

## Nicotinamide의 투여가 일시적인 국소허혈로 유발된 흰쥐의 뇌경색에 미치는 영향

이민섭 · 안영준 · 최기용 · 강구  
강성식<sup>1</sup> · 정일영<sup>1</sup> · 이건재<sup>1</sup> · 김근우<sup>1</sup>

강원대학교 의과대학 병리학교실  
강원대학교병원 임상의학연구소

접 수 : 2005년 10월 31일  
게재승인 : 2006년 2월 27일

책임저자 : 강 구  
우 200-701 강원도 춘천시 효자 2동 192-1  
강원대학교 의과대학 병리학교실  
전화: 033-250-8841  
Fax: 033-242-7571  
E-mail: guk@kangwon.ac.kr

### Nicotinamide Reduces the Infarct Volume in a Rat Model of Transient Middle Cerebral Artery Occlusion

Min Sup Lee, Young Jun Ahn, Ki Young Choi, Gu Kang, Seong Sik Kang,<sup>1</sup>  
Il Young Cheong,<sup>1</sup> Kun Jai Lee<sup>1</sup> and Keun-Woo Kim<sup>1</sup>

Department of Pathology, Kangwon National University College of Medicine, <sup>1</sup>Kangwon National University Hospital Clinical Research Institute, Chunchon, Korea

**Background :** Cerebral ischemia depletes ATP and causes irreversible tissue injury. Nicotinamide is a precursor of NAD<sup>+</sup> and it is also a poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor that increases the neuronal ATP concentration and so protects against stroke. Therefore we examined whether nicotinamide could protect against cerebral ischemia by using a model of transient middle cerebral artery occlusion (MCAO) (reperfusion 2 h post ischemia) in Sprague-Dawley rats. **Methods :** Nicotinamide (500 mg/kg) or normal saline was administered intraperitoneally 24 and 0 h before and after MCAO, respectively. The infarction volumes were determined with triphenyltetrazolium chloride staining 24 h after reperfusion. The nitrotyrosine, PARP polymer and PARP-1 expressions were examined by immunohistochemistry with using brain slices obtained from the rats that were sacrificed at 0, 15, 30, 60 and 120 min after reperfusion. **Results :** The infarction volumes were significantly attenuated (21.8%, p<0.05). The nitrotyrosine expressions were increased at 0, 15 and 30 min, and those expressions for PARP polymer and PARP-1 were increased at 60 and 120 min, respectively. Nicotinamide partly reduced the expressions for nitrotyrosine and PAR polymer except for PARP-1. **Conclusions :** These results suggest that nicotinamide may attenuate ischemic brain injury through its antioxidant activity and the inhibition of PARP-1.

**Key Words :** Nicotinamide; PARP-1; Nitrotyrosine; Brain ischemia

뇌졸중은 뇌혈관의 손상으로 갑자기 발생하고, 정상적인 신경 기능의 상실을 동반하는 뇌혈관 질환이다. 일단 손상을 받은 뇌 조직은 재생이 거의 불가능하며 평생 장애를 가지고 살아야 할 경우가 많다. 통계청의 발표에 따르면 2004년에 대한민국의 5대 사망원인은 암, 뇌혈관질환, 심장질환, 당뇨병, 자살이고 사망자 수가 14만 명(총사망자의 57%)으로 전체 사망자의 절반이상을 차지하고 있었다. 특히 뇌혈관 질환은 인구 10만 명당 70.3명으로 암 다음으로 흔한 사망원인으로 매우 중요한 질병이다(통계청, 2005).<sup>1</sup> 죽상경화증은 관상동맥질환과 더불어 뇌혈관질환의 중요한 원인이다. 뇌동맥이 죽상으로 좁아지고 혈전형성 및 색전으로 말초부의 혈관이 막히면 뇌졸중이 온다.

대뇌허혈을 유발하는 동물모델에서 전체뇌허혈법(global ischemia)과 국소허혈법(focal ischemia)이 있고, 또한 국소허혈

을 영구적으로 일으키는 방법과 일시적으로 일으키는 방법이 있다. 거의 모든 국소적인 뇌허혈 동물모델에서 중간대뇌동맥을 막는다. 이 모델은 전체뇌허혈법과 손상을 일으키는 방법이 다른데, 병터의 중심부에서도 전체뇌허혈법보다 혈류가 높아 뇌손상을 주는 데 더 많은 시간이 걸리고, 병터 중심부에서 가장 바깥경계부에 이르기까지 허혈 정도가 매우 달라서 손상 받은 부위 안의 대사조건에 상당한 차이가 있다. 손상을 일으키는 시간이 길고 병터가 균질하지 않지만 국소허혈법은 뇌졸중 연구에 매우 가치 있는 방법이어서 폭 넓게 사용되고 있다. 일시적 국소허혈법에 의한 뇌손상은 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)의 활성화, 자유기와 NO의 생성, 그리고 호중구의 축적에 달려 있기 때문에, 이들을 억제하면 허혈에 의한 뇌손상을 줄일 수 있는 것으로 알려져 있다. PARP는 재관류시 자유기의 급증으로

인한 DNA의 절단으로 즉시 활성화된다.<sup>2</sup>

Nicotinamide는 Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>)의 전구물질로 PARP 억제제로 작용하는 것으로 알려져 있다. DNA 가닥이 끊어지면 PARP가 활성화됨으로써 NAD<sup>+</sup>를 기질로 이용하여 poly (ADP-ribose) polymer를 합성하고 적절한 복구효소가 손상받은 DNA를 복구할 수 있게 한다. DNA 가닥이 너무 광범위하게 끊어지면 PARP가 과도하게 활성화되어 세포내 NAD<sup>+</sup> pool을 고갈시키는 것으로 생각된다. 하나의 NAD<sup>+</sup>를 재합성하는데 4분자의 ATP가 소모되므로 결과적으로 NAD<sup>+</sup>의 재합성은 세포의 ATP pool을 감소시킨다.<sup>3,4</sup> 실제로 Benza-mide 유도체와 같은 PARP 억제제가 뇌허혈에 의한 뇌손상을 악화시키는 데 중요한 역할을 한다는 것이 입증된 바 있다.<sup>5-8</sup> 만약 이것이 맞다면 Nicotinamide는 뇌의 NAD<sup>+</sup> 양을 증가시키거나 PARP 억제제로 작용하여 허혈로 인한 뇌손상을 막을 수 있을 것이다.<sup>2</sup>

연구자는 일시적인 중간대뇌동맥 폐쇄 모델을 이용하여 nicotinamide가 허혈로 인한 뇌손상을 감소시키는지 확인하고, 그 결과가 통계학적으로 의미가 있으면 PAR polymer, PARP, 그리고 Nitrotyrosine에 대한 조직면역화학검사로 그 기전을 알아보고자 하였다.

## 재료와 방법

### 실험동물과 수술

몸무게가 280-350 g인 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐 76마리를 사용하였다. 부드러운 톱밥을 깎 플라스틱 상자에 쥐를 2, 3마리씩 넣고, 항상 사료를 먹고 물을 마실 수 있도록 하였다. 실험과정은 대한의학회가 제정한 <동물실험지침>에 따랐다.

이소플루오렌(Isofluorene)으로 흡인마취를 시행하였으며, 중간선목절개로 해부현미경 하에서 오른쪽 온목동맥을 노출시키고, 온목동맥의 갈림에서 머리뼈바닥(skull base)까지 조심스럽게 주위의 신경과 근막을 박리하였다. 바깥목동맥과 온목동맥을 5-0 견사봉합사로 묶었다. 속목동맥을 그 주위의 미주신경에서 분리하고 작은 클립을 이용하여 속목동맥의 혈류를 차단하였다. 주위 조직에서 분리된 속목동맥을 5-0 견사봉합사로 아주 느슨하게 묶었다. 3-0 나일론 봉합사를 온목동맥의 갈림에서 속목동맥으로 약 17 mm 정도 넣은 후 속목동맥의 클립을 제거하고, 중간대뇌동맥의 근위부를 막히게 한 다음 속목동맥을 봉합사로 단단히 묶어 출혈을 방지하였다(Fig. 1). 목 절개 부위는 봉합사로 봉합하고, 쥐가 마취에서 깨어나면 플라스틱 상자에 돌려보냈다. 중간대뇌동맥을 나일론 봉합사로 막은 후 2시간 전에 한쪽으로 빙빙 도는 쥐만을 이 실험에 이용하였고, 그런 행동이 관찰되지 않은 쥐는 배제되었다. 중뇌동맥을 폐쇄한 지 2시간 후 수술한 쥐에게 흡인마취를 시킨 다음 동맥 내 나일론 봉합사를 제거

하였다.

수술하기 하루 전에 Nicotinamide (500 mg/kg)을 복강 내에 주입하고 중간대뇌동맥을 막은 후 바로 같은 양의 Nicotinamide를 주었다. 대조군은 같은 방법으로 생리적 식염수를 복강 내에 주입하였다. 중간대뇌동맥폐쇄(MCAO: middle cerebral artery occlusion) 후 재관류를 시행하고 24시간 안에 쥐들은 희생되었다. 뇌경색 부피를 측정하기 위하여 Nicotinamide를 준 군과 대조군으로 각각 12마리와 14마리(전체: 26마리)의 쥐를 이용하였다. 한편 재관류 후 뇌조직의 초기 변화(면역반응성의 변화)를 조사해 보기 위하여, 위에 서술한 방법으로 재관류 후 0, 15, 30, 60, 120분에 쥐를 희생시켰다. Nicotinamide를 준 군과 대조군에서 각 시간대마다 5마리(전체: 50마리)의 쥐를 사용하였다.

### 나일론 봉합사의 제조

3-0 나일론 봉합사를 2 cm 길이로 자른 다음 봉합사의 끝에서 약 1 mm 안을 실리콘(Xantopren VL plus, Heraeus Kulzer GmbH&Co.KG, Germany)으로 씌워 그 끝을 무디게 하였다. 그 반대쪽 끝의 1-2 mm 부위도 실리콘으로 씌워 봉합사를 두 겹께 하여 혈관 내로 들어가는 것을 방지하고 나중에 제거할 때 도움이 되게 하였다. 중간대뇌동맥을 막는 봉합사 부위는 날카로운 부분이 없게 하고 실 굵기의 50%를 초과하지 않게 하였다(Fig. 2).

### Triphenyltetrazolium chloride 염색

뇌의 허혈을 유발한 다음 재관류시키고 24시간 후에 Pentobarbital sodium 4 mg/kg을 쥐의 복강 내로 주사하여 마취하였다. 조심스럽게 뇌를 적출하여 뇌가 약간 단단해질 때까지 얼음 위에 두었다. 적출한 뇌를 절단틀(rat brain matrix, Harvard Bioscience, Inc., Holliston, MA, USA)에 올려놓고 면도칼을 이용하여 자른 2 mm 두께의 관상절편(coronal slices)을 24-well plate에 자른 순서대로 넣었다. 뇌의 절편이 든 plate에 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC, Sigma, Inc., St. Louis, MO, USA) 용액을 붓고 37°C에서 배양기에 약 10분간 염색한 후 4% 중성 포르말린으로 고정하였다.

### 뇌경색 병변의 부피 측정

TTC로 염색한 뇌 절편과 모눈종이를 점영상기(scanner, Microtek ScanMaker 4900, Taiwan) 위에 올려놓고 영상을 얻었다. Adobe Photoshop 5.5 (Adobe Systems Incorporated, USA)를 이용하여 JPEG 파일을 열고, 한계치를 조정하고 자동선택 도구로 원하는 부위를 선택하였다. 선택된 부위의 화소 값을 막대그래프 도구를 이용하여 구하였다. 뇌경색의 면적과 부피를 다음과 같은 방법으로 구하였다.

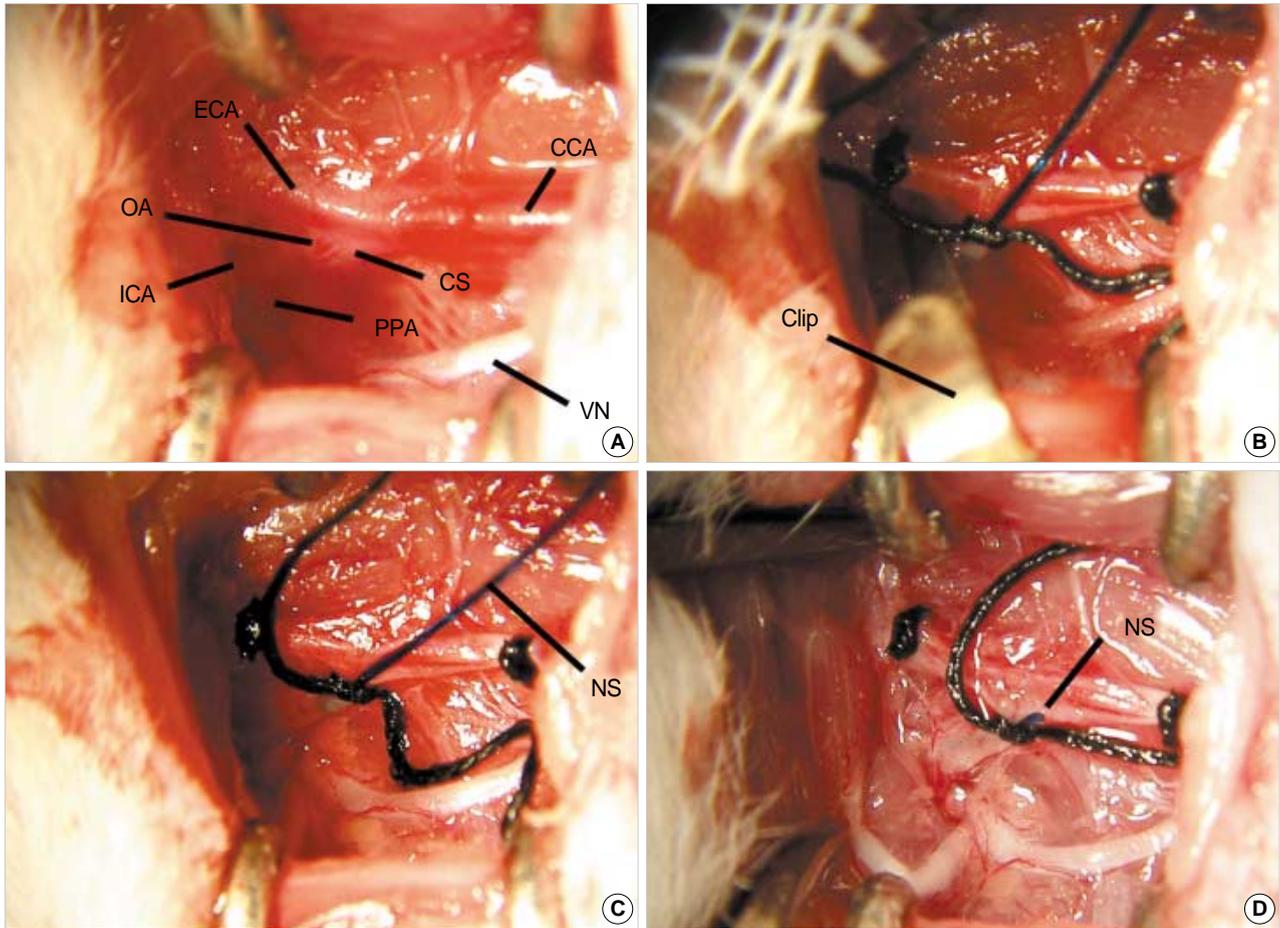


Fig. 1. Middle cerebral artery occlusion. (A) In each rat, an incision was made along the midline from the jaw to the sternum. The digastric muscle, tracheal muscle and omohyoid muscles were located and retracted. The head was turned 15 degrees to expose the right carotid artery. The external and internal carotid arteries were exposed. The occipital artery were electrocoagulated. (B) The common carotid and external carotid arteries were ligated with 5-0 black silk. The internal carotid and pterygopalatine arteries were temporarily closed with a mini vessel clip. A 3-0 nylon suture was introduced into the bifurcation area of the common carotid artery. (C, D) After removing the clip, the suture was advanced into the internal carotid artery for about 17 mm until it occluded the middle cerebral artery.

CCA, common carotid artery; CS, carotid sinus; ECA, external carotid artery; ICA, internal carotid artery; NS, nylon suture; OA, occipital artery; PPA, pterygopalatine artery; VN, vagus nerve.

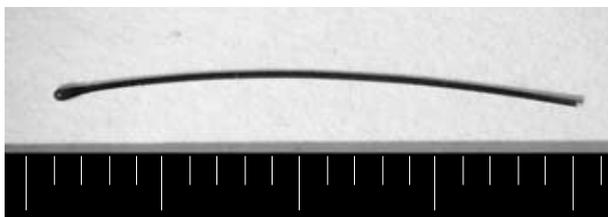


Fig. 2. 3-0 Nylon suture coated with silicone rubber (left end).

$$\text{면적(area, mm}^2\text{)} = (100 \times \text{측정된 면적의 화소 값}) / 100 \text{ mm}^2 \text{의 화소 값(모눈종이)}$$

$$\text{부종지수(edema index)} = \text{오른쪽 대뇌반구의 면적} / \text{왼쪽 대뇌반구의 면적}$$

$$\text{교정된 뇌경색 면적} = \text{측정된 뇌경색 면적} / \text{부종지수}$$

$$\text{부피(volume, mm}^3\text{)} = \text{교정된 뇌경색 면적의 합} \times 2$$

$$\% \text{ 뇌경색 부피} = \frac{\text{측정된 뇌경색 부피}}{\text{왼쪽 대뇌반구의 부피}} \times 100.$$

### 고정액의 관류

Pentobarbital sodium 4 mg/kg을 쥐의 복강내로 주사하여 마취한 후 흉벽을 제거하고 왼쪽 심실에서 대동맥 방향으로 18 게이지 주사바늘을 삽입하였다. 그 다음 오른쪽 심방귀를 가위로 절단한 뒤 연동펌프를 이용하여 50 mL/min의 속도로 phosphate buffered saline (PBS)을 관류시켜 혈액을 제거하였다. 그리고 나서 4% paraformaldehyde 용액 250-300 mL를 관류시켜 고정을 시행하였다. 제거된 뇌는 4°C에서 24시간 동안 4% paraformaldehyde 용액에 후고정을 시행한 다음 30% sucrose 용액에 4°C에서 하루 이상 방치하였다. 절제된 대뇌의 전두엽의

앞끝(frontal pole)에서 4 mm 떨어진 부위에서 8 mm 떨어진 부위까지를 동결절편기로 40 μm의 두께로 박절하였다. 그런 다음 보존액(cryoprotectant solution)이 들어 있는 24-well 배양기의 각 well에 순차적으로 반복하여 조직 절편을 넣은 후 영하 20°C에서 보존하였다.

**면역조직화학염색**

본 연구에 사용한 일차 항체는 단클론 항체인 PAR polymer (4335-MC-100, Trevigen, Germany)와 PARP-1 (ALX-804-210-R050, Alexis, USA), 그리고 다클론 항체인 Nitrotyrosine (#06-283, Upstate, NY, USA)이다. 이들을 각각 1:1,000, 1:1,000, 1:200으로 희석하여 사용하였다. 이차 항체는 biotinylated anti-mouse와 anti-rabbit immunoglobulin을 사용하였다.

면역조직화학 염색은 상기 보존액에 보관된 뇌조직을 이용하였으며 자유부유 면역조직화학법(free floating ABC법)으로 염색하였다. Vectastain ABC elite kit (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA)를 사용하였으며, 그 과정을 요약하면 다음과 같다. 조직 절편을 24-well 배양기에 5-10개씩 넣고, 교반기를 이용하여 0.05 M PBS 용액으로 10분씩 3회 세척하였다. 15-20분간 1.0% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 반응시키고 같은 방법으로 세척한 후 0.2% Triton X-100 용액에 20분 반응시키고 PBS 용액으로 세척하였다. 이어서 여기에 말 혈청과 정상 염소 혈청을 1:100으로 희석

시킨 차단항체를 실온에서 0.5-1시간 반응시킨 후 PBS 용액으로 세척하고, 24시간 동안 4°C에서 일차항체를 가한 후 PBS 용액으로 세척하였다. 그리고 2시간 동안 실온에서 이차 항체(horse anti-mouse IgG, goat anti-rabbit IgG, 1:100)를 가한 후 PBS 용액으로 세척하였다. Avidin-biotin peroxidase complex와 실온에서 1시간 반응시키고 PBS 용액으로 세척한 후 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)로 발색시켰다. 그 다음 조직 절편을 30분 전에 꺼내 놓은 gelatin coated slide에 올린 후 실온에서 2시간 동안 말렸다. 이어서 슬라이드를 증류수에 10분 동안 담근 후 알코올로 탈수시키고 크실렌으로 투명화한 후 캐나다 발삼으로 봉입하고 광학현미경으로 관찰하였다.

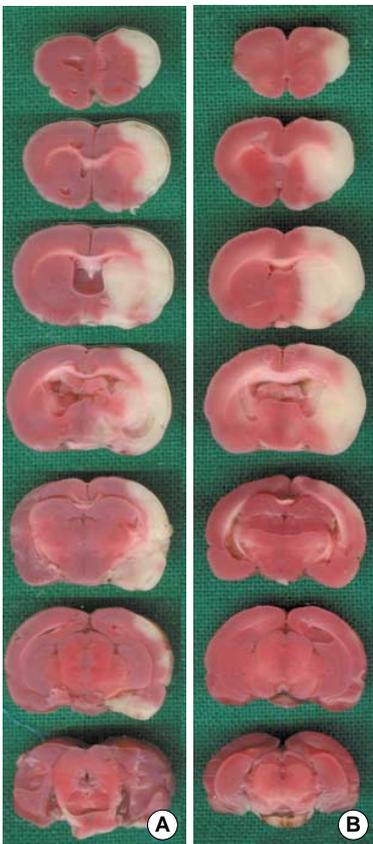
**자료 분석과 통계**

본 연구에 사용한 숫자는 평균치±SEM으로 이루어졌다. 각 군 및 아군 사이에서 뇌경색의 면적과 면역염색 차이는 t-검정 및 Mann-Whitney rank sum 검정으로 계산하였다. 통계학적으로 p 값이 0.05 이하면 의미 있는 것으로 간주하였다.

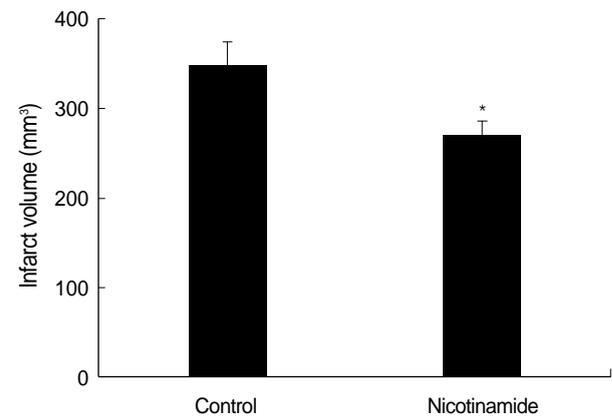
**결 과**

**Nicotinamide의 투여가 뇌경색에 미치는 영향**

Nicotinamide 투여군과 대조군의 뇌경색 부피는 각각 270.5±14.8 mm<sup>3</sup>과 346.0±26.8 mm<sup>3</sup>이었다. 두 군 간에 통계학적 차이가 있었고(p=0.017), 대조군에 비하여 nicotinamide 투여군의 뇌경색 크기는 약 21.8% 감소하였다(Fig. 3, 4). 또한 Nicoti-



**Fig. 3.** Nicotinamide treatment 24 and 0 h before and after onset of MCAO reduced infarction in male Sprague-Dawley rats. 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride-stained coronal brain sections are from representative animals that received a saline (A) or 500 mg/kg IP nicotinamide (B) injection and were euthanized 24 h after MCAO. Infarcts are observed (pale region) involving the cerebral cortex and underlying striatum, representative of the MCAO perfusion region.



**Fig. 4.** The nicotinamide group (n=12) shows reduced infarct volume, compared to control group (n=14). Infarct volumes were expressed as mm<sup>3</sup>, and the data are represented as the mean ± SEM. \*p<0.05 which was considered significant. n, number of animals. (Infarction volumes are 346.0±26.8 and 270.5±14.8 mm<sup>3</sup> in control and nicotinamide groups, respectively).

namide 투여군과 대조군의 % 뇌경색 부피는 각각  $45.6 \pm 2.3\%$ ,  $55.5 \pm 3.9\%$ 였다. 두 군 간에 통계학적 차이가 있었고( $p=0.018$ ), 대조군에 비하여 nicotinamide 투여군의 뇌경색 크기는 약 17.7% 감소하였다.

### Nitrotyrosine 면역염색

핵에 진한 갈색으로 염색된 세포를 nitrotyrosine 면역염색에 양성 반응을 보이는 것으로 판정하였다(Fig. 5). Nitrotyrosine-양성 세포는 주로 경색이 일어난 대뇌반구의 줄무늬체(striatum)와 대뇌피질에서 관찰되었으며, 가장 잘 만들어진 두 개의 절편

을 골라 각각의 부위에서 nitrotyrosine-양성 세포의 수를 세고 평균치를 구하였다. 대조군에서, 재관류한 다음 0, 15, 30분 후에 줄무늬체와 대뇌피질에서 측정된 전체 nitrotyrosine-양성 세포의 수는  $59.6 \pm 12.18$ 개로 증가하였고, 재관류한 다음 60분과 120분 후에는  $7.45 \pm 1.83$ 개로 현저한 감소를 보였다(Fig. 6).

뇌경색을 일으킨 반대쪽 대뇌반구에서 nitrotyrosine-양성세포는 매우 드물게 관찰되었다. 재관류한 다음 0, 15, 30분에 줄무늬체에서 측정된 전체 nitrotyrosine-양성 세포의 수는 대조군과 nicotinamide 투여군에서 각각  $21.93 \pm 4.91$ 개와  $8.06 \pm 2.28$ 개였으며 통계학적 차이가 있었다( $p=0.016$ )(Fig. 7). 또한 재관류한 다음 0, 15, 30분에 대뇌피질에서 측정된 전체 nitrotyrosine-

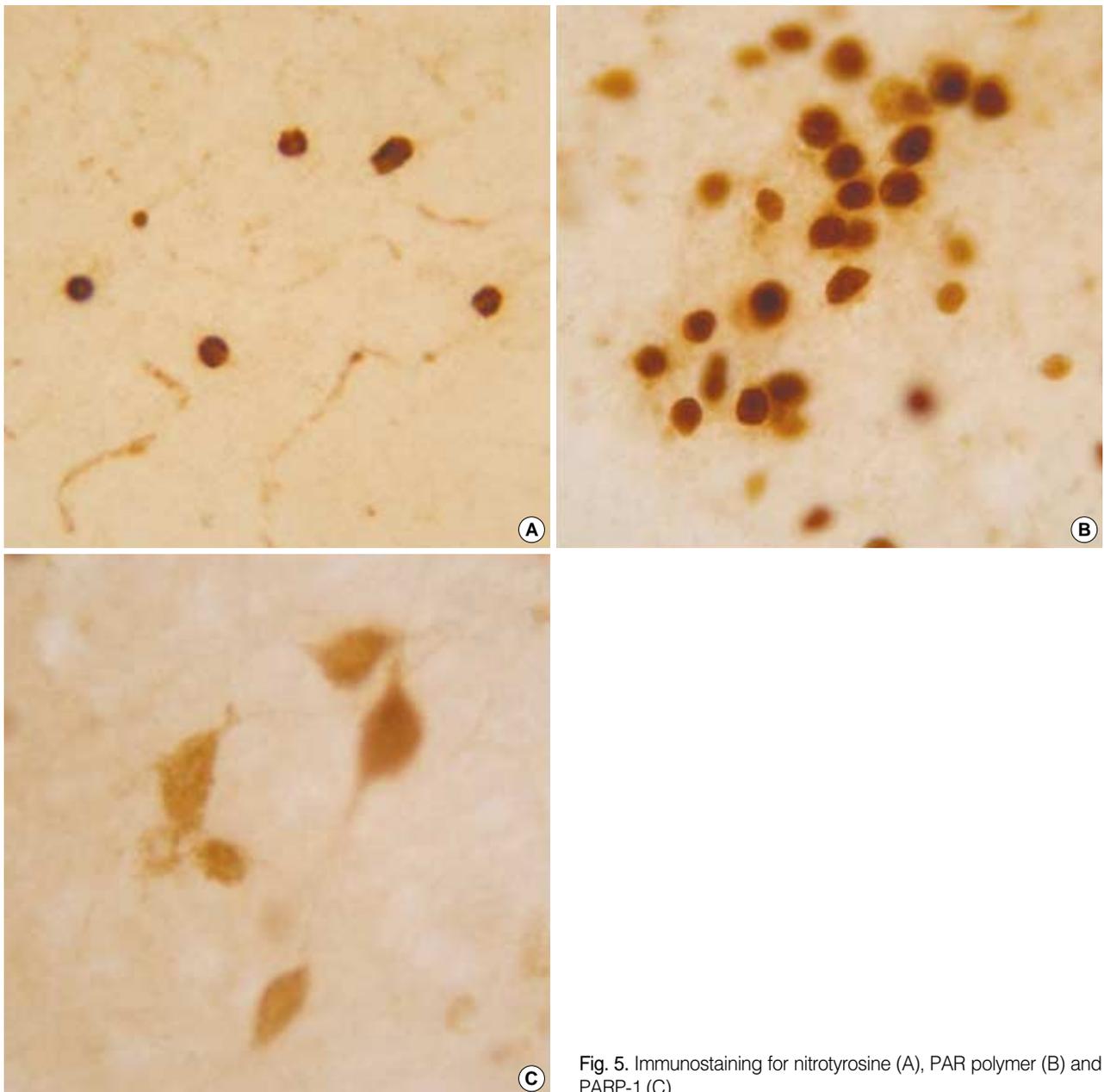
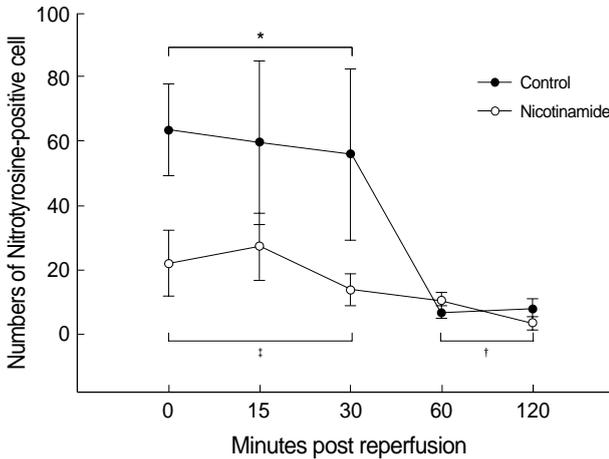


Fig. 5. Immunostaining for nitrotyrosine (A), PAR polymer (B) and PARP-1 (C).

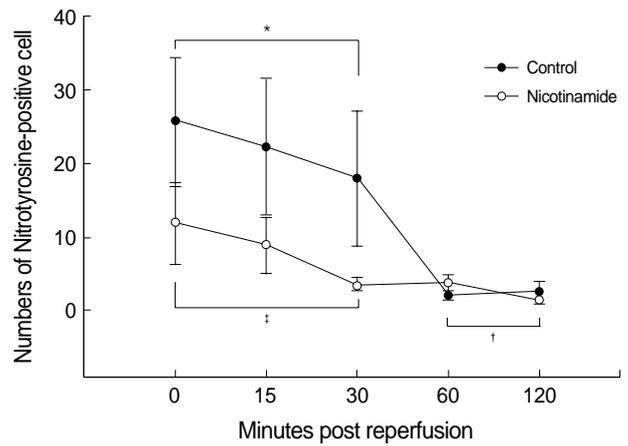
양성 세포의 수는 대조군과 nicotinamide 투여군에서 각각  $33.66 \pm 7.99$ 개와  $13.03 \pm 3.01$ 개였으며 통계학적 차이가 있었다( $p = 0.007$ ).

그러나 재관류 후 각 시간대별 및 부위별로 nitrotyrosine-양성 세포의 수를 비교한 결과, 재관류 후 0분에서 대조군과 nicoti-

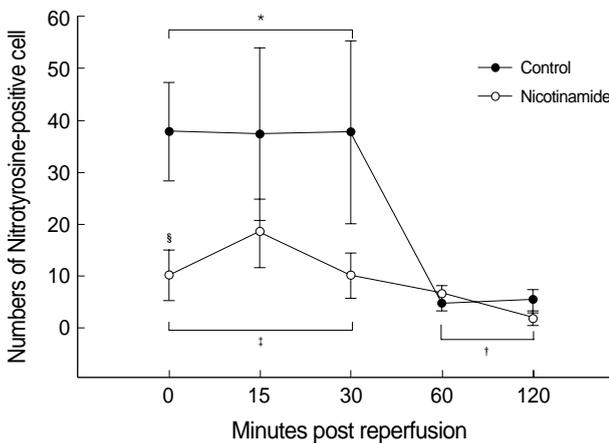


**Fig. 6.** Nitrotyrosine-positive cells in the striatum and cortex. Nicotinamide (500 mg/kg) or normal saline was administered intraperitoneally 24 h before MCAO and immediately after MCAO. Nitrotyrosine expression was examined by immunohistochemistry, using brain slices obtained from the rats that were sacrificed 0, 15, 30, 60 and 120 min after reperfusion.  $n=5$  (each group). Expressions for nitrotyrosine were increased at 0, 15 and 30 min after reperfusion in control group (\* vs. †,  $p < 0.05$ ). Nicotinamide partly reduced immunoreactivity for nitrotyrosine (\* vs. †,  $p < 0.05$ ).

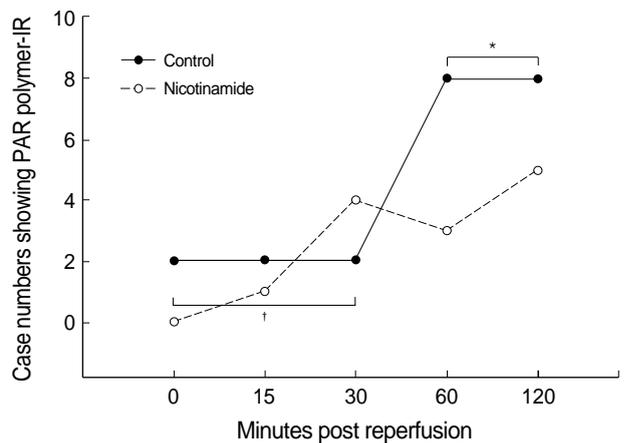
namide 투여군의 대뇌피질내 nitrotyrosine-양성 세포수는 각각  $37.8 \pm 25.84$ 개와  $10.40 \pm 4.81$ 개로 통계학적 차이가 있었으나 ( $p = 0.016$ ), 재관류 후 15 및 30분에서는 통계학적 차이가 없었다( $p > 0.05$ ) (Fig. 8).



**Fig. 7.** Nitrotyrosine-positive cells in the striatum. Nicotinamide (500 mg/Kg) or normal saline was administered intraperitoneally 24 h before MCAO and immediately after MCAO. Nitrotyrosine expression was examined by immunohistochemistry, using brain slices obtained from the rats that were sacrificed 0, 15, 30, 60 and 120 min after reperfusion.  $n=5$  (each group). Expressions for nitrotyrosine were increased at 0, 15 and 30 min after reperfusion in control group (\* vs. †,  $p < 0.05$ ). Nicotinamide partly reduced immunoreactivity for nitrotyrosine (\* vs. †,  $p < 0.05$ ).



**Fig. 8.** Nitrotyrosine-positive cells in the cortex. Nicotinamide (500 mg/kg) or normal saline was administered intraperitoneally 24 h before MCAO and immediately after MCAO. Nitrotyrosine expression was examined by immunohistochemistry, using brain slices obtained from the rats that were sacrificed 0, 15, 30, 60 and 120 min after reperfusion.  $n=5$  (each group). Expressions for nitrotyrosine were increased at 0, 15 and 30 min after reperfusion in control group (\* vs. †,  $p < 0.05$ ). Nicotinamide partly reduced immunoreactivity for nitrotyrosine (\* vs. †,  $p < 0.05$ , §\* $p < 0.05$ ).



**Fig. 9.** Case numbers showing PAR polymer-immunoreactivity (IR) in the striatum and cortex. Nicotinamide (500 mg/kg) or normal saline was administered intraperitoneally 24 h before MCAO and immediately after MCAO. PAR polymer expression was examined by immunohistochemistry, using brain slices obtained from the rats that were sacrificed 0, 15, 30, 60 and 120 min after reperfusion.  $n=5$  (each group). Cases showing immunoreactivity for PAR polymer in control group (8/10 cases, 80%) were increased at 60 and 120 min compared with those at 0, 15 and 30 min in control group (6/15 cases, 40%) (\* vs. †,  $p < 0.05$ ).

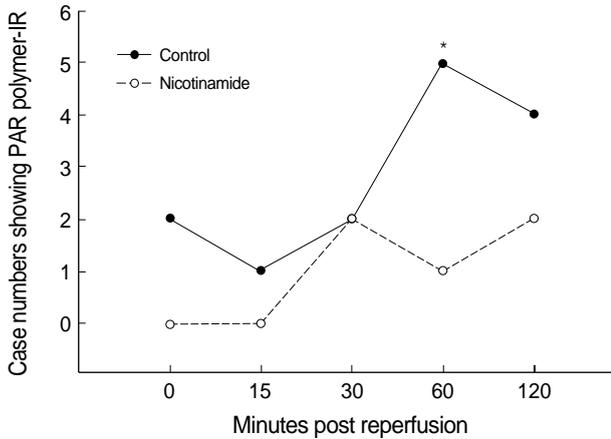


Fig. 10. Case numbers showing PAR polymer-immunoreactivity (IR) in the striatum. Nicotinamide (500 mg/kg) or normal saline was administered intraperitoneally 24 h before MCAO and immediately after MCAO. PAR polymer expression was examined by immunohistochemistry, using brain slices obtained from the rats that were sacrificed 0, 15, 30, 60 and 120 min after reperfusion. n=5 (each group). Nicotinamide partly reduced cases of their expressions (control; 5/5 cases, nicotinamide-treated group; 1/5 cases, in striatum at 60 min after reperfusion, \*p<0.05).

### PAR polymer 면역염색

PAR polymer에 대해 면역염색한 모든 절편을 광학현미경으로 관찰하였다. 그리하여 각 예에서 하나 이상의 절편에서 그림에서와 같은 PAR polymer에 대한 양성 세포들(Fig. 5)이 보이면 1의 값을 주고, 하나의 절편에서도 보이지 않는 경우 0의 값을 주었으며, 줄무늬체와 대뇌피질을 각각 따로 나누어서 검사하였다. 대조군의 줄무늬체와 대뇌피질에서는 PAR polymer-양성 세포들이 관찰되는 경우가 재관류 후 0, 15, 30분인 소집단(15예 중 6예, 40%)보다 60 및 120분인 소집단(10예 중 8예, 80%)에서 더 흔했다(p<0.05)(Fig. 9). 줄무늬체에서 PAR polymer-양성 세포들이 관찰되는 경우는 재관류 후 60분이 지난 소집단에서 nicotinamide 투여 군(5예 중 1예)이 대조군(5예 중 5예)보다 드물게 관찰되었다(p=0.032)(Fig. 10).

### PARP-1 면역염색

PARP-1에 대한 면역염색을 시행한 결과, 핵과 세포질에서 면역반응성을 보였다(Fig. 5). 재관류 후, 대조군과 nicotinamide 투여군 모두 0, 15, 30분 소집단들에서 PARP-1에 면역반응성을 보이는 세포가 거의 관찰되지 않았으며, 60분과 120분군에서 드물게 관찰되었다. PARP-1의 발현에 대조군과 nicotinamide 투여군 사이에 차이가 없었다(data not shown). 따라서 PARP-1의 발현이 60분과 120분군에서 드물게 관찰되기는 하지만, 뇌의 허혈에서 nicotinamide의 투여가 PARP-1의 발현 정도에는 영향을 미치지 않고 그것의 활성화도에 영향을 미칠 수도 있다고 추

정하였다.

## 고찰

인간을 치료하는 약물의 효과 및 가치를 예측하는 데 적절한 동물 모델을 사용하는 것은 필수적이다. 대뇌의 국소적 허혈(뇌졸중)과 전체적인 허혈(심장정지)은 인간에게 흔한 질병이다. 인간에게 장애 및 사망을 일으키는 중요한 원인인 뇌졸중과 심장정지는 전 세계에 걸쳐 수많은 사람들에게 영향을 주며 의료비의 부담을 증가시키고 있다. 이들 질환에서 신경의 손상과 보호기전을 이해하는 것은 허혈을 치료하고 새로운 표적을 연구하는데 매우 중요한 것이다.<sup>9</sup>

국소적 및 전체적 대뇌 허혈 모델은 산소와 포도당을 뇌조직으로 공급하는 것을 감소시키는데 그 목적이 있다. 이 허혈과정은 이온기울기(ionic gradient)를 유지하는 데 필요한 에너지학을 방해하는 다양한 세포학적 및 분자학적 기전을 통하여 뇌손상을 유발한다. 이 기전들은 뇌 안에서 유발된 허혈의 위치, 기간, 그리고 정도에 따른 일련의 복잡한 병리-생리학적 사건들이다. 에너지 상실(energy failure)로 신경세포의 탈분극이 일어나고, 이것은 글루탐산(glutamate) 수용체를 활성화시키고, 다시 Na<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, Cl<sup>-</sup> 그리고 K<sup>+</sup>의 이온기울기를 변화시킨다. 세포외 공간에 글루탐산이 증가하면 괴사주위의 신경세포에 탈분극화가 발생한다. 그러면 물이 이동하고 세포가 팽창하여 뇌부종이 발생한다. 세포내 Ca<sup>++</sup>의 증가로 lipases, proteases, endonucleases와 같은 다양한 효소계가 상향조절된다. 결과적으로 산소 자유기가 다양한 생화학적 경로를 통하여 만들어지고 세포자멸사가 발생한다. 자유기는 또한 혈소판과 내피의 셀렉틴(selectins), 혈소판활성인자, 종양괴사인자- $\alpha$ , interleukins와 같은 다양한 염증매개체의 형성을 유도한다. 대뇌허혈에 관한 동물모델을 이용하는 목적 중 하나는 이러한 여러 가지 손상기전들을 분리하여 허혈성 손상을 치료(예: 신경보호, neuroprotection)하기 위한 잠재적 표적부위에 도달하는 것이다. 그렇기 때문에 허혈로 인한 분자학적 및 세포학적 사건들의 복잡한 병리-생리학적 연속단계를 완전히 이해하는 것은 매우 중요한 일이다.<sup>9-11</sup>

중간대뇌동맥폐쇄법은 1980년대 말 도입된 이래 세포손상 및 신경보호에 대한 기전을 연구하는 데 널리 이용되고 있다.<sup>12,13</sup> 이것은 4-0 나이론 봉합사를 쥐의 속목동맥 안으로 집어 넣고 실을 머리쪽으로 밀어 넣어 중간대뇌동맥을 막는 방법이다. 이 실은 속목동맥의 기시부에서 17-20 mm 들어갈 수 있어서 앞교통동맥으로부터 결순환을 막을 수 있다.<sup>12</sup> Belayev 등<sup>14</sup>은 봉합사에 poly-L-lysine을 씌워서 봉합사가 둘러싸고 있는 내피에 더 달라붙게 하여 좀 더 일정한 경색을 만들었다. Memezawa 등<sup>15</sup>은 이 방법으로 대뇌혈류량(Cerebral blood flow: CBF)이 피질과 꼬리조가비핵(caudoputamen)에서 80% 감소하고 MCAO의 경우에는 180분까지 감소된 혈류량이 유지됨을 보고하였다. 봉합

사를 빼내면 재관류가 쉽게 일어나고, 동물은 수일, 수주, 수개월 동안 생존하여 기능적 결과를 측정할 수 있게 해준다.<sup>16</sup>

Mokudai 등<sup>17</sup>은 무게가 300-330 g인 수컷 Wistar 쥐를 이용한 일과정 국소 대뇌허혈 실험에서 3-일 대조군과 nicotinamide-처리 군에서 뇌경색 부피가 각각  $147 \pm 71 \text{ mm}^3$  및  $87 \pm 83 \text{ mm}^3$ 였고, 1-주 대조군과 nicotinamide-처리 군에서 뇌경색의 부피는 각각  $113 \pm 49$  및  $87 \pm 68 \text{ mm}^3$ 였다. 그런데 본 연구에서 1-일 대조군과 nicotinamide-처리 군의 뇌경색 부피는  $346.0 \pm 26.8$ 과  $270.5 \pm 14.8 \text{ mm}^3$ 였다. 이는 관찰한 시간과 종의 차이가 있고 본 실험에서 오른쪽 온목동맥을 봉합사로 묶었기 때문에, Mokudai의 실험에서 보다 뇌경색의 크기에 현저한 차이가 있는 것으로 사료되었다.

Mokudai 등<sup>17</sup>은 바깥목동맥을 통하여 나일론 봉합사를 속목동맥으로 넣었고 온목동맥을 묶지 않았다. 그들은 같은쪽 대뇌반구의 부종형성과 쥐마다 다른 뇌의 크기를 보상하기 위하여 뇌경색 부피를 반대쪽 대뇌반구에 상대적인 % 변화로 분석하였는데, nicotinamide를 투여하고 3일 및 7일이 지난 집단에서 각각 46% 및 35% 뇌경색 부피가 감소하였다고 보고하였다. 본 연구에서 뇌경색 부피와 % 뇌경색 부피에서 대조군에 비하여 nicotinamide 투여군의 뇌경색 크기는 각각 약 21.8%와 17% 감소하였으며 통계학적 의미가 있었다. 그런데 Chang 등<sup>18</sup>은 일과정 MCAO 모델을 이용한 실험에서 nicotinamide나 ketamine 단독 투여로 뇌경색 부피가 감소하지 않았고, 상기 두 약물의 복합투여로 뇌경색 부피가 현저히 감소하였다고 하여 이전의 논문과 상충되는 결과를 보이고 있다.

PARP-1은 DNA의 절단에 의하여 활성화되는 핵내 효소다. 활성화된 PARP-1은 NAD를 nicotinamide와 ADP-ribose로 나누어 후자를 핵 안의 수용단백(acceptor protein)에 공유결합으로 중합시킨다. Poly (ADP-ribose) ation은 DNA 복구, 염색질의 배열, 전사, 복제에서 단백질의 분해에 이르기까지 세포의 다양한 과정을 조절하는 데 관여하는 것으로 알려져 있다. 그럼에도 poly (ADP-ribose) ation의 어두운 면으로 PARP-1의 활성화가 쇼크, 당뇨병, 심근이나 뇌의 허혈에 이은 재관류, 그리고 다양한 형태의 염증에서 나타나는 조직손상에 기여한다. 최근까지 알려진 바에 의하면, 염증성 질환, 퇴행성 신경질환, 그리고 허혈-재관류(ischemia-reperfusion)에 의한 질환에서 다음의 두 가지 기전이 PARP 억제제의 긍정적인 효과와 관련이 있을 것이다: 1) PARP-1의 과활성화에 의한 세포사 억제기전; 2) 염증성 신호전달 및 염증매개체 생성의 억제기전.<sup>19,20</sup>

본 연구에서 PAR polymer에 대한 면역염색 결과, MCAO 후 60, 120분이 지난 대조군에서 PAR polymer-양성 세포들이 0, 15, 30분이 지난 대조군에서 보다 더 자주 관찰되었고, nicotinamide 투여군 일부에서는 PAR polymer의 생성이 억제되었다. 재관류 후 60분이 지나서 poly (ADP-ribose) ation이 증가하는 것으로 보아 PARP-1은 재관류 후 활성화됨을 추측할 수 있었다. PARP-1-양성 세포들은 재관류 후 60분과 120분이 지난

대조군에서 자주 관찰되었다. 아마도 자유기에 의해서 PARP-1은 활성화될 뿐만 아니라 그 발현도 증가하는 것으로 사료된다. 그러나 그 발현 정도는 대조군과 nicotinamide군 사이에 의미 있는 차이가 없었다. Nicotinamide가 PARP-1의 생산을 억제하는 것이 아니라 PARP-1의 활성화를 억제하는 것으로 생각되었다.

세포내 칼슘( $\text{Ca}^{2+}$ )의 증가는 몇 가지 유형의 세포손상을 통하여 에너지 항상성을 방해하는 반응성 질소 및 산소종들을 만들어 세포독성을 유발한다.  $\text{Ca}^{2+}$ 은 NMDA-아형 글루탐산 수용체와 같은 전압-혹은 ligand-관문 이온통로를 통하여 세포내로 들어갈 수 있다.  $\text{Ca}^{2+}$ 을 세포 밖으로 혹은 세포질그물 안으로 펌핑하는 ATPase를 통하여 세포질에서 칼슘을 제거하는데 ATP가 필요하다. 사립체도 세포질 칼슘에 대하여 완충작용을 한다. 사립체에 과량의  $\text{Ca}^{2+}$ 이 축적되면 산화성 인산화가 방해되고, 전자운반사슬(electron transport chain)을 통하여 과산소( $\text{O}_2$ )와 과산화수소( $\text{H}_2\text{O}_2$ )와 같은 반응성 산소종(reactive oxygen species)의 생성이 촉진된다. 사립체내 고농도의  $\text{Ca}^{2+}$ 은 사립체막의 투과성을 변화시키고, 이것은 사립체의 ATP 생산을 억제하고 세포사를 촉진한다. 더구나 사립체 외막의 선택적 투과성으로 caspases를 활성화하는 cytochrome c가 유리된다.<sup>11,21</sup>

$\text{Ca}^{2+}$ 은  $\text{Ca}^{2+}$ -민감성 인지질분해효소와 단백질분해효소는 물론  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 에 의하여 활성화되는 내핵분해효소(DNase)를 직접 활성화시킨다. 더욱이  $\text{Ca}^{2+}$ 에 의하여 활성화되는 몇 가지 효소는 자유기 생산에 관여한다. Calpains으로 알려진  $\text{Ca}^{2+}$ 에 의하여 활성화되는 단백질분해효소는 xanthine 탈수소효소를 xanthine 산화효소로 전환시켜 과산소 생산을 촉진한다. Cyclooxygenase는 또 다른 과산소의 원천이다. 과산화수소( $\text{H}_2\text{O}_2$ )는 과산소로부터 만들어질 수 있고, 그 자체가 철에 의해 촉매되는 반응을 통하여 반응성이 높은 히드록실기( $\text{OH}\cdot$ )로 전환될 수 있다. 이 반응성 산소종들은 지질, 단백질, 그리고 핵산에 손상을 입힌다.  $\text{Ca}^{2+}$ 은 또한 calmodulin에 의해 조절되는 효소인 nitric oxide synthase (NOS)를 활성화하여 대량의 nitric oxide ( $\text{NO}\cdot$ )를 만들게 한다. 과산소와 nitric oxide은 결합하여 반응성이 매우 큰 peroxynitrite 음이온( $\text{OONO}^-$ )을 형성한다. Peroxynitrite는 세포막을 손상시키고, 티로신(tyrosine)과 같은 방향성 아미노산을 포함한 단백을 산화 및 질화(nitration)시킨다.  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 에 의하여 활성화되는 내핵분해효소(DNase),  $\text{OONO}^-$ 나 히드록실기에 의한 DNA 손상으로 PARP가 엄청나게 활성화되고, 이어서 NAD 양이 고갈된다.<sup>11</sup>

본 실험에서는 허혈-재관류 과정에서 자유기가 발생하는 정도를 간접적으로 알아보기 위해 nitrotyrosine에 대한 면역염색을 시행하였다. Nitrotyrosine-양성 세포 수는 재관류 초기, 0, 15, 30분 후에 증가하였다가 60 및 120분 후에 현저하게 감소하였다(Fig. 6-8). 따라서 허혈-재관류 후 초기에 자유기가 증가하고, 이에 의한 DNA의 절단이 광범위하게 일어나 PARP-1이 활성화되어, 결국 poly (ADP-ribose) ation이 증가함을 추정할 수 있었다. 그리고 nicotinamide의 투여로 일부 nitrotyrosine-양성

세포 수 및 PAR polymer의 생성이 감소하는 것으로 보아, nicotinamide는 PARP-1의 억제제로 작용할 뿐만 아니라 항산화제나 NOS (Nitric oxide synthase)의 억제제로 작용함을 짐작할 수 있었다.

Mukherjee 등<sup>22</sup>에 의한,  $H_2O_2 + FeSO_4$ 로부터 만들어진  $HO^\cdot$ 로 향한 전자산자성공명연구(electron paramagnetic resonance study)에서 nicotinamide는, 아마도 자유기를 제거함으로써,  $HO^\cdot$  기신호(radical signal)를 약간 감소시킨 것으로 추정된다. 이 반응에서 히드록실기(hydroxyl radical)는 nicotinamide에서 하나의 전자를 받는다. Klaidman 등<sup>23</sup>의 연구에 따르면 nicotinamide의 투여로 대뇌의 어떤 부위에서  $NAD^+$ , NADH,  $NADP^+$ , 그리고 NADPH 양이 증가하였다고 한다. 이들의 합성은 nicotinamide를 투여한 후 산화 스트레스가 있는 동안 더욱 상향조절된다. 그들은 Nicotinamide의 항산화 효과는 DNA의 보호와 밀접한 관련이 있을 것이라고 하였다.

허혈 기간 동안에 ATP 양이 매우 낮은 수준으로 감소하는데<sup>24</sup> 재관류한 후 5-10분 안에 ATP 양은 거의 정상으로 되돌아간다.<sup>25</sup> 그러나 Yang 등<sup>26</sup>이 Wister 쥐에 일시적인 국소적 대뇌허혈을 유발한 실험에서 재관류한 후 6시간과 24시간 지난 다음 ATP는 다시 감소하였다. 그들은 전자의 경우는 세포 괴사를 유발하고 후자의 경우는 세포자멸사를 유도하는데 관여할 것이라 하였다. Nicotinamide는 계속해서 NAD의 고갈을 막을 수 있다.<sup>26</sup> Nicotinamide의 투여로 뇌의 NAD 양이 증가하는 것으로 알려져 있다.<sup>23</sup> 그러나 Yang 등<sup>26</sup>은 nicotinamide가 재관류 동안에 NAD보다 APT를 증가시키는 데 더 효율적이라 하였고 뇌세포는 더 많은 ATP를 생산하기 위하여 NAD를 소모할 것이라 하였다.

한편 Nagayama 등<sup>27</sup>은 쥐에서 4-VO (4-vessel occlusion) 중에서 아사적 일과성 전뇌허혈(sublethal transient global ischemia) 모델을 이용한 실험을 하였는데, PARP 억제제인 3-aminobenzamide (30 mg/kg)의 투여로 허혈 후 해마 CA1 부위에서 생존한 신경세포 수가 감소하였고 DNA 단일 가닥의 절단이 증가하였다. 더욱이 in vitro DNA repair assay를 이용한 실험에서 3-aminobenzamide (30 mg/kg)으로 DNA base repair activity를 억제함을 관찰하였다. 그들은 미약한 일과성 허혈이 있을 후  $NAD^+$ 의 고갈이 없이 PARP의 활성화는 뇌에서 신경보호에 도움이 될 것이라고 하였다.

1960년대 이래 동물 모델을 이용한 많은 잠재적인 신경보호약물에 관한 수많은 보고가 있었다. 다수의 임상 전 연구(preclinical studies)로 다양한 허혈모델과 동물종에서 많은 약물의 신경보호 효과가 입증되었다. 그러나 이 약물들을 이용한 임상실험에서는 완전한 성공을 거두지는 못했다. 이러한 실패의 원인은 많고도 복잡적이고, 약물투여의 시기, 약물 용량, 허혈상태의 시간, 종(species), 성별, 나이, 그리고 기왕의 질병과 관련이 있다. 또 다른 문제는 임상실험의 설계다. 동물모델에서는 치료효과가 뛰어난데도 임상실험에서 실패하는 것은 비합리적인 임상실험의

설계 때문이다(예: 이질적인 뇌졸중 환자의 잘못된 선택 기준, 결과의 잘못된 측정, 혹은 잘못된 약물의 투여 시기 및 용량).<sup>9</sup>

새로운 신경보호제중 하나로서 nicotinamide는 그 다양한 보호기전들 때문에 의사들이나 연구자들의 관심을 끌기에 충분하다. 앞으로 뇌졸중을 치료할 때는 혈전용해제와 같은 전통적인 치료에만 매달리지 않을 것이다. 허혈상태의 신경세포에 에너지 공급을 유지시키고 재관류에 따른 산화작용을 억제하는 것이 새로운 치료전략이 되어왔다.<sup>28</sup> 연구자들은 Nicotinamide의 투여로 일시적인 MCAO 쥐 모델에서 대뇌의 허혈성 경색 부피가 감소함을 확인하였고, 이것은 nicotinamide가 PARP의 활성화와 자유기의 생성을 부분적으로 억제하기 때문이라고 생각하였다. Nicotinamide는 비타민 B<sub>3</sub>로 인체에 거의 독성이 없고 가격도 저렴하다. 따라서 nicotinamide를 가지고 더 다양한 임상실험을 거쳐서 허혈성 질병의 치료와 예방에 이용되기를 기대해 본다.

## 참고문헌

1. Korea National Statistical Office. Annual Report on the Cause of Death Statistics (2004). 2005. 9. [http://www.nso.go.kr/nso2005/bbs/report/report10/view.jsp?content\\_id=3343](http://www.nso.go.kr/nso2005/bbs/report/report10/view.jsp?content_id=3343).
2. Sadanaga-Akiyoshi F, Yao H, Tanuma S, *et al*. Nicotinamide attenuates focal ischemic brain injury in rats: with special reference to changes in nicotinamide and  $NAD^+$  levels in ischemic core and penumbra. *Neurochem Res* 2003; 28: 1227-34.
3. Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 1994; 263: 687-9.
4. Meli E, Pangallo M, Baronti R, *et al*. Poly(ADP-ribose) polymerase as a key player in excitotoxicity and post-ischemic brain damage. *Toxicol Lett* 2003; 139: 153-62.
5. Takahashi K, Greenberg JH, Jackson P, Maclin K, Zhang J. Neuroprotective effects of inhibiting poly(ADP-ribose) synthetase on focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17: 1137-42.
6. Takahashi K, Greenberg JH. The effect of reperfusion on neuroprotection using an inhibitor of poly (ADP-ribose) polymerase. *Neuroreport* 1999; 10: 2017-22.
7. Takahashi K, Pieper AA, Croul SE, Zhang J, Snyder SH, Greenberg JH. Post-treatment with an inhibitor of poly (ADP-ribose) polymerase attenuates cerebral damage in focal ischemia. *Brain Res* 1999; 829: 46-54.
8. Tokime T, Nozaki K, Sugino T, Kikuchi H, Hashimoto N, Ueda K. Enhanced poly(ADP-ribosylation) after focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18: 991-7.
9. Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J* 2003; 44: 85-95.

10. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: An integrated view. *Trends Neurosci* 1999; 22: 391-7.
11. Pieper AA, Verma A, Zhang J, Snyder SH. Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends in Pharmacol Sci* 1999; 20: 171-81.
12. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20: 84-91.
13. Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke* 1986; 8: 1-8.
14. Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke* 1996; 27: 1616-22.
15. Memezawa H, Minamisawa H, Smith ML, Siesjo BK. Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *Exp Brain Res* 1992; 89: 67-78.
16. DeVries AC, Nelson RJ, Traystman RJ, Hurn PD. Cognitive and behavioral assessment in experimental stroke research: Will it prove useful? *Neurosci Biobehav Rev* 2001; 25: 325-42.
17. Mokudai T, Ayoub IA, Sakakibara Y, Lee E-J, Ogilvy CS, Maynard KI. Delayed Treatment with nicotinamide (vitamin B3) improves neurological outcome and reduces infarct volume after transient focal cerebral ischemia in wistar rats. *Stroke* 2000; 31: 1679-85.
18. Chang ML, Yang J, Kem S, *et al.* Nicotinamide and ketamine reduce infarct volume and DNA fragmentation in rats after brain ischemia and reperfusion. *Neurosci Lett* 2002; 322: 137-40.
19. Erdelyi K, Bakondi E, Gergely P, Szabo C, Virag L. Pathophysiologic role of oxidative stress-induced poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation: focus on cell death and transcriptional regulation. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 751-9.
20. Liaudet L, Szabo E, Timashpolsky L, Virag L, Cziraki A, Szabo C. Suppression of poly (ADP-ribose) polymerase activation by 3-aminobenzamide in a rat model of myocardial infarction: long-term morphological and functional consequences. *Br J Pharmacol* 2001; 133: 1424-30.
21. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-12.
22. Mukherjee SK, Klaidman LK, Yasharel R, Adams JD Jr. Increased brain NAD prevents neuronal apoptosis in vivo. *Eur J Pharmacol* 1997; 330: 27-34.
23. Klaidman LK, Mukherjee SK, Adams JD JR. Oxidative changes in brain pyridine nucleotides and neuroprotection using nicotinamide. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1525: 136-48.
24. Folbergrova J, Memezawa H, Smith ML, Siesjo BK. Focal and perifocal changes in tissue energy state during middle cerebral artery occlusion in normo- and hyperglycemic rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1992; 12: 25-33.
25. Phillis JW, Perkins LM, Smith-Barbour M, O'Regan MH. Oxypurinol enhanced postischemic recovery of the rat brain involves preservation of adenine nucleotides. *J Neurochem* 1995; 64: 2177-84.
26. Yang J, Klaidman LK, Nalbandian A, *et al.* The effects of nicotinamide on energy metabolism following transient focal cerebral ischemia in Wistar rats. *Neurosci Lett* 2002; 333: 91-4.
27. Nagayama T, Simon RP, Chen D, *et al.* Activation of poly(ADP-ribose) polymerase in the rat hippocampus may contribute to cellular recovery following sublethal transient global ischemia. *J Neurochem* 2000; 74: 1636-45.
28. Yang J, Adams JD. Structure activity relationships for nicotinamide in the treatment of stroke. *Letters in Drug Design & Discovery* 2004; 1: 58-65.