



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	虚血性脳侵襲に及ぼすアシドーシスの影響：ラット海馬スライスにおける無酸素・無グルコースモデルを用いた解析
Author(s)	森本, 裕二
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第3180号
Issue Date	1993-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3092959
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51175
Type	doctoral thesis
File Information	000000265318.pdf



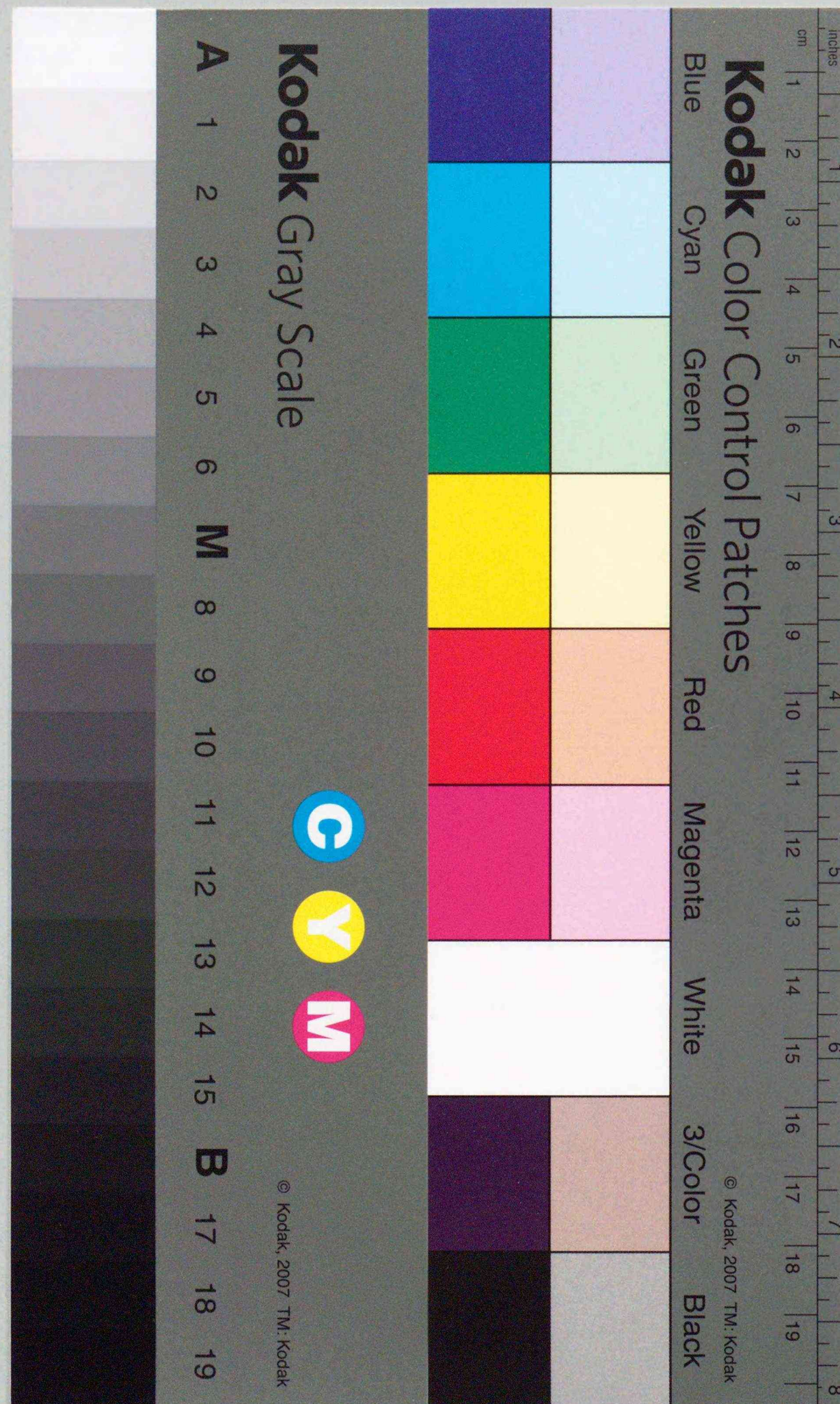
①

虚血性脳侵襲に及ぼすアシドーシスの影響：ラット海馬スライスにおける無酸素・無グルコースモデルを用いた解析

北海道大学医学部麻醉学講座

(主任：劔物 修教授)

森本 裕二



要 旨

本研究では、1) 脳虚血による神経機能障害に対してアシドーシスを合併するとどのような影響を及ぼすか、2) pHが同程度の場合、代謝性または呼吸性のアシドーシスによりその影響に差があるか、について検討した。このために脳虚血モデルとして15分間の無酸素・無グルコース負荷を行った海馬切片を使用し、種々のアシドーシス負荷による神経活動の変化について、誘発電位を指標として比較検討した。海馬切片は、5-6週令(50g前後)のウィスター系ラット脳から作成した。誘発電位は、Schaffer側枝を刺激してCA1細胞層から記録した。

pH6.5の灌流液下における無酸素・無グルコース負荷で、誘発電位の減少の程度はpH7.4の群と比較して有意に少なかった。したがって、軽度のアシドーシスが虚血性脳傷害に対して拮抗的に働くことが示唆された。

一方、pH5.0以下の灌流液下での無酸素・無グルコース負荷により、その60分後の誘発電位の回復は有意に抑制された。すなわち、pH5.0以下のアシドーシスは虚血性脳傷害を増強することが示唆された。灌流液中に乳酸30mMを添加した場合はpH6.0以下で、乳酸15mMを添加した場合はpH5.5以下で、誘発電位の回復が有意に抑制された。したがって、細胞外pHが同程度でも乳酸イオンが存在すると虚血侵襲による神経機能障害の程度を増強し、さらにその効果は濃度依存性であることが示唆された。CO₂アシドーシスの合併によっても、誘発電位の回復は抑制され、その程度は30mM乳酸を負荷した場合と同等であった。

これらの成績から、1) 軽度のアシドーシスは虚血性脳傷害に対し拮抗的に、高度のアシドーシスは増強的に作用し、その作用は二相性である、2) 細胞外pHが同程度でも、アシドーシスの成因によりその作用が異なる

こと、が示唆された。

近年、心肺蘇生法の進歩により心肺蘇生率は著明に向上した¹⁾。しかしながら、蘇生後に重篤な神経機能障害を合併するため、患者の社会復帰率は未だ一次救命症例数の1～2%に止まっている^{1, 2)}。このことは、心肺停止に伴う虚血性脳傷害の発現、機序、進行機転、増悪因子、および治療法などについて未だ不明な点が多いことを示すものでもある。

心肺停止時、生体組織は酸素供給の途絶とともに種々の程度のアシドーシスにさらされる。特に、心肺蘇生時に高度のアシドーシスを合併すると、除細動率、心拍再開率は低下し^{3, 4)}、蘇生に成功しても蘇生後に脳浮腫、痙攣等を招来し⁵⁻⁸⁾、神経学的予後を一層不良にするとされてきた^{9, 10)}。しかし、心拍再開率は心筋の酸塩基平衡状態に影響されないとする最近の報告もある^{11, 12)}。さらに、虚血性脳傷害においても、軽度のアシドーシスはむしろ脳保護的に働くという報告

もある^{13~15)}。これらのことは、アシドーシスが従来考えられてきた程有害ではなく、その程度によって心肺蘇生に及ぼす影響が異なることを示唆している。したがって、虚血性脳傷害に関しても、合併するアシドーシスが早期の神経機能障害および長期の神経学的予後などにどのような修飾的影響を及ぼすかについて依然議論が続いている。

本研究では、合併するアシドーシスの程度と脳虚血との相互関係を解析するため、脳虚血モデルとして無酸素・無グルコース負荷した海馬切片を使用し^{16, 17)}、種々のpHに調節した灌流液中における神経活動の変化を誘発集合電位を指標として比較検討した。アシドーシスは原因によって代謝性アシドーシスと呼吸性アシドーシスに分けられ、脳を含め生体に及ぼす影響がこれらアシドーシスの成因によって異なることが報告されている^{18, 19)}。そこで第2の目的として、アシドーシスのタイプにより虚血性脳傷害に対する

影響に差異があるかどうか、同様のモデルを用いて検討した。

＜対象と方法＞

本研究は「北海道大学医学部動物実験に関する指針」に基づいて計画、実施された。5-6週令（体重50g前後）のウィスター系ラットを用いた。ハロセン麻酔下に左大脳半球を迅速に摘出し、4～5℃以下の酸素加人工脳脊髄液（Artificial cerebro-spinal fluid, ACSF）中にて冷却した。ACSFの組成は、NaCl 145, KCl 4, NaH₂PO₄ 1.25, MgCl₂ 1.5, CaCl₂ 2, HEPES 6, Glucose 10 (mM) とした。pHメーター（PHM-83、Radiometer, Denmark）を用い、1規定NaOHの滴定によって、7.4（30℃）に調製した。冷却した大脳半球をマイクロライザー（Dosaka EM, DTK-1000,

Japan) に移し、矢状面に平行に $400\ \mu\text{m}$ の厚さの海馬切片を 4 ～ 5 枚作成した。切片は室温の酸素加 ACSF 中に移し、2 ～ 3 時間インキュベーションした。

インキュベーション後、切片を容量 1.5 ml の灌流チャンバーに移し、U 型ワイヤーによりシルガード底 (#184, Dow Corning, USA) に固定した。ACSF は 2 ～ 3 ml/min の速度で灌流し、灌流チャンバー内はペルティエ素子 (SM-0671, 日本ブローアー、Japan) により 30°C に維持した。

誘発電位の記録法は以下の通りである (図 1)。刺激電極として、直径 $25\ \mu\text{m}$ のテフロン被膜白金イリディウム線の双極電極を用い、電極の先端を $0.2 \sim 0.3\text{ mm}$ 間隔となるようにした。この刺激電極を海馬 Stratum radiatum の Schaffer 側枝に刺入した。一方、記録電極には外径 1 mm のガラス電極を用い、micropipette puller (Sutter, P-87, USA) により、先端直

径約 $1\ \mu\text{m}$ 、抵抗が $2 \sim 5\ \Omega$ となるように調整した。電極内を 3 M-NaCl で満たし、CA1 細胞層に刺入した。信号の増幅には Duo 773 (WPI, USA) を用いた。刺激電極と記録電極の間隔は $1.2 \sim 1.7\text{ mm}$ となるようにした。 0.1 msec の矩形波電気刺激を 2 秒毎に加え、刺激の強さは、誘発電位の最大振幅が得られるように調節した。記録電極から得られた信号は、高速 A-D 変換器 (TEAC, PS-9351, Japan) を介し、コンピュータ (HP340CH 型、Hewlett-Packard, USA) で処理した。図 1 に誘発電位の一例を示す。刺激によって得られた下向き陰性波の振幅を測定した。誘発電位の振幅と波形が安定した後に対照値を計測し、続いて、以下の 3 つの実験を行った。

実験 1 無酸素・無グルコース負荷
(Oxygen-glucose deprivation:
OGD) による誘発電位の抑制に及ぼすアシ

ドーシスの影響

ACSFを1規定HClもしくは1規定NaOHにて滴定し、7.4、6.5、6.0、5.5、5.0、4.5の5種類の異なったpHの灌流液に調整した。酸素加後、海馬切片を15分間灌流して細胞外pHを安定させた（test-pH）。次に、あらかじめグルコースを等量のマニトールで置換したACSFをtest-pHと同じpHに調整し、100%窒素を曝気した。この灌流液でさらに15分間灌流することでOGDとした。OGD終了直前に誘発電位の変化を観察し、振幅を計測した。その後、pH7.4の酸素加ACSFに戻し、60分後の誘発電位を計測した。海馬切片は一つのtest-pHによる実験終了後に破棄し、別のtest-pHによる実験には新たな海馬切片を用いた。

pH変化のみの影響を検討するため、新しい海馬切片を用いて各々異なったpHの酸素

加灌流液で30分間灌流し、誘発電位の変化を観察した。その後、同様にpH7.4の酸素加ACSFに戻し、60分後の誘発電位を計測した。

実験2 OGDによる誘発電位の抑制に及ぼす乳酸アシドーシスの影響

乳酸添加灌流液（Lactate-ACSF）は15mMまたは30mMの乳酸ナトリウムを等モルのNaClと置換することにより作成した。このLactate-ACSFを実験1と同様の方法で滴定し、pHが7.4、6.5、6.0、5.5、5.0と5種類の異なった灌流液を作成した。OGDも1と同様の方法で施行した。

乳酸アシドーシスのみの影響を検討するため、OGDを行わず、新しい海馬切片を30分間酸素加のLactate-ACSFで灌流した。その後、pH7.4の酸素加ACSFに戻し、60分後の誘発電位を計測した。

実験3 OGDによる誘発電位の抑制に及ぼす二酸化炭素 (CO_2) アシドーシスの影響

pH 7.4 に調整した ACSF に、10%、25%、50% の CO_2 を曝気することにより3種類の CO_2 灌流液 (CO_2 -ACSF) を作成した。酸素濃度は50%に固定し、残りは窒素を通気した。pHメーターで測定した、それぞれの灌流液の pH は、 6.15 ± 0.04 (10% CO_2)、 5.76 ± 0.05 (25% CO_2)、 5.51 ± 0.05 (50% CO_2) であった。 CO_2 添加による軽度低酸素の影響も検討するため、50%酸素、50%窒素曝気による群を含めた計4群において、実験1、2と同様にOGDによる誘発電位の変化とpH 7.4の酸素加ACSFに戻した60分後の誘発電位の回復度を比較した。なお無酸素状態は、各濃度の CO_2 で残りの酸素を窒素に置換することに

より作成した。

次に CO_2 負荷のみの影響を検討するため、OGDを行わず、30分間各濃度の CO_2 -

ACSFで灌流し、その後pH 7.4の酸素化ACSFに戻した60分後の誘発電位の回復度を比較した。

それぞれの実験群における海馬切片の標本数は5から11枚であり、誘発電位の振幅は対照値の百分率で表した。それぞれの値は、平均値±標準誤差(%)で表記した。統計学的解析はWilcoxon signed-rank testを用い、 $P < 0.05$ を統計学的有意と判定した。

< 結果 >

実験1 OGD負荷による誘発電位の抑制に及ぼすアシドーシスの影響

15分間のOGDにより、pH 6.5の群では

誘発電位振幅は31.5%に減少したが、pH 7.4の群と比較した場合には減少の程度は有意に少なかった(図2A)。30分間のtest-ACSFの灌流により、誘発電位振幅は灌流液のpHが低い程抑制された(図2B)。特にpH5.0と4.5では、pH5.5以上のいずれの群と比較しても有意な抑制を認めた。

OGD60分後の集合電位は、pH5.5以上の群でほぼ対照値に復した。しかし、pH5.0、4.5の群では、それぞれ対照値の60.2%、17.1%に回復したのみであった(図3A)。test-ACSF灌流の60分後における誘発電位はpH5.5以上で100%、pH4.5では82.6%に回復し、OGD合併による抑制と比較した場合には、回復の程度が有意に大きかった(図3B)。

実験2 OGDによる誘発電位抑制に及ぼす乳酸アシドーシスの影響

乳酸を15mMまたは30mMを添加した両群ともに、15分間のOGDにより全例において波形が消失した。pH7.4灌流群におけるOGD60分後の誘発電位は、乳酸15mMまたは30mM添加時のいずれにおいても、100%に回復した。一方、乳酸30mM添加ではpH6.0以下において、乳酸15mM負荷ではpH5.5以下において、誘発電位の回復はpH7.4灌流時と比較して有意に抑制された(図4A)。

30分間酸素加のLactate-ACSFで灌流し、pH7.4の酸素加ACSFに戻した60分後の誘発電位は、乳酸15mMの添加では、pH5.0の灌流群でやや回復が抑制されたが、pH7.4灌流群と比較して有意差を認めなかった。しかしながら、乳酸30mMの添加の場合には、pH5.0で1.1%と著明に抑制された(図4B)。

実験3 OGDによる誘発電位抑制に及ぼ

すCO₂アシドーシスの影響

15分間のOGDにより、全例の誘発電位波形は消失し、CO₂負荷の程度で有意差を認めなかった。OGD60分後の電位の回復は25%および50%CO₂曝気群で、有意に抑制された(図5A)。

CO₂負荷のみを行ない、続いてpH7.4の酸素加ACSFに戻した60分後の誘発電位の回復は、CO₂を50%曝気した群でのみ有意に抑制された(図5B)。しかし、その回復の程度はOGD合併による抑制と比較すると、有意に大きかった。

< 考察 >

本研究の目的は、虚血性脳傷害がアシドーシスによりどのような修飾を受けるかを解明することにある。in vivoの標本では、虚血やアシドーシスに伴う循環系の障害や生

理活性物質の二次的な影響を除外することは困難であるが、in vitro標本では虚血侵襲、アシドーシスの程度、温度などの細胞周囲環境を一定にできる利点がある。海馬は虚血に対し脆弱であり^{20, 21)}、また、神経伝達路が比較的よく知られている²²⁾ので本研究のモデルとして適していると考えられた。

Schaffer collateralはCA1錐体細胞の樹状突起に線維を送り、その興奮によって化学伝達物質を放出する²³⁾。本研究で指標とした誘発集合電位は興奮性アミノ酸レセプターのサブタイプの中でも特にnon-N-

methyl-D-aspartate (non-NMDA)タイプのレセプターの活性化により得られ、その振幅の大きさは活動電位を発生した細胞数を反映するとされる^{24, 25)}。したがって、誘発集合電位の振幅の変化は、興奮性シナプス伝達の障害を含むCA1錐体細胞群の機能障害度の指標となると考えた。

本研究の予備実験で、OGDの長さについ

て検討した。10分および15分間のOGDで、pH7.4の酸素加ACSFに戻した60分後には誘発電位の振幅は全例で対照値に回復したが、20分のOGDでは半数に電位の回復を見なかった。15分間のラット不完全脳虚血モデルにおいて、ミトコンドリア機能は高度に抑制され、ATPなどのエネルギー貯蔵も激減する²⁶⁾。しかし、虚血解除の60分以内にこれらの指標は正常範囲内に復する。一方、虚血時間を30分に延長すると、ミトコンドリア機能の回復に障害が発生し始める²⁷⁾。本研究ではOGDによる誘発電位の抑制とアシドーシスとの合併効果を検討する必要があるので、OGD後電位が回復しうる最大限の負荷として、15分と決めた。

生体の主なpH緩衝能は重炭酸イオンに依存している。しかし、*in vitro*の重炭酸緩衝液では灌流液をアシドーシスに調整した場合、重炭酸イオン濃度が減少して、膜電位²⁸⁾や浸透圧²⁹⁾に影響を与える可能性がある。

本研究では重炭酸イオン変動に伴うこれらの二次的影響を除外する目的でHEPES緩衝液を使用した。

OGDによる誘発電位の抑制に及ぼすアシドーシスの影響

pH6.5の群で、OGDによる誘発電位の減少の程度が有意に小さかった。pH6.5前後の軽度なアシドーシスが虚血後の神経障害に対してむしろ保護的に作用するという報告がある^{13~15)}。この機序としては、軽度のアシドーシスがNMDAレセプターの活性化によるカルシウムの細胞内流入を抑制するため、細胞障害を軽減させると推測されている³⁰⁾。本研究では、酸素加pH6.5の30分間の灌流で誘発電位がわずかに抑制されたので、これがOGDによるエネルギー枯渇に対して拮抗的に働いたとも考えられる。いずれの機序にしろ、pH6.5程度の軽度のアシドーシ

スは虚血性脳傷害に対して拮抗的に働くものと推察された。

pH 5.0 以下の群で、OGD 60 分後の誘発電位の回復は pH 7.4 の群と比較して有意に抑制された。すなわち、pH 5.0 以下のアシドーシスは虚血性脳傷害を増強させると考えられた。pH 5.0 以下のアシドーシスはそれ自体が神経細胞機能を障害すると報告されている^{31~33)}。しかし、OGD による抑制と比較して、pH 5.0 および 4.5 の灌流後の誘発電位の回復は、有意に大きかった。これは、pH 5.0 以下の虚血性脳傷害の増強効果が、アシドーシス単独ではなく、アシドーシスと虚血侵襲との相互作用であることを示唆する所見と考えらる。

この相互作用の機序のひとつとして、浮腫の亢進が考えられる。細胞外のアシドーシスは細胞内 pH を低下させて、 Na^+/H^+ 対向輸送を活性化する^{32, 34, 35)}。その結果、 Na イオンが細胞内に流入して、細胞容積が

増加する。一方、この機序は細胞内 pH を改善する。 Na^+/H^+ 対向輸送を抑制すると、細胞内アシドーシスが持続し、むしろ神経障害が増悪するという報告もある^{7, 32, 34)}。また、浮腫の増強に伴う神経障害の主体は微小循環障害であり、細胞機能障害ではないともいわれている⁷⁾。本研究のモデルは循環系を持たないので、浮腫の亢進の関与は低いかもしれない。第2の機序として、アシドーシスはミトコンドリアによる細胞内 Ca^{2+} 調節機構を障害し、虚血による細胞内 Ca^{2+} を上昇させる可能性がある⁷⁾。第3の機序として、アシドーシスは虚血によるフリーラジカル産生をさらに促進する可能性がある^{36, 37)}。

OGD による誘発電位抑制に及ぼす乳酸アシドーシスの影響

pH レベルが同程度でも、乳酸イオンの添加によって濃度依存性に OGD 後の誘発電位

の回復が抑制された。すなわち、乳酸アシドーシスは、より高度に虚血性脳障害を増強する事が示された。その機序として、乳酸イオンがより大量の水素イオンを細胞内に流入させること³³⁾、または両者が結合して非荷電の状態となり、細胞内に拡散しやすくなること^{38, 39)}が推測されるが、いずれの機序においても細胞内pHをより低下させると考えられる。また、フリーラジカル産生の促進¹⁸⁾や乳酸イオンの浸透圧効果による浮腫の増強^{32, 35, 40)}など、乳酸イオン自体の効果も考えられる。

乳酸アシドーシス自体は、塩酸などの外因性の酸によるアシドーシスと比較してその細胞障害作用は強いとされる^{33, 38, 39)}。しかし、30分間酸素加のLactate-ACSFで灌流し、pH7.4の酸素加ACSFに戻した60分後の誘発電位は、30mM乳酸イオン添加時のpH5.0の群以外対照値のレベルに回復した。換言すれば、OGD後の誘発電位の

回復抑制は、30mM乳酸イオン添加時のpH5.0の群では乳酸アシドーシス単独の作用の可能性もあるが、その他の群では、乳酸アシドーシスと虚血侵襲の相互作用と考えられる。

pH7.4の群では乳酸イオンレベルが30mMであっても、OGD60分後の誘発電位は、100%まで回復した。このことは、アシドーシスの並存のない乳酸イオンの存在のみでは、虚血性脳傷害を増強させない事を示唆している。

低酸素状態の持続は脳内に乳酸を蓄積させる^{41, 42)}。したがって、呼吸不全による低酸素血症のために心停止となった場合には、心筋梗塞による突発性の心停止と比較して、脳内の乳酸値が上昇している可能性が高い。乳酸の蓄積と細胞内pH低下の程度は相関する^{43, 44)}と報告されている。したがって、今回の結果から鑑み、たとえ循環停止時間が同程度であっても呼吸不全に続発した心停止

症例では、蘇生後の組織学的所見ならびに神経学的予後が不良となると推測される。イヌで窒息により心停止に至った場合と、電気ショックにより心停止になった場合を比較すると、蘇生後の脳組織所見は、前者での壊死や浮腫等の所見はより高度であるとする報告⁴⁵⁾はこのことを支持している。また、臨床例でも蘇生後著明な脳腫脹をきたし脳死にいたるのは、呼吸不全に続発する心停止症例に有意に多いとされている⁴⁶⁾。

OGDによる誘発電位の抑制に及ぼす CO₂アシドーシスの影響

OGD後60分の電位の回復は、CO₂濃度が25%、50%の群で有意に抑制された。この電位の回復をそれぞれの灌流液の細胞外pHに対してプロットし、test-ACSF、Lactate-ACSFで灌流した時の回復と比較したのが図6である。CO₂アシドーシス負

荷による電位の回復は、30mMの乳酸イオン添加群とほぼ同程度に抑制された。この成績は、脳虚血にCO₂アシドーシスが合併すると、虚血性脳障害に対して高濃度の乳酸アシドーシスと同程度の増強効果が生じる事を示唆している。

これに反して、CO₂アシドーシスでは、同程度のpHでも乳酸アシドーシスと比較して神経障害が軽度で、動脈血CO₂分圧が300mmHgであっても脳のエネルギー障害は認めず⁴⁷⁾、組織学的変化も軽微であると⁴⁸⁾の報告がある。また高気圧下に750

mmHgという高いCO₂分圧のガスを吸入させても、なんら神経学的障害を認めなかったという報告もある⁴⁹⁾。本研究においても、OGDを伴わないCO₂アシドーシス後の電位の回復は、OGD合併による抑制と比較して有意に大きかった。CO₂は速やかに細胞膜を通過し、細胞内pHを低下させる⁵⁰⁾。したがって、本研究で認められた誘発電位の回復

抑制効果は、 CO_2 単独の影響というより、むしろOGD時の細胞内pHをより迅速、高度に低下させる事に起因したと解釈すべきかも知れない。

本研究では、細胞内pHの評価は行わなかった。乳酸、 CO_2 アシドーシス合併時の虚血性脳傷害増強効果の機序として、虚血時の細胞内pHの低下が示唆された。したがって、今後の研究では細胞内pH測定を加えることにより、この機序がより明確になるものと予想される。

臨床の場で、脳内の酸塩基平衡状態を考慮しながら治療方針を決定することは極めて重要である。しかし、現時点では直接的に脳酸塩基平衡状態を評価することは不可能である。一般に、心肺蘇生中の動脈血酸塩基平衡状態は、脳を含めた組織の状態を反映しない^{51, 52)}とされている。したがって、脳内の

酸塩基平衡状態を推定するその他の方法を確認する必要があると思われる。

結語

1 ラット海馬切片の誘発電位を指標にした場合、無酸素無グルコース負荷に合併するアシドーシスは、軽度ではその虚血性脳傷害に対し拮抗性に、高度では相互的に作用する。その交差点はpH5.5～6.0であった。

2 細胞外pHが同じであれば、乳酸イオンの存在は、アシドーシスによる虚血性侵襲を濃度依存性に増強する。

3 CO_2 によるアシドーシスは高濃度の乳酸アシドーシスと同程度の虚血侵襲増強効果をもたらす。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました北海道大学医学部麻酔学講座劔物修教授に深甚なる謝意を表します。また、実験の直接的指導を戴いた同講座山村剛康助教授に深謝いたします。最後に、本研究に対して、貴重な御助言、御協力、御配慮をいただいた北海道大学医学部麻酔学講座教室員に深く感謝いたします。

文 献

1. 小濱 啓次: DOAの現状と今後の課題. 救急医学 15: 250~256, 1991.
2. Safar, P.: Resuscitation from clinical death: Pathophysiologic limits and therapeutic potentials. Crit. Care Med. 16: 923~941, 1988.
3. Kerber, R.E. and Sarnat, W.: Factors influencing the success of ventricular defibrillation in man. Circulation 60: 226~230, 1979.
4. Kerber, R.E., Jensen, S.R., Gascho, J.A., Grayzel, J., Hoyt, R., and Kennedy, J.: Determinants of defibrillation: Prospective analysis of 183 patients. Am. J. Cardiol. 52: 739~745, 1983.

5. Morimoto, Y., Yamamura, T., and Kemmotsu, O.: Influence of hypoxic and hypercapnic acidosis on brain water content after forebrain ischemia. Crit. Care Med. 21: In Press, 1993.

6. Myers, R.E.: Lactic acid accumulation as cause of brain edema and cerebral necrosis resulting from oxygen deprivation. In "Advances in Perinatal Neurology." ed. by Korobkinand, R. and Guilleminault, G., Spectrum, New York, pp. 85~114, 1979.

7. Siesjö, B.K.: Acidosis and ischemic brain damage. Neurochem. Pathol. 9: 31~88, 1988.

8. Warner, D.S., Smith, M-L., and Siesjö, B.K.: Ischemia in normo- and hyperglycemic

rats: Effects on brain water electrolytes. Stroke 18: 464~471, 1987.

9. Nordström, C.H., Rehncrona, S., and Siesjö, B.K.: Restitution of cerebral energy state after complete and incomplete ischemia of 30 min duration. Acta Physiol. Scand 97: 270~272, 1976.

10. Siemkowicz, E. and Hansen, J.: Clinical restitution following cerebral ischemia in hypo-, normo-, and hyperglycemic rats. Acta Neurol. Scand. 58: 1~8, 1978.

11. Kette, F., Weil, M.H., Gazmuri, R.J., Bisera, J., and Rackow, E.C.: Increase in myocardial PCO_2 during CPR correlate inversely with coronary perfusion pressures (CPP) and resuscitability. Circulation 80: II-494, 1989.

12. Kette, F., Weil, M.H., von Planta, M., Gazmuri, R.J., and Rackow, E.C.: Buffer Agents do not reverse intramyocardial acidosis during cardiac resuscitation. *Circulation* 81: 1660~1666, 1990.

13. Giffard, R.G., Monyer, H., Christine, C., and Choi, D.W.: Acidosis reduces NMDA receptor activation, glutamate neurotoxicity, and oxygen-glucose deprivation neuronal injury in cortical cultures. *Brain Res.* 506: 339~342, 1990.

14. Tombaugh, G.C. and Sapolsky, R.M.: Mild acidosis protects hippocampal neurons from injury by oxygen and glucose deprivation. *Brain Res.* 506: 343~345, 1990.

15. Tombaugh, G.C. and Sapolsky, R.M.:

Mechanistic distinctions between excitotoxic and acidotic hippocampal damage in an in vitro model of ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 10: 527~535, 1990.

16. Amagasa, M., Mizoi, K., Ogawa, A., and Yoshimoto, T.: Actions of brain-protecting substances against both oxygen and glucose deprivation in the guinea pig hippocampal neurons studied in vitro. *Brain Res.* 504: 87~93, 1989.

17. Amagasa, M., Ogawa, A., and Yoshimoto, T.: Effects of calcium and calcium antagonists against deprivation of glucose and oxygen in guinea pig hippocampal slices. *Brain Res.* 526: 1~7, 1990.

18. Rehncrona, S., Hauge, H.N., and Siesjö, B.K.: Enhancement of iron-catalyzed free

radical formation by acidosis in brain homogenates: Difference in effect by lactic acid and CO₂. J. Cereb. Blood Flow Metab. 9: 65~70, 1989.

19. Mitchell, J.H., Widenthal, K., and Johnson, R.L., Jr.: The effects of acid-base disturbances on cardiovascular and pulmonary function. Kidney Int. 1: 375~389, 1972.

20. Brierly, J.B. and Graham, D.I.: Hypoxia and vascular disorders of the central nervous system. In "Greenfield's Neuropathology (4th ed)" ed. by Adams, J.H., Crosellis, J.A.N., and Duchen, L.W., Edward Arnold, London, pp. 125~207, 1984.

21. Kirino, T.: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. Brain

Res. 239: 57~69, 1982.

22. Rawlins, J.N.P. and Green, K.F.: Lamellar organisation in the rat hippocampus. Exp. Brain Res. 28: 335~344, 1977.

23. Collingridge, G.L., Kehl, S.J., and McLennan, H.: Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of rat hippocampus. J. Physiol. (Lond.) 334: 33~46, 1983.

24. Otsuka, H., Yamamura, T., Hanaoka, Y., and Kemmotsu, O.: Does propofol enhance GABA-mediated inhibition? J. Anesth. 6: 305~311, 1992.

25. Kass, I.S., Cottrell, J.E., and Chambers, M.S.: Magnesium and Cobalt, not nimodipine,

protect neurons against anoxic damage in the rat hippocampal slice. *Anesthesiology* 69: 710~715, 1988.

26. Smith, M-L., von Hanwehr, R., and Siesjö, B.K.: Changes in Extra- and intracellular pH in the brain during and following ischemia in hyperglycemic and in moderately hypoglycemic rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 6: 574~583, 1986.

27. Hillered, L., Siesjö, B.K., and Arfors, K.E.: Mitochondrial response to transient forebrain ischemia and recirculation in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 4: 438~446, 1984.

28. Astion, M.L., Coles, J.A., and Orkland, R.K.: Effects of bicarbonate on glial cell membrane potential in *Necturus* optic nerve.

Neurosci. Lett. 76: 47~52, 1987.

29. Kimelberg, H.K. and O'Connor, E.: Swelling of astrocytes causes membrane potential depolarization. *Glia* 1: 219~224, 1988.

30. Morad, M., Dichter, M., and Tang, C.M.: The NMDA activated current in hippocampal neurons is highly sensitive to $[H^+]_o$. *Soc. Neurosci. Abstr.* 14: 791, 1988.

31. Norenberg, M.D., Mozes, L.W., Gregorios, J.B., and Norenberg, L.O.B.: Effects of lactic acid on astrocytes in primary culture. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 46: 154~166, 1987.

32. Staub, F., Baethmann, A., Peters, J., Weigt, H., and Kempfski, O.: Effects of

lactacidosis on glial cell volume and viability.
J. Cereb. Blood Flow Metab. 10: 866~876,
1990.

33. Walz, W. and Wuttke, W.A.: Resistance of
astrocyte electrical membrane properties to
acidosis changes in the presence of lactate.
Brain Res. 504: 82~86, 1989.

34. Siesjö, B.K.: Mechanisms of ischemic
brain damage. Crit. Care Med. 16: 954~963,
1988.

35. Jakubovicz, D.E. and Klip, A.: Lactic
acid-induced swelling in C6 glial cells via
 Na^+/K^+ exchange. Brain Res. 485: 215~224,
1989.

36. Bralet, J., Bouvier, C., Schreiber, L., and
Boquillon, M.: Effect of acidosis on lipid

peroxidation in brain slices. Brain Res. 539:
175~177, 1991.

37. Siesjö, B.K., Bendek, G., Koide, T.,
Westerberg, E., and Wieloch, T.: Influence of
acidosis on lipid peroxidation in brain tissues
in vitro. J. Cereb. Blood Flow Metab. 5: 253~
258, 1985.

38. Nedergaard, M., Goldman, S.A.,
Desai, S., and Pulsinelli, W.A.: Acid-induced
death in neurons and glia. J. Neurosci. 11:
2489~2497, 1991.

39. Goldman, S.A., Pulsinelli, W.A., Clarke,
R.P., and Plum, F.: The effects of
extracellular acidosis on neurons and glia in
vitro. J. Cereb. Blood Flow Metab. 9: 471~
477, 1989.

40. Lomneth, R., Medrano, S., and Gruenstein, E.I.: The role of transmembrane pH gradients in the lactic acid induced swelling astrocytes. *Brain Res.* 523: 69~77, 1990.

41. Ardelt, B.B. and Jongkind, J.F.: Effect of hypoxia on substrate levels in the brain of the adult mouse. *J. Neurochem.* 18: 2237~2240, 1971.

42. Gyulai, L., Schnall, M., Mclaughlin, A.C., Leigh, J.S., and Chance, B.: Simultaneous ^{31}P - and ^1H -nuclear magnetic resonance studies of hypoxia and ischemia in the cat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 7: 543~551, 1987.

43. Combs, D.J., Dempsey, R.J., Maley, M., Donaldson, D., and Smith, C.: Relationship between plasma glucose, brain lactate, and

intracellular pH during cerebral ischemia in gerbils. *Stroke* 21: 936~942, 1990.

44. von Hanwehr, R., Smith, M-L., and Siesjö, B.K.: Extra- and intracellular pH during near-complete forebrain ischemia in the rat. *J. Neurochem.* 46: 331~339, 1986.

45. Vaagenes, D., Safar, P., Diven, W., Moosy, J., Rao, G., Cantadore, R., and Kelsey, S.: Brain enzyme levels in CSF after cardiac arrest and resuscitation in dogs: Markers of damage and predictors of outcome. *J. Cereb. blood Flow Metab.* 8: 262~275, 1988.

46. Morimoto, Y., Kemmotsu, O., Kitami, K., Matsubara, I., and Tedo, I.: Acute brain swelling after out-of-hospital cardiac arrest: Pathogenesis and outcome. *Crit. Care Med.*

21: In press, 1993.

47. Folbergrová, J., Potén, U., and Siesjö, B.K.: Patterns of changes in brain carbohydrate metabolites, amino acids and organic phosphates at increased carbon dioxide tensions. *J. Neurochem.* 22: 1115~1125, 1974.

48. Paljärvi, L., Söderfeldt, B., Kalimo, H., Olsson, Y., and Siesjö, B.K.: The brain in extreme respiratory acidosis-A light- and electron-microscopic study in the rat. *Acta Neuropathol (Berl)* 58: 87~94, 1982.

49. Xu, Y., Cohen, Y., Litt, L., Chang, L.H., and James, T.L.: Tolerance of low cerebral intracellular pH in rats during hyperbaric hypercapnia. *Stroke* 22: 1303~1308, 1991.

50. Roos, A. and Boron, W.F.: Intracellular pH. *Physiol. Rev.* 61: 296~434, 1981.

51. von Planta, M., Weil, M.H., Gazmuri, R.J., Bisera, J., and Rackow, E.C.: Myocardial acidosis associated with CO₂ production during cardiac arrest and resuscitation. *Circulation* 80: 684~692, 1989.

52. Wiklund, L., Söderberg, D., Henneberg, S., Rubertsson, S., Stjernström, H., and Groth, T.: Kinetics of carbon dioxide during cardiopulmonary resuscitation. *Crit. Care Med.* 14: 1015~1022, 1986.

Figure Legends

Figure 1. Schematic illustration of recording hippocampal evoked potentials and change of population spike (PS) activity with oxygen-glucose deprivation (OGD).

Arrow indicates stimulus artifact.

Left: Sites of stimulation and recording are illustrated.

Right: Changes of PS activity with OGD are shown.

A: Control; Peak to peak PS amplitude was measured. Negativity indicates downward deflection.

B-D: Depression of PS amplitude with OGD.

E: Recovery of PS amplitude 60 min after perfusion with control solution following OGD.

Figure 2. The effects of acidosis and OGD on hippocampal PS amplitudes.

A: The slices were perfused with a test solution for 15 min and followed by OGD for 15 min while pH of the solution remained unchanged. At the termination of OGD, population spike amplitude was plotted as percent of control amplitude. The PS amplitude was significantly larger for slices tested with pH 6.5 than those tested with pH 7.4. Responses tested with the other pH solutions were all abolished.

B: The slices were perfused with either of the test solutions for 30 min without OGD and PS amplitude was plotted as percent of the

control amplitude. The amplitudes of PS reduced in pH dependent fashion.

bars indicate $\pm$ SEM

* ; significant v.s. pH 7.4

✱ ; significant v.s. groups whose pH is 5.5 or above

Figure 3 Recovery of the PS amplitudes after acidotic challenge with and without OGD.

A: The test slices were allowed to recover from acidotic challenge with OGD in oxygenated pH 7.4 solution for 60 min. The recovery of PS amplitudes was plotted as percent of control amplitudes. The recovery was significantly inhibited for slices tested with pH 5.0 and 4.5.

B: Recovery following 30 min acidotic challenge without OGD. Significant greater recovery of PS amplitudes of pH 5.0 and 4.5 groups suggests that OGD produces irreversible effects when combined with profound acidosis.

bars indicate $\pm$ SEM

*; significant v.s. pH 7.4

✱; significant v.s. the same groups with OGD

Figure 4. Recovery of the PS amplitudes following lactic acidosis with or without OGD.

Lactate, 15 or 30 mM, was replaced with equivalent NaCl in the test solutions. The other procedures are the same as in Fig.3.

A: With OGD. Recovery was significantly inhibited by addition of lactate even though the test pH remained the same.

B: Without OGD. Profound lactic acidosis itself had no damaging effects on hippocampal activity except pH 5 with 30 mM lactate.

bars indicate $\pm$ SEM

*; significant v.s. pH 7.4

*; significance between A and B

◆; No recovery of PS

Figure 5. Recovery of the PS amplitudes following exposure to CO₂ acidosis with or without OGD.

The test solutions were bubbled with 10, 25 or 50 % CO₂, respectively. The other procedures were the same as in Fig. 3. The recovery of PS amplitudes was significantly inhibited for the slices tested with 25 or 50 % CO₂ in A and with 50% CO₂ in B.

bars indicate $\pm$ SEM

*; significant v.s. the group without CO₂ exposure

*; significant v.s. the group with OGD

Figure 6. The effects of different acidosis on the recovery of PS amplitude following OGD.

Recovery of PS amplitude was plotted as percent of control against the extracellular pH value. Lactate and CO₂ potentiated the aggravating effects of acidosis even though the extracellular pH remained the same.

Figure 2

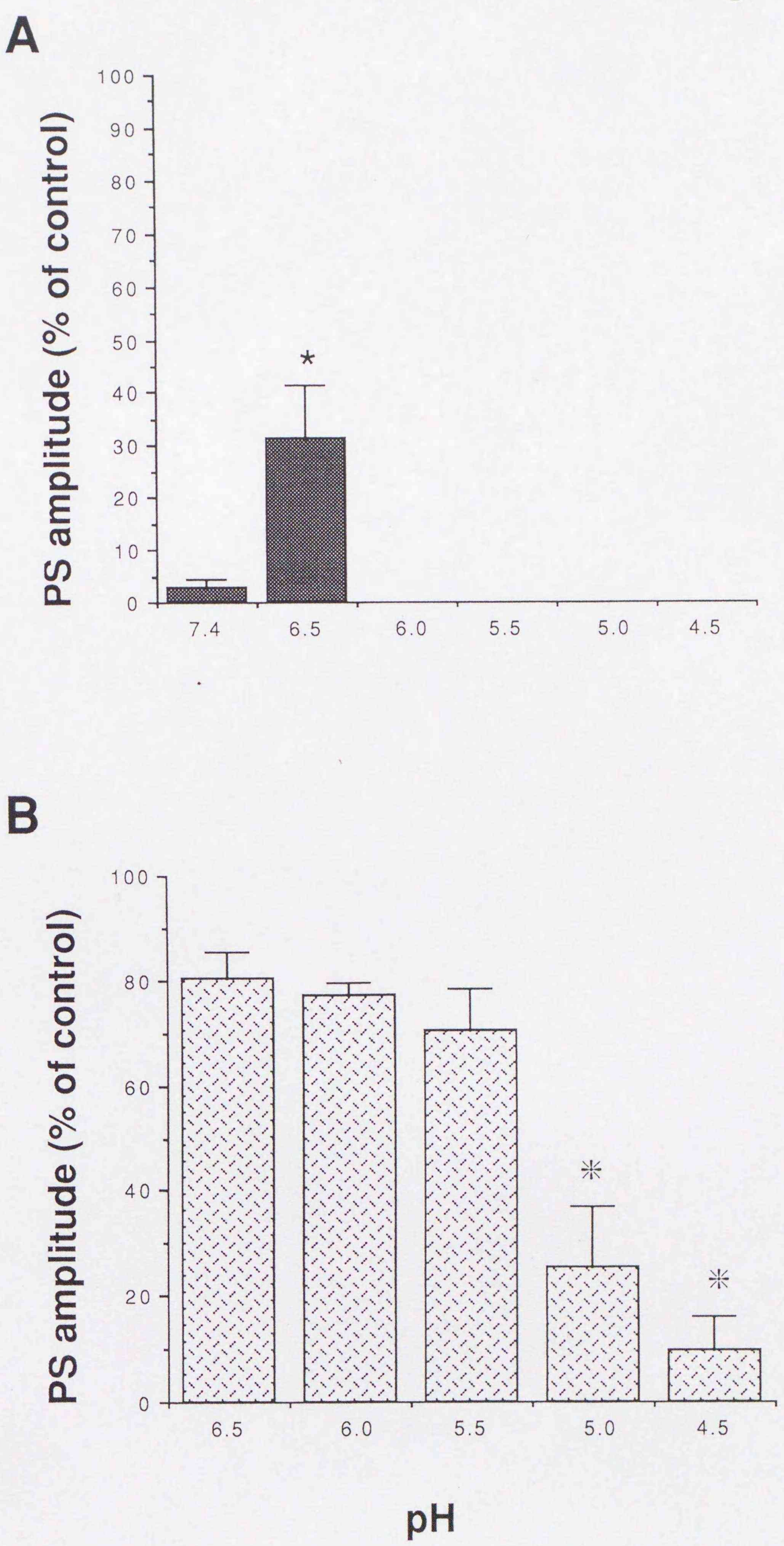
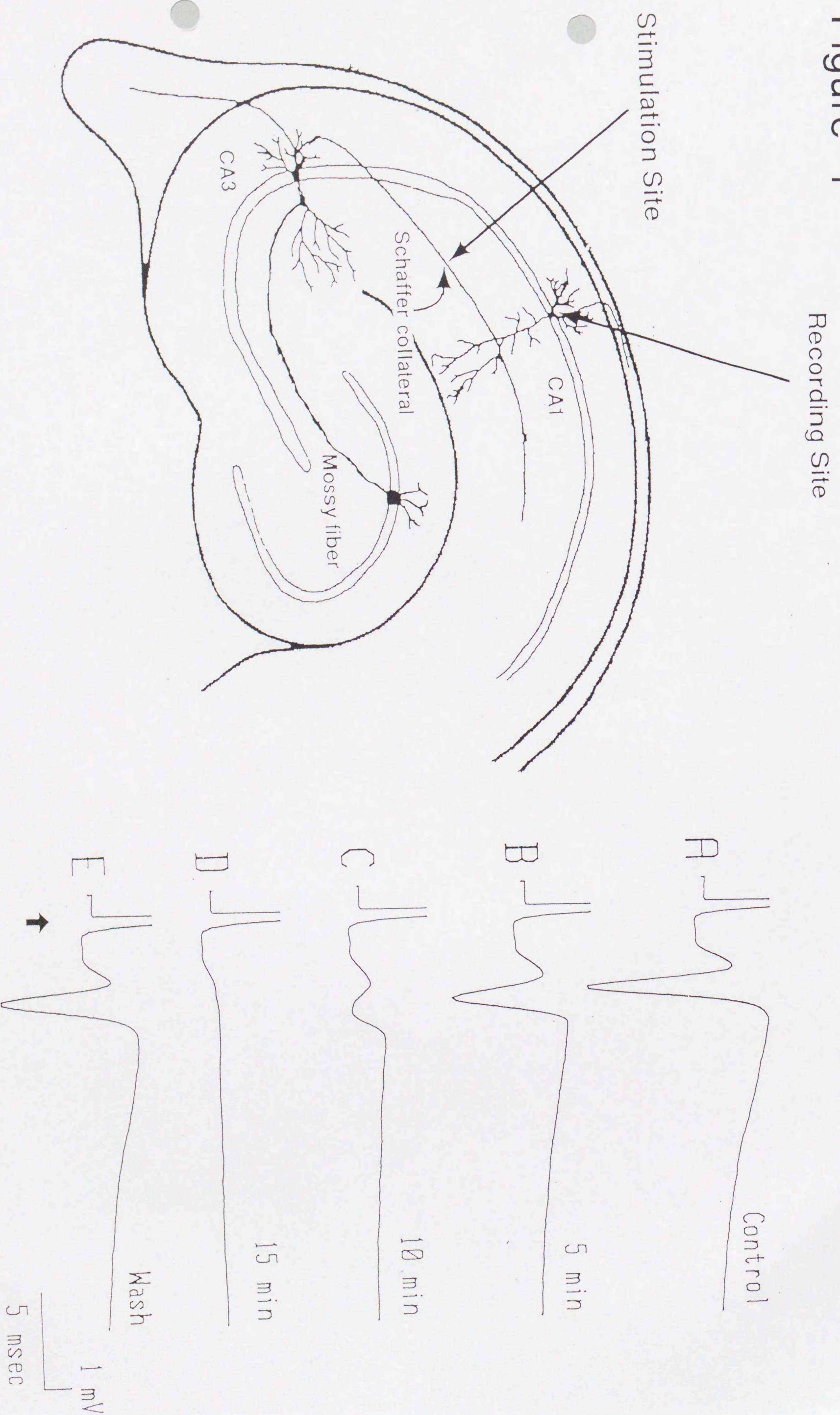
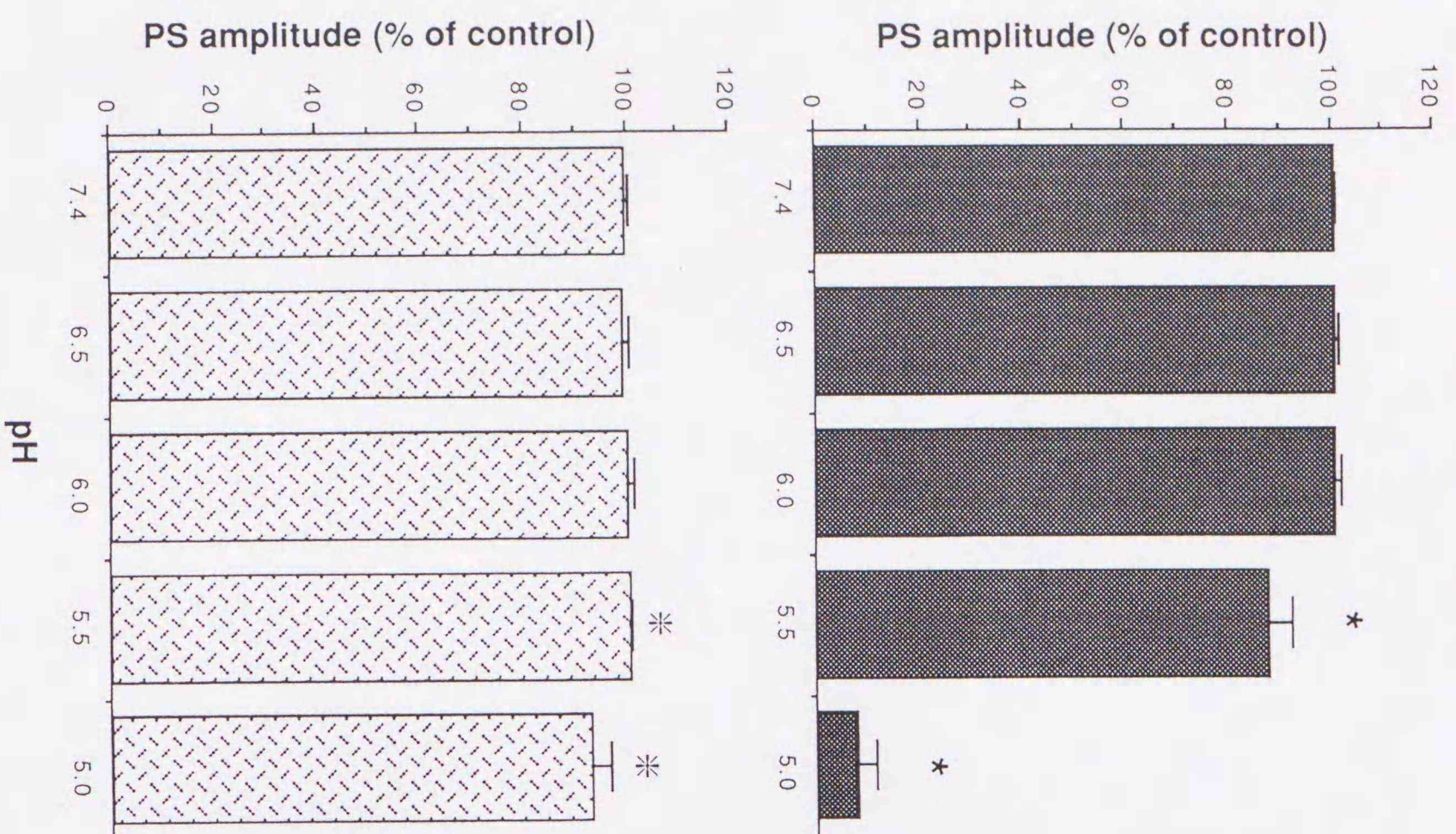


Figure 1



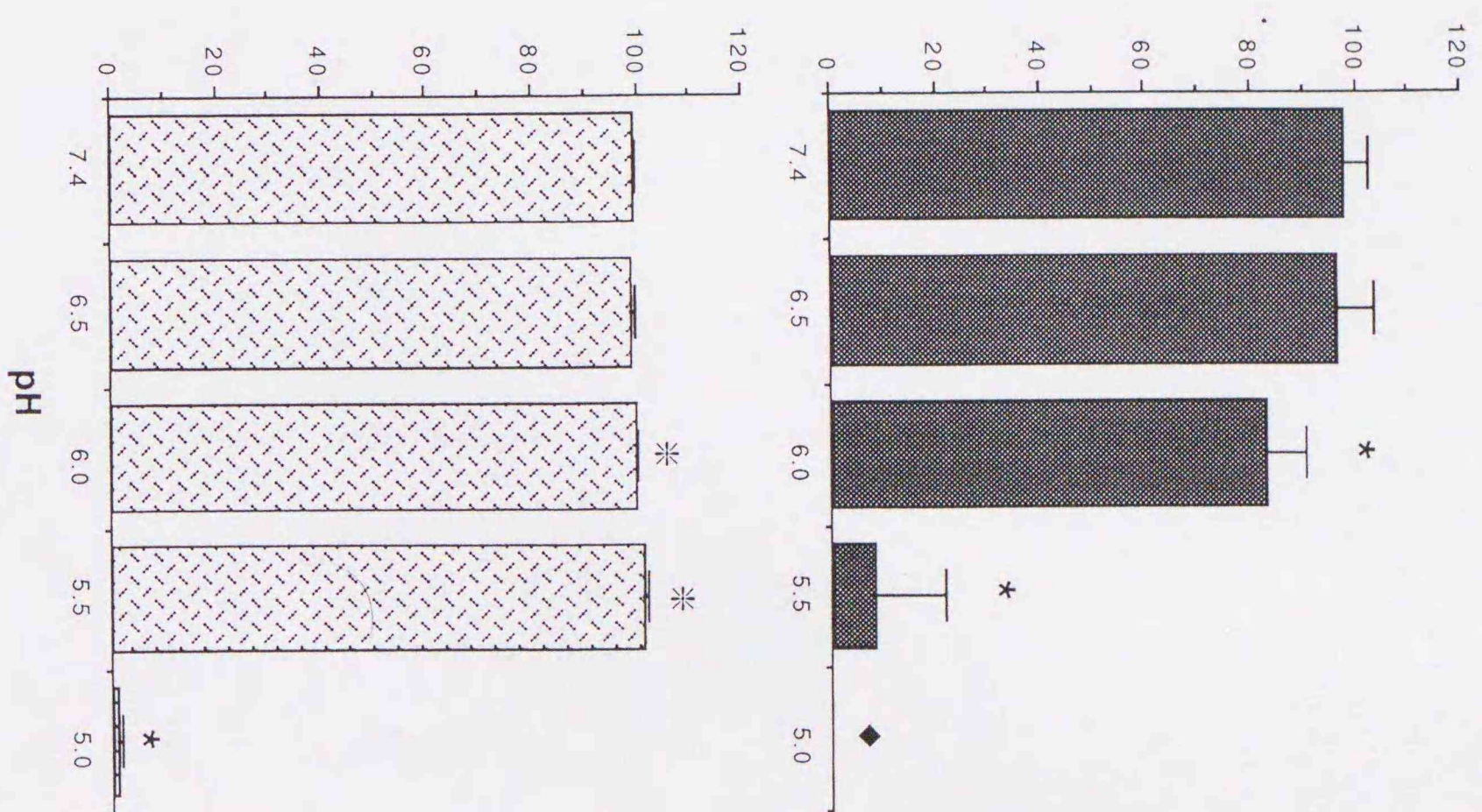
A

15mM lactic acidosis



30mM lactic acidosis

Figure 4



B

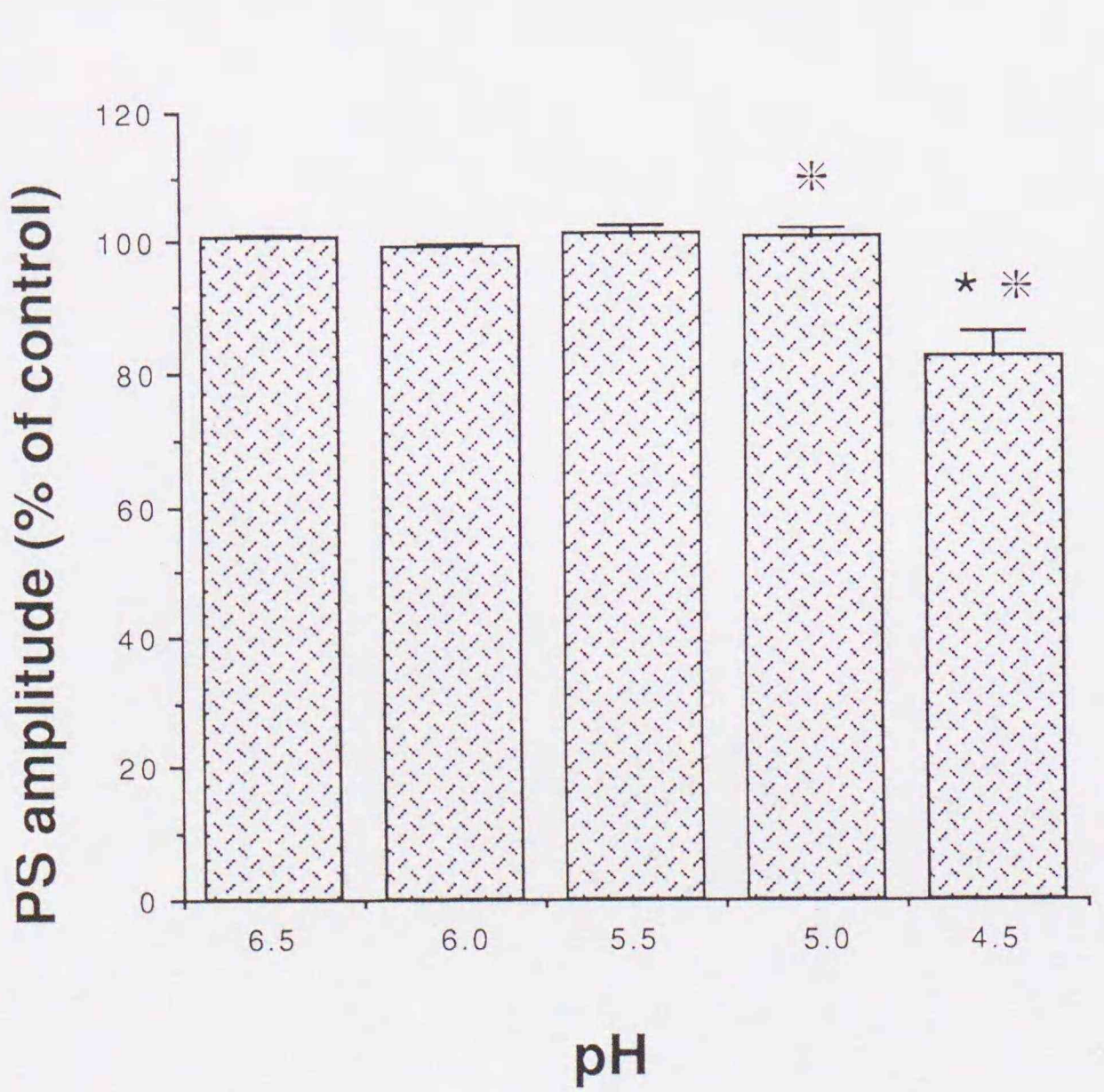
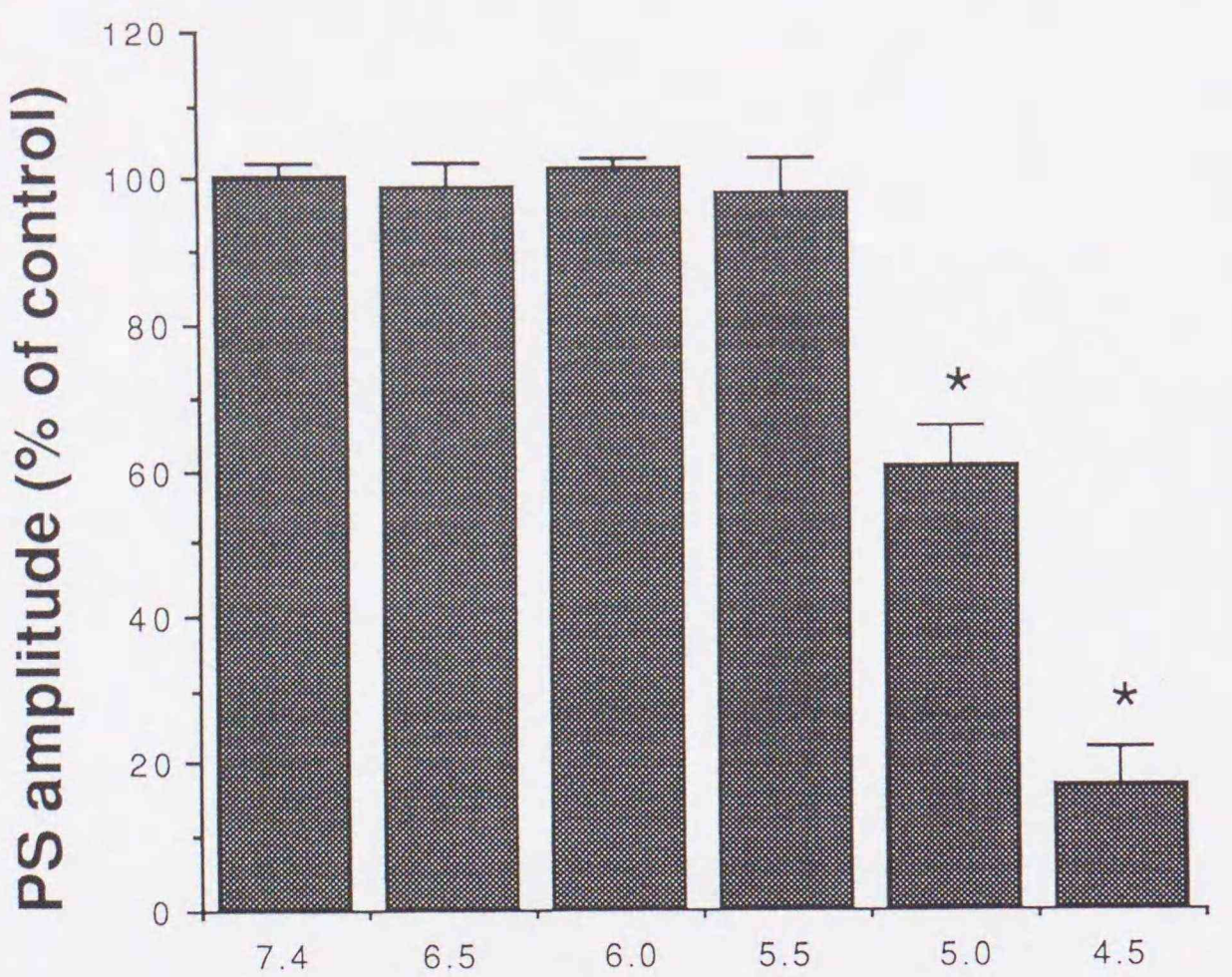


Figure 3

Figure 6

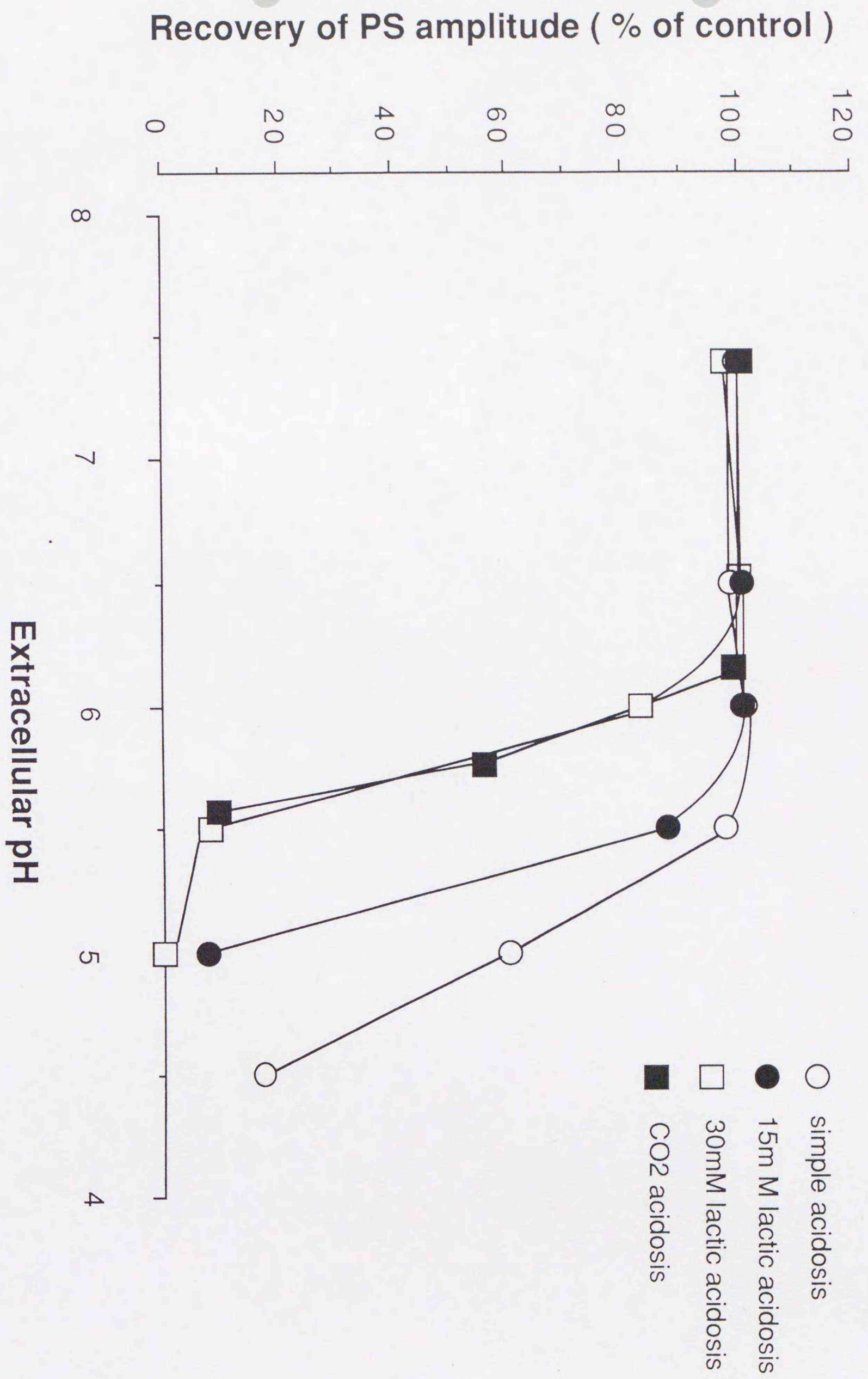
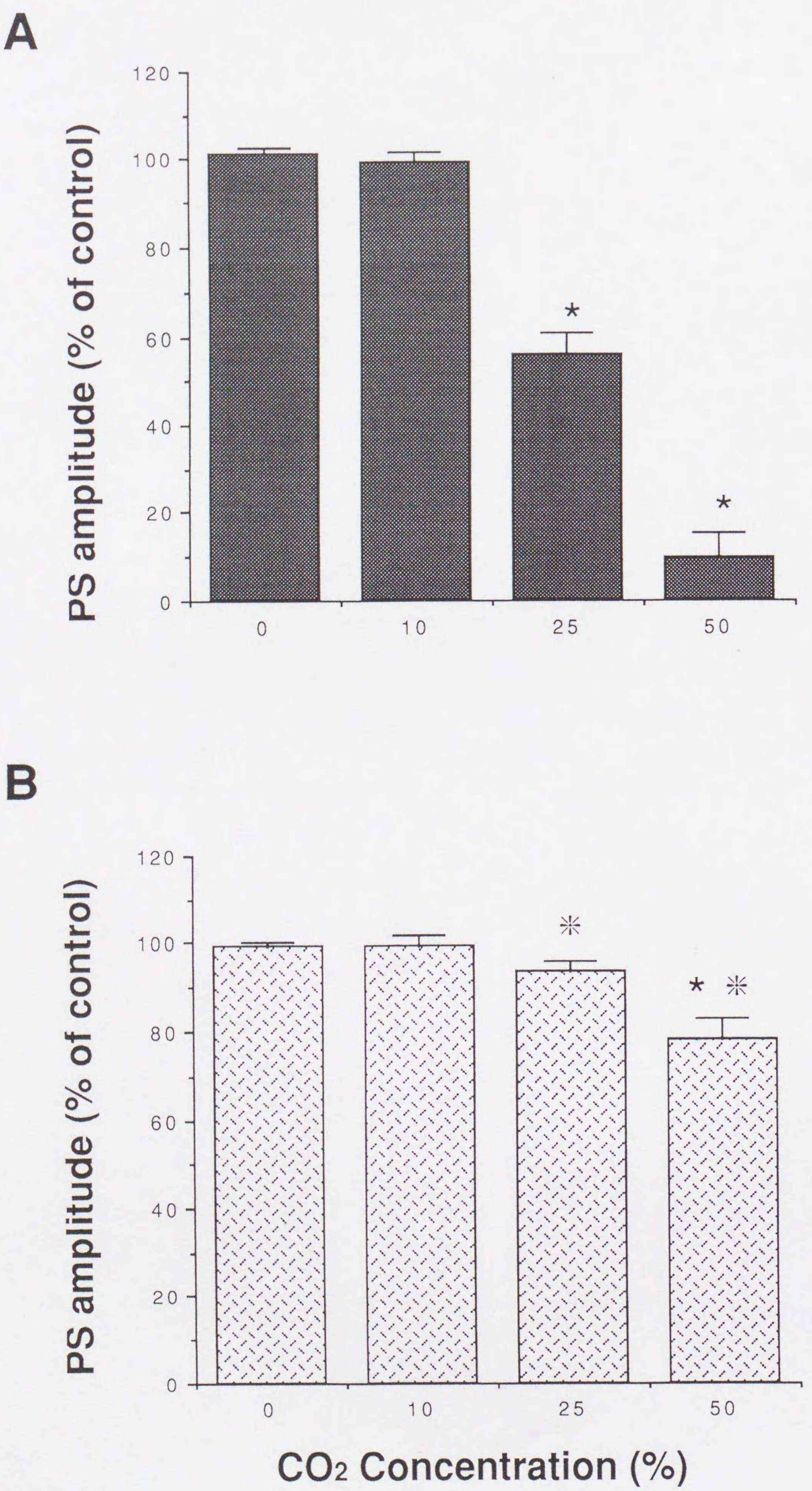


Figure 5



**Effects of acidosis on the neuronal function following
oxygen-glucose deprivation in the rat hippocampal slices**

Yuji Morimoto

Abstract

This study was designed to examine 1) whether cerebral ischemic damage is aggravated by accompanying acidosis and 2) which has more potential to cause neural damage between respiratory and metabolic acidosis. To investigate these points, inhibition and recovery of hippocampal evoked potentials were studied in vitro with different pH solutions. Population spike (PS) activity was recorded from CA 1 region after stimulation of the Schaffer collaterals of the 400 μ m hippocampal slices from young Wister rats. Ischemic insult was mimicked by combined oxygen and glucose deprivation (OGD) of the perfusate for 15 min.

PS activity was almost abolished by OGD in the test solutions, the pH of which was adjusted at either 7.4, 6.5, 6.0, 5.5, 5.0 or 4.5. PS persisted (though markedly depressed to 31.5 % of control) with pH 6.5 solution, indicating that mild acidosis had antagonistic effects on ischemic injury. The recovery of PS in the control solution was significantly inhibited for the slices tested with pH 4.5 and 5.0 solutions. The results suggest that acidosis had diverse effects on ischemic cerebral damage.

When 15 mM lactate was added to the solution, the recovery of PS was significantly inhibited for the slices tested with pH 5.5 or lower. When 30 mM lactate was added, the critical pH point at which the recovery of population spike was inhibited changed to 6.0, suggesting that ischemic cerebral damage was enhanced by lactate in a dose dependent fashion. By addition of CO₂, the recovery of PS following OGD was inhibited to a similar degree as with 30 mM lactic acidosis.

It is concluded that concomitant acidosis has divergent effects on the cerebral ischemic damage depending on the pH; mild acidosis had a protective effect but profound acidosis had an aggravating effect, the cross over point being at around pH 6.0. Lactate and CO₂ potentiated the aggravating effects of acidosis even though the extracellular pH remained the same.

