

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

電子情報通信学会技術研究報告(MEとバイオサイバネティクス)
(2001.06) 101巻130号:95~102.

31P-MRSによるGerbil前脳一過性虚血後の軽度低体温の脳内リン代謝動態
—脳虚血後のredox state recoveryに対するmild hypothermiaによる効果—

木村輝雄, 田中邦雄, 佐古和廣, 日下部光俊, 田中達也,
高橋 均, 中田 力

³¹P-MRS による Gerbil 前脳一過性虚血後の軽度低体温の脳内リン代謝動態

—— 脳虚血後の redox state recovery に対する mild hypothermia による効果 ——

木村 輝雄**、田中 邦雄**、佐古 和廣*、日下部 光俊**、田中 達也*、高橋 均**、中田 力*
*旭川医科大学脳神経外科、**同実験実習機器センター、*新潟大学脳研究所脳機能解析学
**同病理学

連絡先：〒951-8122 新潟市旭町通1-757 新潟大学脳研究所脳機能解析学

TEL: 025-227-0678

FAX: 025-227-0822

E-mail: tekimura-nsu@umin.ac.jp

あらまし 軽度低体温群 (34°C, n=10) と常温群 (37°C, n=10) とにおいて虚血中及び再灌流後の高エネルギーリン酸代謝(ATP、PCr、Pi)、pH の変化を Mongolian Gerbil (n=20, mail, BW:50-60g) の両側頸動脈 15 分間の閉塞による前脳虚血モデルを用いて、³¹P-MRS によって 1 週間測定し、軽度低体温による脳保護効果を組織学的にも評価した。虚血中は常温群と軽度低体温群でいかなる高エネルギーリン酸代謝も統計学的に有意差がなかった。再灌流後、軽度低体温群の代謝(ATP、PCr)の回復率は常温群のそれに比べて、約 10-20%より高く、より速く回復した。虚血一週間後、ATP、PCr は軽度低体温群、常温群ともさらにそれぞれ 10-20%に徐々に低下した。病理組織所見では、海馬、大脳皮質の虚血神経細胞障害は軽度低体温群でそれぞれ 35%、24%であったが常温群でそれぞれ 82%、59%であった。この実験の結果は、軽度低体温の脳保護効果は ATP、PCr の高い回復率と、高エネルギーリン酸代謝の 2 次的の低下を妨げることによることを意味し、病理組織学的にも確認された。

軽度低体温、一過性脳虚血、全脳虚血、redox state recovery、ミトコンドリア、³¹P-MRS

Phosphate Metabolites measured by ³¹P-MR Spectroscopy in Mild Hypothermic brain following Transient Forebrain Ischemia in Gerbil

T Kimura**, K Tanaka**, K Sako*, M Kusakabe**, T Tanaka*, Takahashi**, T Nakada*

*Department of Neurosurgery, **Central Laboratory for Research and Education, Asahikawa Medical College, *Department of Integrated Neuroscience, **Department of Pathology, Brain Research Institute, University of Niigata, Japan

Address for correspondence and reprints requests: Department of Integrated Neuroscience, Brain Research Institute, University of Niigata, 1-757 Asahimachi Niigata City, 951-8585 Japan, Phone: +81-25-227-0679, Fax: +81-25-227-0822

Abstract High-energy phosphate metabolism (ATP, PCr, Pi) and intracellular pH were sequentially measured with gerbil (50-60g) with a transient (15 min.) bilateral carotid artery occlusion models using ³¹P-MRS during ischemia and after reperfusion in mild hypothermic (34°C n=10) and normothermic (37°C n=10) group for 1 week. They were also evaluated by histopathology. During ischemia there were no statistically significant differences in any metabolites in both groups. However, after the reperfusion, metabolic recovery of mild hypothermic group was significantly faster and about 10-20% higher than in normothermic group. One week after ischemia, energy metabolism was gradually decreased about 10-20% in both groups. In histopathology, pyramidal cell damage in hippocampus was 35% in average in mild hypothermia, and 82% in normothermia. The neuronal damage in cerebral cortex was 24% in mild hypothermia, and 59% in normothermia. The results of the present experiment imply that the protective effect of mild hypothermia is due to the high recovery rate of ATP and PCr and the prevention of 2nd decline of high phosphate energy.

key words

mild hypothermia, transient ischemia, global ischemia, redox state recovery, mitochondria, ³¹P-MRS

1.はじめに

近年、外傷や虚血による脳損傷に対し、低体温療法の臨床的有用性が見直されている(3)。30度から32度の低体温における脳保護効果はこれまで基礎的に確かめられているが(8,24)、動物実験において軽度低体温(33-34度)の脳エネルギー状態(redox state)は常温の場合と差がないとされている(6)。従って、そのメカニズムは脳代謝の抑制によるものではなく、hypoxiaによってトリガーされた脳細胞内の二次的化學変化を抑制するためであると考えられている(12)。そこで、本稿では代謝物質の非侵襲的、経時的測定法である³¹P-MRS法を用い、軽度低体温群と常温群において、脳虚血時、再還流早期の脳内リン酸化合物代謝動態を連続的に測定し、虚血後における軽度低体温の脳保護効果について、病理組織学的観察と総合して基礎的に検討した。

2.方法

実験には、Mongolian gerbil(Male BW 50-60g; n=20)を用いた。10%urethan 溶液 0.5-0.6ml(1ml/100g)を腹腔内注射し、0.5%ハロセン、70%のN₂Oと30%のO₂を自発呼吸下で麻酔した動物に手術操作を行った。体温は直腸温および海馬温(定位的にサーミスターを挿入)をモニターした。常温群(直腸温で37度、n=10)と軽度低体温群(直腸温で34度、n=10)に³¹P-MRS測定の1時間前から、測定中、測定3時間後まで体温をモニター、保温装置および冷却装置を用いて維持し、その後は両群とも室温に置いた。連続的に血圧をモニターし、血液ガスや血糖のための動脈血サンプルを採取するために右大腿動脈にカテーテルを挿入した。動脈圧は平均値で表した。虚血モデルは、腹側頸部切開の後、両側頸動脈を露出し、一過性的前脳虚血のモデルを作るために6.0ナイロンを頸動脈にかけてそれを引くことによって15分間閉塞して虚血負荷を与えた。

虚血の範囲はオートラジオグラフィーで、control、軽度低体温虚血群、常温虚血群に対し、¹⁴C-IAPを使って定性的に検討した。¹⁴C-IAP(0.6mlの生食に10μCi)を1分以上かけて連続的に大腿静脈から注入し、注入後すぐに断頭し、脳を素早く取り出し40度に凍結した。Cryostatで一連の冠状断面に20μmの厚さで切断した。脳断面をカバーガラスに乗せ、60度で乾燥した。オートラジオグラムは7日間、X線カセットの中で¹⁴C-methyl methacrylate standardで乾いた脳断面をKodak SB-5 X-ray filmに感光する事によって作製した。

³¹P-MRSは、GX-270FT-NMRスペクトロメーター(日本電子、静磁場強度6.3テスラ、リン共鳴周波数109.25MHz)を用いて測定した。直径12mmのサーフェスコイルに露出した頭蓋を置き、gerbilをプローブに固定した。磁場均一性は水のプロトンシグナルの半値幅が

0.2ppm以下となるように調整した。RFパルス幅を15μs、パルス繰り返し時間を500msecとし、1スペクトルあたり600回の信号加算(5分間)の測定を行い、スペクトルを得た。エディカレントによるスペクトルの歪みは観られなかった。Broadなbaseline signalはconvolution differenceで取り除き、peak areaの歪みを最小にするためにline broadeningを800Hzのexponential関数で3連続繰り返し行って行った。FIDは30Hzのexponential関数でフィルターをかけた後に、フーリエ変換した。位相補正はbaselineのスペクトルで視覚的に行った。クレアチンリン酸(PCr)のピークを基準とした無機リン酸(Pi)のchemical shiftから細胞内pHを計算した(38)。虚血負荷前最初10分間のスペクトルをbaselineとし(2本)、虚血中15分間を(3本)、再灌流35分後まで(7本)を連続的に測定した。また、虚血後24時間後10分間(2本)、1週間後にも10分間(2本)測定した。

PCr、Pi、β-ATPの各リン酸化合物の定量は各ピークの面積で求め、虚血負荷前の2つのbaselineの平均値に対する百分率で表した。

虚血7日後、全ての動物は実験終了後に、10%のurethan溶液を腹腔内に注射し、0.5%ハロセン、70%のN₂Oと30%のO₂にて自発呼吸で麻酔し、sacrificeされた。ヘパリン溶液と10%ホルマリン溶液を経心臓的に注入した。灌流後すぐに脳を注意深く取り出した。脳をホルマリン溶液に1週間浸した後、brain matrixを用いて、3mmの冠状のブロックに切断した。脳組織が処理されたらパラフィンに包埋、おのおのの組織塊から6マイクロミリの厚さにカットし、H-E(Hematoxylin-Eosin)で染色した。両側海馬のCA-1領域、大脳皮質の細胞層に見られる障害された細胞を光学顕微鏡的に分析するために、Bregmaから-2.0mmと0.0mmの冠状断面を基準断面として選んだ。虚血神経細胞障害は両側海馬のCA-1領域と両側大脳皮質の内錐体層における200倍率での正方形(長方形)の中の虚血細胞数と正常神経細胞数をカウントし、全神経細胞数に対する虚血神経細胞数の百分率で表した。海馬と大脳皮質の断面のH-E染色した断面に隣接したパラフィン包埋した6マイクロの断面をカットし、gelatin-coatされたスライドにマウントして、GFAP染色を行って、astrocyte reactivityの評価に用いた。GFAP免疫組織化学活性のrelative transmittance distributionの評価は画像解析装置(WinROOF、Mitani Corporation、Japan)を使用した。astrocytic reactivityは両側海馬のCA-1領域と両側大脳皮質の内錐体層における200倍率での正方形(長方形)の中のarea fractionとして分析した。なお、全てのデータは左右とも計測され、その平均値で表した。

Physiological and histopathological variablesにおける軽度低体温群と常温群の間の有意差検定はunpaired t-testを行った。³¹P-MRS測定結果に対する軽度低体温群と常温群

の間の統計学的有意差はおおのの時点で unpaired t-test を行った。危険率 5%以下で有意差ありと判定し、実験結果は平均値±標準偏差で表した。

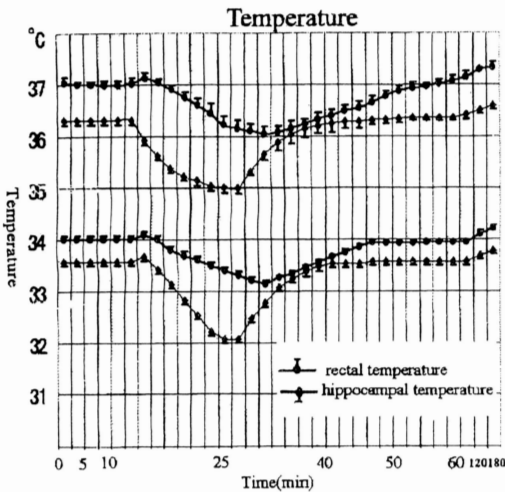
3.結果

Table 1 Physiological data in normothermic and mild hypothermic gerbils during MR spectroscopy experiments

	arterial pH		arterial PCO ₂ (mmHg)		arterial PO ₂ (mmHg)		BS(mg/dl)		MABP(mmHg)	
	NT	MHT	NT	MHT	NT	MHT	NT	MH	HT	MHT
Preischemia	7.36±0.03	7.33±0.02	36.1±3.8	38.2±2.1	106±4.3	104±3.2	120±21	109±31	115±5	103±6
Ischemia	7.28±0.03	7.32±0.03	42.7±4.2	43.2±3.1	107±5.8	102±3.8	135±16	130±26	144±8	128±7
Reperfusion										
60min	7.25±0.04	7.29±0.05	40.3±0.9	42.1±3.5	101±9.6	101±2.1	139±12	132±18	115±5	103±5
24hr	7.35±0.03	7.32±0.03	36.0±4.1	37.1±5.2	105±8.3	104±6.1	124±31	122±28	-	-
7days	7.36±0.03	7.33±0.02	36.2±4.3	38.9±4.4	101±5.1	110±4.6	119±21	112±20	-	-

NT: normothermia MHT: mild hypothermia MABP: mean arterial blood pressure

直腸温、海馬温を除いて、動脈血pH、二酸化炭素分圧、酸素分圧、血糖、血圧とも常温群、軽度低体温群間で虚血前、虚血中、虚血後に有意な差は認められなかった (Table-1)。

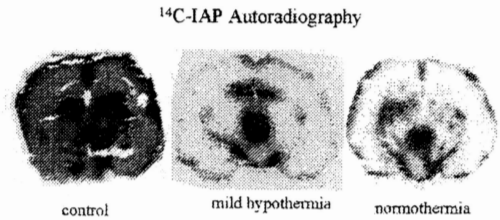


<Fig.1 虚血負荷に伴う直腸温と海馬温の経時的変化>

Figure-1 に、虚血前、虚血中、再灌流後における常温群と軽度低体温群の直腸温と海馬温の測定結果を示した。海馬温は直腸温より常温群で 0.7 ± 0.08 度、軽度低体温群で 0.4 ± 0.08 度、それぞれ低かった。直腸温は再灌流 5 分後、虚血前よりも軽度低体温群で 0.8 ± 0.07 度、常温群で 1.0 ± 0.15 度それぞれ徐々に低下した。海馬温は虚血にした 15 分後に軽度低体温群で虚血前より 1.5 ± 0.08 度、常温群で 1.3 ± 0.11 度速やかに低下した。再灌流後すぐに、海馬温は速やかに上昇し、約 16 分以内には虚血前のレベルに回復し、その後徐々に約 0.3 ± 0.07 度上昇した。直腸温は再灌流後徐々に上がり、30 分以内に虚血前のレベル

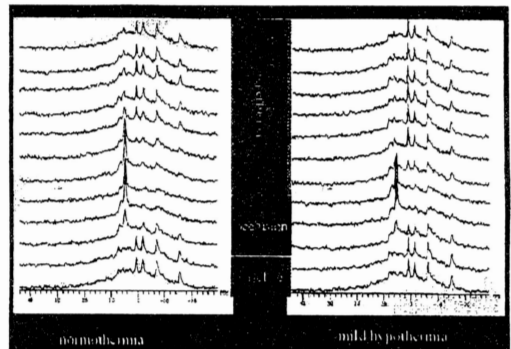
に戻り、その後も徐々に約 0.3 ± 0.10 度上昇した。

Figure 2 はコントロール (非虚血)、虚血時の常温群、軽度低体温群におけるオートラジオグラムの代表例を示す。常温群と軽度低体温群間で虚血領域には違いなかった (Figure 2)。また、このモデルが control と比べて前脳の高度の虚血を呈し、椎骨脳底動脈の支配領域においては灌流されていることが観察できる。



<Fig.2 コントロール、常温群および軽度低体温群におけるオートラジオグラムの代表例>

Figure-3 は、虚血前、虚血中、再灌流後における常温群と軽度低体温群から得られた共鳴スペクトルの経時的変化の代表例を示す。



<Fig.3 虚血負荷に伴うリン共鳴スペクトルの経時的変化>

Figure 4 に両群における ATP、PCr、Pi レベル及び細胞内 Ph の経時的变化を示す。虚血前、虚血中は各リン酸化化合物レベル及び細胞内 pH とともに常温群と軽度低体温群の間で統計学的有意差はなかった。虚血 15 分後、ATP、PCr は常温群、軽度低体温群ともそれぞれ baseline の 30% および 20% まで急激に低下した。虚血 15 分後 Pi は baseline の 4.7 倍に急激に増加した。細胞内 pH は常温群で 7.07 ± 0.10 から 6.66 ± 0.06 に、軽度低体温群では 7.07 ± 0.07 から 6.71 ± 0.09 にそれぞれ低下した。再灌流後、各リン酸化化合物レベルは虚血前のレベルに回復していった。軽度低体温群では灌流 10 分から 25 分の間で常温群に比べてその回復は有意に早かった。軽度低体温群における ATP、PCr レベルは baseline の $90.2 \pm 7.8\%$ 、 $92.9 \pm 5.6\%$ まで回復した。また、常温群では ATP、PCr レベルは baseline の $73.3 \pm 7.0\%$ 、 $78.3 \pm 13.4\%$ までの回復にとどまり、軽度低体温群の方が Pi レベルは常温群よりも有意に早く約 20% 多く回復していた。再灌流後、軽度低体温群における細胞内 pH は常温群よりも有意に早く baseline のレベルに回復した。

虚血 1 週間後、ATP、PCr は軽度低体温群において baseline の $74.5 \pm 6.9\%$ 、 $81.6 \pm 11.9\%$ に、また常温群において $64.9 \pm 10.6\%$ 、 $59.3 \pm 7.3\%$ にそれぞれ徐々に減少した。一方、Pi は軽度低体温群において baseline の $135.4 \pm 14.8\%$ に、また常温群においては $165.7 \pm 24.6\%$ まで徐々に増加した。

Figure 5a に常温群と軽度低体温群における海馬の CA-1 領域と大脳皮質の神経細胞障害をそれぞれ表した。壊死性神経細胞は濃染された核とエオジン好性の細胞質によって同定される。Table 2 は軽度低体温群と常温群における海馬と大脳皮質の神経細胞障害の数を数えて、まとめたものである。海馬における虚血性神経細胞障害は常温群で $82 \pm 10\%$ であったのに対して軽度低体温群では $35 \pm 15\%$ しか障害されていなかった。大脳皮質における虚血性神経細胞障害は、常温群で約 $59 \pm 11\%$ であったのに対して軽度低体温群では $24 \pm 13\%$ しか障害されていなかった。常温群は軽度低体温群よりも海馬や大脳皮質において有意により多くの神経細胞障害を示した ($P < 0.01$)。

Figure 5b に常温群と軽度低体温群における海馬の CA-1 領域と大脳皮質の GFAP reactivity をそれぞれ表した。コントロールでは GFAP 陽性 astrocyte は主に白質で観られ、海馬や大脳皮質にはほとんど観られない (Table 2)。GFAP 陽性 astrocyte は小さい核で明瞭であり、明るく、GFAP に細胞質が染まってみえる。Table 2 は軽度低体温群と常温群における虚血群とコントロール群の海馬と大脳皮質の astrocyte reactivity をまとめたものである。Astrocyte reactivity は、海馬において常温群では 4.48 ± 1.27 (control 0.15 ± 0.12)% であったが、軽度低体温群では $2.56 \pm 1.56\%$ であり (control $0.37 \pm 0.28\%$)、大脳皮質では、常温群で $4.74 \pm 1.96\%$ (control $0.04 \pm 0.03\%$) であったが、軽度低体温群では $1.03 \pm 0.84\%$ であった (control $0.70 \pm 0.07\%$)。常温群では軽度低体温群よりも有意に海馬や大脳皮質においてより高い astrocyte reactivity を示した ($P < 0.01$)。

4. 考察

我々の研究では、虚血中の脳温は低下し、再灌流後は一時的に baseline より上昇した。これらは従来報告 (31,34) されたものと同じ傾向であった。その理由は、一つは脳温が脳血流に依存していること、もう一つは回復した血流による虚血侵襲後に続発する虚血細胞の 2 次的な化学反応の結果であることが考えられる。hyperthermia は focal ischemia (8,27,35) 及び global ischemia (14,22,33) とも虚血障害を助長し、進行させるといわれている。これは、hypothermia の protective effect とは逆の機序で起こっていると考えられる (11,15,16,25,32,33,40,41)。従って、常温群での虚血性組織障害は再灌流後も助長された可能性がある。

neuronal damage に導く様々な process を低体温がどのようにして阻止するのかはまだはっきりしていない。低体温による neuroprotection のメカニズムの一つとして脳代謝率 (CMR) の減少が一般に受け入れられていた (28)。Hypothermia により代謝活性が減少し、結果的にグルコースや酸素に対する demand の減少が起こる (9) というものである。さらに、高エネルギーリン酸の枯渇と乳酸の蓄積の程度が減少するという報告 (9,10,29,37,43) は、

Table 2
Neuronal injury and astrocyte reactivity in mild hypothermic and normothermic group

	Hippocampus(H-E)	cortex(H-E)	hippocampus(GFAP)	cortex(GFAP)
MHT(%)	35 ± 15 (0) *	24 ± 15 (0) *	2.56 ± 1.56 (0.37 \pm 0.28) *	1.03 ± 0.84 (0.07 \pm 0.07) *
NT (%)	82 ± 10 (0)	59 ± 11 (0)	4.48 ± 1.27 (0.15 \pm 0.12)	4.74 ± 1.96 (0.04 \pm 0.03)

(): control MHT: mild hypothermia NT: normothermia

*p < 0.01 compared to the normothermic and control group

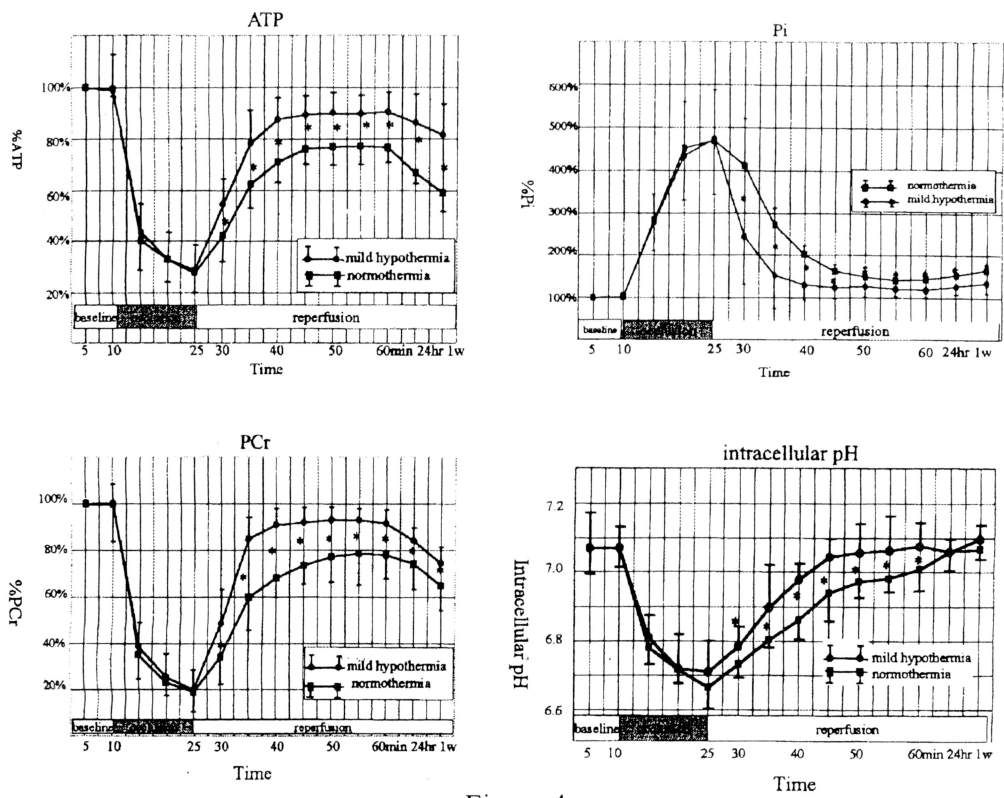


Figure 4

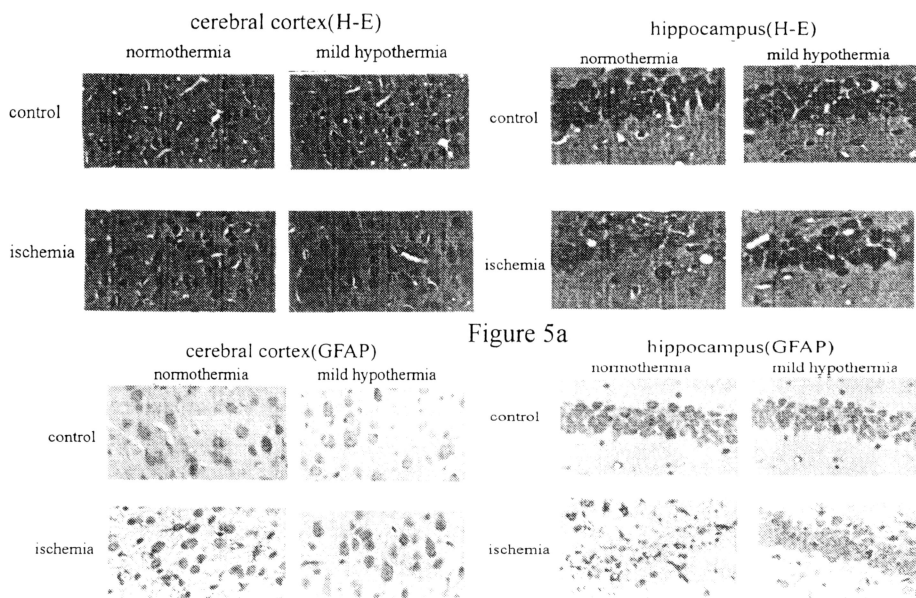


Figure 5a

Figure 5b

これを支持する所見である。このように、Hypothermiaの脳への効果はかつて、もっぱらCMRの減少によると信じられてきた。しかし、正常脳においては、hypothermiaは1度あたりわずか5%のmetabolic activityを減らし、エネルギーの貯蔵に影響しないことから、hypothermiaで保護された程度は完全に細胞の代謝活性によるものではないということが示唆されている(1,17,19)。また、低体温によりCMRが50%下がっても、脳梗塞のサイズを必ずしも減少させるとは限らない(42)。さらに、hypothermiaであるにも関わらず、虚血脳で乳酸の蓄積が認められる(5,36)という最近の報告から、neuroprotectionのメカニズムはCMRの低下のみでは説明できない。

しかし、hypothermiaがpostischemic oxygen radical activityの低下や(18)やendogenous antioxidants(20)とlipid peroxidation(26)の消費を制限しているという事実から、hypothermiaのneuroprotective effectはfree radicalを介するカスケードの抑制と言う仮説が成り立つ。Free radicalの産生にはATPが関与しているが、hypothermiaと常温での高エネルギーリン酸の枯渇を比較した報告(4,30,43)はいくつもあるが、虚血の程度、虚血時間の差や、虚血モデルの違いなどにより単純には比較できない。

我々の実験では、虚血前及び虚血中の高エネルギーリン酸は、軽度低体温群、常温群とも有意な違いを認めなかった。このことから、これまで報告されているように、global ischemia modelでは軽度低体温のredox stateは常温の場合と差がないことが確かめられた。しかし、再還流後、軽度低体温群は、PCr、ATP、Pi、pHとも常温群よりも速やかに回復し、P-MRSで約10-20%の回復の差を認めた。再還流の間、ATPはより早く補給されるので、回復する能力をもった細胞膜のpotentialや虚血神経細胞やグリア細胞の生き残ったものの統合性(integrity)の再確立が得られる(23)。再灌流24時間後および1週間後には軽度低体温群でbaselineの15-25%、常温群で25-40%のPCr、ATPの低下、軽度低体温群でbaselineの135%、常温群で166%のPiの上昇を認めた。つまり再灌流後も高エネルギーリン酸の枯渇状態が持続しており、より常温群で高度であった。Degenerating processは虚血中にすでに起こっているかもしれないが、再灌流後に引き続き障害が進行していることを示唆している。再灌流後における神経細胞の二次的損傷の機序としては、少なくとも一部はミトコンドリアレベルでelectron transport systemの障害が推測される。特に、electron transport chain enzymeの一つであるcomplex 4のdamageが考えられている(7)。虚血中は常温であっても、再還流後に軽度低体温にすればneuroprotectiveであると言う報告(5,7,12)があるが、それは一つの傍証と言えるかもしれない。

³¹P-MRSでは常温群と軽度低体温群の間で障害の程度の差が約10-20%であったのに対して、病理組織所見で

は両群の間に障害の程度の差が30-40%であった。この解離の理由の一つは、虚血に陥った前脳だけでなく、虚血に陥っていない脳幹部や小脳など頸動脈の支配領域外の領域も含めて測定された可能性がある。虚血時、前脳は高度の虚血であることと脳にはエネルギーのリザーブがないことから、そのエネルギー代謝(供給)はほぼ0であるはずなのに、PCr、ATP両群とも20-30%認められているということからもその可能性はサポートされている。また、もうひとつの理由は、病理組織の結果が実際の全体のダメージよりも強調された結果になっている可能性がある。なぜならば、病理で見た海馬CA-1領域や大脳皮質は選択的に虚血に対して障害されやすい部位であるからである(37)。しかし、高エネルギーリン酸値等の絶対値には多少問題があるにせよ、相対的な評価では真実を反映しているものと確信している。

References

1. Allen KL, Busza AL, Proctor E, King MD, Williams SR, Crockard HA, Gadian DG (1993) Controllable graded cerebral ischemia in the gerbil: studies of cerebral blood flow and energy metabolism by hydrogen clearance and ³¹P NMR spectroscopy. *NMR Biomed.* 6: 181-186
2. Almeida A, Allen KL, Bates TE, Clark JB (1995) Effect of reperfusion following cerebral ischemia on the activity of the mitochondrial respiratory chain in the gerbil brain. *J. Neurochem.* 65: 1698-1703
3. Baker KZ, Young WL, Stone JG, Kader A, Baker CJ, Solomon RA (1994) Deliberate mild intraoperative hypothermia for craniotomy. *Anesthesiology* 81: 361-367
4. Berntman L, Welsh FA, Harp JR (1981) Cerebral protective effect of low-grade hypothermia. *Anesthesiology* 55: 495-498
5. Busto R, Dietrich WD, Globus MYT, Ginsberg MD (1989) Postischemic moderate hypothermia inhibits CA1 hippocampal ischemic neuronal injury. *Neurosci. Lett.* 101: 299-304
6. Busto R, Dietrich WD, Globus MYT, Valdes I, Scheinberg P, Ginsberg MD (1987) Small differences in intras ischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J Cereb. Blood Flow Metab.* 7: 729-738
7. Canevari L, Console A, Tendi EA, Clark JB, Bates TE (1999) Effect of postischemic hypothermia on the mitochondrial damage induced by ischaemia and reperfusion in the gerbil. *Brain Res.* 817: 241-245
8. Chen H, Chopp M, Jiang Q, Garcia JH (1992) Neuronal damage, glial response and cerebral metabolism after hypothermic forebrain ischemia in the rat. *Acta Neuropathol* 84: 184-189
9. Chopp M, Knight R, Tidwell CD, Helpert JA, Brown E.

- Welch KMA (1989) The metabolic effects of mild hypothermia on global cerebral ischemia and recirculation in the cat: Comparison to normothermia and hyperthermia. *J Cereb. Blood Flow Metab.* 9: 141-148
10. Chopp M, Welch KMA, Tidwell CD, Knight R, Helpem JA (1988) Effect of mild hyperthermia on recovery of metabolic function after global cerebral ischemia in cats. *Stroke* 19: 1521-1525
 11. Churn SB, Taft WC, Billingsley MS, Blair RE, DeLorenzo RJ (1990) Temperature modulation of ischemic neuronal death and inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in gerbils. *Stroke* 21: 1715-1721
 12. Colbourne F, Corbett D (1994) Delayed and prolonged post-ischemic hypothermia is neuroprotective in the gerbil. *Brain res.* 654: 265-272
 13. Dietrich WD, Busto R, Valdes I, Loo Y (1990) Effects of normothermic versus mild hypothermic forebrain ischemia in rats. *Stroke* 21: 1318-1325
 14. Dietrich WD, Halley M, Valdes I, Busto R (1991) Interrelationship between increased vascular permeability and acute neuronal damage following temperature-controlled brain ischemia in rats. *Acta Neuropathol.* 81: 615-625
 15. Dietrich WD (1992) The importance of brain temperature in cerebral injury. *J. Neurotrauma* 9: S475-485
 16. Fox LS, Blackstone EH, Kirklm JW, Bishop SP, Bergdahl LAL, Bradley EL (1984) Relationship of brain blood flow and oxygen consumption to perfusion flow rate during profoundly hypothermic cardiopulmonary bypass. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 87: 685-664
 17. Globus MYT, Busto R, Lin B, Schnippering H, Ginsberg MD (1995) Detection of free radical activity during transient global ischemia and recirculation: Effect of intras ischemic brain temperature modulation. *J. Neurochem.* 65: 1250-1256
 18. Hagerdal M, Harp J, Siesjo BK (1975) Effect of hypothermia upon organic phosphates, glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates and associated amino acids in rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* 24: 743-748
 19. Karibe H, Chen SF, Zarow GJ, Gafni J, Graham SH, Chan PH, Weinstein PR (1994) Mild intras ischemic hypothermia suppresses consumption of endogenous antioxidants after temporary focal ischemia in rats. *Brain Res.* 649: 12-18
 20. Katsura K, Minamisawa H, Ekholm A, Folbergrova J, Siesjo BK (1992) Changes of labile metabolites during anoxia in moderately hypo- and hyperthermic rats: correlation to membrane fluxes of K^+ . *Brain Res.* 590: 6-12
 21. Kluger MJ, D'Alecy LG (1975) Brain temperature during reversible upper respiratory bypass. *J. Appl. Physiol.* 38: 268-271
 22. Kozlowski P, Buchan AM, Tuor UI, Xue D, Huang ZG, Chaundy KE, Saunders JK (1997) Effect of temperature in focal ischemia of rat brain studied by ^{31}P and 1H spectroscopic imaging. *Magn. Reson. Med.* 37, 346-354
 23. Kuroiwa T, Bonnekoh P, Hossmann KA (1990) Prevention of posts ischemic hyperthermia prevents ischemic injury of CA1 neurons in gerbil. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 10: 550-556
 24. Lei B, Tan X, Cai H, Xu Q, Guo Q (1994) Effect of moderate hypothermia on lipid peroxidation in canine brain tissue after cardiac arrest and resuscitation. *Stroke* 25: 147-152
 25. Meden P, Overgaard K, Pedersen H, Boysen G (1994) The influence of body temperature on infarct volume and thrombolytic therapy in a rat embolic stroke model. *Brain Res.* 647: 131-138
 26. Michenfelder JD, Milde JH (1991) The relationship among canine brain temperature, metabolism, and function during hypothermia. *Anesthesiology* 75: 130-136
 27. Michenfelder JD, Milde JH (1977) Failure of prolonged hypocapnia, hypothermia, or hypertension to favorably alter acute stroke in primates. *Stroke* 8: 87-91
 28. Michenfelder JD, Theye RA (1970) The effects of anesthesia and hypothermia on canine cerebral ATP and lactate during anoxia produced by decapitation. *Anesthesiology* 33: 430-439
 29. Minamisawa H, Nordstrom C-H, Smith ML, Siesjo BK (1990) The influence of mild body and brain hypothermia on ischemic brain damage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 10: 365-374
 30. Mitani A, Kodoya F, Kataoka K (1991) Temperature dependence of hypoxia-induced calcium accumulation in gerbil hippocampal slices. *Brain Res.* 562: 159-163
 31. Miyazawa T, Bonnekoh P, Widmann R, Hossmann KA (1993) Heating of the brain to maintain normothermia during ischemia aggravates brain injury in the rat. *Acta Neuropathol.* 85: 488-494
 32. Miyazawa T, Hossmann KA (1992) Methodological requirements for accurate measurements of brain and body temperature during global forebrain ischemia of rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 12: 817-822
 33. Morikawa E, Ginsberg MD, Dietrich WD, Duncan RC, Kraydieh S, Globus MYT, Busto R (1992) The significance of brain temperature in focal cerebral ischemia: histopathological consequences of middle cerebral artery occlusion in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 12:

- 380-389
34. Natale JE, D'Alecy LG (1989) Protection from cerebral ischemia by brain cooling without reduced lactate accumulation in dogs. *Stroke* 20: 770-777
 35. Rosomoff HL, Holaday DA (1954) Cerebral blood flow and cerebral oxygen consumption during hypothermia. *Am. J. Physiol.* 179: 85-88
 36. JE Natale, LG D'Alecy, Protection from cerebral ischemia by brain cooling without reduced lactate accumulation in dogs. *Stroke* 20 (1989) 770-777
 37. HL Rosomoff, DA Holaday, Cerebral blood flow and cerebral oxygen consumption during hypothermia. *Am. J. Physiol.* 179 (1954) 85-88
 38. Y Seo, M Murakami, H Watari, Y Imai, K Yoshizaki, H Nishikawa, T Morimoto, Intracellular pH determination by ³¹P-NMR technique. The second dissociation constant of phosphoric acid in a biological system. *J. Biochem. (Tokyo)* 94 (1983) 729-734
 39. A Shiino, M Matsuda, J Handa, B Chance, Poor recovery of mitochondrial redox state in CA1 after transient forebrain ischemia in gerbils. *Stroke* 29 (1998) 2421-2425
 40. WC Taft, KA Tennes-Rees, RE Blair, GL Clifton, RJ DeLorenzo, Cerebral ischemia decreases endogenous calcium-dependent protein phosphorylation in gerbil brain. *Brain Res.* 447 (1988) 159-163
 41. K Takagi, MD Ginsberg, MYT Globus, E Martinez, R Busto, Effect of hyperthermia on glutamate release in ischemic penumbra after middle cerebral artery occlusion in rats. *Am. J. Physiol.* 266 (1994) H1770-1776
 42. D Warner, J Zhou, R Ramani, MM Todd, Reversible focal ischemia in the rat: Effect of halothane, isoflurane and methohexital anesthesia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 11 (1991) 794-802
 43. FA Welsh, RE Sims, VA Harris, Mild hypothermia prevents ischemic injury in gerbil hippocampus. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 10 (1990) 557-563
 44. RL Zhang, M Chopp, H Chen, JH Garcia, ZG Zhang. Postischemic (1 hour) hypothermia significantly reduces ischemic cell damage in rats subjected to 2 hours of middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 24 (1993) 1235-1240