

조직학적 측면에서 본 중증도의 미만성 축삭손상 백서 모델에서 $MgSO_4$ 의 신경보호 작용

인하대학교 의과대학 신경외과학교실

심유식 · 박종운 · 현동근 · 하 윤 · 박현선 · 박형천

Histologically Neuroprotective Effect of $MgSO_4$ after Moderate Diffuse Axonal Injury in Rats

Yu Shik Shim, M.D., Chong Oon Park, M.D., Dong Keun Hyun, M.D., Yoon Ha, M.D.,
Hyeon Sun Park, M.D., and Hyung Chun Park, M.D.

Department of Neurosurgery, College of Medicine, Inha University, Incheon, Korea

Objective: Previous studies have shown that blood-ionized magnesium levels decline, associated with the development of histological changes (apoptosis), after traumatic brain injury. Therefore, we have a hypothesis that early magnesium salt treatment may be improving posttraumatic apoptotic change.

Methods: Thirty two anesthetized adult Sprague-Dawley rats were injured with a Marmarou's weight-drop device and blood-ionized magnesium was checked, prior to and following magnesium administration ($MgSO_4$ 750 μ mol/kg, IM). The temporal pattern of apoptosis in rat brain after moderate diffuse axonal injury (mDAI) was characterized using TUNEL histochemistry.

Results: After $MgSO_4$ injection at 30 min. posttrauma, animals demonstrated an elevated blood-ionized magnesium concentration reaching a maximum of 2.57 ± 0.03 mg/dL at 2.5 hours after drug administration and apoptotic index was significantly declined by about 45% (54.8 ± 1.7 , 51.5 ± 3.2 at 12, 24 h in control group, 24.8 ± 2.6 , 20.5 ± 1.4 at 12, 24 h in treated group, $p < 0.05$).

Conclusions: These findings suggest that early treatment with $MgSO_4$ is very effective in histological findings following experimental traumatic brain injury in the rat. Clinically, we suspect that an increase in blood-ionized magnesium concentration with administration of magnesium salt may be associated with improvement in neurological and functional outcome.

Key Words: Ionized magnesium · Apoptosis · $MgSO_4$



서론

중추신경계의 외상이 신경학적 손상을 일으키는 것은 일차적 기전과 이차적 기전으로 설명되고 있다. 일차적 기전은 외상 후 직접 발생하는 것으로 축삭의 전단, 파열, 신진 등이며, 이차적 기전은 일차적 기전 이후 발생하는 생물화학적, 생리적 변화를 말한다. 지금은 두 가지 기전 중 이차적 기전

이 중추 신경계 외상 후 발생할 수 있는 비가역적 손상의 더 중요한 원인으로 받아 들여지고 있다. 이와 같은 이차적 생화학, 생리적 변화는 이온의 변화, 에너지 대사의 변화, 세포막의 파괴, 자유 라디칼의 생성 및 신경전달물질의 유리 등을 포함한다^{5,9,21}.

외상성 뇌 손상 후 뇌 에너지 대사의 변화와 미토콘드리아 기능 저하와 관련있는 여러 요소 중 하나가 마그네슘 이온이다^{30,31,32}. 마그네슘 이온의 작용기전을 손상 후 뇌 허혈 부위로 국소혈류의 증가, 모든 아류의 전압 의존성 칼슘 채널의 비특이적 저하, 글루타메이트 수용체 중 N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) 수용체의 비경쟁적 억제, 글루타메이트 방출의 실패, 뇌 허혈 후 에너지 대사의 회복, 미토콘드리아 칼슘 완충의 증가 등으로 설명하고 있다^{17,22,27,29,34}.

Corresponding Author: **Chong Oon Park, M.D.**
Department of Neurosurgery, College of Medicine, Inha University,
7-206, 3-Ga, Sinheung-Dong, Jung-Gu, Incheon, 400-711, Korea
Tel: 82-32-890-3506, Fax: 82-32-890-2947
E-mail: nspco@inha.ac.kr

국소 뇌 허혈 임상 전 실험모델에서 혈중 마그네슘 농도를 1.49 mmol/L 이상 유지하는 것은 신경 보호 작용을 가지며, 혈중 농도를 두 배 이상 증가시키는 것이 임신 중 자간증이나 자간전증 발작 예방과 치료에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다²³⁾.

뉴클레오타이드 내에 DNA 파괴 물질이 신경세포의 세포사에 대한 중요한 성분으로 알려져 있으며, TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotin-dUTP nick end labeling) 염색 및 정량 분석이 뇌 실질 내 DNA 파괴물질 및 위치를 확인하는 수단으로 널리 사용되고 있다^{15,18,19)}.

저자들은 초기 $MgSO_4$ 투여가 중증도의 미만성 축삭손상 후 아포프토시스된 세포를 감소시킬 수 있는지 연구하였다.



재료 및 방법

1. 손상 기구 및 두부손상

실험 모델은 Marmarou 등에 의해 고안된 weight-drop-device를 이용하였다²⁰⁾. 간단히 기술하면, 성체 Sprague-Dawley (300~350 gm)를 페노바비탈 복강내 주사(35 mg/kg)로 마취하였으며, 모든 과정은 기관절개 없이 자발호흡이 가능한 상태에서 진행되었다. 중심선을 따라 두피를 중앙 절개 한 뒤 periosteal elevator를 이용하여 두정 봉합과 람다 봉합 사이 두개부 천정부위를 노출시켰다. 두개 천정 부위가 노출되면 건조 후 1 cm 직경의 스테인레스 재질로 된 헬멧을 치과용 acryl을 이용하여 접착시켰다.

중증도의 미만성 축삭 손상을 만든 과정은 다음과 같다. 450 gm의 추를 투명관 내에서 1 m 높이로 자유 낙하시켰다. 1차 충격 후 추의 반동으로 인한 재충격을 막기 위해서 주위에 탄력있는 받침대를 설치하였으며, 충격 후 죽거나 두개골이 골절된 백서는 연구 대상에서 제외시켰다.

2. 처치 프로토콜

32마리의 백서에게 미만성 축삭손상을 가한 30분 후에 $MgSO_4$ (750 μ mol/kg)를 근육 주사하였다. 이 용량은 이전에 발표되었던 실험 연구들에 기초를 두었다^{14,15)}.

손상 전 혈중 마그네슘 이온농도를 측정하기 위해서 모든 백서들에서 외상 전 30분에 0.5 mL의 동맥혈을 채취하였으며, $MgSO_4$ 주사 후 8군으로 분류하여 농도를 측정하였다(손상 후 30분, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48시간). 동맥혈 채취 후에는 즉시 혈액분석을 하였으며(NOVA biomedical Ultra M3 free

magnesium analyzer, NOVA Biomedical Instruments Waltham, MA, USA)를 사용하였다. 표준용액은 pH 7.418~7.468로서 마그네슘 이온(0.50~0.64 mmol/L), 칼슘이온(1.02~1.18 mmol/L), 나트륨이온(129.5~137.5 mmol/L), 칼륨이온(4.20~4.60 mmol/L)이 함유되었다.

3. 조직학적 연구

뇌 조직 단편을 만든 후에 Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotin-dUTP nickend labeling (TUNEL) 염색을 시행하였다. 두개골에서 뇌를 제거한 후 썬씨 4도에서 24시간 고정 처리를 하였으며, 파라핀 블록을 만들어서 6 μ m 단편을 만들었다. Bregma 후방 3.5~3.8 mm에서 6 μ m 단편을 poly-L-lysine-coated slide에 접합시켜 썬씨 60°C에서 15~20분간 가열하였다. 파라핀을 떼어내고 재수화 후 proteinase K (20 μ g/mL; DAKO S3020)에 15분간 담그고 endogenous peroxidase의 활성화를 막기 위하여 3% H_2O_2 에서 incubation시켰다. 끝으로 미지근한 물로 세척 후 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 5분 이상 세척하였다. 단편들을 humid chamber에 넣고 1시간 동안 PBS속에서 labeling solution containing TdT (0.3 U/mL; Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)로 labeling을 하였다. PBS로 5분간 세척 후 hematoxylin으로 역염색을 하였으며, crystal medium 속에 보관하였다. 아포프토시스 지표 (Apoptotic index, AI)는 TUNEL 염색되는 세포 수에 대한 H&E 염색이 되는 세포수의 비율로 정하였다^{14,15)}.

$$AI = \frac{\text{The number of apoptotic cells}}{\text{The total number of cells}} \times 100$$

4. 분석과 통계처리

혈중 마그네슘 이온 농도와 아포프토시스 지표(AI)로부터 평균값을 계산하였다.

평균값과 표준편차는 Student's t-test와 ANOVA with Scheffes' contrast test를 사용하여 검증하였으며, $p < 0.05$ 일 경우 통계적 유용성이 있는 것으로 하였다.



결 과

저자들은 이전에 외상 후 마그네슘 이온과 전체 마그네슘 농도의 변화를 보고한 바 있다. 두부 외상 후 1시간 이내에 혈중 마그네슘 이온 농도는 외상 전에 비해 1.07 ± 0.04 mg/dL

에서 0.73 ± 0.01 mg/dL까지 감소한다. 시간이 경과함에 따라 마그네슘 이온 농도는 계속 감소하여 외상 후 3시간에 이르면 평균 0.84 ± 0.04 mg/dL까지 감소하고, 12시간이 경과하면 외상 전 수준으로 회복된다. 이와는 달리 전체 마그네슘 농도는 3시간 안에 2% 감소하며, 전체 마그네슘 농도에 비해 마그네슘 이온 농도(Mg^{2+}/tMg)의 감소는 18%였다. 이것으로부터 전체 마그네슘 농도는 근소한 변화를 보여도 마그네슘 이온 농도의 변화는 상당한 것을 알 수 있다. 따라서 외상 후에는 전체 마그네슘 농도보다 마그네슘 이온 농도가 더욱 중요한 의미를 가진다¹⁴⁾(Fig. 1).

혈중 마그네슘 이온의 시간에 따른 곡선을 보면, $MgSO_4$ 를 주사한 1시간 30분 후 혈중 농도는 현저히 증가하며, 2시간 30분 후 최고치에 도달하는 것을 보였다(2.57 ± 0.03 mg/dL). 그 후 혈중 농도는 점차 감소하고, 외상 후 12시간 후에는 손상 전의 농도에 도달하였다(Fig. 2).

마그네슘을 투여한 모든 백서에서 손상 3시간 후 AI는 3.8 ± 2.2 로 대조군 보다 유의하게 감소하였다(18.8 ± 1.9 , $p < 0.05$). 또한 마그네슘을 투여한 군의 24시간 이내 AI(18.9 ± 1.3 at 6 hours, 24.8 ± 2.6 at 12 hours, 20.5 ± 1.4 at 24 hours)는 동일 시간대의 대조군의 AI(32.9 ± 1.8 at 6 hours, 54.8 ± 1.7 at 12 hours, 51.5 ± 3.2 at 24 hours, $p < 0.05$)에 비해 유의하게 감소함을 알 수 있었다. 그러나 손상 후 48시간에도 AI의 감소를 보였으나, 통계적인 의의는 없었다(처치군: 대조군 = $2.35 \pm 1.3 : 13.5 \pm 1.2$, $p > 0.05$, Table 1). 초기 $MgSO_4$ 처치는 미만성

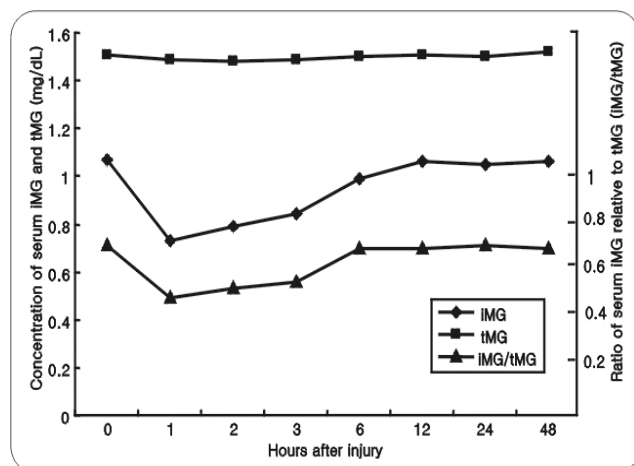


Fig. 1. Graph demonstrating serum ionized magnesium (iMG) and total magnesium (tMG) concentration and amount of serum ionized magnesium relative to total magnesium (iMG/tMG). The zero point represents the point in time immediately before injury is induced.

축삭손상 시 조직학적 변화인 아포프토시스의 진행에 상당한 호전을 보였다(Fig. 3).

그러나, $MgSO_4$ 를 반복 투여하는 것이 단일 투여에 비해 조직학적 변화를 더욱 호전시키는 것 인지에 대해서는 밝혀져 있지 않다. 이전에 저자들은 뇌 손상 후 백서의 아포프토시스는 외상 3시간부터 발생되어, 6~24시간 사이에 최대 변화를 보인다고 보고한 바 있다¹⁴⁾. 이번 연구에서는 $MgSO_4$ 주입 후 혈중농도가 두 배로 도달하는 데 걸리는 시간이 2.5 시간(손상 후 3시간)이며, 12시간에는 손상 전 수준으로 떨어지는 것을 알 수 있었다. 이런 소견으로 볼 때 12시간 간

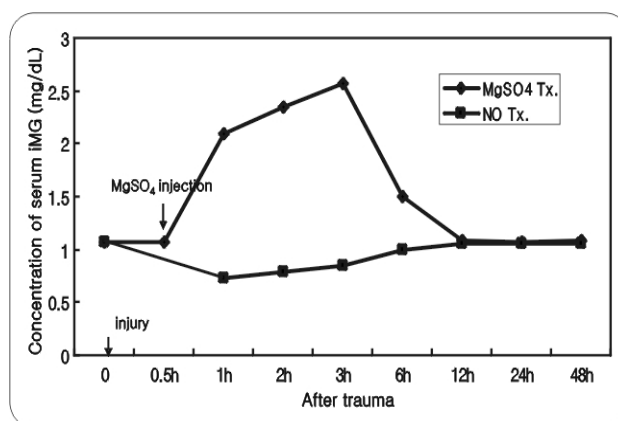


Fig. 2. Diagram demonstrating serum ionized magnesium (iMG) level with and without $MgSO_4$ treatment. About doubling of serum concentrations is shown at 3 hours, but return to pre-injured level at 12 hours.



Fig. 3. Photographs illustrating apoptotic cells in the rat brain before (A) and after (B) $MgSO_4$ injection. Note the intense TUNEL reactivity and morphological characteristics in the injured cortex from 3 hr to 48 hr. Markedly decreased apoptotic change ($p < 0.05$) was shown as compared with no treated group. Apoptotic changes declined at 48 hr. Original magnification ($\times 100$).

Table 1. Apoptotic Index (AI) to elapsed time after mDAI

	1 hour	2 hours	3 hours*	6 hours*	12 hours*	24 hours*	48 hours
No Tx.	0	0	18.8±1.9	32.9±1.8	54.8±1.7	51.5±3.2	23.5±1.3
Tx.	0	0	3.8±2.1	18.9±1.3	24.8±2.6	20.5±1.4	13.5±1.2

Tx. Means treatment, *Statistically significant ($p < 0.05$)

격으로 $MgSO_4$ 를 반복 주사하는 것이 단일주사(single injection)에 비해 아포프토시스의 변화에 도움이 되지 않을 것으로 생각되어 반복 주사 실험을 시행하지 않았다.



고 찰

저자들의 이전 연구에 의하면, 외상성 뇌 손상은 혈중 마그네슘 이온농도의 감소를 야기하며, 이것이 조직학적 아포프토시스의 진행과 관련이 있다¹⁴⁾.

이 연구에서 손상 후 30분에 $MgSO_4$ 단일 주사만으로도 조직학적 아포프토시스의 진행을 개선시키는데 효과가 있었다.

일반적으로 칼슘 이온은 전압-의존성 칼슘채널을 통하여 세포 내로 이동하며, 세포막 에너지 변화로 인한 탈분극이 일어나게 되며, 이것은 허혈이나 외상으로 인한 글루타메이트와 아스파테이트의 유리가 증가되어 결국 칼슘채널은 더욱 활성화된다. 결국, 칼슘이온의 비정상적 증가는 칼파인의 자가 단백 분해능력의 활성을 가져오게 된다. 칼파인이 활성화되면 세포 이중 지방막에 분포하는 구조 단백질에 작용하여 단백질의 변화를 일으키며, 구조 단백질의 변성은 단백질의 해리로 진행된다^{22,24)}. 한편으로 칼슘이온의 증가는 phospholipase A2를 활성화시키며, 그로 인해 phosphatidylcholine이나 phosphatidylethanolamine으로부터 유리되는 아라키돈산이 증가되어 세포의 이중 지방막 자체를 파괴시킨다^{1,7)}. 동시에 미토콘드리아에서는 칼슘이온의 유입이 점차 증가하게 되는데, 이는 칼슘이온의 누적과 미토콘드리아의 기능 정지로 이어져서 신경세포는 세포괴사에 빠지게 된다^{24,29)}. 마그네슘 이온은 칼슘 이온의 이동시 조정 역할을 하고 있으며, 칼슘 길항제로서 세포 내 마그네슘 이온농도의 감소는 칼슘으로 인한 신경독성을 가속화 시키게 된다^{11,12)}.

다른 연구에 의하면, 뇌 손상 후 마그네슘이온은 막의 구조와 투과성³⁾, 자유 라디칼의 형성^{7,16)}, DNA합성^{18,19)}, ATPase^{8,13)}, 혈소판의 응집⁶⁾, 뇌혈관의 긴장도^{2,6,28)}, 당질분해^{4,26)}, 인지질의 전환^{7,25)}과도 관련이 있다고 보고되고 있다.

최근 Health와 Vink^{10,23)} 등은 혈중 마그네슘 이온 농도가

뇌 실질의 마그네슘 이온 항상성(homeostasis)에 대한 가치 있는 정보를 제공할 뿐만 아니라, 예후 측정에도 중요한 가치가 있다고 보고하였다. 이와 같은 진단 방법은 임상에 있어서 가격이 비싼 magnetic resonance spectroscopy (MRS) 보다 실질적이며, 다양한 상황에서 자유 마그네슘의 항상성을 신속히 측정 하게 할 것이다.

McIntosh²¹⁾ 등의 사전 연구에 의하면 외상 후 $MgCl_2$ 의 투여가 혈중 마그네슘 이온농도와 뇌 내 마그네슘 이온농도를 상승 시킨다고 한다. 형질막이 상대적으로 마그네슘 이온과 같은 2가 양이온에 비 투과적이긴 하지만, 무 산소화 또는 저 산소화 환경에서 다시 산소 공급이 재개되면 형질막의 투과도는 높아지는 것으로 알려졌다. Health와 Vink¹¹⁾의 연구에서 $MgSO_4$ 처치와 $MgCl_2$ 처치 모두 손상 후 1주일만에 결과가 좋은 것으로 보고하고 있으나, 뇌에 있어서는 $MgSO_4$ 가 $MgCl_2$ 보다 빠르게 마그네슘 이온 농도를 회복시키기 때문에 신경학적인 결과에서는 더 유용하다고 했다. 이런 명백한 차이의 이유는 아직 밝혀지지 않았지만, CA1 손상은 세포 외액의 chloride에 더 많은 영향을 받기 때문이며, 비록 chloride가 지방막을 투과한다는 장점에도 불구하고, 다른 염들에 비해서는 적당하지 않은 것으로 보고되었기 때문에³³⁾ 저자들은 $MgSO_4$ 를 선택하였다.

혈중 농도에 대해서는 1.49 mmol/L 이상 또는 농도를 두 배로 올리는 것이 국소 대뇌 허혈과 자간전증 및 자간증의 간질 치료에 있어 신경보호작용 및 유용성이 있는 것으로 알려졌다²⁶⁾. 그래서 저자들은 혈중 농도를 두 배로 유지하는 것이 다른 임상적인 지표가 없는 상황에서는 가장 적당한 용량이라 생각했다.

이전에 저자들은 급성 중증도의 미만성 축삭손상 후 $MgSO_4$ 를 처리하지 않았을 때 혈중 전체 마그네슘, 마그네슘 이온, 칼슘 이온과 아포프토시스의 변화를 보고한 바 있다¹⁴⁾. 급성 중증도의 미만성 축삭 손상이 초기 마그네슘 이온의 감소와는 관련이 있으나, 전체 마그네슘에 대해서는 외상 후 상당 시간을 비교해 보아도 유의한 차이를 보이지 않았다($p > 0.05$). 비록 혈중 마그네슘 이온의 감소가 일시적인 양상을 보이고

있지만, 조직학적 측면에서는 외상 후 12~24시간 동안 뇌의 심각한 아포프토시스를 보였다. 결과적으로 뇌 손상은 마그네슘이온의 감소를 야기하고, 마그네슘 이온이 비가역적 조직 손상의 중요한 초기 인자임을 알 수 있었다.

이번 연구에서는 외상 30분 후 $MgSO_4$ 를 투여하는 것이 조직학적 변화에 긍정적 효과를 보였다. 작용기전은 불확실하지만, 이번 연구로부터 초기에 $MgSO_4$ 를 투여하는 것이 조직학적인 아포프토시스 변화에 유용한 효과가 있다는 것을 알 수 있었다(AI가 약 45% 감소를 보임). 이와 같은 결과는 외상 후 뇌의 마그네슘 이온의 감소가 외상성 뇌 손상의 병태생리에서도 중요한 역할을 하고 있다는 것을 뒷받침 해주고 있다.



결론

이번 연구를 통해 외상성 뇌 손상 후 혈중 마그네슘농도의 초기 변화를 알 수 있고, 그것은 뇌손상의 정도를 측정함에 있어서 상당한 진단적 가치가 있으며, 또한 예후를 알 수 있는에도 많은 기여를 할 것이다. 이러한 생화학적 검사 방법은 중재적 치료에 반응하는 초기 뇌 손상을 모니터링 하는 것에도 이론적 근거로 사용 될 수 있다.

이번 결과를 통해 외상성 뇌 손상 후 초기에 마그네슘을 투여하는 것이 중요할 것으로 생각된다.



REFERENCES

1. Abe K, Kogure K, Yamamoto H, Imazawa M, Miyamoto K: Mechanism of arachidonic acid liberation during ischemia in gerbil cerebral cortex. **J Neurochem** 48:503-509, 1987
2. Altura BT, Altura BM: The role of magnesium in etiology of strokes and cerebrovasospasm. **Magnesium** 1:277-91, 1982
3. Bara M, Guet-Bara A. Potassium, magnesium and membranes. review of present and new findings. **Magnesium** 3:212-225, 1984
4. Ebel H, Gunther T: Magnesium metabolism: A review. **J Clin Chem Clin Biochem** 18:257-270, 1980
5. Faden AI, and Salzman S: Pharmacological strategies in CNS trauma. **Trends Pharmacol Sci** 13:29-35, 1992
6. Gawaz M, Ott I, Reininger AJ, Neumann FJ: Effects of magnesium on platelet aggregation and adhesion-magnesium modulates surface expression of glycoproteins on platelets in vitro and ex vivo. **Thromb Haemost** 72:912-918, 1994
7. Gunther T, Hollrieg IV, Vormann J, Bubeck J, Classen HG: Increased lipid peroxidation in rat tissues by magnesium deficiency and vitamine E depletion. **Magnesium Bull** 16:38-43, 1994
8. Hayashi H, Chaudry IH, Clemens MG, Hall MJ, Baue AE: Reoxygenation injury I in isolated hepatocytes: Effect of extracellular ATP on cation homeostasis. **Am J Physiol** 63: R573-R579, 1986
9. Heath DL, and Vink R: NMR characterization of impact-acceleration included severe traumatic brain injury in rats. **J Neurotrauma** 12:1027-1032, 1995
10. Heath DL, Vink R: Blood-free magnesium concentration declines following graded experimental traumatic brain injury. **Scand J Clin Lab Invest** 58:161-166, 1998
11. Heath DL, Vink R: Neuroprotective effects of $MgSO_4$ and $MgCl_2$ in closed head injury: A comparative phosphorus NMR study. **J Neurotrauma** 15:183-189, 1998
12. Heath DL, Vink R: Improved motor outcome in response to magnesium therapy received up to 24 hours after traumatic diffuse axonal brain injury in rats. **J Neurosurg** 90:504-509, 1999
13. Jenkins Wt: Yeast mitochondrial F1-ATPase-effects of metal ions. **J Cereb Blood Flow Meta** 11:1025-1030, 1991
14. Kim JG, Park CO, Hyun DK, Youn SH, Kim EY, Park HC: Change in serum concentration of magnesium and calcium ions following moderate diffuse axonal injury in Rats. **J Korean Neurosurg Soc** 36:229-234, 2004
15. Kim JH, Park CO, Hyun DK, Ha YS: Correlation between activity of nitric oxide synthases and apoptotic change in the closed head injury animal model. **J Korean Neurosurg Soc** 32:142-148, 2002
16. Kontos HA, Wei EP: Superoxide production in experimental brain injury. **J Neurosurg** 64:803-807, 1986
17. Kudo Y, Ogura A. Glutamate-induced increase in intracellular Ca^{2+} concentration in isolated hippocampal neurones. **Br J Pharmac** 89:191-198, 1986
18. Linnik MD, Miller JA, Sprinkle-Cavallo J, Mason PJ, Thompson FY, Montgomery LR, et al: Apoptotic DNA fragmentation in the rat cerebral cortex induced by permanent middle cerebral artery occlusion. **Mol Brain Res** 32:116-124, 1995
19. MacManus JP, Buchan AM, Hill IE, Rasequinha I, Preston

- E: Global ischemia can cause DNA-fragmentation indicative of apoptosis in rat brain. **Neurosci Lett** **164**:89-92, 1993
20. Marmarou, Foda M.AAE, Brink WB, Campbell J, Kita H, Demetriadou K: A new model of diffuse brain injury in rats. **J Neurosurg** **80**:291-300, 1994
21. McIntosh TK: Novel pharmacologic therapies in the treatment of experimental traumatic brain injury: A review. **J Neurotrauma** **10**:215-261, 1993
22. Melloni E, Pontremoli S: The calpains. **Trends Neurosci** **12**: 438-444, 1989
23. Muir KW, Lees KR: Dose optimization of intravenous magnesium sulfate after acute stroke. **Stroke** **29**:918-923, 1998
24. Ogura A, Miyamoto M, Kudo K. Neuronal death in vitro: Parallelism between survivability of hippocampal neurons and sustained elevation of cytosolic Ca^{2+} after exposure to glutamate receptor agonist. **Expl Brain Res** **73**:447-458, 1988
25. Rosner MJ, Becker DP: Experimental brain injury: Successful therapy with the weak base, tromethamine. With an overview of CNS acidosis. **J Neurosurg** **60**(5):961-971, 1984
26. Rubin H: Specificity of the requirement of magnesium and calcium in the growth and metabolism of chick embryo fibroblast. **J Cell Physiol** **91**:449-458, 1977
27. Sakamoto N, Kogure K, Kato H, Ohtomo H: Disturbed Ca^{2+} homeostasis in the gerbil hippocampus following brief transient ischemia. **Brain Res** **364**:372-376, 1983
28. Seelig JM, Wei EP, Kontos HA, Choi SC, Becker DP: Effect of changes in magnesium ion concentration on cat cerebral arterioles. **Am J Physiol** **245**:22-26, 1983
29. Tsuda T, Kogure K, Ishii K, Orihara H. Postischemic change of calcium and endogenous antagonist in the rat hippocampus studied by proton-induced X-ray emission analysis. **Brain Res** **484**:228-233, 1989
30. Vink R: Nuclear magnetic resonance characterization of secondary mechanism following traumatic brain injury. **Mol Chem Neuropathol** **18**:279-297, 1993
31. Vink R, Golding EM, Headrick JP: Bioenergetic analysis of oxidative metabolism following traumatic brain injury in rats. **J Neurotrauma** **11**:265-274, 1994
32. Vink R, Heath DL, and McIntosh TK: Acute and prolonged alterations in brain free magnesium following fluid percussion induced brain trauma in Rats. **J Neurochem** **66**:2477-2483, 1996
33. Wallis RA, Panisson KL: Ionic mechanisms of CA1 traumatic neonatal injury. Abstract. **J Neurotrauma** **13**:626, 1996
34. Zhang L, Rzigalinski BA, Ellis EF, Satin LS: Reduction of voltage-dependent Mg^{2+} blockade of NMDA current in mechanically injured neurons. **Science** **274**:1921-1923, 1996