

# İskemi Reperfüzyon Hasarı Sonrasında Akciğer Dokusunda Meydana Gelen Histopatolojik Değişiklikler Üzerinde Morfin Sulfatın Etkisi

## Effect of Morphine Sulphate on Histopathologic Changes in Lung Tissue After Ischemia Reperfusion Injury

Nuri DÜZGÜN,<sup>a</sup>  
Hıdır ESME,<sup>a</sup>  
Pınar KARABAĞLI,<sup>b</sup>  
Mehmet Sinan İYİSOY,<sup>c</sup>  
Melike DURAN<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Göğüs Cerrahisi Kliniği,  
Sağlık Bilimleri Üniversitesi,  
Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi,  
<sup>b</sup>Patoloji AD,  
Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
<sup>c</sup>Biyostatistik AD,  
Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi  
Meram Tıp Fakültesi,  
Konya

Geliş Tarihi/Received: 17.02.2017  
Kabul Tarihi/Accepted: 27.03.2017

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Hıdır ESME  
Sağlık Bilimleri Üniversitesi,  
Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi,  
Göğüs Cerrahisi Kliniği, Konya,  
TÜRKİYE/TURKEY  
drhesme@hotmail.com

**ÖZET Amaç:** Hücre düzeyinde iskemiye karşı toleransın oluşmasında endojen opioidler önemli rol oynamaktadır. Çalışmamızda akciğerin iskemi-reperfüzyon hasarı sonrasında akciğer dokusunda meydana gelen histopatolojik değişiklikler üzerinde morfin sulfatın etkisini araştırmayı amaçladık. **Gereç ve Yöntemler:** Çalışmada 40 adet Wistar Albino cinsi dişi sıçan kullanıldı. Denekler 4 gruba ayrıldı. İskemi reperfüzyon (IR) grubunda sol beşinci interkostal aralıktan torakotomi yapılarak iskemi reperfüzyon hasarı oluşturuldu. İskemi reperfüzyon ve ardkoşullama (İschemic postconditioning) (IRAK) grubunda torakotomi, iskemi reperfüzyon ve iskemik ardkoşullama yapıldı. IRAK3 ve IRAK30 gruplarında IRAK grubunda yapılan işlemlere ilave olarak 3µmol ve 30µmol dozlarında morfin sülfat verildi. Akciğer dokusu histopatolojik incelemesinde nötrofil sayısı, konjesyon, interstisyel ödem, doku hasarı, VEGF (Vasküler endotelial büyüme faktörü) ve EGFR (Epitelial büyüme faktörü reseptörü) ile pozitif boyanan hücreler yarı nicel olarak değerlendirildi. **Bulgular:** Histopatolojik incelemede IR grubu ile IRAK (P<0.01), IRAK3 (P<0.01) ve IRAK30 (P<0.01) grupları arasında nötrofil sayısı ve konjesyon skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Doku hasarı skoru açısından IR grubu ile IRAK (P<0.01), IRAK3 (P<0.01) grupları arasında ve IRAK grubu ile IRAK30 (P<0.05) grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Ayrıca IR grubu ile IRAK3 (P<0.01), IRAK30 (P<0.01) grupları arasında VEGF (+) ve EGFR (+) boyanan hücre sayısı skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. **Sonuç:** Sonuç olarak iskemi reperfüzyon periyodunda iskemik ardkoşullama ve morfin sulfat uygulanmasının histopatolojik değerlendirilmesinde, iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesinde ard koşullamadan çok morfin sulfat verilmesinin daha etkin bir yöntem olduğu saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Reperfüzyon hasarı; morfin; patoloji

**ABSTRACT Objective:** Endogenous opioids play an important role in tolerance to ischaemia at cellular level. We aimed to investigate the effect of morphine sulphate on the histopathologic changes in the lung tissue after ischemia reperfusion injury. **Material and Methods:** Forty female Wistar Albino rats were used in the study. The subjects were divided into 4 groups. Ischemia reperfusion (IR) group; thoracotomy was performed from the fifth left intercostal space and ischemia reperfusion injury was established. Ischemia reperfusion and ischemic postconditioning (IRPC) group; thoracotomy, ischemia reperfusion and postconditioning. IRPC3 and IRPC30 groups; in addition to IRPC group, 3 and 30 µmol morphine sulphate were administered. In the histopathological examination of lung tissue, neutrophile count, congestion, interstitial edema, tissue damage, and VEGF (Vascular endothelial growth factor) and EGFR (Epidermal growth factor receptor) positively stained cells were evaluated semi quantitatively. **Results:** In the histopathological analysis there was a statistically significant difference between the IR with IRAK (P<0.01), IRAK3 (P<0.01), and IRAK30 (P<0.01) groups in terms of neutrophile count and congestion edema scores. There was a statistically significant difference between the IR with IRAK (P<0.01) and IRAK3 (P<0.01) groups and IRAK with IRAK30 (P<0.05) groups in terms of tissue damage score. Moreover there was a statistically significant difference between the IR and IRAK3 (P<0.01) and IRAK30 (P<0.01) groups in the histopathological analysis in terms of VEGF (+) and EGFR (+) staining cell scores. **Conclusion:** As a result, ischemic postconditioning and administration of morphine sulphate were applied in the ischemic reperfusion period and histopathologic evaluation was performed. It has been determined that administration of morphine sulphate in the prevention of ischemia reperfusion injury is a more effective method than ischemic postconditioning.

**Keywords:** Reperfusion injury; morphine; pathology

**A**kciğerlerde iskemi-reperfüzyon hasarı kardiyopulmoner bypass, pulmoner trombo-endarterektomi ve akciğer transplantasyonunda sıklıkla oluşmaktadır.<sup>1</sup> Reperfüzyon sonrasında görülen pulmoner ödem, endotel hücrelerinin iskemi-reperfüzyona maruz kalması sonucu değişen vasküler denge, reperfüzyon sırasında azalan nitrik oksit (NO), siklik guanozin monofosfat düzeylerine bağlı olarak gelişen vasküler disfonksiyon sonucu bozulan koagülasyon, vasküler permeabilite, vazomotor tonus, lökositlerin adezyon ve agregasyon fonksiyonunda artış karşılaşılan en önemli sorunlar olarak değerlendirilmektedir.<sup>2,3</sup>

Opioidler son zamanlarda analjezik ve antinoseptif etkilerinin yanı sıra özellikle beyin ve kalp dokusunda iskemi-reperfüzyon sonucu gelişen hücre hasarını sınırlamaları ile gündeme gelmişlerdir.<sup>4,5</sup> Endojen opioidlerin memelilerin kış uykusunda oynadığı rol, opioidlerin dokuyu iskemiye karşı koruduğunun en önemli kanıtıdır. Memelilerde kış uykusu, hücre düzeyinde iske-miye benzer şekilde hücre içi asidoz ve hipoksi ile karakterizedir. Hücre düzeyinde iskemiye karşı toleransın oluşmasında endojen opioidler önemli rol oynamaktadır. İskemi-reperfüzyon hasarını azaltmak için son yıllarda farklı metodlar uygulanmıştır. Çalışmamızda akciğerin iskemi-reperfüzyon hasarı sonrasında akciğer dokusunda meydana gelen histopatolojik değişiklikler üzerinde morfin sulfatın etkisini araştırmayı amaçladık.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmada 40 adet Wistar Albino cinsi dişi sıçan (250 mg±25 mg) kullanıldı. Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi Kombassan Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Etik Kurulundan onay alındı. Tüm sıçanların bakımı, Tıbbi Araştırmalar Ulusal Derneği tarafından biçimlendirilen Deney Hayvanlarının Bakım Prensipleri'ne ve Laboratuvar Hayvanı Kaynakları Enstitüsü tarafından hazırlanıp Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından yayınlanan, Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanım Kılavuzu'na uygun olarak yapıldı.

## GRUPLAR

Denekler kendi aralarında 10'ar sıçan bulunan toplam 4 gruba bölündü. IR (İskemi-reperfüzyon) grubunda sol torakotomi yapıp IR hasarı oluşturuldu, ard-koşullama yapılmadı. IRAK (İskemi-reperfüzyon periyodu ve ard-koşullama) grubunda sol torakotomi yapılarak iskemi reperfüzyon periyodu ve ard-koşullama yapıldı. IRAK3 ve IRAK30 gruplarında iskemi-reperfüzyon periyodu ve ard-koşullamaya ilaveten deney hayvanlarına deneklerin kilosundan bağımsız olarak 3 µmol ve 30 µmol dozlarında morfin sülfat venöz yol (İnternal juguler ven) kullanılarak reperfüzyondan 5 dakika önce verilmeye başlanıp 20 dakika içinde verildi. Deney hayvanları deneyin 128. dakikasında intraperitoneal yüksek doz (150 mg/kg ketamin/30 mg/kg Ksilazin) anestezi madde verilerek sakrifiye edildi. Sol akciğer dokusu %10' luk formaldehit içinde tespit edilip patolojik incelemeye tabi tutuldu.

## ANESTEZİ VE CERRAHİ

Tüm işlemler steril şartlarda yapıldı. Anestezi intraperitoneal 50 mg/kg ketamin (Ketalar flk., Pfizer Pharma GmbH, Germany) ve 10 mg/kg ksilazin hidroklorid (Alfazyne %2, Alfasan International, Holland) ile sağlandı. Gerektiğinde sıçanların anestezi derinliğini sabit tutmak için ketamin (yarı dozda, 25 mg/kg) refleks yanıtla (pensetle ayağa ağırlı uyarın verilmesi-pedal refleksi) bakılarak tekrarlandı. 5. interkostal aralıktan sol torakotomi yapıldı. Toraks eksplore edilip inferior ligaman kesilmek suretiyle serbestlendi. Sol akciğer laterale retrakte edilerek sol hiler yapılar açığa çıkarıldı.

## İSKEMİ REPERFÜZYON VE İSKEMİK ARDKOŞULLAMA PERİYODLARI

Tüm sıçanlara deneyin birinci dakikasında 500 U/kg intravenöz heparin verildi. Heparin uygulamasından 5 dakika sonra deneyin 6. dakikasında sol hilus non-travmatik vasküler bulldog klemp (Vascu-Statt REF 1001-535) kullanılarak oklüde edildi, 60 dakika süreyle iskemi oluşturuldu. Akciğer sıcak, steril salin solüsyonu periyodik uygulamaları ile nemli tutuldu ve kesi buharlaşma

kayıplarını en aza indirmek için steril sıcak salin solüsyonu emdirilmiş gazlı bez ile kapatıldı. Reperfüzyonun 1. dakikasında ard koşullama algoritmine başlanarak vasküler klemp ile 30 saniye iskemi oluşturuldu, takip eden 30 saniye süreyle reperfüzyon yapıp, ardından ikinci kez 30 saniye süre ile iskemi ve 30 saniye reperfüzyon yapıldı. Üçüncü ve son olarak 30 saniye iskemi oluşturulduktan sonra 60 dakika süreyle reperfüzyon yapılarak deneyin 128. dakikasında doku örnekleri alındı ve yüksek doz anestezi ile deney sonlandırıldı. Deney sonlanmadan exitus olan 3 rat çalışmadan çıkarıldı. Akciğerden alınan doku örnekleri %10'luk formaldehit içinde tespit edildi.

### HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Tüm grupların alınan sol akciğer örnekleri %10'luk formol içinde tespit edilerek rutin takip işlemlerinden geçirildi. Parafin bloklara gömülen dokulardan 4 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Alınan kesitler deparafinize edilerek Hematoksilen-Eozin (H-E) ile boyandı ve ışık mikroskopunda değerlendirildi. Büyütme alanı içerisinde bulunan akciğer dokusundaki nötrofil (PNL) sayısı, konjesyon, interstisyel ödem, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve epitelyal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ile pozitif boyanan hücreler yarı nicel olarak değerlendirildi.

Daha önce Tassiopoulos ve ark. tarafından kullanılan skorlama sistemi modifiye edilerek akciğerlerde oluşan hasarın miktarı saptandı.<sup>6</sup> Buna göre 0 puan, değişiklik yok; 1 puan, fokal hafif değişiklikler; 2 puan, multifokal orta dereceli değişiklikler; 3 puan, yaygın belirgin değişiklikler şeklinde numaralandırıldı. Doku hasarı puanı ise nötrofil sayısı, konjesyon ve interstisyel ödem değerlendirme puanlarının toplamı olarak hesaplandı.

### İSTATİSTİKSEL İNCELEME

İstatistiksel analizlerde SPSS 15.0 programı kullanıldı. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi. Patolojik sonuçların değerlendirilmesinde çoklu grupların karşılaştırılmasında Dunn Bonferroni testi kullanıldı. Test so-

nucunun anlamlı çıkması durumunda grupların karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanıldı. Tüm istatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi  $P < 0.05$  olarak kabul edildi.

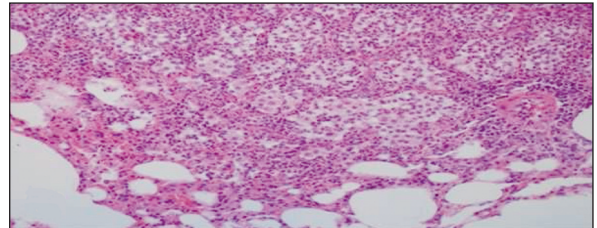
### BULGULAR

Histopatolojik incelemelerin istatistiksel değerlendirme sonuçları Tablo 1'de  $p$  değerleri olarak sunuldu.

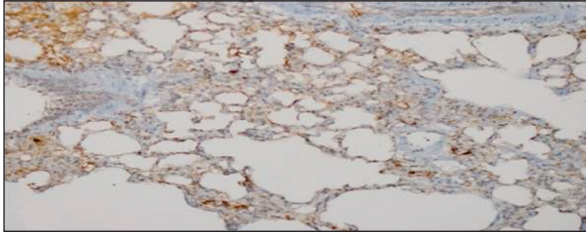
Histopatolojik incelemede IR grubu ile IRAK ( $p=0.000$ ), IRAK3 ( $p=0.001$ ) ve IRAK30 ( $p=0.002$ ) grupları arasında nötrofil sayısı skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Nötrofil sayısı açısından diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Resim 1).

IR grubu ile IRAK ( $p=0.000$ ), IRAK3 ( $p=0.003$ ) ve IRAK30 ( $p=0.006$ ) grupları arasında konjesyon skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Konjesyon skoru açısından diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. IR grubu ile IRAK ( $p=0.000$ ) ve IRAK3 ( $p=0.001$ ) grupları arasında, IRAK grubu ile IRAK3 ( $p=0.002$ ) ve IRAK30 ( $p=0.037$ ) grupları arasında interstisyel ödem skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

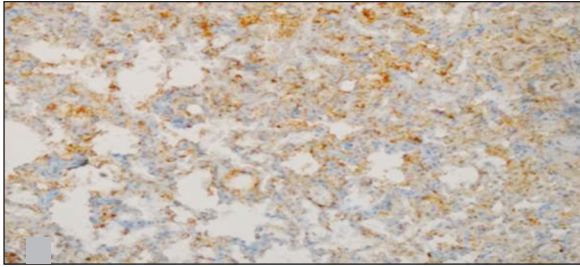
IR grubu ile IRAK ( $p=0.000$ ), IRAK3 ( $p=0.001$ ) grupları arasında ve IRAK grubu ile IRAK30 ( $p=0.025$ ) grubu arasında doku hasarı skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Ayrıca IR grubu ile IRAK3 ( $p=0.000$ ), IRAK30 ( $p=0.000$ ) grupları arasında ve IRAK grubu ile IRAK30 ( $p=0.038$ ) grubu arasında VEGF (+) boyanan hücre sayısı skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (Resim 2).



**RESİM 1:** IR grubunda 7 nolu deney hayvanının akciğer dokusunda nötrofil yoğunluğu (H-E 200X) skor 3.



**RESİM 2:** IRAK3 grubunda 8 nolu deney hayvanının akciğer dokusu bronş epitelinde ve alveolar makrofajlarda VEGF (+) boyanan hücreler (VEGF (+) 200X) skor 2.



**RESİM 3:** IRAK grubunda 2 nolu deney hayvanının akciğer dokusu bronş epitelinde ve alveolar makrofajlarda EGFR (+) boyanan hücreler (EGFR (+) 200X) skor 2.

Histopatolojik incelemede IR grubu ile IRAK3 ( $p=0.002$ ), IRAK30 ( $p=0.000$ ) grupları arasında EGFR (+) boyanan hücre sayısı skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (Resim 3).

## TARTIŞMA

İskemi reperfüzyon hasarı; akut akciğer hasarı, akut solunum sıkıntısı sendromu, akciğer transplantasyonu, travma, kalp cerrahisi ve septik şok gibi çeşitli klinik koşullarda ortaya çıkabilir. Akciğer IR hasarının önemli özellikleri; vasküler permeabilite artışı, mikrovasküler hasar, artan nötrofil infiltrasyonu, çeşitli inflamatuvar mediatörlerin oluşumu ve doku hasarını kapsamaktadır.<sup>7</sup>

İskeminin yegane tedavisi olan reperfüzyon, iskeminin dokuda yapmış olduğu hasarı artırarak infarkt sahasının genişlemesine neden olur. Bu süreç “reperfüzyon hasarı” olarak adlandırılır. Reperfüzyon hasarı konusu ilk olarak 1970’lerde Buckberg ve daha sonraları Braunwald ve ark. tarafından ortaya atılmıştır.<sup>8,9</sup> Reperfüzyonun

zararlı etkilerinin büyük bir kısmı ilk anlarda oluşmaktadır ve direkt hücre ölümü ile ilgilidir.

İskemik ardkoşullama konsepti, reperfüzyon başlangıcında, belirlenmiş bir algoritmi izleyecek şekilde reperfüzyonun kısa süreli tekrarlayıcı mekanik kısa kesintiler serisi olarak tanımlanmıştır. Vinten-Johansen ve ark. iskemik ardkoşullama adını verdikleri, iskemi sonrası reperfüzyon başlangıcında kısa IR periyotlarından oluşan ve köpek kalp modelinde infarkt alanında önemli küçülme oluşturan kalp koruyucu bir fenomen tanımladılar.<sup>10</sup> Çalışmamızda reperfüzyonun 1. dakikasında ardkoşullama algoritmine başlayarak vasküler klemp ile 30 saniye iskemi oluşturup, takip eden 30 saniye süreyle reperfüzyon yapıldı. Ardından ikinci kez 30 saniye süre ile iskemi ve 30 saniye reperfüzyon yapıldıktan sonra üçüncü ve son olarak 30 saniye iskemi oluşturulduktan sonra 60 dakika süreyle reperfüzyon uygulandı. IR grubu ile IRAK grubu arasında yapılan istatistiksel analizde nötrofil sayısı, konjesyon, interstisyel ödem ve doku hasarı açısından anlamlı farklılık saptandı, bu iskemik ardkoşullamanın etkinliğini göstermiştir.

Deney hayvanlarında iskemik önkoşullama ve ardkoşullama ile elde edilen korumanın opioid reseptör antagonisti olan naloksan ile blokajı, opioidlerin önkoşullamaya bağlı korumada rol aldıklarını düşündürmektedir. Bu etki delta reseptörleri üzerinden gerçekleşir.<sup>11,12</sup> Min ve ark. opioid reseptörlerinin interselüler adezyon molekülü (ICAM-1) yolunu kullandıklarını kanıtlamak için deneklere 0.3, 3 ve 30  $\mu$ mol morfin vermişlerdir.<sup>13</sup> Biz de deneklerimize 3 ve 30  $\mu$ mol morfin verdik ve IR hasarı üzerine etkilerini araştırdık.

Akciğerde oluşan IR hasarını gösterme yöntemlerinden biri de, histopatolojik preparatların hematoksilen-eozin ile boyandıktan sonra ışık mikroskopuyla incelenmesidir.<sup>6</sup> Çalışmamızda hematoksilen-eozin ile boyamada ışık mikroskopunda akciğer dokusundaki nötrofil sayısı, konjesyon, interstisyel ödem, VEGF ve EGFR ile pozitif boyanan hücreler yarı nicel olarak değerlendirildi.

Çalışmamızda hem ardkoşullama uygulanan hem de özellikle 3 µmol dozda verilen morfin grubunun iskemi reperfüzyona bağlı oluşan doku hasarının engellenmesinde önemli etkiye sahip olduğu görülmüştür. Ardkoşullama uygulanan gruplar ile morfin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında IRAK30 grubunda interstisyel ödemin ve doku hasarının IRAK grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede daha az olduğu saptandı.

Epidermal büyüme faktörü farklılaşma ve büyümeyi etkileyerek organizmanın gelişiminde rol oynar. Çeşitli epitelyum hücre kültürlerinde EGFR'nin büyümeyi, çoğalmayı ve farklılaşmayı artırdığı gösterilmiştir.<sup>14</sup> VEGF alveol epitel hücrelerinden salınan bir glikoproteindir, vasküler geçirgenliği indükler ve önemli bir anjiogenez düzenleyicisidir. VEGF salınımına etkili faktörler hipoksi, inflamatuvar sitokinler, reaktif oksijen radikalleri, nitrik oksit ve hormonlardır. Hipoksi anjiogenez için potent bir stimulatördür, özellikle en önemli aktivatör olan VEGF'yi stimüle eder.<sup>15,16</sup> Çalışmamızda iskemi reperfüzyon periyodunun önemli aktörleri olan hipoksi, inflamatuvar sitokinler ve reaktif oksijen radikallerinin EGFR ve VEGF üzerine olan etkileri, ayrıca iskemik ardkoşullama ve

morfin uygulanması ile bu faktörlerdeki değişimini saptamaya çalıştık. Histopatolojik incelemede IR grubu ile IRAK3, IRAK30 grupları arasında VEGF (+) boyanan ve EGFR (+) boyanan hücre sayısı skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanırken IR grubu ile IRAK grubu arasında anlamlı fark saptanmadı.

Sonuç olarak iskemi reperfüzyon periyodunda iskemik ardkoşullama ve morfin sulfat uygulanmasının histopatolojik değerlendirilmesinde, iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesinde ard koşullamadan çok morfin sulfat verilmesinin daha etkin bir yöntem olduğu saptanmıştır.

### Çıkar Çatışması

*Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması veya finansal destek bildirmemiştir.*

### Yazar Katkısı

**Çalışmanın tamamının yazılmasında sorumluluk almak;** Nuri DÜZGÜN, **Araştırma ve makalenin hipotezini ve fikrini oluşturmak;** Hıdır ESME, **Hastalar ile ilgili biyolojik materyallerin toplanması, verilerin düzenlenmesi ve raporlanması;** Pınar KARABAĞLI, **İstatistiksel bulguların mantıklı bir şekilde değerlendirilerek sonuçlandırılması;** Mehmet Sinan İYİSOY, **Çalışma için gerekli kaynak taramasında sorumluluk alma katkısında bulunmuşlardır;** Melike DURAN.

## KAYNAKLAR

1. Nakamura T, Vollmar B, Winning J, Ueda M, Menger MD, Schäfers HJ. Heparin and the nonanticoagulant N-acetyl heparin attenuate capillary no-reflow after normothermic ischemia of the lung. *Ann Thorac Surg* 2001;72(4):1183-8.
2. Levinson RM, Shure D, Moser KM. Reperfusion pulmonary edema after pulmonary artery thromboendarterectomy. *Am Rev Respir Dis* 1986;134(6):1241-5.
3. Vural KM, Oz MC. Endothelial adhesivity, pulmonary hemodynamics and nitric oxide synthesis in ischemia-reperfusion. *Eur J Cardiothorac Surg* 2000;18(3):348-52.
4. Zhang Y, Irwin MG, Wong TM. Remifentanyl preconditioning protects against ischemic injury in the intact rat heart. *Anesthesiology* 2004;101(4):918-23.
5. Zhang Y, Chen ZW, Girwin M, Wong TM. Remifentanyl mimics cardioprotective effect of ischemic preconditioning via protein kinase C activation in open chest of rats. *Acta Pharmacol Sin* 2005;26(5):546-50.
6. Tassiopoulos AK, Carlin RE, Gao Y, Pedoto A, Finck CM, Landas SK, et al. Role of nitric oxide and tumor necrosis factor on lung injury caused by ischemia/reperfusion of the lower extremities. *J Vasc Surg* 1997;26(4):647-56.
7. de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167(4):490-511.
8. Follette DM, Fey K, Buckberg GD, Helly JJ Jr, Steed DL, Foglia RP, et al. Reducing postischemic damage by temporary modification of reperfusate calcium, potassium, pH, and osmolarity. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1981; 82(2):221-38.
9. Braunwald E, Kloner RA. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest* 1985;76(5):1713-9.
10. Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Zatta AJ, Kin H, Halkos ME, Kerendi F. Postconditioning-- A new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 2005;100(4):295-310.
11. Schulz R, Gres P, Heusch G. Role of endogenous opioids in ischemic preconditioning but not in short-term hibernation in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280(5): H2175-81.

12. Aitchison KA, Baxter GF, Awan MM, Smith RM, Yellon DM, Opie LH. Opposing effects on infarction of delta and kappa opioid receptor activation in the isolated rat heart: implications for ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol* 2000;95(1):1-10.
13. Min TJ, Kim JI, Kim JH, Noh KH, Kim TW, Kim WY, et al. Morphine postconditioning attenuates ICAM-1 expression on endothelial cells. *J Korean Med Sci* 2011;26(2):290-6.
14. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Annu Rev Biochem* 1979;48:193-216.
15. Tanaka F, Ishikawa S, Yanagihara K, Miyahara R, Kawano Y, Li M, et al. Expression of angiopoietins and its clinical significance in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2002;62(23):7124-9.
16. Eriksson P, Brattström D, Hesselius P, Larsson A, Bergström S, Ekman S, et al. Role of circulating cytokeratin fragments and angiogenic factors in NSCLC patients stage IIIa-IIIb receiving curatively intended treatment. *Neoplasma* 2006;53(4):285-90.