



## UvA-DARE (Digital Academic Repository)

### Nitric oxide in focal cerebral ischemia, an experimental study

Coert, B.A.

**Publication date**  
2008

[Link to publication](#)

#### **Citation for published version (APA):**

Coert, B. A. (2008). *Nitric oxide in focal cerebral ischemia, an experimental study*. [Thesis, fully internal, Universiteit van Amsterdam].

#### **General rights**

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

#### **Disclaimer/Complaints regulations**

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

## SAMENVATTING

In vivo modellen zijn een belangrijk instrument bij het onderzoeken van de pathofysiologie van focale cerebrale ischemie en het testen van mogelijke behandelingen. Het ratten arteria cerebri media occlusie (MCAo) model is een veel gebruikt model dat tijdelijke arteriële occlusie tijdens vasculaire operaties simuleert. Reproduceerbaarheid van het infarct in dit MCAo model in de rat bleek afhankelijk te zijn van de duur van afsluiting<sup>9</sup>, anesthesie techniek<sup>39</sup>, temperatuur<sup>15</sup>, bloeddruk<sup>46</sup>, serum bloedglucose waarde<sup>38</sup>, ras<sup>19,29</sup> en histologische techniek. De interactie tussen deze factoren wordt geïllustreerd door effecten van de anesthesie middelen halothaan en isofluraan<sup>39</sup>. Terwijl enerzijds het beschermende effect van narcose middelen wordt toegeschreven aan een verlaging van het metabolisme, veroorzaken deze middelen in hogere doseringen een toename van het infarct door een verlaging van de bloeddruk en dientengevolge de collaterale bloedstroom. Aandacht voor fysiologische parameters als hersentemperatuur, en bloeddruk in combinatie met informatie over anesthesie techniek kan helpen de resultaten van experimentele hersen ischemie studies beter te interpreteren.

Experimenteel kan de ernst van hersen ischemie worden vergroot door het verlengen van de duur van afsluiting of door reductie van de collaterale bloedstroom. Met het Tamura model, een model voor focale cerebrale ischemie in de rat ontwikkelde 60% van de dieren na 1 uur occlusie geen corticaal infarct (hoofdstuk 2)<sup>9</sup>. Toevoeging van bilaterale carotis communis occlusie resulteerde in een reductie tot 25%. Verlenging van de occlusie tijd tot 3 uur resulteerde in een infarct in 88% van de dieren (hoofdstuk 2)<sup>9</sup>. Uiteindelijk bleek de omvang van het corticale infarct na 3 uur arteria cerebri media met bilaterale arteria carotis communis occlusie gelijk te zijn aan de waarde gevonden voor permanente media afsluiting (hoofdstuk 2)<sup>9</sup>. Het infarct in het media stroomgebied veroorzaakte geen ernstige neurologische beperkingen<sup>41</sup>, maar bij deze techniek wordt ten behoeve van de craniotomie de kaak geluxeerd waardoor het proefdier na de operatie moeilijker kan eten. De reperfusie periode werd beperkt tot 3 dagen omdat er na 7 dagen 24 % gewichtsverlies was. Reproduceerbaarheid is een groot probleem bij herseninfarct modellen. Pogingen om deze reproduceerbaarheid te verbeteren zullen resulteren in een reductie van het vereiste aantal proefdieren. In onze experimenten produceerde 3 uur arteria cerebri media en bilaterale arteria carotis communis occlusie een corticaal infarct van 83 mm<sup>3</sup> (gemiddeld) in mannelijke Wistar ratten onder (1%) halothaan narcose en normocapnische, normotensieve, normotermie en normoxische omstandigheden.

Studies over de cascade van gebeurtenissen bij cerebrale ischemie hebben geresulteerd in de identificatie van een glutamaat geactiveerde NMDA receptor gemedieerde transmembraan calcium stroom de cel in<sup>8</sup>. De activatie van calcium afhankelijke enzymen mediëert de verdere schadelijke effecten. De stikstofoxide synthase (NOS) iso-enzymen

zijn belangrijke calcium afhankelijke enzymen<sup>34</sup> gelokaliseerd in respectievelijk in neuronen (nNOS), endotheel (eNOS) en glia cellen en macrofagen (iNOS). Het belang van de ontdekking van stikstofoxide als signaal overbrengend molecuul in het cardiovasculaire systeem werd bevestigd met een Nobelprijs in 1998. Onder pathologische omstandigheden zoals bij hersen ischemie wordt het NOS systeem overgeactiveerd en mediëert stikstofoxide NMDA toxiciteit<sup>34</sup>. Omdat de halfwaarde tijd van stikstofoxide kort is zijn directe metingen technisch moeilijk. Directe en indirecte metingen hebben piekconcentraties geconstateerd kort na het ontstaan van ischemie<sup>23,26</sup>. Meer indirecte aanwijzingen over de rol van stikstofoxide in cerebrale ischemie komen van studies met NOS remmers en stikstofoxide donoren. Het effect van niet iso-enzym specifieke NOS remmers wisselt van beschermend tot schadelijk, waarbij het effect dosis afhankelijk is<sup>5</sup>. Meer consistente resultaten werden gevonden met iso-enzym specifieke remmers. Aspecifieke bijeffecten van deze remmers konden worden uitgesloten als mogelijke verklaring voor de werking door middel van studies met proefdieren waarbij dit enzym specifiek door genetische manipulatie was uitgeschakeld; een zogenaamde "knock-out". Proefdieren die het nNOS enzym misten ontwikkelden kleinere infarcten, wat indirect de schadelijkheid van stikstofoxide uit in vitro studies bevestigt<sup>10</sup>. Behandeling met stikstofoxide donoren anderzijds kan ischemische schade reduceren in vivo als hypotensie wordt vermeden<sup>44</sup>. Directe vergelijking van de effecten tussen NOS remmers en stikstofoxide donoren werd bemoeilijkt door belangrijke verschillen in de gebruikte modellen en gekozen experimentele parameters. In een model dat ischemie simuleert gedurende tijdelijke arteriële occlusies bij neurovasculaire operaties werd het dosis-afhankelijke effect getest van twee verschillende NOS remmers en twee stikstofoxide donoren. Niet selectieve NOS remmer L-NAME reduceerde het corticale infarct volume significant in de midden dosis (1.0 mg/kg) groep, terwijl selectieve nNOS remmer 7-NI beschermend was bij hogere dosis (10 en 100 mg/kg). In hogere dosis verloor L-NAME zijn beschermende effect wat wordt toegeschreven aan eNOS gemediëerde reductie van de collaterale bloedstroom. In vergelijking met de controle groep reduceerde 7-NI het infarct volume met 92% (hoofdstuk 3, fig 1) waaraan het sederende effect van 7-NI kan hebben bijgedragen. De anti-ischemische vaatverwijdende werking van stikstofoxide donoren werd al een eeuw geleden voor het eerst gerapporteerd<sup>7</sup> voor acute coronaire syndromen en wordt tot op de dag van vandaag gebruikt. In ons model van focale cerebrale ischemie werd een trend gezien in de richting van reductie van het infarct volume bij behandeling met stikstofoxide donoren maar deze reductie was niet significant (hoofdstuk 3, fig 1)

Polyamines met een stikstofoxide donerende werking reduceren ischemische schade in experimentele focale cerebrale ischemie<sup>33</sup>. Onder normale (fysiologische) omstandigheden reguleren polyamines zoals spermine, putrescine en spermidine belangrijke celfuncties als  $Ca^{2+}$  transport<sup>21,25</sup> en stikstofoxide productie via NOS<sup>20</sup> en het onschadelijk maken

van vrije radicalen<sup>21</sup>. De rol van polyamines in de pathofysiologie van het herseninfarct is onduidelijk. Gereduceerde spermine concentraties werden gevonden bij experimentele focale cerebrale ischemie<sup>31,35</sup>. Behandeling met spermine veroorzaakte een reductie van ischemische schade in experimentele, meer globale hersen ischemie<sup>13</sup>. Om de beschermende werking van het spermine deel te testen op een wijze die vergelijking met eerdere experimenten met NOS remmers en stikstofoxide donoren mogelijk maakt werd hetzelfde model van 3 uur arteria cerebri media met bilaterale arteria carotis communis occlusie gebruikt. Behandeling met spermine in de dosering van 10 mg/kg intraveneus resulteerde in een significante reductie van het corticale infarct. Dit effect was meer uitgesproken dan dat van de behandeling met beide stikstofoxide donoren in hoofdstuk 3. De behandeling met spermine veroorzaakte een significante reductie in de serum glucose waarden van ongeveer 30% en een reductie in het lactaat gehalte. Mogelijke verklaringen voor het beschermende effect van spermine zijn dan ook: hypoglycemie, directe werking op de NMDA receptor<sup>28</sup> en remming van het nNOS enzym<sup>20</sup>. De beschermende werking van 10 mg/kg spermine benadert het effect van selectieve nNOS remming met 7-NI (hoofdstuk 3). Met behulp van studies met combinaties van spermine en NOS remmers en of stikstofoxide donoren kan worden getracht het mechanisme van dit effect verder vast te stellen.

Selectieve depletie of remming van het neuronale NOS enzym resulteert in een reductie van het corticale infarct volume, terwijl niet iso-enzym specifiek remmen van het NOS enzym in een meer complex, dosis en tijdsafhankelijk effect resulteert<sup>27,45</sup>. De bevinding dat de ernst van het ischemische incident de effectiviteit van neuroprotectie lijkt te bepalen van NOS remmers<sup>2,16</sup>, gecombineerd met gegevens over de bifasische pH gevoeligheid van het NOS enzym<sup>14,24,32</sup> heeft geleid tot de hypothese dat de neuroprotectieve werking van nNOS remming afhankelijk is van de intracellulaire pH<sup>4</sup>. Door middel van de serum glucose waarden kan de intracellulaire pH gedurende ischemie worden beïnvloed<sup>4</sup>. Het is mogelijk dat hyperglycemie op andere wijze dan middels de versterkte acidose de ischemische schade beïnvloedt. Hyperglycemie met serum glucose waarden van 20 mmol/l en milde hypoglycemie, met serum glucose waarden van 5 mmol/l, werden gebruikt om de intracellulaire acidose tijdens ischemie te beïnvloeden. Het resultaat hiervan was dat onder hyperglycemische omstandigheden het infarct toenam (met gemiddeld 77%) terwijl milde hypoglycemie resulteerde in een reductie (van gemiddeld 80%) van het infarct volume. In vivo fluorescentie beeldvormende technieken werden gebruikt om de intracellulaire pH, rCBF (regionale cerebrale bloedstroom) en de NAD<sup>+</sup>/NADH ratio te bestuderen<sup>3</sup>. In verband met deze in vivo fluorescentie techniek werd de occlusie tijd aangepast naar 2 uur. Het gemiddelde corticale infarct volume veranderde hierop niet significant in vergelijking met het 3 uurs schema. In de normoglycemische groep (gemiddelde serum glucose waarde van 9 mmol/l) daalde de intracellulaire pH gedurende de 2 uur occlusie van 7.0 naar 6.6. In de hyperglycemische groep werd de pH

6.1 en in de mild hypoglycemische groep 6.8. Onder hyperglycemische omstandigheden werd een reductie van het infarct volume van 28 % bereikt met selectieve nNOS remming met 7-NI (100 mg/kg), terwijl dat onder normo- en hypoglycemische omstandigheden respectievelijk 93 en 73% was. Uit in vitro studies over de pH gevoeligheid van het NOS enzym<sup>14,17,32</sup> blijkt dat binnen het geobserveerde pH bereik de enzym activiteit (van nNOS) aanzienlijk varieert. Bij herstel van de pH werd door Wei en Quast de verwachte toename in NOS activiteit gemeten<sup>40</sup>. De resultaten van deze studie ondersteunen de hypothese dat het neuroprotectieve effect van selectieve nNOS remming afhankelijk is van de intracellulaire pH.

Het gunstige effect van behandeling met stikstofoxide donoren bij experimentele herseninfarcten is eerder beschreven<sup>42-44</sup>. Stikstofoxide donoren zoals SIN-1 worden gebruikt in de interventie cardiologie in verband met het vaatverwijdende effect<sup>36</sup>. De stikstofoxide afgifte van deze stof wordt beïnvloed door het zuurstof gehalte en de zuurgraad, maar is intact zelfs onder ischemische omstandigheden<sup>6</sup>. Het gebruik van een stikstofoxide donor toegediend in een enkele gift resulteerde in een tijdelijke bloeddruk daling die spontaan herstelde binnen 30 minuten (voor de aanvang van de occlusie). Om de relatie tussen de rol van stikstofoxide en de intracellulaire pH in focale cerebrale ischemie verder te onderzoeken werd opnieuw naast normoglycemische omstandigheden gewerkt met hyperglycemie en milde hypoglycemie (als in hoofdstuk 5). Het effect van behandeling met een stikstofoxide donor werd bestudeerd onder de verschillende omstandigheden. Zoals in het vorige hoofdstuk (5) werd opnieuw in vivo fluorescentie<sup>3</sup> gebruikt voor berekening van de pHi, rCBF, en NAD<sup>+</sup>/NADH ratio met aanpassing van het experimentele schema naar 2 uur arteria cerebri media en bilaterale carotis communis occlusie. De zuurgraad die werd bereikt varieerde van 6.6 onder normoglycemische omstandigheden tot 6.1 bij hyperglycemie (serumglucose 20 mmol/l) en 6.6 onder mild hypoglycemische omstandigheden (serumglucose 5 mmol/l). Behandeling met SIN-1 beïnvloedde het serum glucose gehalte niet (hoofdstuk 6, tabel 1). Onder normo- en hyperglycemische omstandigheden reduceerde stikstofoxide donor SIN-1 het corticale infarct volume significant, in tegenstelling tot eerdere experimenten in hoofdstuk 3, waarin de reductie niet significant was bij 3 uur MCA en bilaterale CCA occlusie (hoofdstuk 3, fig 1D). De reductie van het infarct door SIN-1 was het meest uitgesproken in de normoglycemische groep. In de mild hypoglycemische groep was de reductie niet significant (hoofdstuk 6, fig 2). Deze resultaten passen bij de gegevens over de pH gevoeligheid van het NOS enzym<sup>14,17,32</sup>. We kunnen concluderen dat onder acidotische omstandigheden als het eigen NOS minder actief is het effect van exogeen stikstofoxide blijft bestaan.

Aandacht voor details in het kiezen van experimentele parameters kan helpen de reproduceerbaarheid van experimentele modellen te vergroten. De variabelen als occlusie tijd,

collaterale bloedstroom en serum glucose waarden kunnen belangrijke veranderingen veroorzaken in het infarct volume. De vertaling van experimentele resultaten uit het lab naar de kliniek is moeilijk gebleken<sup>37</sup>. Er wordt meer aandacht gevraagd voor de farmakokinetiek, bepalen van doseringen, keuze van het experimentele model en uitkomst parameters<sup>1</sup>. Verbeteringen hierin zullen hopelijk leiden tot meer klinisch bruikbare kennis vanuit het laboratorium.

De complexe rol van stikstofoxide onder fysiologische omstandigheden en in de ontwikkeling van het herseninfarct in combinatie met de zeer beperkte periode van mogelijk ingrijpen maakt stikstofoxide een onaantrekkelijk doelwit voor behandeling. Het bewijs voor een belangrijke rol van de activatie van het stikstofoxide synthase (NOS) enzym in de pathofysiologie van het herseninfarct is overtuigend. Tot de dag van vandaag is direct kwantificeren van stikstofoxide technisch moeilijk. Met behulp van stikstofoxide donoren en NOS remmers kan de rol stikstofoxide worden bestudeerd op een meer indirecte wijze. De resultaten van deze indirecte studies moeten voorzichtig worden geïnterpreteerd omdat een deel van het effect niet gemedieerd hoeft te zijn via stikstofoxide zoals uit de spermine experimenten uit hoofdstuk 4 bleek. De verminderde effectiviteit van selectieve neuronale NOS remmers bij ernstigere ischemie kan goed worden verklaard met de pH gevoeligheid van het NOS enzym. Bij ernstigere ischemie zal meer uitgesproken acidose ontstaan, waaronder het NOS enzym in activiteit is geremd. Neuronale NOS remming bleek geen invloed te hebben op de postischemische lactaat productie en het herstel van andere energie gerelateerde metabolieten<sup>18</sup>. Het beschermende effect van exogeen stikstofoxide bleef ook bij lagere pH waardes aanwezig. Dit beschermende effect werd in 2006 opnieuw bevestigd in een studie met de stikstofoxide donor natrium nitriet<sup>22</sup>. De aandacht is verschoven van het neuronale iso-enzym naar de andere iso-enzymen. Zo werd in een studie het beschermende effect van oestrogenen op hersen ischemie bij vrouwen gerelateerd aan verminderde iNOS expressie<sup>30</sup>. Anderzijds lijkt de beschermende werking van regelmatige lichaamsbeweging op cardiovasculaire gebeurtenissen en het herseninfarct gemedieerd te zijn door versterkte eNOS activiteit<sup>12</sup>. Het beschermende effect van de angiotensine II type 1 (AT-1) receptor remmer candesartan en HMG coA (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coA) reductase remmer rosuvastatine lijkt ook tenminste deels te zijn gemedieerd door versterkte eNOS activiteit<sup>11</sup>. Stikstofoxide heeft een centrale rol in de pathofysiologie van het herseninfarct maar medieert ook de beschermende effecten van bijvoorbeeld oestrogenen, statines en regelmatige lichaamsbeweging. De pH gevoeligheid van het NOS enzym levert een goede verklaring voor de geobserveerde gereduceerde cerebroprotectiviteit van nNOS remming bij ernstigere ischemie en hyperglycemie. Verdere toenames van kennis over dit mechanisme en de rol van stikstofoxide onder fysiologische en pathologische omstandigheden kunnen een belangrijk startpunt zijn voor de ontwikkeling van nieuwe behandelingen in de toekomst.

## REFERENTIES

1. Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* 30:2752-2758, 1999
2. Anderson RE, Meyer FB: Is intracellular brain pH a dependent factor in NOS inhibition during focal cerebral ischemia? *Brain Res* 856:220-226, 2000
3. Anderson RE, Meyer FB, Tomlinson FH: Focal cortical distribution of blood flow and brain pHi determined by in vivo fluorescent imaging. *Am J Physiol* 263:H565-575, 1992
4. Anderson RE, Tan WK, Martin HS, Meyer FB: Effects of glucose and PaO<sub>2</sub> modulation on cortical intracellular acidosis, NADH redox state, and infarction in the ischemic penumbra. *Stroke* 30:160-170, 1999
5. Ashwal S, Cole DJ, Osborne TN, Pearce WJ: Dual effects of L-NAME during transient focal cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 267:H276-284, 1994
6. Bohn H, Schonafinger K: Oxygen and oxidation promote the release of nitric oxide from sydnonimines. *J Cardiovasc Pharmacol* 14 Suppl 11:S6-12, 1989
7. Brunton T: Use of nitrite of amyl in angina pectoris. *Lancet* 2:97-98, 1867
8. Choi DW: Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1:623-634, 1988
9. Coert BA, Anderson, R.E., Meyer, F.B.: Reproducibility of Cerebral Cortical Infarction in the Wistar Rat After Middle Cerebral Artery Occlusion. *J Stroke and Cerebrovasc Dis* 8:380-387, 1999
10. Dawson VL, Dawson TM, Bartley DA, Uhl GR, Snyder SH: Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J Neurosci* 13:2651-2661, 1993
11. Engelhorn T, Doerfler A, Heusch G, Schulz R: Reduction of cerebral infarct size by the AT<sub>1</sub>-receptor blocker candesartan, the HMG-CoA reductase inhibitor rosuvastatin and their combination. An experimental study in rats. *Neurosci Lett* 406:92-96, 2006
12. Gertz K, Priller J, Kronenberg G, Fink KB, Winter B, Schrock H, et al: Physical Activity Improves Long-Term Stroke Outcome via Endothelial Nitric Oxide Synthase-Dependent Augmentation of Neovascularization and Cerebral Blood Flow. *Circ Res*, 2006
13. Gilad GM, Gilad VH: Polyamines can protect against ischemia-induced nerve cell death in gerbil forebrain. *Exp Neurol* 111:349-355, 1991
14. Gorren AC, Schrammel A, Schmidt K, Mayer B: Effects of pH on the structure and function of neuronal nitric oxide synthase. *Biochem J* 331 ( Pt 3):801-807, 1998
15. Goto Y, Kassell NF, Hiramatsu K, Soleau SW, Lee KS: Effects of intras ischemic hypothermia on cerebral damage in a model of reversible focal ischemia. *Neurosurgery* 32:980-984; discussion 984-985, 1993
16. Harukuni I, Traystman RJ, Kirsch JR: Effect of AR-R 17477, a potent neuronal nitric oxide synthase inhibitor, on infarction volume resulting from permanent focal ischemia in rats. *Crit Care Med* 27:2508-2511, 1999
17. Hecker M, Mulsch A, Busse R: Subcellular localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase. *J Neurochem* 62:1524-1529, 1994
18. Helps SC, Sims NR: Inhibition of Nitric Oxide Synthase with 7-Nitroindazole does not Modify Early Metabolic Recovery Following Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Neurochem Res*, 2006

19. Herz RC, Jonker M, Verheul HB, Hillen B, Versteeg DH, de Wildt DJ: Middle cerebral artery occlusion in Wistar and Fischer-344 rats: functional and morphological assessment of the model. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:296-302, 1996
20. Hu J, Mahmoud MI, el-Fakahany EE: Polyamines inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Neurosci Lett* 175:41-45, 1994
21. Jensen JR, Lynch G, Baudry M: Polyamines stimulate mitochondrial calcium transport in rat brain. *J Neurochem* 48:765-772, 1987
22. Jung KH, Chu K, Ko SY, Lee ST, Sinn DI, Park DK, et al: Early intravenous infusion of sodium nitrite protects brain against in vivo ischemia-reperfusion injury. *Stroke* 37:2744-2750, 2006
23. Kader A, Frazzini VI, Solomon RA, Trifiletti RR: Nitric oxide production during focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 24:1709-1716, 1993
24. Kuluz JW, Prado RJ, Dietrich WD, Schleien CL, Watson BD: The effect of nitric oxide synthase inhibition on infarct volume after reversible focal cerebral ischemia in conscious rats. *Stroke* 24:2023-2029, 1993
25. Lenzen S, Munster W, Rustenbeck I: Dual effect of spermine on mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport. *Biochem J* 286 ( Pt 2):597-602, 1992
26. Malinski T, Bailey F, Zhang ZG, Chopp M: Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:355-358, 1993
27. Margaiil I, Allix M, Boulu RG, Plotkine M: Dose- and time-dependence of L-NAME neuroprotection in transient focal cerebral ischaemia in rats. *Br J Pharmacol* 120:160-163, 1997
28. Munir M, Subramaniam S, McGonigle P: Polyamines modulate the neurotoxic effects of NMDA in vivo. *Brain Res* 616:163-170, 1993
29. Oliff HS, Weber E, Eilon G, Marek P: The role of strain/vendor differences on the outcome of focal ischemia induced by intraluminal middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain Res* 675:20-26, 1995
30. Park EM, Cho S, Frys KA, Glickstein SB, Zhou P, Anrather J, et al: Inducible nitric oxide synthase contributes to gender differences in ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:392-401, 2006
31. Paschen W, Csiba L, Rohn G, Bereczki D: Polyamine metabolism in transient focal ischemia of rat brain. *Brain Res* 566:354-357, 1991
32. Riveros-Moreno V, Heffernan B, Torres B, Chubb A, Charles I, Moncada S: Purification to homogeneity and characterisation of rat brain recombinant nitric oxide synthase. *Eur J Biochem* 230:52-57, 1995
33. Salom JB, Orti M, Centeno JM, Torregrosa G, Alborch E: Reduction of infarct size by the NO donors sodium nitroprusside and spermine/NO after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 865:149-156, 2000
34. Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL: Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* 28:1283-1288, 1997
35. Sauer D, Martin P, Allegrini PR, Bernasconi R, Amacker H, Fagg GE: Differing effects of alpha-difluoromethylornithine and CGP 40116 on polyamine levels and infarct volume in a rat model of focal cerebral ischaemia. *Neurosci Lett* 141:131-135, 1992



36. Serruys PW, Deckers JW, Lijten HE, Reiber JH, Tijssen JG, Chadha D, et al: Long-acting coronary vasodilatory action of the molsidomine metabolite Sin 1: a quantitative angiographic study. *Eur Heart J* 8:263-270, 1987
37. Shuaib A: Neuroprotection - STAIR-Way to the Future? *Cerebrovasc Dis* 22 Suppl 1:10-17, 2006
38. Tan WK, Anderson, R.E., Meyer, F.B.: Glucose and PaO<sub>2</sub> modulation of cerebral metabolic responses following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:S303, 1997
39. Warner DS, Ludwig PS, Pearlstein R, Brinkhous AD: Halothane reduces focal ischemic injury in the rat when brain temperature is controlled. *Anesthesiology* 82:1237-1245; discussion 1227A, 1995
40. Wei J, Quast MJ: Effect of nitric oxide synthase inhibitor on a hyperglycemic rat model of reversible focal ischemia: detection of excitatory amino acids release and hydroxyl radical formation. *Brain Res* 791:146-156, 1998
41. Yamamoto M, Tamura A, Kirino T, Shimizu M, Sano K: Behavioral changes after focal cerebral ischemia by left middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* 452:323-328, 1988
42. Zhang F, Iadecola C: Nitroprusside improves blood flow and reduces brain damage after focal ischemia. *Neuroreport* 4:559-562, 1993
43. Zhang F, Iadecola C: Reduction of focal cerebral ischemic damage by delayed treatment with nitric oxide donors. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:574-580, 1994
44. Zhang F, White JG, Iadecola C: Nitric oxide donors increase blood flow and reduce brain damage in focal ischemia: evidence that nitric oxide is beneficial in the early stages of cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:217-226, 1994
45. Zhang F, Xu S, Iadecola C: Time dependence of effect of nitric oxide synthase inhibition on cerebral ischemic damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:595-601, 1995
46. Zhu CZ, Auer RN: Graded hypotension and MCA occlusion duration: effect in transient focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:980-988, 1995