用研究一直未受重视。直到有文献报道, 氟烷、异氟醚在临床麻醉浓度下可减少脑梗死体积、有效改善预后, 吸入麻醉药脑保护渐成为研究减轻脑缺血再灌注损伤、预防性药物预处理的热点^[1-3]。七氟醚是继氟烷、安氟醚和异氟醚之后开发出来的新型吸入麻醉药, 麻醉诱导迅速、麻醉深度容易控制、恢复苏醒快而完全, 是颇具前途的吸入麻醉药。研究发现在缺氧前、缺氧期间单纯应用七氟醚, 仅高浓度(6%)七氟醚可有效改善缺氧无糖(oxygen-glucose deprivation, OGD)损伤所致的神经电生理改变^[1], 地氟醚和七氟醚可剂量依赖性减轻不同程度培养神经元 OGD 损伤引起的神经元死亡^[3]。有学者报道, 异氟醚和氟烷预处理可缩小大脑中动脉栓塞大鼠脑梗塞体积, 减轻缺血再灌注损伤, 而且异氟醚预处理的脑保护作用可被非选择性 ATP 敏感钾通道阻滞剂优降糖部分阻断^[4,5]。线粒体内膜 ATP 敏感钾通道(mitochondrial ATP-sensitive potassium channels, $mitoK_{ATP}$ channels)在心肌保护中的地位已引起广泛关注。大量研究证实, 开放 $mitoK_{ATP}$ 通道是吸入麻醉药预处理产生心肌保护作用的重要机制之一^[6,7]。而脑组织的 $mitoK_{ATP}$ 通道蛋白浓度是心肌含量的 7 倍^[8]。有研究发现, $mitoK_{ATP}$ 通道选择性开放剂二氮嗪预处理可使大鼠脑梗塞体积缩小, 产生脑保护作用^[9]。七氟醚预处理对脑缺血有无保护作用? 其保护作用是否与 $mitoK_{ATP}$ 通道有关? 本实验采用大鼠离体海马脑片 OGD 损伤模型研究七氟醚预处理是否产生抗 OGD 损伤的作用并探讨该作用和 $mitoK_{ATP}$ 通道的关系。

1 材料与方法

1.1 制备离体海马脑片 将 Sprague-Dawley 大鼠(体重 80~100 g, 雌雄各半, 由徐州医学院实验动物中心提供)在乙醚麻醉下迅速断头、取脑, 置于 0~4℃ 经 95% O_2 /5% CO_2 混合气体饱和的人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF)中, 剥离出海马, 用 ZQP-86 型振动切片机沿冠状面切成厚度为 400 μm 的海马脑片 5~6 片。然后将脑片置于 34℃ 的 ACSF 内孵育 2~3 h, 并持续通入 95% O_2 /5% CO_2 混合气体。正常 ACSF 成份(mmol/L): NaCl 124、KCl 3.6、 NaH_2PO_4 1.25、 $MgSO_4$ 2.2、 $NaHCO_3$ 26、 $CaCl_2$ 2.2、葡萄糖 10.0, 用 HCl 或 NaOH 调节 pH 值至 7.35~7.45。

1.2 实验分组 将海马脑片随机分为 OGD 组、Sev I 组(2% 七氟醚组, 七氟醚由江苏恒瑞医药股份有限公司提供, 批号 20030417)、Sev II 组(4% 七氟醚组)、Sev III 组(6% 七氟醚组)、SH 组[6% 七氟醚通入用正常 ACSF 配制的 50 $\mu mol/L$ 5-羟基奎酸盐(5-hydroxydecanoic acid, 5-HD)溶液中, 5-HD 购自 Sigma 公司]和 HD 组(50 $\mu mol/L$ 5-HD 预处理组)。

1.3 顺向群峰电位(orthodromic population spike, OPS)的记录

1.3.1 记录 OPS 将孵育后的脑片浸于 34℃ 恒温表面灌流槽内, 不断通入含 95% O_2 /5% CO_2 混合气体的 ACSF, 气体流量为 200 ml/min, ACSF 的灌流速度为 1.5 ml/min。刺激电极置于海马 CA3 区 Schaffer 侧支路径上, 刺激强度为 0.6 mA, 玻璃微电极(内充 4 mmol/L NaCl 溶液, 阻抗 4~10 MW, 置于 CA1 区海马锥体细胞层, 记录电刺激诱发的 OPS。电位经 MEZ-8301 微电极放大器放大后输入电脑, 用华翔公司 HYD-2000 电生理系统处理软件处理。选取 OPS 波幅大于 3 mV 的脑片, 待 OPS 波形稳定 30 min 后进行后续实验。

1.3.2 药物预处理 含 95% O_2 /5% CO_2 混合气体通过标准的七氟醚挥发罐, 得到不同浓度七氟醚(0%、2%、4%、6%)混合气, 通入 ACSF 中预充

30min 达到相应的饱和浓度，灌流海马脑片 30 min，5-HD 组以 50 $\mu\text{mol/L}$ 溶液灌流海马脑片 30 min，然后用含氧 ACSF 冲洗 15 min，洗脱溶解在细胞外液内的药物，即为药物预处理。

1.3.3 OGD 的实施 药物预处理完成后将灌流液改为经 95% $\text{N}_2/5\%$ CO_2 混合气体饱和的 ACSF，同时用相同摩尔浓度的蔗糖代替葡萄糖，灌流 14 min 即为 OGD 损伤。OGD 后用含氧的正常 ACSF 灌流 1 h 即为复氧供糖。

1.4 观察指标 海马脑片 OGD 损伤后 OPS 消失的时间、OPS 恢复程度(复氧后 1 h OPS 波幅与缺血前波幅之百分比)、OPS 恢复率(复氧后 1 h OPS 恢复的脑片数与总脑片数之百分比，OPS 恢复至缺血前 60% 以上者定为恢复，不足 60% 者为未恢复)。

1.5 海马脑片 CA1 区超微结构检查 各组实验完毕后均取海马脑片 2 张，置于预冷的 4% 戊二醛溶

液中固定 24 h 以上，磷酸缓冲液冲洗后 2% 锇酸后固定 1 h，梯度乙醇脱水，并同时用溶于 70% 乙醇中的醋酸铀进行块染，置于苯二甲酸二丙烯脂 (PDAP) 渗透 24 h，以 PDAP 包埋后 63 $^{\circ}\text{C}$ 聚合 72 h，半薄切片定位海马锥体细胞层后进行修块，超薄切片，枸橼酸铅染色后在透射电镜下观察并照像。

1.6 统计学处理 计量数据均用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示，用 SPSS12.0 软件对所获数据进行处理，OPS 消失时间和 OPS 恢复程度的比较采用单因素方差分析，各组 OPS 恢复率的比较采用四格表的确切概率法。

2 结果

2.1 七氟醚预处理对海马脑片 OGD 损伤的影响

由于海马 CA3 区和 CA1 区锥体细胞之间有突触连接，当局部电刺激 CA3 区锥体细胞侧支通路时，

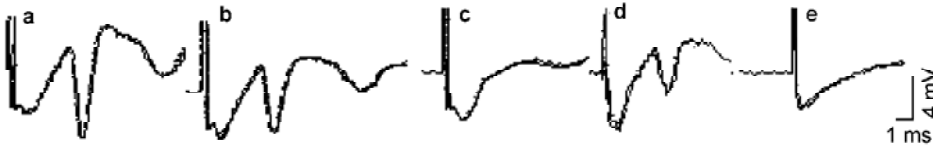


图 1. OGD 损伤前后 OPS 的变化

Fig. 1. Changes of OPS before and after OGD. a, OPS before OGD; b, 1-minutue after OGD; c, 3-minutue after OGD; d, OPS recovery from slight OGD injury; e, no recovery of OPS from severe OGD injury.

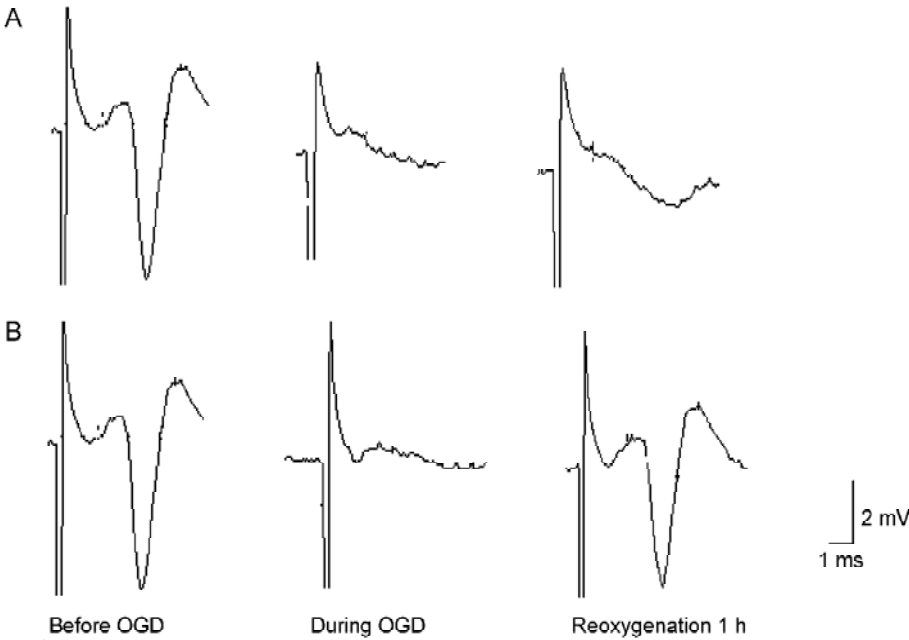


图 2. 七氟醚预处理对 OGD 损伤前后 OPS 的影响

Fig. 2. Effect of sevoflurane preconditioning on OPS before and after OGD injury. A: OPS unrecovered from OGD injury in group OGD. B: The recovery amplitude of OPS increased significantly in group Sev III.

表 1. 七氟醚预处理对海马脑片 OGD 损伤的影响

Table 1. Protective effect of sevoflurane preconditioning on OGD injury in hippocampal slices of rat

Group	OPS abolishing time (min)	OPS recovery time (min)	OPS recovery amplitude (%)	OPS recovery rate (%)
OGD	3.2 ± 0.6	—	0	0 (0/7)
Sev I	4.5 ± 0.6**	14.8 ± 3.7	19.6 ± 31.4	14.3 (1/7)
Sev II	5.4 ± 1.5**	13.9 ± 3.3	61.0 ± 42.3** &&	71.4 (5/7)* &
Sev III	5.4 ± 0.7**	10.5 ± 3.4	78.7 ± 21.1** # &&	71.4 (5/7)* &
SH	3.8 ± 0.3	—	0	0 (0/7)
HD	3.6 ± 1.1	—	0	0 (0/7)

mean±SD, $n = 7$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs OGD group; # $P < 0.01$ vs Sev I group; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$ vs SH group.

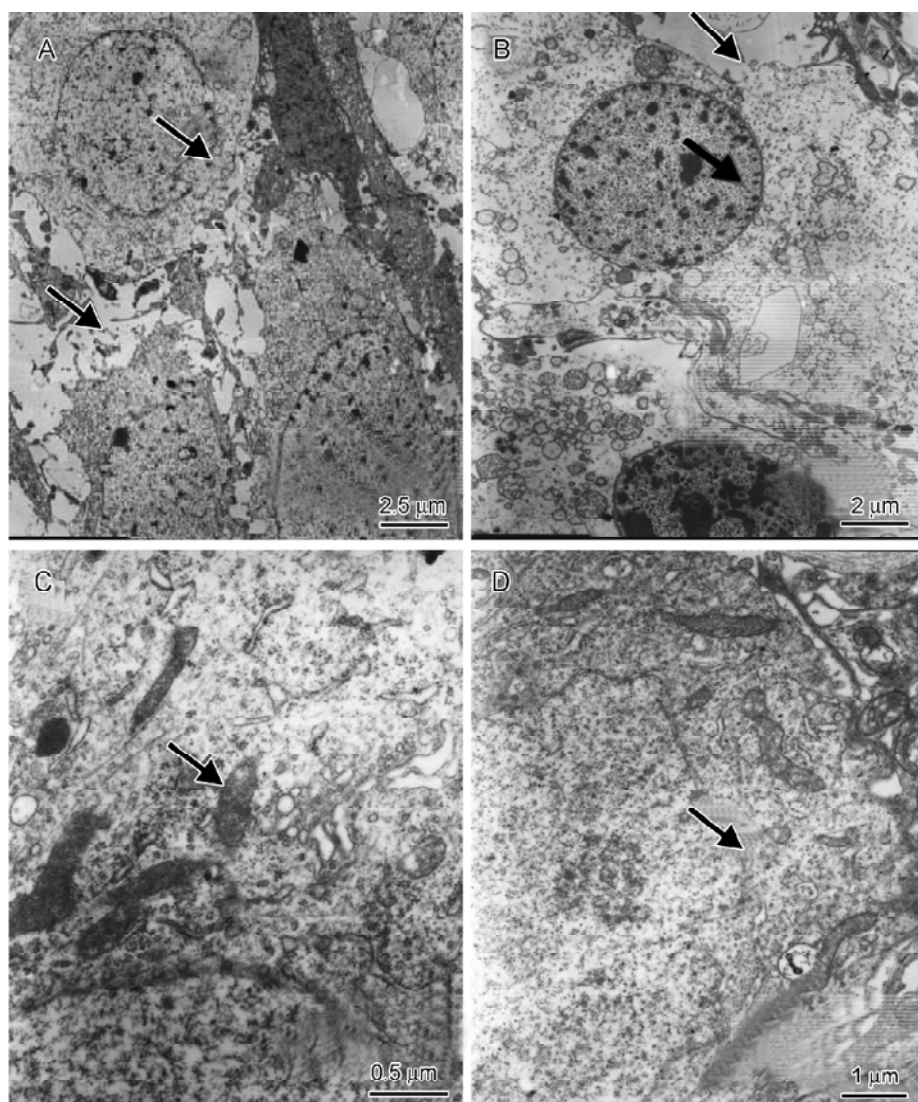


图 3. 海马脑片 CA1 区锥体细胞超微结构

Fig. 3. Ultrastructure of pyramidal cells of hippocampal slices in CA1 area. A: Pyramidal cells showing severe edema, nucleus membranes ruptured, chromatin mass formed in group OGD. Scale bar, 2.5 μm . B: Pyramidal cells showing severe edema, nucleus membranes crimped in group Sev I. Scale bar, 2 μm . C: The neurons were almost intact, edema was slight between cells, the nucleus membranes were regular, and mitochondria expanded lightly in group Sev II. Scale bar, 0.5 μm . D: Edema was slight between pyramidal cells, chromatin was uniform, and mitochondria was mostly intact in group Sev III. Scale bar, 1 μm .

可在 CA1 区锥体细胞层记录到一个幅度较大的 OPS, 系突触传递诱发的锥体细胞群体的细胞外电位(图 1a)。OPS 是反映缺氧或缺血对突触传递功能影响的敏感指标。海马脑片缺氧过程中, CA1 区锥体细胞诱发的 OPS 呈时相性变化。第一阶段, 诱发的 OPS 开始减小并逐渐消失(图 1b, c); 第二阶段, OPS 重新出现, 此即缺氧损伤电位(hypoxic injury potential, HIP); 第三阶段, 伴随着 HIP 消失, 细胞电活动消失, 呈现完全电沉寂现象; 第四阶段, 复氧后, OPS 恢复(图 1d), 如果缺氧较严重, 可不恢复(图 1e)。OPS 消失是海马 CA1 区锥体细胞突触传递功能丧失的特征性表现, 缺氧时 OPS 幅度减小和消失时间反映了脑片对缺氧的耐受性, 而复氧后 OPS 的恢复程度和恢复率可反映脑片突触功能的损伤程度。OGD 组缺氧期间 OPS 消失时间为(3.2 ± 0.6) min, 复氧后 OPS 未恢复(0%), 而给予不同浓度的七氟醚预处理 30 min OPS 可以部分恢复(图 2)。Sev I 组没有明显改善 OPS 的恢复程度和恢复率, 但较 OGD 组明显延缓了 OGD 损伤后 OPS 的消失时间[(4.5 ± 0.6) min, $P < 0.01$]; Sev II 组和 Sev III 组较 OGD 组不仅明显延长了 OGD 损伤后 OPS 的消失时间[分别为(5.4 ± 1.5) min, (5.4 ± 0.7) min, $P < 0.01$], 并明显提高 OPS 的恢复率(均为 71.4%, $P < 0.05$), 其恢复程度分别为(61.0 ± 42.3)%和(78.7 ± 21.1)% ($P < 0.01$)(表 1)。

在 6% 七氟醚预处理的同时给予 50 mmol/L 5-HD, 海马脑片 OPS 在 OGD 损伤后 3.8 min 左右消失, 复氧供糖 1 h OPS 没有恢复, 而单用 5-HD 对 OGD 损伤时 OPS 消失时间、复氧后 OPS 恢复率无明显影响, 可见 5-HD 基本取消了 6% 七氟醚预处理的神经保护作用。

2.2 七氟醚预处理对海马脑片 OGD 损伤后细胞超微结构的影响

OGD 组海马 CA1 锥体细胞胞间水肿严重, 细胞核变形, 核膜皱缩, 染色质或均质化、或凝集呈块状, 重者核膜破裂。线粒体肿胀畸形, 嵴结构断裂或消失, 整个胞质呈空化、溶解现象(图 3A); Sev I 组, 锥体细胞间水肿严重, 核膜尚完整、核内染色质凝集呈块状并聚集于外周, 部分锥体细胞碎裂、溶解(图 3B); Sev II 组海马 CA1 区锥体细胞间有水肿, 核膜有皱缩, 染色质均匀, 线粒体轻度肿胀、嵴结构存在, 部分粗面内质网少量脱颗粒(图 3C); Sev III 组海马 CA1 区锥体细胞间轻度水肿,

细胞形态基本正常, 染色质均匀, 线粒体无明显改变(图 3D)。

3 讨论

海马是脑组织对缺氧最敏感的部位之一, 而离体海马脑片兼有在体试验和离体神经细胞培养的某些特点, 已作为一种经典的离体缺氧损伤模型。海马脑片缺氧过程中, CA1 区神经元锥体细胞诱发的 OPS 呈时相性变化, 是反映缺氧对突触传递功能影响的敏感指标, 可以有效地反映脑片损伤程度。

吸入麻醉药是临床普遍使用的麻醉药, 七氟醚是继氟烷、安氟醚和异氟醚之后开发出来的新型吸入麻醉药, 它具有诱导迅速、循环稳定、肌松良好以及副作用小等特点。近年来研究发现七氟醚有良好的脑保护作用^[1-3], 在缺氧前、缺氧期间单纯应用七氟醚, 仅高浓度(6%)七氟醚可有效改善 OGD 损伤所致的神经电生理改变^[1], 地氟醚和七氟醚可剂量依赖性减轻不同程度培养神经元 OGD 损伤引起的神经元死亡^[3], 吸入麻醉药脑保护渐成研究减轻脑缺血再灌注损伤、预防性药物预处理的热点^[1-3]。在预想可能发生的脑缺血前给予短暂缺血进行预处理行脑保护, 在临床应用中尚不实际。因此, 寻求安全、有效、可行的预处理方法十分重要, 药物预处理是近年来研究之重点。

在缺血前采取某些药物学措施, 使神经系统不受或少受缺血的干扰, 有利于阻断缺血性级联反应, 从而可能起到脑保护作用。吸入麻醉药预处理诱导的脑保护作用可通过减轻兴奋性毒性所引起的级联反应^[6]、激活腺苷受体^[7]、诱导一氧化氮合酶的产生^[7,8]、激活蛋白激酶 C^[9]。近年来, $mitoK_{ATP}$ 通道在心、脑保护中的地位已引起广泛关注, 大量研究证实, 开放 $mitoK_{ATP}$ 通道是吸入麻醉药预处理产生心肌保护作用的重要机制之一^[10,11]。而脑组织的 $mitoK_{ATP}$ 通道蛋白浓度是心肌含量的 7 倍^[12], 吸入麻醉药发挥脑保护时 $mitoK_{ATP}$ 通道的作用地位尚罕见报道, 新近研究发现 $mitoK_{ATP}$ 通道选择性开放剂二氮嗪预处理可使大鼠脑梗塞体积缩小, 产生脑保护作用^[13]。脑缺血时 $mitoK_{ATP}$ 通道开放可降低膜电位, 有助于抑制 Ca^{2+} 内流, 从而有效防止线粒体内钙超载; 膜电位降低与线粒体呼吸作用增强的“适度去耦联”可以减少氧自由基的产生; 线粒体基质体积增加, 能激活脂肪酸氧化和电子转移, 促进 ATP 的生成^[14-16]。在离体海马脑片 OGD 损伤模型

上, 吸入麻醉药发挥脑保护作用的 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 通道机制尚未见报道。

在本实验中, 我们采用的 4%、6% 七氟醚分别相当于 1.67、2.5 MAC (大鼠的 MAC 值为 2.4 vol%^[17]), 为临床常用浓度。研究发现, 4% 和 6% 的七氟醚预处理海马脑片 30 min, 可明显减轻 OGD 损伤, 延长 OPS 消失时间, OPS 恢复率和恢复程度明显优于 OGD 损伤组, 而 2% 七氟醚组 OPS 恢复程度和恢复率与 OGD 损伤组相比无统计学差异, 可能是预处理时间较短或低浓度的七氟醚脑保护效果不明显。我们选择 50 $\mu\text{mol/L}$ 5-HD 与 6% 七氟醚同时预处理海马脑片, 发现 5-HD 取消了七氟醚预处理所产生的抗 OGD 损伤的作用; 而 50 $\mu\text{mol/L}$ 5-HD 单独预处理无抗 OGD 损伤的作用。结果表明, 七氟醚预处理海马脑片在 30 min 之内即可迅速产生明显的脑保护作用, 开放 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 通道可能是其作用的重要靶点。但其具体机制仍不甚清楚, 可能与激活 PKC 信号通路、上调诱导型一氧化氮合酶、激活 p38-MAPK 信号通路有关。七氟醚预处理后对线粒体内游离钙离子浓度、电子传递链、ATP 的生成等微观变化的影响尚需进一步深入研究。

临床常见的严重颅脑外伤手术、控制性降压、颈动脉内膜剥脱术等手术常有潜在的脑缺血可能, 寻求一种具有脑保护作用的全麻药成为当前脑保护研究的热点之一。七氟醚预处理所诱导的早期的抗 OGD 损伤作用, 可为临床用药提供一定的依据。

参考文献

- Matei G, Pavlik R, McCadden T, Cottrell JE, Kass IS. Sevoflurane improves electrophysiological recovery of rat hippocampal slice CA1 pyramidal neurons after hypoxia. *J Neurosurg Anesthesiol* 2002; 14(4): 293-298.
- Kehl F, Payne RS, Roewer N, Schurr A. Sevoflurane-induced preconditioning of rat brain *in vitro* and the role of K_{ATP} channels. *Brain Res* 2004; 1021(1): 76-81.
- Wise-Faberowski L, Raizada MK, Sumners C. Desflurane and sevoflurane attenuate oxygen and glucose deprivation-induced neuronal cell death. *J Neurosurg Anesthesiol* 2003; 15(3): 193-199.
- Kapinya KJ, Lowl D, Futterer C, Maurer M, Waschke KF, Isaev NK, Dirnagl U. Tolerance against ischemic neuronal injury can be induced by volatile anesthetics and is inducible NO synthase dependent. *Stroke* 2002; 33(7): 1889-1898.
- Xiong L, Zheng Y, Wu M, Hou L, Zhu Z, Zhang X, Lu Z. Preconditioning with isoflurane produces dose-dependent neuroprotection via activation of adenosine triphosphate-regulated potassium channels after focal cerebral ischemia in rats. *Anesth Analg* 2003; 96(1): 233-237.
- Toner CC, Connelly K, Whelpton R, Bains S, Michael-Titus AT, McLaughlin DP, Stamford JA. Effect of sevoflurane on dopamine, glutamate and aspartate release in an *in vivo* model of cerebral ischaemia. *Brit J Anaes* 2001; 86(4): 550-554.
- Cope DK, Impastato WK, Cohen MV, Downey JM. Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. *Anesthesiology* 1997; 86(3): 699-709.
- Zhao P, Zuo Z. Isoflurane preconditioning induces neuroprotection that is inducible nitric oxide synthase-dependent in neonatal rats. *Anesthesiology* 2004; 101(3): 695-703.
- Toller WG, Montgomery MW, Pagel PS, Hettrick DA, Warltier DC, Kersten JR. Isoflurane-enhanced recovery of canine stunned myocardium: role for protein kinase C? *Anesthesiology* 1999; 91(3): 713-722.
- Gross GJ, Auchampach JA. Role of ATP dependent potassium channels in myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res* 1992; 26(11): 1011-1016.
- Schulz R, Cohen MV, Behrends M, Downey JM, Heusch G. Signal transduction of ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 2001; 52(2): 181-198.
- Bajgar R, Seetharaman S, Kowaltowski AJ, Garlid KD, Paucek P. Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP-sensitive potassium channel in brain. *J Biol Chem* 2001; 276(36): 33369-33374.
- Shimizu K, Lacza Z, Rajapakse N, Horiguchi T, Snipes J, Busija DW. $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ opener, diazoxide, reduces neuronal damage after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283(3): H1005-H1011.
- Pomerantz BJ, Robinson TN, Heimbach JK, Calkins CM, Miller SA, Banerjee A, Harken AH. Selective mitochondrial K_{ATP} channel opening controls human myocardial preconditioning: too much of a good thing? *Surgery* 2000; 128(2): 368-373.
- Ghosh S, Standen NB, Galinanes M. Evidence for mitochondrial K_{ATP} channels as effectors of human myocardial preconditioning. *Cardiovasc Res* 2000; 45(4): 934-940.
- Gross GJ. The role of mitochondrial K_{ATP} channels in cardioprotection. *Basic Res Cardiol* 2000; 95(4): 280-284.
- Crawford MW, Lerman J, Saldivia V, Carmichael FJ. Hemodynamic and organ blood flow responses to halothane and sevoflurane anesthesia during spontaneous ventilation. *Anesth Analg* 1992; 75(6): 1000-1006.