مقاله

تأثیر حفاظتی بازکننده کانال‌های پتاسیمی میتوکندریایی وابسته به ATP بر جمعیت نورونهای کورتیکال مغز رت

منصوره سلیمانی Ph.D*، ✉مهدی مهدی‌زاده Ph.D*، معصومه بخشایش M.Sc، سارا سلیمانی M.Sc*، پروانه طباطبائی B.Sc****

* گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی ایران

** مرکز تحقیقات سلولی ـ مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران

تاریخ وصول: دی‌ماه ۸۵ ، تاریخ پذیرش: اسفندماه ۸۵

چکیده

هدف: تا به حال درمان دارویی موثری برای پیشگیری از کاهش تعداد نورونی بعد از سکته مغزی مشخص نشده است. در مطالعه حاضر اثر تنظیم کننده‌های کانالهای میتوکندری بر تعداد نورونهای کورتکس مغز رت و فعالیت نورولوژیکی بعد از ایسکمی ـ ریپرفیوژن بررسی شده است.

مواد و روشها: دررتهای نژاد ویستار یک هفته بعد از تجویز داروهای تنظیم کننده کانالهای پتاسیمی چهار رگ اصلی خون دهنده به مغز به مدت ۱۵ دقیقه مسدود و سپس پرفیوژن برقرار شد.۲٤ ساعت بعد از ریپرفیوژن سطح هوشیاری و اعمال حرکتی توسط متد Lemay وTarloe به ترتیب ارزیابی گردید، همچنین با استفاده از رنگیآمیزی کریزل ویولت و میکروسکوپ نوری تعداد کل سلولها و سلولهای نرمال در کورتکس پریتال بررسی شد و نتایج توسط نرم افزار ANOVA انالیز شد.

یافته‌ها: جمعیت نورونی نرمال در گروههایی که دیازوکساید به‌عنوان بازکننده طبیعی پتاسیم داده شد در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: شمارش سلولی و ارزیابی نورولوژیکی در *In vivo* وابسته به دوز تنظیم‌کننده کانال‌های پتاسیم وابسته به ATP هستند. نتایج ما نشان داد که استفاده از دیازوکساید بقای نورون‌ها را در صدمات مغزی ناشی از ایسکمی ـ ریپرفیوژن افزایش می‌دهد.

کلیدواژه: باز کننده کانال پتاسیمی میتوکندری وابسته به ATP، ایسکمی، ریپرفیوژن

مقدمه

سکته مغزی یک علت اصلی مرگ و میر است. بیماران سکته‌ای نیازمند صرف سرمایه فراوان برای بهبود نسبی هستند [۱و۲]. شواهدی وجود دارد که دارو درمانی می‌تواند تا حدوی بهبود نسبی ضایعات مغزی را ایجاد کند [۳].

میتوکندری یک نقش کلیدی در آپوتپوز و نکروز بعد از یسکمی حاد مغز بازی می‌کنند [٤و٥]. صدمات میتوکندریایی فاکتوری است که نقش اساسی در آپوتپوز و پاتوفیزیولوژی

1. mKATP:Mitochondrial Potassium Adenosine Three

✉ آدرس مکاتبه: تهران، بزرگراه همت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

E-mail: maranaoo@yahoo.com

ایسکمی مغـزی دارد. جمعیـت زیـادی از کانالهـای mKATP[1] (کانالهای پتاسیمی وابسته به ادنوزین تری فسفات)تنظیم کننده حجم ماتریکس میتوکنـدریایی و تولیـد ATP (ادنـوزین تـری فسفات) در غشای داخلی میتوکندری وجود دارد [۹-٦].

پیشتر گزارش شده اسـت کـه بازکننـدههای کانالهـایKATP میتوکندریایی، میزان کلسیم را در حین ایـسکمی ـ ریپرفیـوژن قلب رت کاهش می‌دهند [۱۰و۱۱]. که ممکـن اسـت مـانع از پیشرفت آپوتپوز از طیـق مـسیر میتوکنـدریایی شـود.راهکـار فارموکولوژیکی انتخابی برای مطالعه کانالهای پتاسیمی وابسته به ATP میتوکندریایی در موجود زنده وجود ندارد [۱۲]. انواع مختلفی از مواد شامل آدنوزین ـ استیل کـولین و اپیوئیـدها از طریق باز کردن این کانالها بافت را در برابر صدمات ناشـی از ایـسکمی ـ ریپرفیـوژن محافظـت مـی‌کننـد [۱۰، ۱۳و۱٤]. مکانیسمی که توسط آن فعال شدن کانالهای پتاسـیمی وابـسته به ادنوزین تری فسفات میتوکندریای عمل محافظت را انجـام می‌دهند کاملاً روشـن نـشده اسـت. در مطالعـه حاضـر تـاثیر داروی دیازوکساید بـه عنـوان بـاز کننـده کانالهـای پتاسـیمی میتوکندری بـر تعـداد نورونهـای کـورتکس مغـز رت بعـد از ایسکمی ـ ریپرفیوژن بررسی شده است.

مواد و روشها

در مطالعه حاضر از رتهای نر نژاد ویـستار بـا وزن ۲۰۰ـــ۱۸۰ گرم استفاده شد. رتها در شرایط استاندارد هوای مطلوب و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ سـاعت تـاریکی قـرار داشـته و غـذای استاندارد فشرده و اب معمولی مصرف می‌کردنـد. یـک هفتـه قبل از جراحی رتهابه هـشت گـروه تقـسیم شـدند و قبـل از جراحی گروهی از رتها داروی گلی بـن ـ گلامیـد بـه عنـوان داروی انسداد کننده کانالهای پتاسیم میتوکندری و دیازوکساید به‌عنوان داروی باز کننده کانال پتاسـیم میتوکنـدری دریافـت کرده و در نهایت:

۱ـ گروه شم که پروسه جراحی روی آنها بدون انسداد جریان خون انجام شد.

۲ـ گروه حامل که انسداد چهار رگ به طور موقت انجام شـد و نرمال سالین را به روش
داخل صفاقی دریافت کردند.

۳ـ گروهی که ۱mg/kg گلیبن کلامید بـه شـکل IP دو سـاعت قبل از جراحی دریافت کردند.

٤ـ گروهی که ۵mg/kg گلیبن کلامید بـه شـکل IP دو سـاعت قبل از جراحی دریافت کردند.

۵ـ گروهـی کـه ۲۵mg/kg گلیـبن کلامیـد دو سـاعت قبـل از جراحی به شکل IP دریافت کردند.

٦ـ گروهی که ۲mg/kg دیازوکساید قبل از جراحی به شکل IP دریافت کردند.

۷ـ گروهی که ٦mg/kg دیازوکساید قبل از جراحی به شکل IP دریافت کردند.

۸ـ گروهی که ۱۸mg/kg دیازوکساید قبل از جراحی به شـکل IP دریافت کردند.

رتهـا بـا ترکیـب کتـامین ۱۰۰mg/kg و زایلازیـن ۱۰۰mg/kg بیهوش شدند. برای اندازه‌گیری دمای بدن در حین بیهوشی از دماسنج رکتال استفاده شد وبا استفاده از نور مادون قرمـز دمـا در حد ۰/۵ ± ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد.

روش جراحی

ابتدا در حدود یک سانتی‌متر در خط میانی خلـف سـر برشـی ایجـاد شـد و سـپس عـضلات پـاراورتبرال کنـار زده شـد و شریانهای ورتیرال با الکتروکوتر نیم‌میلی‌متر کوتر شـد. سـپس برش را بخیه زده وبا برش یک سـانتی‌متـری دیگـر در ناحیـه قدامی گردن شریانهای کاروتید مشترک را به مدت ۱۵ دقیقـه با clips بسته و بعد از ۱۵ دقیقه عروق باز و ریپرفیوژن برقرار شد.

ارزیابی نورولوژیکال

۲٤ ساعت بعد از ریپرفیوژن ارزیابی سطح هوشیاری و اعمـال حرکتی انجـام شـد. بـرای ارزیـابی حرکتـی از روش tarloe و

برای ارزیابی هوشیاری از متـد lemay اسـتفاده شـد. (جـدول ۱و۲) [۱۵و۱٦].

جدول ۱. ارزیابی حرکتی بر اساس روش Tarloe

درجه نقص حرکتی	امتیاز
بدون حرکت و بدون تحمل وزن	۰
کمی حرکت در اندامها، بدون تحمل وزن	۱
حرکات مکرر، بدون تحمل وزن	۲
حرکت روی یک یا دو پله	۳
راه رفتن با اندکی نقص	٤
راه رفتن طبیعی	۵

جدول ۲. ارزیابی هوشیاری بر اساس روش Lemay

درجه نقص نورولوژیک	امتیاز
طبیعی	۰
هوشیاری مداوم	۲
هوشیاری منقطع	٤
گیجی	٦
کمای سبک	۸
کمای عمیق	۱۰

میکروسکوپ نوری

۲٤ ساعت بعد از ریپرفیوژن مغز سریع خـارج و در فرمـالین ده‌درصد تثبیت شد. بعد از آبگیری، شفاف‌کردن و قالبگیری از هر نمونه سه مقطع ده میکرونی با فواصل ۱۲۰ میکـرون تهیـه شد.کورتکس پارتیال را به طور قراردادی به چهار ناحیه C1 و C2 و C3 و C4 تقسیم کرده و نمونه ها را بـا کریـزل وایولـت رنگ‌آمیزی کرده و با میکروسکوپ نـوری بررسـی شـد و در نهایت عکسهایی با بزرگنمایی ٤۰۰ از نمونهها تهیه و شمارش سلولی انجام شد.شـمارش تعـداد کامـل سـلولها و سـلولهای نرمال به‌طور جداگانـه در چهـار ناحیـه قـراردادی و در همـهٔ گروهها و با استفاده از نرم‌افزار Imaging آنالیزور انجام و data با استفاده از آزمون ANOVA یک طرفه آنالیز شد.

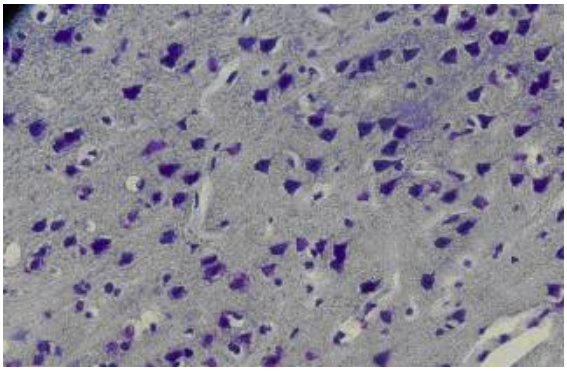
یافته‌ها

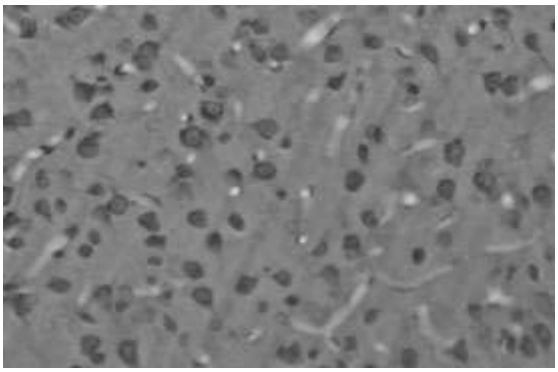
۱۵ دقیقـه انـسداد عـروق و ۲٤ سـاعت ریپرفیـوژن کـاهش واضحی در جمعیت نورونهای نرمال در گروه ایسکمی نسبت به شم ایجاد می‌کند (جدول ۳ و شکل ۱).

جدول ۳. جمعیت سلولی نورون های هرمی سالم و جمعیت کل نورونهای هرمی شمارش شده در ۲۵۰۰ میکرو متر مربع از نواحی کورتکس پاریتال رت‌های دو گروه کنترل و حامل پس از ۱۵ دقیقه ایسکمی گلوبال مغزی و ۲٤ ساعت ریپرفیوژن

جمعیت نورونی	گروه کنترل Mean±SD	گروه حامل Mean±SD	Mean
جمعیت کل نورون	C1	۲۲/۵±۱۰/۳٦	۲۱/۵±۱۰/٦٦
	C2	۲٤±۱/۹۵	۲۳/۵±۲/۱٦
	C3	۲۰/۷۵±۲/۲٤	۲۰/۲۵±۲/۱٦
	C4	۲٦/۷۵±۳/۱۲	۲٦/۲۵±۳/۳۰
جمعیت نورونهای سالم	C1	۲۲/۲۵±۱۰/۷۵	۷/۵±۱۰/۵۳*
	C2	۲۳/۵±۱/۷٤	۸±۱/۹۱*
	C3	۲۰/۲۵±۲/۰۷	٦/۲۵±۲/۲۱*
	C4	۲٦/۵±۲/۱٤	۹/۲۵±۳/٦۹*

*: $p < 0.01$ در مقایسه با کنترل





شکل ۱. تصویر سمت راست: گروه کنترل با نورون های هرمی نرمال کورتکس پاریتال با هسته و هستک واضح ، تصویر سمت چپ: گروه حامل (ایسکمی) با هسته های تیره نورون های هرمی کورتکس پاریتال. رنگ‌آمیزی: کریزیل وایولت، بزرگ‌نمایی ٤۰۰×

بررسی تعداد سلولهای طبیعی و غیر طبیعی در کورتکس مغزرتها نشان داد که مغزهایی قبل از ایسکمی با دیازوکساید درمان شده بودند افزایش معنی‌داری در جمعیت سلولی طبیعی نسبت به گروه ایسکمی نشان دادند (جدول٤). رتهای درمان شده با دیازوکساید با دوز ٦mg/kg افزایش معنی‌داری در نورونهای نواحی C2 و C3 نسبت به گروه ایسکمی داشتند و استفاده از دیازوکساید با دوز ۱۸mg/kg منجر به افزایش معنی‌داری در نورونهای نواحی C1-C4 نسبت به گروه ایسکمی شد. درحیوانات درمان شده با گلیبن کلامید با دوزهای ٦mg/kg و ۱۸mg/kg صدمه کورتکس در همه نواحی به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه ایسکمی افزایش یافته بود (جدول ۲) (شکل ۲). واستفاده از گلیبن کلامید با دوز ۲۵mg/kg باعث کاهش معنی دار نورونها در ناحیه C2 نسبت به گروه ایسکمی شد (جدول ۲).

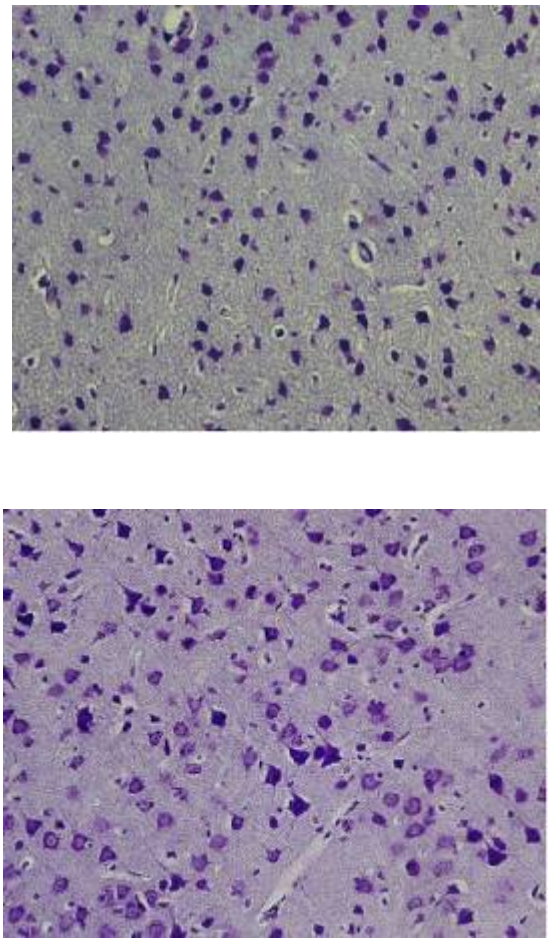
جدول ۲. جمعیت سلولی نورون های سالم و جمعیت کل نورون های هرمی شمارش شده در ۲۵۰۰ میکرو متر مربع از نواحی کورتکس پاریتال مغز رتهای

هفت گروه مختلف پس از ۱۵ دقیقه ایسکمی گلوبال مغزی و ۲٤ ساعت ریپرفیوژن (C1-C4)

جمعیت نورونی	نواحی کورتکس	گروه حامل (ایسکمی) Mean±SD	گروه D1 Mean±SD	گروهD2 Mean±SD	گروهD3 Mean±SD	گروهG1 Mean±SD	گروهG2 Mean±SD	گروهG3 Mean±SD
جمعیت کل نورونها	C1	۲۱/۵±۱۰/٦٦	۲۱/۳٤±۹/۳۷	۲۱/٦۱±۹/۱۷	۲۱/۵۷±۹/۰۳	۲۱/۵۳±۹/۱۵	۲۱/۲٦±۸/٦۹	۲۰/۸۳±۸/۲۵*
	C2	۲۳/۵±۲/۱٦	۲۳/۵۲±۱/۳۲	۲۳/٤۸±۱/۳٦	۲۳/۷۹±۱/۰۵	۲۳/۳٤±۱/۰۹	۲۲/۱۸±۱/۳۹*	۲۲/۲۵±۱/۱۲*
	C3	۲۰/۲۵±۲/۱٦	۲۰/۵۸±۲/۵۷	۲۰/۱۷±۲/۳۱	۲۱/٤۵±۱/٦۲	۲0/۱۱±۲/۳۰	۲۰/۱۵±۲/۹٤	۲۰/۰۸±۲/٤۰
	C4	۲٦/۲۵±۳/۳۰	۲٦/۳۸±۲/۷۹	۲٦/۱۵±۲/٦۲	۲٦/۵۰±۲/۳۷	۲٦/۱۸±۲/۵۹	۲٦/۱۱±۲/۷۰	۲۵/۹۳±۲/۰۵
جمعیت نورونهای سالم	C1	۷/۵±۱۰/۵۳	۷/٤٦±۳/۱٦	۷/۵۷±۳/٤۰	۷/٦۵±۳/۱۱*	۷/٤٦±۳/۳۵	۷/۱۰±۲/۸۷*	٦/٤۳±۲/۱۲*
	C2	٦/۲۵±۲/۲۱	٦/٤۰±۱/۷۷	٦/۵۵±۰/۸۱*	٦/۰۹±۱/۱۷*	٦/۱٤±۰/۵۲*	۵/۷۵±۱/۰۳*	۵/۷۵±۱/۱۵*
	C3	۸±۱/۹۱	۸/۲۵±۰/٦۵	۸/۳۰±۰/۸۵*	۸/۷۰±۰/٤۱*	۷/۹۳±۱/۳۵	۷/۳٤±۰/۲۷*	۷/٦۲±۰/۲۲*
	C4	۹/۲۵±۳/٦۹	۹/۲۷±۱/۱۵	۹/٦۱±۱/۱۵	۹/۸٤±۰/۷۵*	۹/۱۵±۰/۸٤	۸/٤۹±۰/٦۲*	۸/٤۵±۱/۱۷*

D1= 2mg/kg Dizoxide, D2= 6mg/kg Dizoxide, D3= 18mg/kg Dizoxide, G1= 1mg/kg Glibenclamid, G2= 5mg/kg Glibenclamid, G3= 25mg/kg Glibenclamid,

*: $p < 0.05$ در مقایسه با گروه حامل (ایسکمی)



شکل ۲. تصویر سمت راست: تجویز۱۸ میلی گرم دیازوکساید به ازای هر کیلوگرم در رتهای گروه آزمایش باعث حفظ بسیاری از نورونهای هرمی طبیعی کورتکس پاریتال شد، تصویر سمت چپ: تجویز۲۵ میلی گرم گلیبن‌کلامید به ازای هر کیلوگرم در رتهای گروه آزمایش باعث کاهش جمعیت نورونهای هرمی طبیعی کورتکس پاریتال شد. رنگ‌آمیزی کریزیل وایولت، بزرگنمایی: ٤۰۰×

ارزیابی نورولوژیکی

نتایج ما نشان داد که سطح هوشیاری گروه ایسکمی نسبت به گروه شم تغییر معنی‌داری دارد. تنظیم‌کنندههای کانال پتاسیم وابسته به ATP، دیازوکساید و گلیبن کلامید به طور معنی‌داری روی نمونههای ایسکمی ـ ریپرفیوژن اثر می‌گذارند. متوسط امتیاز هوشیاری برای گروه D3، ۱/۷۸ ± ۲ در مقایسه با ۱/۵۰ ± ٤/۳۳ برای گروه ایسکمی و ۱/۵ ± ٦/٦٦ برای گروه G3 بود(جدول ۵).اختلاف معنی‌داری بین حیوانات درمان شده با دوز پایین دیازوکساید و گلیبن کلامید درمقایسه با گروه ایسکمی وجود نداشت.

جدول ۵. درجه هوشیاری رت های گروه های کنترل و آزمایش پس از ۱۵ دقیقه ایسکمی گلوبال مغزی و ۲٤ ساعت ریپرفیوژن.

گروههای مطالعه	درجه هوشیاری Mean±SD
کنترل	۰±۰/۰۰
حامل (ایسکمی)	٤/۳۳±۱/۵۰*
D1	۱/۸۳±۱/۳۲
D2	۳±۲/۰۹
D3	۲±۱/۷۸*
G1	۳/٦٦±۱/۹٦
G2	۵±۱/۰۹
G3	٦/٦٦±۱/۰۳*

*: $p < 0.05$ در مقایسه با گروه حامل (ایسکمی)

انسداد چهار رگ کاهش معنی داری در اعمال حرکتی در مقایسه با گروه شم ایجاد می‌کند.مسدودکنندههای کانال پتاسیم وابسته به ATP(گلیبن کلامید) به طور معنی‌داری روی اعمال حرکتی در حین ایسکمی ـ ریپرفیوژن اثر می‌گذارد.
اختلاف معنی‌داری بین حیوانات درمان شده با دیازوکساید در مقایسه با گروه ایسکمی وجود نداشت.

بحث

سکته مغزی از مهمترین عوامل مرگ و میر و اصلی ترین عامل معلولیت است. سلولهای عصبی به ویژه نورونها نسبت به انواع صدمات نظیر ایسکمی، هیپوکسی و ضربه حساس هستند [۱و۲].کانالهای پتاسیمی وابسته به ATP میتوکندریایی نقشی اصلی در بقای نورون تحت ایسکمی ـ ریپرفیوژن بازی می‌کنند [٤]. دیازوکساید یک بازکننده کانال پتاسیم وابسته به ATP است که به صدمات ناشی از ایسکمی ـ ریپرفیوژن پاسخ می‌دهد [۱۷و۱۸].
مطالعات نشان می‌دهد که استفاده از دیازوکساید در بچه خوکهای تازه متولد شده بهبودی را در ایسکمی مغزی گلوبال تسریع کرده است [۱۹]. بنابراین فعالیت کانالهای پتاسیمی

وابسته به ATP میتوکندریایی ممکن است نورونها را در برابر انواع مختلف صدمات ایسکمی محافظت کند [۵و۱۱]. هر چند که مکانیسمهایی که توسط آن کانالهای پتاسیمی وابسته به ATP در محافظت نورون نقش دارند هنوز کاملا شناخته نشده است [٤]، مشاهدات حاضر پیشنهاد می‌کند که اعمال محافظتی دیازوکساید ناشی از عمل عروقی این دارو نیست.مطالعه ای که توسط tarlov و همکارانش انجام شد نشان می دهد که آثار دیازوکساید روی فشارخون و جریان خون ناشی از اثرات این دارو روی کانالهای پتاسیم غشا سلولی است [۱۵].
قبلاً اعمال محافظتی دیازوکساید در Invivo توسط گلیبن کلامید سرکوب شد و این نشان‌دهنده این مسئله است که اعمال محافظتی دیازوکساید توسط فعال‌سازی KATP کانالهای میتوکندری صورت می‌گیرد.علاوه بر این قبلاً بررسی شده که بازکننده‌های کانالهای پتاسیمی در بقای سلول نقش دارند [۲۰]. هولوهامدو (Holmuhamedov) و همکارانش نشان دادند که عوامل باز کننده در کانالهای KATP میتوکندریایی در نگهداری و تنظیم حیات سلولها نقش دارند [۱۲و۱۷].
همچنین در مطالعه حاضر نشان داده شد که دیازوکساید مستقیماً تعداد سلولهای طبیعی را افزایش می‌دهد.
بنابراین با توجه به نقش پوروپروتکتیو و حمایتی دیازوکساید پیشنهاد می‌شود که این دارو احتمالا بتواند به طور ویژه‌ای در جلوگیری از صدمه نورونی بعد از ضایعه مغزی مؤثر باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت محترم پشتیبانی، گروه آناتومی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران که در اجرای این طرح ما را یاری نمودند تشکر و قدر دانی می‌گردد.

References

1. **Wolf PA, Kannel WB, D'Agostino RB.** Epidemiology of stroke In: Cerebrovascular disease: pathophysiology, diagnosis, and management. Eds. MD Ginsberg and J Bogousslavsky. Blackwell Science, Malden, Massachusetts, 1998, pp 834-49.
2. **Nagahiro S, Uno M, Sato K, Goto S, Morioka M, Ushio Y.** Pathophysiology and treatment of cerebral ischemia. J Med Invest 1998; 45:57-70.
3. **Goldstein LB.** Basic and clinical studies of pharmacologic effects on recovery from brain injury. J Neural Transplant Plast 1993; 4:175-92.
4. **Mattson MP, Clumsee C, Yu ZF.** Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. Cell Tissue Res 2000; 301:173-87.
5. **Szewczyk A, Czyz A, Wojcik G, Wojczak L, Nalecz M.** ATP-regulated K+ channel in mitochondria: pharmacology and function. J Bioenerg Biomembr 1996; 28:147-52.
6. **Garlid KD.** Cation transport in mitochondria. Biochim Biophys Actan 1996:1275:123-6.
7. **McPherson, BC, Yao Z.** Morphine mimics preconditioning via free radical signals and mitochondrial KATP channels in myocytes. Circulation 2001;103: 290-5.
8. **Saraste A, Pulkki K.** Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. Cardiovasc Res 2000; 45: 528–37.
9. **Halestrap AP.** Regulation of mitochondrial metabolism through changes in matrix volume. Biochem Soc Trans 1994; 22:522-9.
10. **Wang L**, **Cherednichenko G**, **Hernandez L**, **Halow J**, **Camacho SA**, **Figueredo V**, **Schaefer S**. Preconditioning limits mitochondrial Ca2+ during ischemia in rat hearts: role of KATP channels. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001; 280.
11. **Kis, Bela 1 CA; Nagy, Krisztina 1 2; Snipes, James A. 1; Rajapakse, Nishadi C. 1; Horiguchi, Takashi 1; Grover, Gary J,et al.** The mitochondrial K ATP channel opener BMS-191095 induces neuronal preconditioning. Lippincott Williams & Wilkins, Inc 2004; 15(2): 345-9.
12. **Holmuhamedov EL, Jovanovic S, Dzeja PP, J Holmuhamedov EL**, **Jovanović S**, **Dzeja PP**, **Jovanović A**, **Terzic A**.. Mitochondrial ATP-sensitive K+ channels modulate cardiac mitochondrial function. Am J Physiol 1998; 275:1567-76.
13. **MichaelVC, Baines CP, Downey JM.** Ischemia preconditioning: from adenosine receptor to KATP channel. Annu Rev Physiol 2000;62: 79-109.
14. **Richer C, Pratz J, Mulder P, Mondot S, Giudicelli JF, Cavero I.**Cardiovascular and biological effects of K+ channel openers, a class of drugs with vasorelaxant and cardioprotective properties. Life Sci 1990; 47:1693-705.
15. **Tarlov IM, Klinger H.** Spinal cord compression studies. Arch Neurol Psychiat 1954; 71:271-90.
16. **LeMay DR, Gehua L, Zelenock GB, D'Alecy, LG.** Insulin administration protects neurologic function in cerebral ischemia in rats. Stroke 1988; 19: 1411-9.
17. **Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, Grover GJ.** Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K+ channels. Possible mechanism of cardioprotection. Circ Res 1997; 81:1072-82.
18. **Kis B**, **Rajapakse NC**, **Snipes JA**, **Nagy K**, **Horiguchi T**, **Busija DW**.. Diazoxide induces delayed pre-conditioning in cultured rat cortical neurons. Neurochem 2003; 87:969-70.

19. **Domoki F**, **Perciaccante JV**, **Veltkamp R**, **Bari F**, **Busija DW** . Mitochondrial potassium channel opener diazoxide preserves neuronal-vascular function after cerebral ischemia in newborn pigs. Stroke 1999; 30:2713-5.

20. **Nicholls DG, Budd SL.** Mitochondria and neuronal survival. Physiol Rev 2000; 80: 315-60.