

쥐에서 허혈 재관류 신장손상에 대한 반대편 신장의 허혈 선조정의 신장 보호효과

가톨릭대학교 의과대학 마취통증의학교실

주진덕 · 김대우 · 강유진 · 김용신 · 전연수 · 인장혁 · 최진우 · 박연진

Renal Protective Effects of Opposite Renal Ischemic Preconditioning against Renal Ischemic Reperfusion Injury in Mice

Jin Deok Joo, M.D., Dae Woo Kim, M.D., Yoo Jin Kang, M.D., Yong Shin Kim, M.D., Yeon Soo Jeon, M.D., Jang Hyeok In, M.D., Jin Woo Choi, M.D., and Yeon Jin Park, M.D.

Department of Anesthesiology and Pain Medicine, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Background: Acute renal failure (ARF) results from renal ischemic reperfusion (IR) injury and is a major contributor to the morbidity and mortality encountered during the perioperative period. It was previously demonstrated that ischemic preconditioning (IPC) of the heart, brain, and kidney offered protection against IR injury. Therefore, this study examined whether or not distant IPC can also be effective against IR injury in other organs.

Methods: C57BL6 mice were classified into three groups, Sham group (n = 7), IR group (n = 7) and Cross IPC IR group (n = 7). The sham group was subjected only to a right renal nephrectomy (ligation of renal pedicle with silk). The IR group was subjected to 30 min of left renal ischemia after a right nephrectomy. The cross IPC IR group was subjected to right renal IPC (two cycles of 5 min of ischemia and reperfusion) followed 15 min later by a right nephrectomy and 30 min left renal ischemia. The left kidney was harvested 24 h after surgery and the histology and blood creatinine level was analyzed. The left kidneys were isolated 15 min after right nephrectomy (sham, n = 7) and right renal IPC (cross IPC, n = 7), respectively, and analyzed by western blotting.

Results: The level of the intra-cellular signaling proteins, iNOS, Akt and ERK increased significantly as a result of the right renal IPC, and the renal functions were well preserved in the cross IPC IR group compared with the IR group.

Conclusions: Cross renal IPC offers protection by elevating the iNOS, Akt and ERK levels due to the distant oxygen free radicals stream against the opposite renal IR injury in mice. (Korean J Anesthesiol 2007; 53: 229~33)

Key Words: ischemic preconditioning, ischemic reperfusion injury, western blots.

서 론

대동맥 및 신장이식 수술에서 허혈 재관류 신장손상(renal ischemic reperfusion injury, IR)은 수술 후 치명적 환자 합병증과 사망률을 높이는 원인이 된다. 이를 예방하기 위하여 허혈 선조정(ischemic preconditioning), 아데노신 전처치, 흡입마취제 선조정, AMPK (AMP-activated protein kinase) 활성화 등의 방법들이 연구되고 있으며,¹⁻⁴⁾ 지금까지 급성 허혈

선조정 뿐만 아니라 지연성 허혈 선조정이 심장, 신장 그리고 신경계의 허혈 재관류 손상에 대하여 세포내 신호전달 단백질인 Akt, ERK, HSP27 (heat shock protein 27), HSP70, iNOS (inducible nitric oxide synthase) 등의 중간 매개물질을 통하여 보호 작용을 한다고 알려져 왔다.^{5,6)} 따라서 저자들은 해당 장기의 직접적인 허혈 유도 뿐만 아니라 인접한 다른 장기의 허혈 선조정이 이들의 중간 단백질을 통해 해당 장기의 허혈 재관류 신장손상으로부터 장기를 보호 할 수 있으리라 생각하였다.

본 실험에서는 오른쪽 신장의 허혈 선조정(cross ischemic preconditioning, cross IPC)이 장시간 허혈 후 재관류된 왼쪽 신장을 보호할 수 있는지를 알아보고자 하였다. 이번 실험에서의 의미 있는 결과는 실제 임상에서의 간단한 허혈 선조정을 통하여 허혈 재관류 장기 손상이 예상되는 치명적

논문접수일 : 2007년 4월 23일

책임저자 : 김대우, 경기 수원시 팔달구 지동

성빈센트병원 마취통증의학과, 우편번호: 442-723

Tel: 031-249-7211, Fax: 031-258-4212

E-mail: vincnt@chollian.net

수술 위험 군으로부터 비교적 쉽게 장기를 보호 할 수 있는 효과를 얻으리라 생각하였다.

대상 및 방법

모든 실험계획은 동물실험 위원회로부터 승인을 얻은 후 C57BL/6 쥐를 사용하여 실험을 진행하였다. 쥐(20-25 g)는 펜토바비탈 소듐(50 mg/kg or to effect)을 복강 내로 주입하여 마취 시켰으며, 수술 중 36-38°C로 체온을 유지하기 위하여 백열등과 전기담요를 사용하였다. 정상군(sham)은 개복 후 오른쪽 신장 뿌리(pedicle)를 실크로 묶은 후 15분이 지나 왼쪽 신장을 적출하여 western blots을 위한 조직으로 보관 사용하였고(n = 7), 24시간 후에 왼쪽 신장과 혈액을 채취하였다(n = 7). 허혈 재관류 신장손상군(IR)은 오른쪽 신장 뿌리(pedicle)를 실크로 묶은 후 왼쪽 신장을 30분 동안 집게(DeBAKEY, ROBOZ, USA)로 잡은 후 풀어 신장의 색깔이 선홍색으로 회복되는 것을 확인하고 24시간 동안의 재관류 신장 손상을 유도한 후 왼쪽 신장과 혈액을 채취하였다. 오른쪽 신장의 허혈 선조정 후 허혈 재관류 신장손상군(cross IPC IR)은 먼저 오른쪽 신장의 허혈 선조정을 유도하기 위하여 신장 뿌리(pedicle)를 집게로 5분 잡고 5분 재관류 시키는 과정을 2차례 반복한 후 15분이 경과하여 오른쪽 신장을 실크로 묶고 western blots을 위한 왼쪽 신장의 적출과(n = 7), 왼쪽의 신동맥을 30분 동안 집게로 혈류를 차단한 후 24시간 동안의 재관류 신장 손상을 유도한 후 왼쪽 신장과 혈액을 채취하였다(n = 7). 24시간 후에 채취한 혈액은 원심분리기를 이용하여 혈장을 분리한 후 크레아티닌(creatinine)을 구하는데 사용했고 왼쪽 신장은 적출하여 10% 포르말린용액으로 고정한 후 24시간 후 슬라이

드로 만들었으며, 임상병리과 의사에 의한 조직학적 신장 손상 평가 방법인 Jablonski 평가(0-4)를 통하여 신장의 바깥쪽 수질부위에서 세포의 괴사 정도를 평가하였다.^{7,8)}

세포내 신호전달 체계에 관여하는 단백질인 iNOS, Akt, ERK 등의 특정 단백질의 변화는 western blots과 면역염색 기법(immunostaining)을 사용하였다. 위에서 sham군과 cross IPC IR군의 중간에서 얻어진 western blots을 위한 왼쪽 신장은 액화질소를 이용 급속 냉동한 후 초저온 냉장고(-80°C)에 보관 사용하였다. 급속 냉동 보관된 쥐의 신장 피질조직을 얼음 위에서 녹인 후 분쇄하여 즉시 차가운 RIPA (radioimmunoprecipitation) 완충액(150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, and 1% Triton-X[pH 7.4])에 넣고 10 초 정도 균질화 용해 시킨다. 조직을 1시간 동안 초원심분리(32,500 rpm, 4°C, vacuum) 시킨 후 시험관 상층부의 액체를 수집하였다.^{9,10)}

Bradford method로 각 단백질 양을 분석한 후에 Laemmli 완충액으로 단백질을 안정화 시킨다. 각각의 단백질 샘플(20-40µg)을 10% SDS (sodium dodecyl sulfate)-polyacrylamide gels를 통해 80 V에서 4시간 동안 전기 영동 시켜 얻어진 단백질 대(band)를 20 V에서 Transfer unit을 이용해 밤 동안 PVDF (polyvinylidene fluoride) 막으로 단백질을 운반시킨다. TBST (Tris-Buffered Saline Tween-20) 용액(0.1% Tween 20 in 1 × TBS) 과 Blocking 용액(5% dry milk in TBST)으로 PVDF 막을 잘 씻고 blocking 용액을 도포한 후 phospho- ERK와 total-ERK의 1차 항체는 Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, California, USA), phospho-Akt와 total-Akt의 1차 항체는 Cell Signaling Technologies (Danvers, Massachusetts, USA)를 사용하였으며 iNOS의 1차 항체는 BD Biosciences Pharmingen (San Jose, California, USA)을 사용하

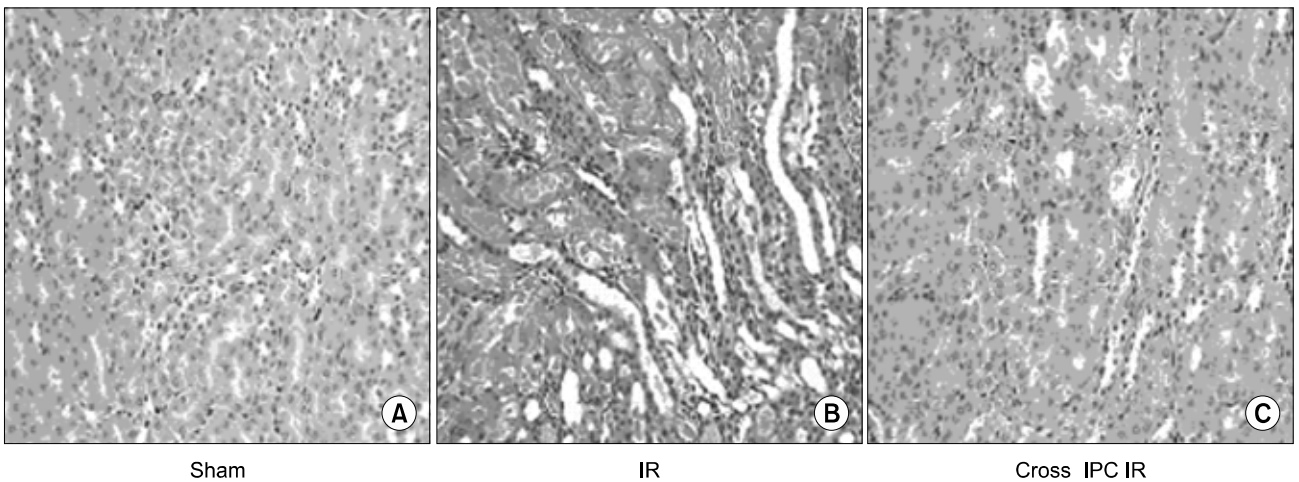


Fig. 1. Representative hematoxylin and eosin staining photomicrographs of the outer medulla of kidneys of sham-operated mice (A), and mice subjected to IR (B), cross IPC IR (C). IPC: ischemic preconditioning, IR: ischemic reperfusion injury. Magnification, ×200.

었다. PVDF 막을 TBST 용액으로 잘 씻어내고 2차 항체 (goat anti-Rabbit or anti-mouse IgG)를 1시간 동안 배양 시킨 후 ESL (electronic system level) 용액 (Amersham, Piscataway, New Jersey, USA)과 UVP (ultraviolet products) Bio-imaging System (Upland, California, USA)를 이용하여 현상하였다. 모든 값은 Mean ± SEM으로 표시하였고 두 그룹 간의 자료는 t-test로 비교되었다. 혈장 크레아티닌의 경우 one-way ANOVA test를 사용하였으며 Jablonski 평가는 Kruskal-Wallis nonparametric test를 사용하여 P 값이 0.05보다 작은 경우에 의미 있는 것으로 간주하였다.

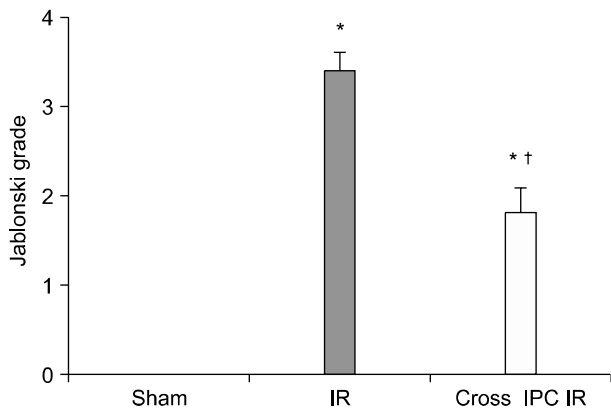


Fig. 2. Jablonski grading scale scores of outer medullary area for the histologic appearance of acute tubular necrosis in sham-operated mice (Sham; n = 7) and mice subjected IR (n = 7), cross IPC IR (n = 7). IPC: ischemic preconditioning, IR: ischemic reperfusion injury. *P < 0.05 versus Sham, † P < 0.05 versus IR.

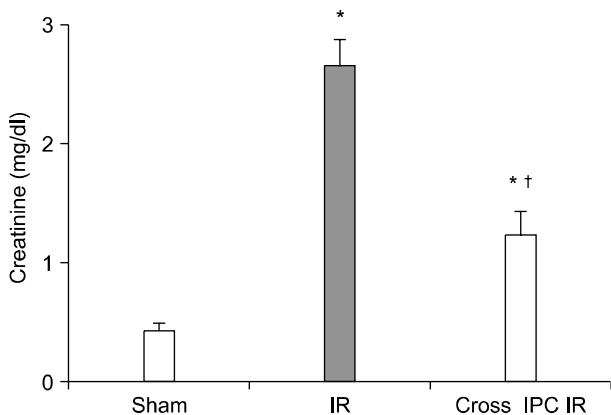


Fig. 3. Plasma creatinine values in mice subjected to Sham (n = 7), IR (n = 7) and cross IPC IR (n = 7). IPC: ischemic preconditioning, IR: ischemic reperfusion injury. *P < 0.05 versus Sham, † P < 0.05 versus IR.

결 과

신장의 현미경하 조직학적 소견을 살펴보면 먼저 IR 군에서 신장의 바깥쪽 수질부에 심한 관상구조의 소실, 수질충혈 및 출혈, 그리고 단백질 성분의 석회화 현상을 볼 수 있었으나 cross IPC IR 군에서는 비교적 조직의 관상구조가 잘 보존되어 있고 출혈이 상당히 감소되어 있는 것을 볼 수 있었다(Fig. 1). Jablonski 점수를 통한 신장 근위 세뇨관의 조직학적 괴사정도를 보면 IR군에서 3.4 ± 0.3 점으로 상당히 심한 조직이 괴사를 보인 반면, Cross IPC IR군에서는 1.8 ± 0.4 점으로 완화된 양상을 보여주고 있다(P < 0.05 versus IR, Fig. 2).

혈장 크레아티닌의 경우 sham군 0.4 ± 0.1 mg/dl에 비하여 IR군 2.7 ± 0.3 mg/dl과 Cross IPC IR군 1.3 ± 0.2 mg/dl 모두에서 의미 있는 증가를 보였으며, IR군과의 비교에서는 Cross IPC IR군에서 크레아티닌의 의미 있는 감소를 보였다(P < 0.05 versus IR, Fig. 3).

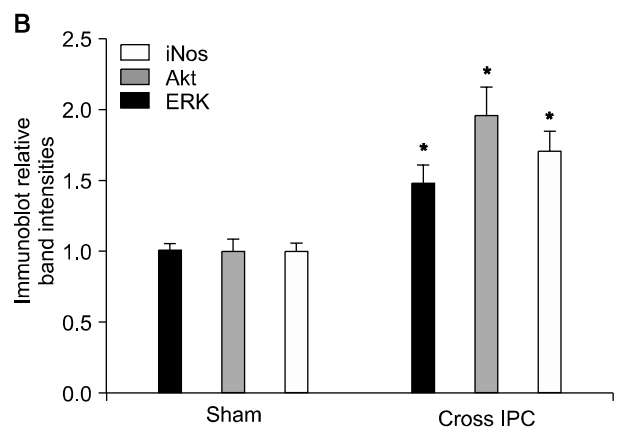
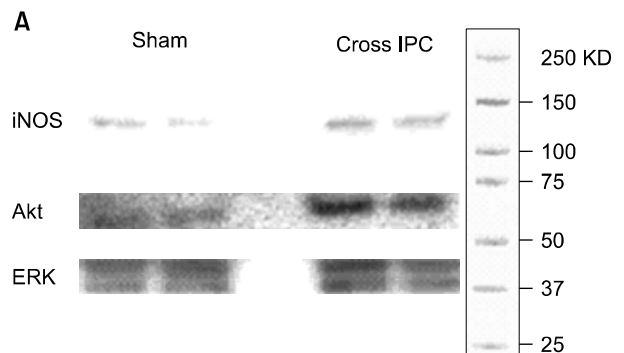


Fig. 4. (A) Representative immunoblots for inducible nitric oxide synthase (iNOS), protein kinase B (Akt), extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) from renal cortices of mice subjected to sham operation (n = 7), cross IPC (n = 7). (B) Densitometric quantifications of relative band intensities. *P < 0.001 versus Sham.

왼쪽 신장의 30분 허혈 전에 오른쪽 신장의 허혈 선조정이 세포내 신호전달 단백질인 iNOS, Akt, ERK의 변화에 미친 영향을 알아보기 위한 western blots 결과 Cross IPC IR군에서 sham 군에 비해 상대적으로 iNOS $148 \pm 13\%$, Akt $197 \pm 17\%$, ERK $172 \pm 13\%$ 가량의 모든 단백질에서 의미 있는 증가를 보였다($P < 0.001$ versus Sham, Fig. 4).

고 찰

현재까지 약 100가지 이상의 G-protein coupled receptor (GPCR)가 알려져 있으며, acetylcholine-muscarinic, glutamate (mGluR1-7), GABA, serotonin (5-HT1, 2), dopamine, norepinephrine과 같은 신경전달물질과, 여러 내분비 호르몬, 향기 (odorants), 빛(light)과 같은 다양한 세포 외 자극에 의해 세포막 수용체가 활성화되면 세포 내 G단백질의 활성을 통해서 세포의 성장과 생존에 관여하는 여러 신호전달 단백질을 만들게 된다.^{11,12)} 이들 단백질의 양을 western blots과 같은 방법을 통해 알아 봄으로서 신약 개발을 위한 분자 생물학적 연구에 많이 이용되고 있는 아주 흥미 있는 연구 분야이다. 본 연구에서는 오른쪽 신장의 간단한 허혈 선조정으로 혈류를 통한 산소 자유기(oxygen derived free radical, O₂⁻, H₂O₂, OH⁻, NO 등)의 유입으로 왼쪽 신장에서 Akt와 ERK, iNOS같은 신호 단백질이 증가 하는지와 이들이 실제 신장보호작용을 나타낼 수 있는지를 알아보기 위하여 금번 실험이 고안되었다.

혈액 재관류 동안에 일어나는 허혈 재관류 장기손상의 중요한 원인은 허혈 세포내의 사립체(mitochondria) 변화와 lipoxygenase, xantine oxidase 및 nitric oxide synthase (NOS) 등의 과 활성화로 생성되는 다량의 산소 자유기와 활성 산화물(reactive oxygen species, ROS)의 생성이다.^{13,14)} 그러나 장시간 지속된 허혈 상태 후의 재관류 기간 동안 과도한 농도로 증가된 산소 자유기가 조직손상을 유발함에도 불구하고 소량으로 증가된 산소 자유기는 심장과^{15,16)} 뇌,¹⁷⁾ 혈관 내피¹⁸⁾ 세포에서의 조직을 보호하는 허혈 선조정의 필요한 요소로 간주된다. 특히, 신장 세포를 포함한 여러 세포 형태에서 산소 자유기는 보호기전에서 주요한 2차 매개체가 된다.¹⁹⁾ 지금까지의 허혈 선조정에 대한 여러 실험연구에 의하면 산소 자유기의 제거제인 N-(2-mercaptopropionyl)-glycine (MPG) 100 mg/kg을 허혈 선조정 15분전에 전처치한 쥐 그룹에서 조직의 허혈 재관류 손상에 대한 선조정의 보호작용은 관찰되지 않았다.^{20,21)} 따라서 신장 세포에서 허혈 선조정에 의해 초기에 적당히 증가된 산소 자유기는 후속적으로 장시간 허혈 조작에 의해 과하게 증가된 산소 자유기를 통한 조직 손상으로부터 세포를 보호하는 신호를 유발하게 된다. 이처럼 세포 내 신호전달체계 내에서 유발된

신호는 중간 단백질인 Akt와 ERK, iNOS 등을 올리게 되고 이들이 핵 내에서 전사(transcription) 과정을 거쳐 세포의 성장과 생존, 염증반응과 같은 여러 작용을 나타내는 단백질을 만들게 되는 것이다. 본 실험에서도 위와 같은 세포내 신호 단백질이 증가하는지를 알아보고자 western blots을 시행하였으며, 결과에서 확인된 Akt와 ERK, iNOS 등의 증가는 반대편 신장 세포에서 허혈 선조정을 위한 두 차례의 짧은 허혈 자극이 재관류 기간 동안에 산소 자유기의 의미 있는 증가를 가져왔을 것이고 이는 신장에서의 선조정을 위한 유력한 신호 전달 물질로 추론 될 수 있다.

Joo 등의²¹⁾ 연구에 의하면 쥐의 좌측 신장에 대하여 금번 실험과 동일한 방법으로 유도된 급성과 지연성 허혈 선조정 모두에서 세포내 신호 단백질인 Akt와 ERK, iNOS 등이 증가하였고 이들의 신장보호 작용은 허혈 재관류로 인한 치명적 손상으로부터 신장을 보호할 수 있었다. 그러나 GPCR신호전달과정 중 G_{βγ} 단백질의 역할을 알아보기 위해 파괴제인 pertussis toxin (25µg/kg, intraperitoneally 48 h before)의²²⁾ 사용에서 선조정에 의한 신장의 보호작용은 나타나지 않았고 Akt와 ERK, iNOS의 억제제인 wortmannin,²³⁾ PD98057,²⁴⁾ L-N(6)[1-iminoethyl]lysine (L-NIL)의²⁵⁾ 전처치와 iNOS knockout mice에서 시행한 급성과 지연성 허혈 선조정이 장시간 허혈로 인한 재관류 신장손상으로부터 신장을 보호할 수 없었다.

그리고 허혈 선조정에 의한 조직의 허혈 재관류 손상으로부터 보호작용을 일으키는 다른 요소는 선조정 후에 나타나는 혈류량의 증가이다. 쥐 실험에서 24시간 전에 시행한 허혈 선조정은 신장의 바깥쪽 수질부위에서 측정된 혈류량이 거의 20% 정도 증가를 가져왔다고 한다.²¹⁾

금번 실험과 같은 동물실험에서 특히 유의해야 할 점은 개복에 따른 체온의 유지이다. 개복시간이 길어지고 실험과정 중에 생리식염수의 사용으로 인해 체온이 떨어지면 조직의 기초 대사량이 감소하고 그에 따른 조직의 보호효과로 자칫하면 실험상의 오류를 가져올 수 있다는 것이다.²⁶⁾ 체온에 근접되게 가온 된 생리식염수의 사용과 백열등의 적절한 사용으로 체온이 36-38°C로 일관되게 유지 되도록 관리하는 것이 무엇보다 중요하다. 그리고 western blot과 같은 섬세한 기술을 어떻게 익히고 적용하는가? 라는 문제와 3일내지 4일 소요되는 과정을 시간적으로 잘 배정하는 것이 가장 큰 어려움으로 여겨진다.

이상의 결과로 볼 때 반대편 신장의 허혈 선조정이 혈류를 따라 이동한 산소 자유기의 자극으로 세포내 신호 전달 단백질인 iNOS, Akt, ERK 등의 생성을 유발 했으며, 이들은 혈장 크레아티닌 분석과 Jablonski 점수를 통한 신장의 조직학적 손상정도를 비교해 볼 때 허혈 재관류 신장 손상으로부터 신장을 보호하는데 중요한 역할을 담당한 것으로

생각된다.

이는 결과적으로 해당 장기의 직접적인 허혈 선조정외에 다른 먼 장기의 허혈 선조정을 통해서도 장시간 허혈로 인한 조직의 허혈 재관류 조직손상으로부터 장기를 보호할 수 있을 것으로 여겨진다.

또한, 금번 실험에서 더 나아가 혈관의 허혈 선조정 뿐만 아니라 우리가 현재 사용하고 있는 isoflurane, sevoflurane, desflurane 등의 흡입마취제를 통한 심장, 신장, 간 등의 선조정에 대한 각 장기의 보호효과를 이와 같은 방법으로 연구할 수 있을 것이며, GPCR중의 NF- κ B, 사립체의 apoptosis 조절 외에 adenosine 수용체(A1, A2, A3)와의 관계, TGF- β signaling pathway, 그리고 통증영역에서의 ERK1/2, MAPK (mitogen activated protein kinase) pathway 등의 연구가 우리 마취통증의학과 영역에서도 연구될 수 있으리라 생각한다.

참 고 문 헌

- Buyukates M, Kalaycioglu S, Oz E, Soncul H: Effects of ischemic preconditioning in human heart. *J Card Surg* 2005; 20: 241-5.
- Lee HT, Gallos G, Nasr SH, Emala CW: A1 adenosine receptor activation inhibits inflammation, necrosis, and apoptosis after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 102-11.
- Lee HT, Ota-Setlik A, Fu Y, Nasr SH, Emala CW: Differential protective effects of volatile anesthetics against renal ischemia-reperfusion injury in vivo. *Anesthesiology* 2004; 101: 1313-24.
- Sukhodub A, Jovanovic S, Du Q, Budas G, Clelland AK, Shen M, et al: AMP-activated protein kinase mediates preconditioning in cardiomyocytes by regulating activity and trafficking of sarcolemmal ATP-sensitive K⁺ channels. *J Cell Physiol* 2007; 210: 224-36.
- Lee HT, Emala CW: Protein kinase C and G(i/o) proteins are involved in adenosine- and ischemic preconditioning-mediated renal protection. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 233-40.
- Choi JS, Kim HY, Cha JH, Lee MY: Ischemic preconditioning-induced activation of ERK1/2 in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 2006; 409: 187-91.
- Jablonski P, Howden BO, Rae DA, Birrell CS, Marshall VC, Tange J: An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia. *Transplantation* 1983; 35: 198-204.
- Lee HT, Emala CW: Protective effects of renal ischemic preconditioning and adenosine pretreatment: Role of A(1) and A(3) receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278: F380-7.
- Lee HT, Emala CW: Adenosine attenuates oxidant injury in human proximal tubular cells via A(1) and A(2a) adenosine receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 282: F844-52.
- Lee HT, Emala CW: Characterization of adenosine receptors in human kidney proximal tubule (HK-2) cells. *Exp Nephrol* 2002; 10: 383-92.
- Burchett SA: In through the out door: nuclear localization of the regulators of G protein signaling. *J Neurochem* 2003; 87: 551-9.
- Simon MI, Strathmann MP, Gautam N: Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 1991; 252: 802-8.
- Traystman RJ, Kirsch JR, Koehler RC: Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol* 1991; 71: 1185-95.
- Moore LE, Traystman RJ: Role of oxygen free radicals and lipid peroxidation in cerebral reperfusion injury. *Adv Pharmacol* 1994; 31: 565-76.
- Baines CP, Goto M, Downey JM: Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 207-16.
- Tritto I, D'Andrea D, Eramo N, Scognamiglio A, De Simone C, Violante A, et al: Oxygen Radicals Can Induce Preconditioning in Rabbit Hearts. *Circ Res* 1997; 80: 743-8.
- Ravati A, Ahlemeyer B, Becker A, Kriegstein J: Preconditioning-induced neuroprotection is mediated by reactive oxygen species. *Brain Res* 2000; 866: 23-32.
- Kaeffer N, Richard V, Thuillez C: Delayed coronary endothelial protection 24 hours after preconditioning: Role of free radicals. *Circulation* 1997; 96: 2311-6.
- Li C, Jackson RM: Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C227-41.
- Martin HB, Walter CL: Preconditioning: an endogenous defense against the insult of myocardial ischemia. *Anesth Analg* 1996; 83: 639-45.
- Joo JD, Kim M, D'Agati VD, Lee HT: Ischemic preconditioning provides both acute and delayed protection against renal ischemia and reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 3115-23.
- Lee HT, Emala C: Protein kinase C and Gi/o proteins are involved in adenosine- and ischemic preconditioning-mediated protection of renal ischemic-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 233-40.
- Kang WS, Tamarkin FJ, Wheeler MA, Weiss RM: Rapid upregulation of endothelial nitric-oxide synthase in a mouse model of Escherichia coli lipopolysaccharide-induced bladder inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 310: 452-8.
- Toma O, Weber NC, Wolter JI, Obal D, Preckel B, Schlack W: Desflurane preconditioning induces time-dependent activation of protein kinase C epsilon and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 in the rat heart in vivo. *Anesthesiology* 2004; 101: 1372-80.
- Park KM, Byun JY, Kramers C, Kim JI, Huang PL, Bonventre JV: Inducible nitric-oxide synthase is an important contributor to prolonged protective effects of ischemic preconditioning in the mouse kidney. *J Biol Chem* 2003; 278: 27256-66.
- Attuwaybi BO, Hassoun HT, Zou L, Kozar RA, Kone BC, Weisbrodt NW, et al: Hypothermia protects against gut ischemia/reperfusion-induced impaired intestinal transit by inducing heme oxygenase-1. *J Surges* 2003; 115: 48-55.