

Mieczysław Śmiałek

AKTYWNOŚĆ ODDECHOWA IZOLOWANYCH NEURONÓW OŚRODKOWEGO
UKŁADU NERWOWEGO W NASTĘPSTWIE ZATRUCIA TLENKIEM WĘGLA
OCENIANA PRZY ZASTOSOWANIU METODY MIKRONURKA KARTEZJUSZA

Rozprawa na stopień doktora habilitowanego



ZS 61 (dublet)
H3215

Zespół Neuropatologii

Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Warszawa, 1979

Prof.dr hab.med. Mirosławowi J. Mossakowskiemu
Kierownikowi Zespołu Neuropatologii i Dyrektorowi Centrum
Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk
w Warszawie pragnę wyrazić gorące podziękowanie za umożli-
wienie mi poznania techniki mikronurka Kartezjusza w Insty-
tucie Neurobiologii Uniwersytetu w Göteborgu w Szwecji, pomoc
we wdrożeniu powyższej metody, możliwość wykonania pracy ha-
bilitacyjnej w C.M.D.i K. PAN i udzielenie wielu cennych rad
podczas przygotowania rozprawy.

Szczególne wyrazy wdzięczności i uznania składam
p. Teresie Bok za znakomitą pomoc techniczną w wykonaniu
całości eksperymentów. Dr. Barbarze Gajkowskiej dziękuję
serdecznie za opracowanie materiału do badań w elektronowym
mikroskopie transmisyjnym, a p.Andrzejowi Reńskiemu w elektro-
nowym mikroskopie odbiciowym.

SPIS TREŚCI

| | |
|--|----|
| Wstęp | 1 |
| Cel pracy | 26 |
| Materiał i metody | 27 |
| Materiał | 27 |
| Model zatrucia tlenkiem węgla | 27 |
| Technika ampułkowego mikronurka Kartezjusza | 31 |
| Izolowanie neuronu | 31 |
| Przygotowanie szklanego mikronurka | 34 |
| Aparatura pomiarowa i sposób pomiarów | 35 |
| Badanie aktywności oddechowej | 39 |
| Zużycie tlenu w obecności askorbinianu i cytochromu c | 39 |
| Zużycie tlenu w obecności bursztynianu | 40 |
| Ocena glikolizy w warunkach beztlenowych | 40 |
| Pomiar objętości cytoplazmy neuronu | 41 |
| Elektronowo-mikroskopowa analiza stanu struktur submikroskopowych komórki | 44 |
| Analiza statystyczna | 44 |
| Wyniki | 45 |
| Objętość cytoplazmy izolowanych neuronów | 45 |
| Aktywność oddechowa izolowanych neuronów w warunkach normoksji | 50 |
| Zużycie tlenu w układzie askorbinian - cytochrom c | 50 |
| Zużycie tlenu w obecności bursztynianu | 51 |
| Glikoliza w warunkach beztlenowych | 52 |
| Aktywność oddechowa izolowanych neuronów bezpośrednio po zatruciu tlenkiem węgla | 53 |
| Zużycie tlenu w układzie askorbinian-cytochrom c | 53 |
| Zużycie tlenu w obecności bursztynianu | 55 |
| Glikoliza w warunkach beztlenowych | 56 |
| Aktywność oddechowa izolowanych neuronów w okresie zejścia procesu patologicznego po zatruciu tlenkiem węgla | 57 |
| Komórki piramidowe płytki końcowej rogu Amona | 57 |
| Zużycie tlenu w układzie zawierającym askorbinian i cytochrom c | 58 |
| Zużycie tlenu w układzie zawierającym bursztynian | 59 |

| | |
|---|-----|
| Glikoliza w warunkach beztlenowych | 61 |
| Kolorki Purkinjego kory mózdzku | 62 |
| Zużycie tlenu w układzie askorbinian - cytochrom c | 62 |
| Zużycie tlenu w układzie zawierającym bursztynian | 63 |
| Glikoliza w warunkach beztlenowych | 64 |
| Neirony jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pna mózgu | 66 |
| Zużycie tlenu w układzie askorbinian - cytochrom c | 66 |
| Zużycie tlenu w układzie zawierającym bursztynian | 67 |
| Glikoliza w warunkach beztlenowych | 69 |
| Neirony ruchowe rogu przedniego rdzenia kręgowego. | 70 |
| Zużycie tlenu w układzie askorbinian - cytochrom c | 70 |
| Zużycie tlenu w układzie zawierającym bursztynian | 71 |
| Glikoliza w warunkach beztlenowych | 73 |
| Obraz mikroskopowo-elektronowy | 74 |
| Omówienie wyników i dyskusja | 82 |
| Wnioski | 109 |
| Spis piśmiennictwa | 110 |

W S T Ę P

Ośrodkowy układ nerwowy wykazuje szczególnie dużą wrażliwość na niedotlenienie wynikającą z intensywności procesów utleniania biologicznego w jego elementach strukturalnych, przede wszystkim w komórkach nerwowych. Metabolizm tlenu w tkance nerwowej związany jest z układem oksydaz i oksydoreduktaz. Należy przy tym podkreślić, że tylko około 1% tlenu dostarczanego do mózgu, zużytkowane jest w układzie oksydaz tlenowych oraz oksydaz o funkcjach mieszanych. Głównym torem zużytkowania tlenu jest układ oksydoreduktaz, w którym odbywa się transport elektronów i wodoru z utlenianych substratów na tlen za pośrednictwem łańcucha oddechowego. Aktywność oddechowa ośrodkowego układu nerwowego związana jest przede wszystkim ze stałym dopływem tlenu i najważniejszego substratu - glukozy drogą krwi /Norberg, Siesjö, 1974B/. Efektem spalania glukozy jest tworzenie energii w postaci wysokoenergetycznych wiązań fosforanu. Powstała pula związków wysokoenergetycznych, utrzymywana na optymalnym poziomie, przy równowadze reakcji endo- i egzoergicznych pozwala na zachowanie prawidłowych funkcji biologicznych układu nerwowego oraz jego metabolicznej i strukturalnej integralności. Szczególnie istotne jest zachowanie prawidłowego stanu struktur błonowych mózgu, przede wszystkim mitochondriów, w których głównie odbywa się odnowa ATP /Siesjö i wsp. 1974/.

Mózg człowieka, stanowiący około 2% ciężaru ciała zużywa 20% tlenu dostarczonego do organizmu /Bartko, 1971/. Najwyższe

zużycie tlenu charakteryzuje komórki nerwowe. Pojedynczy neuron kory mózgu człowieka zużytkowuje przeciętnie $1,2 \times 10^{-4}$ $\mu\text{l O}_2$ na godzinę, podczas gdy jego zużycie przez izolowaną komórkę glejową wynosi jedynie około $0,04 \times 10^{-4}$ na godzinę /Hess, 1961/. Komórki nerwowe stanowiące jedynie około 20% ogólnej populacji komórkowej mózgu metabolizują w warunkach normoksji blisko 75% dostarczonego do niego tlenu /Bartko, 1971/. Znane są istotne różnice gatunkowe zapotrzebowania mózgu na tlen. Dla utrzymania prawidłowej funkcji kory mózgu człowieka niezbędne jest dostarczenie tlenu w ilości $6,1 \mu\text{l/mg}$ suchej masy/godz, podczas gdy w tych samych warunkach kora mózgu szczura metabolizuje tlen na poziomie prawie dwukrotnie wyższym, wynoszącym $11,2 \mu\text{l/mg}$ suchej masy/godz. /Elliott, 1960/.

Istnieją ponadto istotne różnice w poziomie przemiany tlenowej pomiędzy poszczególnymi strukturami mózgu, a nawet ugrupowaniami neuronów w obrębie tej samej formacji anatomicznej. Tak na przykład, stwierdzono, że komórki piramidowe sektora H_3 kory amonalnej chomika mongolskiego zużywają tlen w ilości $1,45 \times 10^{-6} \mu\text{l}/\mu\text{m}^3$ cytoplazmy neuronu/godz, podczas gdy metabolizm tlenu w komórkach nerwowych sektora H_2 wynosi aż $4,46 \times 10^{-6} \mu\text{l O}_2/\mu\text{m}^3$ cytoplazmy neuronu/godz. /Śmiałek, 1977/. Szereg badań wskazuje, że w mózgach tego samego gatunku zwierząt zużycie tlenu, produkcja dwutlenku węgla i mleczanu oraz innych produktów przemiany może wahać się w szerokich granicach, nawet w przypadku gdy oznaczenia dotyczą tych samych struktur anatomicznych /Rose, 1968/. Wydaje się, że zróżnicowanie to należy

odnosić do różnic w stanie metabolicznym i czynnościowym elementów komórkowych mózgu. Nie bez znaczenia są również odrębności zastosowanych metod badawczych.

Dopływ tlenu do mózgu jest proporcjonalny do objętości dostarczonej do niego krwi. Przy przepływie mózgowym, wynoszącym u szczura 100 ml/100 g tkanki/min. dopływ tlenu wynosi 10.2 ± 0.3 ml 100 g tkanki/min. /Norberg, Siesjö, 1974A/. Przy tym samym przepływie mózgowym dopływ glukozy do mózgu wynosi /0,94 μ mola/g/min./. W oparciu o oznaczenia zawartości dwutlenku węgla w mózgowej krwi żyłnej ustalono, że zużycie glukozy przez tkanki mózgu jest proporcjonalne do ilości zmetabolizowanego tlenu /Norberg, Siesjö, 1974B/. Wskazuje to na uwarunkowanie prawidłowej funkcji mózgu od podaży glukozy i tlenu. W przypadku mózgu ludzkiego wykazano, że przy przepływie krwi równym 50-60 ml/100g/min., zużywane jest 16-20 μ moli glukozy/g/min. Wydzielony w tym czasie dwutlenek węgla w ilości 95 μ moli/g/godz. równoważy około 87% zużytego tlenu. Przyjmuje się, że pozostały odsetek nieutlenionej glukozy w postaci mleczanu i pirogranianu metabolizuje się do dwutlenku węgla w toku dalszych przemian /Bradford, 1968/.

Niedobór tlenu i glukozy, bądź ich całkowity brak prowadzi do zaburzeń metabolizmu tkanki nerwowej, zakłócenia czynności układu nerwowego i wreszcie do uszkodzeń jego struktury. Niedostateczne zaopatrzenie ośrodkowego układu nerwowego w tlen może być wywołane przez szereg różnorodnych czynników, do których należą między innymi, obniżenie zawartości tlenu we wdychanym powietrzu, upośledzenie transportu tlenu do narządu, czy wresz-

cie ograniczenie jego metabolizmu w tkance. W zależności od patomechanizmu niedotlenienia wyróżnia się za Brierleyem /1976/ następujące jego typy:

1. Niedotlenienie hipoksyjne, związane z obniżeniem ciśnienia cząsteczkowego tlenu w powietrzu wdychanym.
2. Niedotlenienie ischemiczne, uwarunkowane miejscowym ograniczeniem dopływu krwi do mózgu, najczęściej w następstwie całkowitego lub częściowego uniedroźnienia naczyń tętnicznych.
3. Niedotlenienie hipowolemiczne, stanowiące następstwo zmniejszenia objętości krwi krążącej w mózgu na skutek spadku układowego ciśnienia tętniczego. Ten typ niedotlenienia nosi również często nazwę niedotlenienia stagnacyjnego, ze względu na towarzyszący obniżonemu przepływowi mózgowemu zastój żylny.
4. Niedotlenienie anemiczne, uwarunkowane obniżeniem transportu tlenu drogą krwi, w wyniku spadku poziomu nośnika tlenu-erytrocytów bądź hemoglobiny. Ten typ niedotlenienia rzadko stanowi następstwo niedokrwistości, znacznie częściej wynika zablokowania czynnych grup hemoglobiny przez różne substancje chemiczne takie jak tlenek węgla lub azydki.
5. Niedotlenienie histotoksyczne, rozwijające się w wyniku zablokowania czynności łańcucha oddechowego komórki. Klasycznym reprezentantem tego typu niedotlenienia jest zatrucie cyjankami.

6. **Niedotlenienie metaboliczne**, stanowiące specjalny typ niedotlenienia, w którym u podstaw zaburzeń przemian tlenowych jest nie niedobór tlenu, lecz substratu energetycznego - glukozy. W warunkach klinicznych i doświadczalnych reprezentują go stany hipoglikemiczne.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że poszczególne typy niedotlenienia bardzo rzadko występują w czystej postaci. Niedotlenieniu hipoksyjnemu i anemicznemu towarzyszą czynniki niedokrwienne związane z zaburzeniami mikrokrążenia mózgowego /Kapuściński, 1976, Wierzba, 1977, Mossakowski, 1975/. W przypadku niedotlenienia ischemicznego i hipowolemicznego istotną rolę odgrywa upośledzenie lub ograniczenie dopływu glukozy, stanowiące cechę charakterystyczną niedotlenienia metabolicznego.

Ograniczenie procesów utleniania biologicznego, występujące w każdym typie niedotlenienia prowadzi do zaburzeń metabolicznych w tkance nerwowej. Glukoza transportowana do tkanki i pochodząca z degradacji glikogenu metabolizuje się w łańcuchu glikolitycznym do mleczanu /Duffy i wsp. 1972, McMillan, Siesjö, 1972, Levy i Duffy 1975, Lust i wsp. 1976, Mrsulja i wsp. 1976/. Zwolnienie bądź zahamowanie przemian w łańcuchu oddechowym prowadzi do podwyższenia stosunku NADH/NAD oraz FADH_2/FAD /Folbergrová i wsp. 1972, Welsh i wsp. 1977/. Stan ten prowadzi do zakwaszenia tkanki, a obniżenie pH pociąga za sobą zakłócenie równowagi szeregu procesów metabolicznych. Obniża się pula wysokoenergetycznych fosforanów, a w szczególności ATP i fosfo-

kreatyny /Folbergrová i wsp. 1970, Müller i wsp. 1970, Duffy i wsp. 1972, Sikorska i wsp. 1974, Ljunggren i wsp. 1974, Kobayashi i wsp. 1977, Broniszewska, Sikorska 1979/ Wynika to przede wszystkim z obniżenia zysku energetycznego do 2 moli ATP z 1 mola glukozy w niedotlenieniu w stosunku do 38 moli ATP metabolizowanych w warunkach normoksji. Przesunięcie metabolizmu komórkowego w kierunku mleczanu prowadzi do obniżenia poziomu wszystkich metabolitów cyklu kwasów trójkarboksylowych z wyjątkiem bursztynianu, którego stężenie w warunkach niedokrwienia mózgu wzrasta do około 270% w stosunku do warunków normoksji /Folbergrová i wsp. 1974/. Zaburzenia wszystkich niemal przemian energozależnych, przy ich wzajemnym bezpośrednim lub pośrednim powiązaniu stwarza w warunkach niedotlenienia sytuację prowadzącą do głębokich zmian w wyjściowym metabolizmie glukozy. Bardzo ważną rolę w tym względzie odgrywają zaburzenia w poziomie amin katecholowych, stwierdzone przez Zervasa i wsp. /1974/, Lavynego i wsp. /1975/ i Szumańską i wsp. /1976/ oraz cyklicznego AMP opisane przez Lusta i wsp. /1975/ oraz Sikorską /1976/. Już w czasie trwania niedotlenienia dochodzi do obniżenia biosyntezy białek mózgu /Albrecht, 1973, Albrecht, Śmiałek, 1975, Cooper i wsp. 1977, Yanagihara, 1978/.

Dzięki uruchomieniu mechanizmów kompensacyjnych możliwe jest przywrócenie do poziomu prawidłowego zaburzeń metabolicznych i czynnościowych tkanki nerwowej w przypadku krótkotrwałego niedotlenienia. W pełnym niedokrwieniu mózgu trwającym nie dłużej niż 4-5 min. możliwy jest powrót homeostazy meta-

bolicznej tkanki nerwowej bez nieodwracalnych jej uszkodzeń strukturalnych /Schneider, 1963/. To samo dotyczy nawet kilkunastominutowej anoksji /Mossakowski i wsp. 1968, Miller, Myers, 1970, Hinzen i wsp. 1972, Hossman i wsp. 1973/. Czas odnowy homeostazy metabolicznej w mózgu jest różny i w znacznym stopniu zależny od typu niedotlenienia i czasu jego trwania. Już po 5 min. po ustaniu 5-minutowego niedokrwienia mózgu u chomików mongolskich powraca do poziomu prawidłowego pula nukleotydów adeninowych, po 30 min. - mleczanu, a po 6 godz. - glikogenu i fosfokreatyny /Kabayashi i wsp. 1977/. Przy dłuższym trwaniu niedokrwienia - czas powrotu do poziomu prawidłowego tych samych związków - wydłuża się do kilku i kilkunastu godzin /Mrsulja i wsp. 1975/.

Częstym zjawiskiem, stanowiącym następstwo różnego typu niedotlenienia, nie prowadzącego do nieodwracalnych uszkodzeń tkankowych, jest gromadzenie się w ośrodkowym układzie nerwowym glikogenu /Mossakowski i wsp. 1968, Śmiałek i wsp. 1971, 1973, Long i wsp. 1972, Sikorska, Śmiałek, 1974, Lust, Passonneau, 1976, Kobayashi i wsp. 1977/. W badaniach histochemicznych stwierdzono przy tym, że złożki polisacharydu odkładają się w sposób zróżnicowany w poszczególnych strukturach i elementach komórkowych ośrodkowego układu nerwowego /Mossakowski i wsp. 1968, Ibrachim i wsp. 1970/. Gromadzą się one przede wszystkim w astrocytach, a znacznie rzadziej i tylko w niektórych ugrupowaniach komórek nerwowych. Zwrócono przy tym uwagę, że odkładanie się glikogenu występuje w tych grupach neuronów, które

charakteryzują się mniejszą wrażliwością na niedostatek tlenu /Long i wsp. 1972/.

Głębsze lub dłużej trwające niedotlenienie prowadzi do nieodwracalnych uszkodzeń tkanki nerwowej, wyrażających się w pierwszej kolejności zwyrodnieniem komórek nerwowych lub/ i ich zanikiem. Komórki glejowe charakteryzują się mniejszą wrażliwością na niedostatek tlenu. Najwrażliwsze są oligodendrocyty, mniej wrażliwe - astrocyty, a najmniej - mikroglej. Zróżnicowanie wrażliwości komórek nerwowych i glejowych prowadzi do sytuacji, w której w następstwie niedotlenienia zanikają pierwsze z nich, podczas gdy ich ubytki ulegają wypełnieniu przez rozplam astrocytów. Zjawisko to nosi nazwę martwicy selektywnej i jest typowe dla stanów niedotlenienia ośrodkowego układu nerwowego.

Zmiany zwyrodnieniowe komórek nerwowych rozwijające się w następstwie niedostatku tlenu opisywano pod wieloma nazwami, takimi jak schorzenie ostre, ciężkie, ischemiczne, homogenizacyjne i przewlekłe, wiążąc ich morfologiczne zróżnicowanie bądź z różnymi typami niedotlenienia, bądź też jego odmienną dynamiką. Z bardzo wnikliwych badań Browna i Brierleya /1966/ wynika, że najwcześniejsze zmiany komórkowe wyrażają się mikro-wakuolizacją cytoplazmy perikarialnej i wypustkowej neurocytów, która w obrazie mikroskopowo-elektronowym odpowiada obrzmieniu mitochondriów, a w mniejszym stopniu zbiorników i kanałów siatki śródplazmatycznej. Zmiany te mogą mieć charakter odwracalny, lub też przechodzą w kolejną fazę uszkodzeń komórkowych, odpo-

wiadającą klasycznemu schorzeniu ischemicznemu Nissla, stanowiącemu w istocie skrzepową martwicę komórki. Obkurczone, blade w barwieniu fioletem krezylu i czerwone w barwieniu hematoxyliną-eozyną komórki nerwowe w obrazie mikroskopowo-elektronowym charakteryzują się znacznym zagęszczeniem hialoplazmy z równoczesnym wybitnym poszerzeniem zbiorników i kanałów siatki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego oraz przejaśnieniem lub zagęszczeniem macierzy mitochondriów. Zmianą pokrewną lub odmianą martwicy ischemicznej komórki nerwowej jest schorzenie homogenizacyjne, uważane przez niektórych autorów za kolejną fazę uszkodzenia hipoksyjnego. Występując przede wszystkim w komórkach Purkiniego kory mózdzku, charakteryzuje się ono rozpadem ziarnistości Nissla oraz obkurczeniem i rozpadem jądra, przy żywej metachromazji jąderka. W obrazie mikroskopowo-elektronowym stwierdza się zmniejszenie gęstości elektronowej cytoplazmy, poszerzenie przestrzeni okołojądrowej i ziarnisty rozpad mitochondriów. Zejściem zarówno schorzenia ischemicznego i homogenizacyjnego jest rozpad neuronu i jego zanik, w którym rzadko uczestniczą komórki mikrogleju.

Zjawiskiem charakterystycznym dla stanów niedotlenienia mózgu jest zróżnicowana wrażliwość poszczególnych populacji komórek nerwowych. W tych samych warunkach w obrazach morfologicznych ośrodkowego układu nerwowego obok neuronów uszkodzonych nieodwracalnie stwierdza się komórki wykazujące jedynie odwracalne nieprawidłowości strukturalne, jak i neurony zupełnie niezmienione.

Zjawisko wybiórczej wrażliwości na niedotlenienie niektórych struktur cytoarchitektonicznych mózgowia, a nawet posz-

czególnych ugrupowań i typów komórek nerwowych znane jest od połowy ubiegłego stulecia. Występowanie ognisk martwicy w niektórych tylko, powtarzalnych okolicach ośrodkowego układu nerwowego wyjaśniono odmiennymi warunkami ich ukrwienia, zależnymi od charakteru ich angioarchitektoniki /Kolisko, 1893/. Dalsze szczegółowe obserwacje wykazały umiejscowienie ognisk uszkodzenia mózgu w strukturach położonych na pograniczu unaczynienia przez powierzchowne i głębokie tętnice mózgu /Spielmeyer, 1925/. Lindenberg /1955, 1959, 1963/ w oparciu o spostrzeżenia dotyczące umiejscowienia ognisk martwicy w niektórych ugrupowaniach jąder wzgórza, w gałce białej i jądrze ogoniastym, wysunął koncepcję zależności selektywnych uszkodzeń mózgu od odrębności unaczynienia w miejscu styku obszarów zaopatrywanych w krew przez duże tętnice mózgu, sprzyjającej zastojowi krwi żyłnej. W podobnym kierunku poszły rozważania Zülcha /1954, 1955/ w jego teorii "ostatniej łączki", według której obszary pogranicza unaczynienia dużych tętnic mózgowia są szczególnie predysponowane na miejscowe zaburzenia hemodynamiczne. Wysunięto również przypuszczenie, że różnice wrażliwości na niedotlenienie w tej samej okolicy mózgu mogą być uwarunkowane różnicami w gęstości sieci kapilarnej. Uboższa sieć naczyń włosowatych miałaby uwarunkować upośledzenie dyfuzji tlenu i substancji chemicznych w tkance /Kety, 1951/. Podnoszone przez Kety /1960/ znaczenie miejscowych zaburzeń hemodynamicznych w patogenezie wybiórczej wrażliwości na niedotlenienie znalazło swoje potwierdzenie w serii późniejszych prac nad nieprawidłowościami mikrokrążenia mózgu w różnych typach niedostatku tlenowego /Mossakowski, 1978/.

Koncepcja naczyniowa nawet w swoim najnowocześniejszym ujęciu okazała się niewystarczająca dla wyjaśnienia złożonego mechanizmu wybiórczej wrażliwości komórek nerwowych. Nie tłumaczy ona na przykład wrażliwości niektórych tylko stref Sommera rogu Amona, komórek Purkinjego kory mózdzku, czy małych komórek prążkowania, przy względnej oporności dużych. Wydaje się, że miejscowe odrębności zaburzeń krążenia w poszczególnych obszarach mózgu mogą stanowić tylko jeden z czynników warunkujących zjawisko wybiórczej wrażliwości na niedotlenienie.

Inny punkt widzenia na to zagadnienie reprezentowali Cecilia i Oskar Vogt /1933/. Nie negując roli odrębności angioarchitektoniki poszczególnych struktur ośrodkowego układu nerwowego dla rozwoju ich wybiórczego uszkodzenia, podstawowe znaczenie przypisywali tzw. zjawisku patoklizy. Uważali oni, że zróżnicowana wrażliwość na działanie czynników uszkadzających, w tym również niedotlenienie, wiąże się z odrębnymi właściwościami fizyko-chemicznymi poszczególnych jednostek topistycznych ośrodkowego układu nerwowego, które warunkują różnice w powinowactwie tkanki do szkodliwych substancji chemicznych. Podobną koncepcję reprezentowali Hallervorden i Spatz /1949/, którzy powstawanie wybiórczych ognisk patologicznych w mózgu wiązali ze zjawiskiem synerazy, rozumianym jako zróżnicowanie w dyspersji koloidów w poszczególnych jego częściach.

Teoria patoklizy stała się inspiracją do badań nad różnicami składu chemicznego, przemian biochemicznych i odczynów immunologicznych w poszczególnych częściach ośrodkowego układu nerwowego, zarówno w stanach prawidłowych jak i w warunkach patologicznych. W bardzo licznych badaniach, zarówno histo-

chemicznych jak i biochemicznych, pochodzących głównie z okresu ostatniego dwudziestolecia, wykazano istotne różnice w składzie chemicznym poszczególnych struktur i układów czynnościowych mózgowia oraz dynamice procesów metabolicznych, które mogłyby mieć bezpośredni lub pośredni wpływ na zróżnicowanie reakcji tkanki na niedostatek tlenowy/Friede, 1959, Levine, 1960, Pearse, 1960, Zeman, 1963, Geiger i wsp., 1963, Śmiałek Hamberger, 1970, Norberg i wsp. 1975, Sikorska i wsp. 1975, Norberg, Siesjö, 1975/. Dotyczą one miejscowego zróżnicowania zasobów rezerw węglowodanów, transportu glukozy z krwi do tkanki, stężenia jonów wodorowych, wpływającego na aktywność układów enzymatycznych, a przede wszystkim aktywności enzymów oddechowych i dynamiki procesów metabolicznych.

Na specjalną uwagę zasługują spostrzeżenia wskazujące na zależność rozwoju ognisk uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego od stanu metabolicznego tkanki, wyrażającego się jej zapotrzebowaniem na tlen w okresie wystąpienia niedostatku tlenowego /Dewes, 1963/. Szczególnie przekonujących danych w tym zakresie dostarczyły badania nad charakterem i umiejscowieniem uszkodzeń spowodowanych niedotlenieniem w rozwijającym się ośrodkowym układzie nerwowym /Dąbska, i wsp. 1977/. Dane ilościowe uzyskane w badaniach na izolowanych neuronach z różnych odcinków kory amonalnej wykazują, że najwyższa wrażliwość na niedotlenienie charakteryzuje komórki nerwowe o najwyższym metabolizmie tlenowym /Śmiałek, 1977/.

Zatrucie tlenkiem węgla stanowi niedotlenienie o złożonym mechanizmie patogenetycznym. Jego wiodącym ogniwem jest niedo-

tlenienie anemiczne rozwijające się w następstwie wiązania CO z hemoglobina, prowadzącego do zubożenia krwi w hemoglobinę utlenowaną i obniżenia transportu tlenu do tkanek /Ball i wsp. 1951, Forbes, 1970/. Przetrzywanie szczurów w atmosferze zawierającej 1% tlenku węgla prowadzi w okresie 20 min do osiągnięcia poziomu karboksyhemoglobiny, wynoszącego $76,6 \pm 0,9\%$ /Śmiałek i wsp. 1973/. W tych samych warunkach doświadczalnych, już po 5 min. zawartość tlenu w krwi tętniczej spada z 20-22 ml do 10-14 ml/100, a po 20 min. do około 5-6 ml/100 ml, utrzymując się na tym poziomie do 60 min. zatrucia. Równocześnie obserwuje się spadek ciśnienia cząstkowego CO_2 z 37,5 mm Hg w warunkach prawidłowych do około 32,5 mm Hg po 60 - minutowym zatruciu. W tym samym czasie dochodzi do wzrostu kwasoty krwi od wartości pH 7,42 do 7,05, przy równoczesnym zmniejszaniu się zasobów wodorowęglanów z 24 mEq /1l do około 9 mEq/1l /MacMillan, 1977/.

Przy wysokim stężeniu tlenku węgla w powietrzu wdychanym dołączają się cechy niedotlenienia hipoksyjnego. Jego mechanizm w warunkach zatrucia CO jest złożony. Stwierdzono jednakże, że przy obniżonej puli oksyhemoglobiny, tlenek węgla przyczynia się do osłabienia procesu uwalniania tlenu związanego z hemoglobina, w wyniku czego dochodzi do zwolnienia reakcji $HbO_2 \rightarrow Hb + O_2$. Ilościowe obniżenie dopływu tlenu do komórki zachodzi również na dalszym etapie na skutek osłabienia dyfuzji uwolnionego z HbO_2 tlenu z krwi do płynów ustrojowych i tkanek /Zander, Schmidt-Schönbein, 1973/.

Nie można wyłączyć również bezpośredniego histotoksycznego działania tlenu węgla na ośrodkowy układ nerwowy, pomimo braku dowodów na jego przenikanie przez barierę krew-mózg /Graziani, Gauriano, 1965/. Tlenek węgla, po przedostaniu się do ustroju związany jest przede wszystkim z hemoglobina krwi, jego pula gromadząca się poza łożyskiem naczynionym jest stosunkowo mała i u większości zwierząt w warunkach ostrego zatrucia wynosi jedynie 10-15%, a tylko wyjątkowo u psów około 25% /Coburn, 1970/. Jest to tlenek węgla związany przede wszystkim z mioglobina i mitochondriami. W postaci niezwiązanej, jako rozpuszczony w płynach ustrojowych, włącznie z surowicą krwi występuje on w stężeniu nie przekraczającym 1% /Coburn, 1970/. W dotychczasowych doświadczeniach nie udało się wykazać obecności tlenu węgla w tkankach ośrodkowego układu nerwowego /Graziani, Guariano, 1965/. Znaczne, bo wynoszące 25% obniżenie aktywności oksydazy cytochromowej w mózgu w ostrym zatruciu tlenkiem węgla, nieproporcjonalnie wyższe niż w odpowiednim niedotlenieniu hipoksyjnym, sugeruje w sposób pośredni możliwość histotoksycznego działania tlenu węgla na tkankę nerwową /Śmiałek i wsp. 1973/. Potwierdzają to obserwacje uzyskane w warunkach hodowli tkankowej /Korthals i wsp. 1973, Hoppe, 1974/. Według koncepcji Schwedenberga /1959/, podtrzymywanej przez Osetowską /1964/ tlenek węgla może przenikać do tkanek ośrodkowego układu nerwowego wraz z płynem obrzękowym. Rap i wsp. /1974/ wykazali, że ostremu zatruciu tlenkiem węgla towarzyszy wczesny rozwój obrzęku cytotoksycznego.

Chance i wsp. /1970/ przedstawiają następującą hipotezę toksycznego działania tlenku węgla na komórkę. Zdolność do kompleksowego wiązania tlenku węgla przez cytochrom a_3 prowadzi do upośledzenia utleniania komórkowego w końcowym etapie łańcucha oddechowego w mitochondriach. W tych warunkach dochodzi do obniżenia aktywności oksydazy cytochromowej. Rozwijające się niedotlenienie uniemożliwia z kolei rozpad kompleksu cytochrom a_3 - tlenek węgla i efekt toksycznego zahamowania oddychania komórkowego wydłuża się w czasie. Powstały kompleks cytochrom a_3 - CO prowadzi do zwolnienia transportu elektronów w łańcuchu oddechowym, co z kolei wywołuje naruszenie ilościowych przemian w reakcjach redukcji-utleniania tego łańcucha. Ten właśnie mechanizm w powiązaniu z następczym obniżeniem puli wysokoenergetycznych fosforanów ma być głównie odpowiedzialny za nieprawidłowości metabolizmu mitochondriów i rozwijające się ich uszkodzenie strukturalne. Koncepcja ta może potwierdzać wcześniejsze spostrzeżenia poczynione na modelu niedotlenienia hipoksyjnego /Thews, 1963/, w którym powstanie uszkodzeń tkanki nerwowej wiązano ze zwolnieniem aktywności oksydazy cytochromowej wobec niedostatku tlenu jako akceptora elektronów.

Do toksycznego działania tlenku węgla na oksydazę cytochromową dołączyć się może jego wpływ na procesy utleniania zachodzące w mikrosomach. Stanowi on następstwo kompetycyjnego wiązania CO przez cytochrom P_{450} , analogicznego jak ma to miejsce w przypadku cytochromu a_3 . Cytochrom P_{450} jest ważnym

czynnikiem utleniającym, uczestniczącym w licznych reakcjach metabolicznych o charakterze mieszanym /reakcje hydroksylacji/ /Eastbrook i wsp. 1970, Cooper i wsp. 1970/.

Zatrucie tlenkiem węgla zawiera ponadto elementy niedotlenienia ischemicznego, związanego z towarzyszącymi mu układowymi i miejscowymi zaburzeniami hemodynamicznymi /Zelman, Mossakowski, 1975/. Wysokie powinowactwo CO do mioglobiny i cytochromów mięśnia sercowego leży u podstaw jego uszkodzenia, którego następstwem może być niewydolność krążenia z obniżeniem układowego ciśnienia tętniczego i wzrostem układowego ciśnienia żylnego, konsekwencją których jest upośledzenie mózgowego przepływu krwi /Lapresle, Fardeau, 1967, Preziosi i wsp. 1970/. W warunkach doświadczalnego zatrucia CO u szczurów MacMillan /1977/ stwierdził spadek układowego tętniczego ciśnienia krwi ze 140 mm Hg do 90-100 mm Hg. Na zmiany o charakterze uogólnionym nakładają się miejscowe nieprawidłowości mikrokrążenia uwarunkowane zarówno właściwościami angioarchitektoniki poszczególnych struktur ośrodkowego układu nerwowego jak i zaburzeniami mechanizmów autoregulacji krążenia mózgu /Mossakowski 1978/.

Nakładanie się wszystkich wymienionych czynników prowadzi do głębokich zaburzeń metabolizmu tkanki nerwowej, przede wszystkim przemian glukozy. W swoim ogólnym wzorcu przypominają one nieprawidłowości metaboliczne występujące w niedotlenieniu hipoksyjnym /Norberg, Siesjö, 1975/. Wykazują one przy tym zróżnicowanie zależne od czasu zatrucia.

Po 2,5 min. od zadziałania tlenu węgla stwierdza się spadek poziomu glukozy i glukozy-6-fosforanu w mózgu oraz wzrost stężenia frukto-1,6-dwufosforanu, co może wskazywać na aktywację przemian w łańcuchu glikolitycznym w tym okresie /McMillan, 1977/. Potwierdzają to badania Rollestona /1972/, w których wykazano we wczesnym okresie zatrucia wzrost aktywności heksokinazy /6-fosfotranferazy: ATP-d-heksozy, EC 2.7.1.1/ oraz fosfofruktokinazy /1-fosfotransferazy: ATP-d-fruktozo-6-fosforanu, EC. 2.7.1.11/. Zgodnie z teorią Krebsa /1957/ i Chance'a /1958/ występująca w tym czasie aktywacja łańcucha glikolitycznego może być następstwem obniżenia poziomu tlenu w krwi tętniczej i jest traktowana przez Norberga i Siesjö /1975/ jako wykładnik ostrej hipoksydozy mózgu. Za podwyższeniem przemian glukozy w łańcuchu glikolitycznym przemawia również spadek zawartości wewnątrzkomórkowej glukozy, przy równoczesnym niewielkim, aczkolwiek znamionym jej wzroście we krwi /Norberg, Siesjö, 1975/.

Po 7,5 min zatrucia podwyższa się w mózgu poziom mleczanu, poprzedzony jego wzrostem we krwi, występującym już w 5 min., przy niezmiennym w stosunku do warunków prawidłowych zużyciu glukozy wynoszącym 0,8-0,9 mmola/kg/min. /Norberg, Siesjö, 1974B/. Dochodzi do wzrostu zawartości glukozy i narastania poziomu pirogromianu w mózgu /McMillan, 1975, 1977/. Może to wskazywać zarówno na obniżenie metabolizowania glukozy w cyklu kwasów trójkarboksylowych, jak i na zahamowanie w tym czasie wstępnej aktywacji łańcucha glikolitycznego. O tym

ostatnim mogą świadczyć nieprawidłowości metaboliczne stwierdzone w dalszych przedziałach czasowych od 20 do 60 min. zatrucia, kiedy to występuje przyrost glukozy-6-fosforanu i spadek fruktozy-1,6-dwufosforanu oraz zahamowanie aktywności fosfofruktokinazy. Wydaje się, że gromadzenie się pirogronianu w mózgu w tym okresie zatrucia może stanowić następstwo aktywacji przemian glukozy-6-fosforanu w cyklu heksozomonofosforanowym, prowadzących do powstawania fosfotrioz. Przemawiają za tym obserwacje Domańskiej-Janik /1972/ oraz Sikorskiej i wsp. /1975/, w których stwierdzono wzrost aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej, oraz wyniki badań Bachelarda /1974/, który wykazał wysokie zużycie puli fosfodwuhydroksyacetonu z podwyższeniem aktywności oksydoreduktazy 1-glicero-3-fosforanu: NAD /E.C. 1.1.1.8/.

Zmiany w aktywności łańcucha glikolitycznego, przy zwiększonej puli mleczanu w nieznacznym tylko stopniu odbijają się na poziomie rezerw wysokoenergetycznych fosforanów. McMillan /1977/ stwierdził w zatruciu tlenkiem węgla jedynie obniżenie poziomu fosfokreatyny w mózgu, przy prawie niezmienionej puli nukleotydów adeninowych, podczas gdy w doświadczeniach Sikorskiej i wsp. /1974/ występował wzrost stężenia ATP po zatruciu CO.

Niskie zużycie glukozy w czasie zatrucia, przy zachowanych warunkach jej fosforylacji może kierować przemianę glukozy-6-fosforanu do cyklu Leloiré'a, prowadząc do nagromadzenia glikogenu w mózgu obserwowanego we wczesnym okresie po

zatruciu /Śmiałek i wsp. 1973, Korthlas i wsp. 1973, McMillan, 1977/.

W wyniku zatrucia tlenkiem węgla występują również zaburzenia przemian w cyklu kwasów trójkarboksylowych, którym Környey /1955, 1960/ przypisywał podstawowe znaczenie w patogenezie uszkodzeń tkanek ośrodkowego układu nerwowego. Na szczególną uwagę zasługuje stwierdzony przez McMillana /1977/ wzrost poziomu jabłczanu, utrzymujący się przez cały okres zatrucia. Zjawisko to Duffy i wsp. /1972/ oraz Norberg i Siesjö /1975/ wiązali z faktem iż nagromadzony pirogronian prowadzi do przesunięcia reakcji aminotransferazy L-alanina: 2-oksoglutaran, a zmiana poziomu 2-oksoglutaranu może z kolei przesunąć reakcję aminotransferazy l-asparaginian-2-oksoglutaran w kierunku tworzenia glutaminianu i szczawiooctanu z następowym generowaniem jabłczanu, wobec zwiększonej puli NADH, stwierdzonej w zatruciu CO /McMillan, 1977/.

Na stan przemian w cyklu kwasu izocytrynowego wpływać mogą również zaburzenia ściśle z nim powiązanego łańcucha oddechowego. Należą do nich przede wszystkim zahamowanie aktywności oksydazy cytochromowej /Chance i wsp. 1970, Śmiałek i wsp. 1973/ oraz zwolnienie procesów redukcyjno-oksydacyjnych w łańcuchu oddechowym. W badaniach na izolowanych neuronach ośrodkowego układu nerwowego szczurów w następstwie zatrucia tlenkiem węgla stwierdzono upośledzenie zużycia tlenu w obecności askorbinianu i cytochromu c /Śmiałek, 1974, 1975, Dydyk i wsp. 1973/. W badaniach in vivo trudno jest jednoznacznie rozstrzygnąć na ile zmiany te są wynikiem niedotlenienia związanego

z zatruciem tlenkiem węgla, a na ile zaś efektem jego bezpośredniego cytotoksycznego działania. Na ten ostatni mechanizm wskazywać mogą obserwacje poczynione przez Raybourna i wsp. /1978/ na modelu pozaustrojowej hodowli tkankowej mózdzku.

Na odrębne podkreślenie zasługuje fakt, że zaburzenie układów metabolizmu glukozy, stanowiące następstwo zatrucia tlenkiem węgla, prowadzą również do upośledzenia biosyntezy białek we frakcji neuronalnej mózgu /Albrecht, Śmiałek, 1975/ oraz spadku aktywności kinaz białkowych zależnych od cyklicznego adenozyno 3,5 - monofosforanu /Sikorska, 1979/.

W przypadku krótkotrwałego zatrucia CO, opisane zaburzenia metaboliczne mają charakter odwracalny. Stają się one natomiast nieodwracalne przy przedłużeniu ekspozycji na działanie tlenku węgla, jej kilkakrotnym powtarzaniu lub zwiększeniu zawartości gazu we wdychanym powietrzu. Prowadzą one wówczas do nieodwracalnych uszkodzeń strukturalnych tkanki nerwowej.

W badaniach doświadczalnych Korthalsa i wsp. /1973/ wykazano, że w następstwie zatrucia tlenkiem węgla szczurów przetrzymywanych przez 90 min. w atmosferze zawierającej wstępnie 1% CO, u których na skutek stopniowego zmniejszania zawartości gazu stan śpiączki utrzymywał się jedynie przez okres 15 min., nieprawidłowości strukturalne w ośrodkowym układzie nerwowym ograniczały się do przejściowego obrzmienia mitochondriów komórek nerwowych i oligodendrocytów. Po zatruciu stwierdzono krótkotrwałe gromadzenie się złogów glikogenu w strukturach szarych ośrodkowego układu nerwowego, zlokalizowanych przede wszystkim w astrocytach i tylko w niektórych ugrupowa-

niach komórek nerwowych, do których należały między innymi komórki Purkinjego kory mózdzku, neurony jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu i motoneurony rogów przednich rdzenia kręgowego. W obrazach histochemicznych stwierdzono ponadto zmiany w aktywności szeregu enzymów w tym obniżenie aktywności enzymów mitochondrialnych: oksydazy cytochromowej i dehydrogenazy bursztynianowej oraz wzrost aktywności enzymów metabolizujących glikogen: syntetazy glikogenu /UDP-glukoza: glikogen α - 4 glukozylotransferaza, EC 2.4.1.11/ i fosforylazy α / α - 1,4-glukan: ortofosforan glukozylotransferaza, EC 2.4.1.1/ oraz dehydrogenazy mleczanowej /Szumańska, 1973/.

W tych samych warunkach doświadczalnych, przy przedłużeniu śpiączki zwierząt do 40 min., na skutek dłuższego utrzymywania 1% stężenia CO w mieszaninie oddechowej, oraz przy kilkakrotnym powtórzeniu zatrucia dochodziło do trwałych uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego /Korthals i wsp. 1973/. Wyrażały się one zwyrodnieniem komórek nerwowych lub ich zanikaniem, z wtórnym obrazem martwicy selektywnej, oraz rozlaną demielinizacją istoty białej półkul mózgu, którą wiązano z uszkodzeniem gleju skąpowypustkowego. Uszkodzenia komórek nerwowych, aż do martwicy włącznie umiejscowione były przede wszystkim w korze amonalnej, z wybiórczą predylekcją do sektora H₂ Sommera i płytki końcowej /H₄-H₅/ . Rzadziej zmiany występowały w nowej korze mózgu, głównie w jej warstwach powierzchniowych i głębokich oraz w prążkowie. Nigdy nie stwierdzano ich w komórkach ruchomych rogów przednich, a do rzadkości należały nieprawidłowości strukturalne w gałce bladej, stanowiącej miejsce predylekcyjnych

uszkodzeń w zatruciu tlenkiem węgla u ludzi /Osetowska, 1964; Lapresle, Fardeau, 1973; Brucher, 1973/. Zajęcie gałki bladej w zatruciu tlenkiem węgla wykazuje zresztą bardzo znaczne zróżnicowanie gatunkowe /Romanowa, 1959; Kőrnyey, 1963/.

W obrazie histochemicznym mózgow wykazujących trwałe uszkodzenia tkankowe stwierdzono w okresie po zatruciu gromadzenie się nieprawidłowych złogów glikogenu, o umiejscowieniu identycznym jak w mózgow zwierząt bez nieodwracalnych nieprawidłowości strukturalnych, z tą tylko różnicą, że występowały one dodatkowo w otoczeniu ognisk martwicy /Korthals i wsp. 1973/. Porównanie topograficznego rozkładu glikogenu z rozmieszczeniem uszkodzeń komórkowych pozwala na stwierdzenie, że złogi polisacharydu gromadzą się w neuronach opornych na zatrucie tlenku węgla i odwrotnie wysoką wrażliwość wykonują komórki nie deponujące glikogenu. Sugeruje to uwarunkowanie wrażliwości poszczególnych populacji komórkowych na działanie tlenku węgla ich odrębnościami metabolicznymi. Wcześniejsze badania własne wskazywały na jej zależność od intensywności przemian tlenowych /Śmiałek, 1977/. Skłoniło to do podjęcia badań aktywności oddechowej izolowanych komórek nerwowych ośrodkowego układu nerwowego charakteryzujących się zróżnicowaniem wrażliwości na zatrucie tlenkiem węgla. Metodą z wyboru wydawała się technika mikronurka Kartezjusza, stosowana przez licznych badaczy dla oznaczania przemiany gazowej w ośrodkowym układzie nerwowym /Hydén, 1955; Hamberger, 1963; Oman, Brzin, 1972/.

Badania nad pobieraniem tlenu i procesami tworzenia dwutlenku węgla przez tkanki wprowadzono na początku XX w. W roku 1905 Thunberg skonstruował aparat będący wzorem późniejszych

respirometrów objętościowych. Tashiro w latach 1913 i 1914 zastosował po raz pierwszy biometr służący do oznaczenia oddychania tkanki nerwowej posługując się nim dla określenia objętości gazu powstającego w wyniku drażnienia nerwu. Urządzenie to zapewniało czułość oznaczeń wynoszącą $2.5 \times 10^{-5} \mu\text{l} \pm 6\%$. Aparatura stworzona przez Warburga /1924/ i stosowana do dziś w pomiarach metabolizmu gazowego tkanek pozwalała na uzyskiwanie wyników o czułości $1,0 \mu\text{l O}_2$ lub $\text{CO}_2 \pm 3\%$.

Linderström-Lang /1937, 1943/ zwrócił uwagę na możliwość wykorzystania do tych celów mikrogazometrycznej metody opartej na zasadzie pływaka Kartezjusza. W technice tej wykorzystano prawo Pascala i Archimedesesa, pozwalające na utrzymanie pływaka zanurzonego w cieczy. W myśl prawa Pascala na zanurzony w cieczy mikronurek działa w każdym jego punkcie jednakowe ciśnienie, a zgodnie z prawem Archimedesesa mikronurek nie tonie, ponieważ traci na ciężarze tyle ile waży ciecz przez niego wyparta. Czułość wprowadzonej przez Linderströma-Langa metody, pozwalającej na pomiary gazometryczne minimalnych fragmentów tkankowych wynosiła $1.0 \times 10^{-3} \mu\text{l O}_2$ lub $\text{CO}_2 \pm 3\%$. Metoda została nazwana techniką mikronurka Kartezjusza.

Stała się ona inspiracją do konstrukcji całego szeregu nowych aparatów do pomiarów mikrogazometrycznych, takich między innymi jak kapilarny respirator różniczkowy o czułości $1.0 \times 10^{-2} \mu\text{l}$ /Barth, Kirk, 1942/ czy respirator otwarty o wyższym stopniu czułości, wynoszącej $1.0 \times 10^{-4} \mu\text{l}$, przy błędzie sięgającym jednak kilkunastu procent /Cunnigham, Kirk, 1942/, lub wreszcie nurek olejowy, o zatopionym dolnym końcu

ampułki i otwartą górną kapilarą, zapewniający czułość pomiarów $2.0 \times 10^{-4} \mu\text{l} \pm 3\%$ /Holter, 1943/. W roku 1948 Zeuthen wprowadził nurek kapilarny o czułości $2.0 \times 10^{-5} \mu\text{l} \pm 3\%$. Jego ampułkowa modyfikacja /Zeuthen, 1953/ pozwoliła na przeprowadzenie badań z dokładnością $1.0 \times 10^{-5} \mu\text{l} \pm 5\%$ i na ich przedłużenie do 1 godz. przy czułości $1.0 \times 10^{-4} \mu\text{l}$. Jego zastosowanie umożliwiło zmniejszenie masy materiału biologicznego do $0,2 \mu\text{g}$. Tak skonstruowane urządzenie mogło być wykorzystane do ilościowych oznaczeń wymiany gazowej izolowanych pojedynczych komórek nerwowych /Hydén, 1955; Hydén, Pigoń, 1960; Hamberger, 1961/.

Dokładność pomiarów za pomocą ampułkowego mikronurka została zwiększona przez zastosowanie magnesu w nurku /Oman, Brzin, 1972/. W konstrukcji magnetycznego mikronurka poza prawem Pascala i Archimedesesa, wykorzystano prawa Faradaya, w myśl którego każdej zmianie strumienia magnetycznego towarzyszy powstawanie zmiernego prądu magnetycznego. W przypadku techniki magnetycznego mikronurka, każda zmiana położenia nurka z wbudowanym magnesem wywołuje powstanie różnicy napięcia na końcach cewki indukcyjnej znajdującej się pod nurkiem. Uzyskiwane w tej metodzie wyniki wyrażane są w miliVoltach. Czułość magnetycznego mikronurka wynosi $1.0 \times 10^{-7} \mu\text{l}$ gazu.

W Polsce technikę mikronurka Kartezjusza zastosował po raz pierwszy Bicz /1956/, posługując się własną jego modyfikacją z mikromieszalnikiem magnetycznym dla oznaczeń zużycia tlenu przez komórki szpiku kostnego myszy. W dalszych badaniach metodę tę wykorzystywano do pomiarów oddychania leuko-

cytów ludzkich /Koj i wsp. 1958; Bicz, 1960; Bicz i wsp. 1960/ oraz przemian gazometrycznych komórek niektórych nowotworów /Rymar, 1958/. Do badania metabolizmu gazowego pierwotniaków i innych mikroorganizmów stosowany jest zmodyfikowany mikronurek kapilarny z korkiem /Klekowski, Szuszkina, 1966/.

Dla potrzeb doświadczalnej neuropatologii, technikę ampułkowego mikronurka Kartezjusza zastosował po raz pierwszy Śmiałek /1974, 1975, 1976/ w badaniach aktywności oddechowej izolowanych neuronów mózgu szczurów w warunkach zatrucia tlenkiem węgla. Późniejsze badania dotyczyły innych typów niedostatku tlenowego /Śmiałek, Kraśnicka, 1975; Dydyk i wsp. 1975; Śmiałek, 1977/.

CEL PRACY

Celem pracy była ocena metabolizmu oddechowego izolowanych neuronów ośrodkowego układu nerwowego o różnej lokalizacji i funkcji oraz odmiennej wrażliwości na zatrucie tlenkiem węgla. W oparciu o poprzednie obserwacje histologiczne i histochemiczne uzyskane w doświadczalnej encefalopatii tlenkowęgłowej /Korthals i wsp. 1973/ badania przeprowadzono na następujących grupach neuronów:

- a. komórki piramidowe płytki końcowej rogu Amona /strefa H_{4-5} Sommera/,
- b. komórki nerwowe jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego szary pnia mózgu,
- c. komórki Purkinjego kory mózdzku,
- d. ruchowe komórki nerwowe rogu przedniego rdzenia kręgowego /odcinek szyjny/.

Postanowiono dokonać oceny aktywności metabolicznej izolowanych neuronów w następujących układach: a/ aktywność oddechowa w środowisku zawierającym askorbinian i cytochrom c, b/ zużycie tlenu w obecności bursztynianu, c/ glikoliza w warunkach beztlenowych.

Badania obejmowały ocenę aktywności oddechowej wyżej wymienionych ugrupowań komórkowych w warunkach normoksji, bezpośrednio po zatruciu tlenkiem węgla i w okresie zejścia procesu patologicznego po zatruciu tlenkiem węgla.

Porównawczą analizę biochemiczną uzupełniono mikroskopowo-elektronową oceną stanu komórek stanowiących przedmiot badań ze szczególnym zwróceniem uwagi na struktury subkomórkowe odpowiedzialne za procesy oddychania komórkowego.

MATERIAŁ I METODY

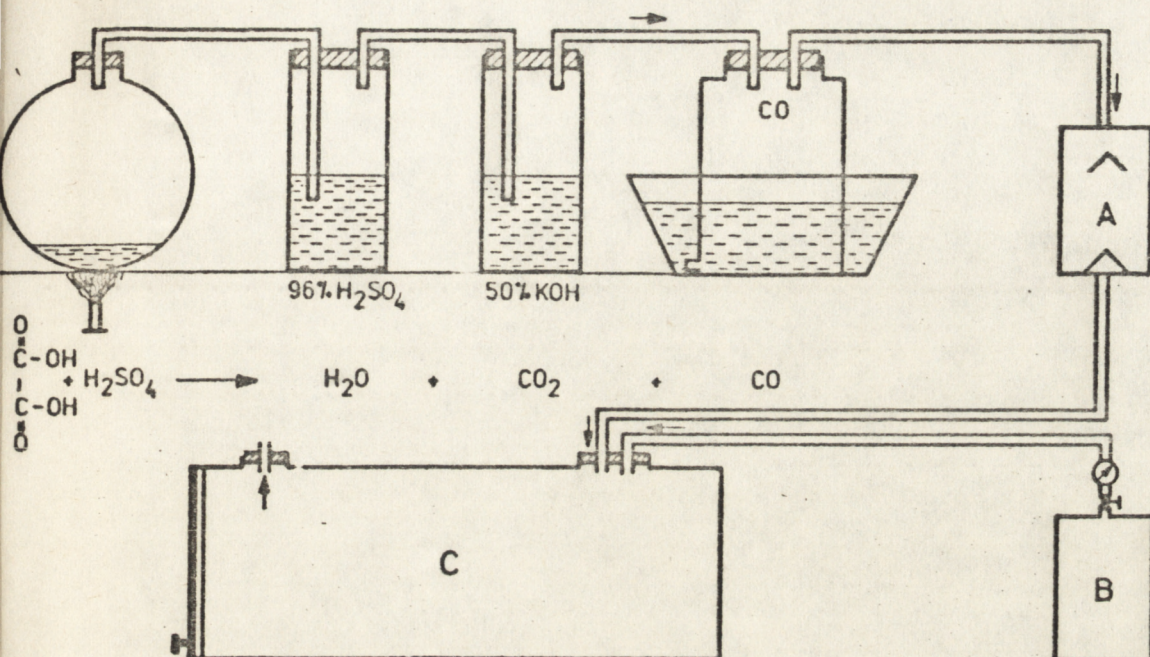
Materiał

Badania przeprowadzono na szczurach białych rasy Wistar, płci męskiej, w wieku sześciu tygodni, o ciężarze ciała około 250 g. Badania obejmowały grupę zwierząt doświadczalnych poddawanych zatruciu tlenkiem węgla i kontrolnych niepoddanych żadnym zabiegom. Z ogólnej liczby 452 zwierząt 56 wykorzystano dla charakterystyki dynamiki zatrucia tlenkiem węgla na podstawie pomiaru zawartości karboksyhemoglobiny /HbCO/ we krwi. Pozostałe zwierzęta w liczbie 333 służyły do badań biochemicznych, a 20 do badań mikroskopowo-elektronowych. Czterdzieści trzy szczury, które padły w czasie doświadczeń wyłączono z materiału badanego. Liczby zwierząt w poszczególnych grupach doświadczalnych i kontrolnych podano w zestawieniach tabelarycznych wyników.

Model zatrucia tlenkiem węgla.

Ostre zatrucie tlenkiem węgla przeprowadzono w komorze doświadczalnej połączonej z układem generującym CO, według schematu przedstawionego na ryc. 1.

Tlenek węgla otrzymywano w reakcji kwasu szczawowego ze stężonym kwasem siarkowym w wyniku ich podgrzewania. Gaz oczyszczano z domieszek wody przepuszczając go przez płuczkę ze stężonym kwasem siarkowym, a z dwutlenku węgla przez założenie drugiej płuczki z 50% roztworem wodorotlenku potasu. Tlenek węgla przetrzymywano w butli z dolnym tubusem, zanurzonej w roztworze nasyconego chlorku sodu.



Ryc.1. Układ służący do generacji CO wraz z komorą doświadczalną do zatruwania zwierząt.

A - pompa perystaltyczna, B - butla z powietrzem, C - komora doświadczalna.

Zwierzęta doświadczalne umieszczono w komorze /Ryc. 1 C/ o pojemności 60 l, przez którą przepuszczano w sposób ciągły mieszaninę powietrza z 1% tlenku węgla, tłoczonego za pomocą pompy perystaltycznej przy przepływie 1 l/min.

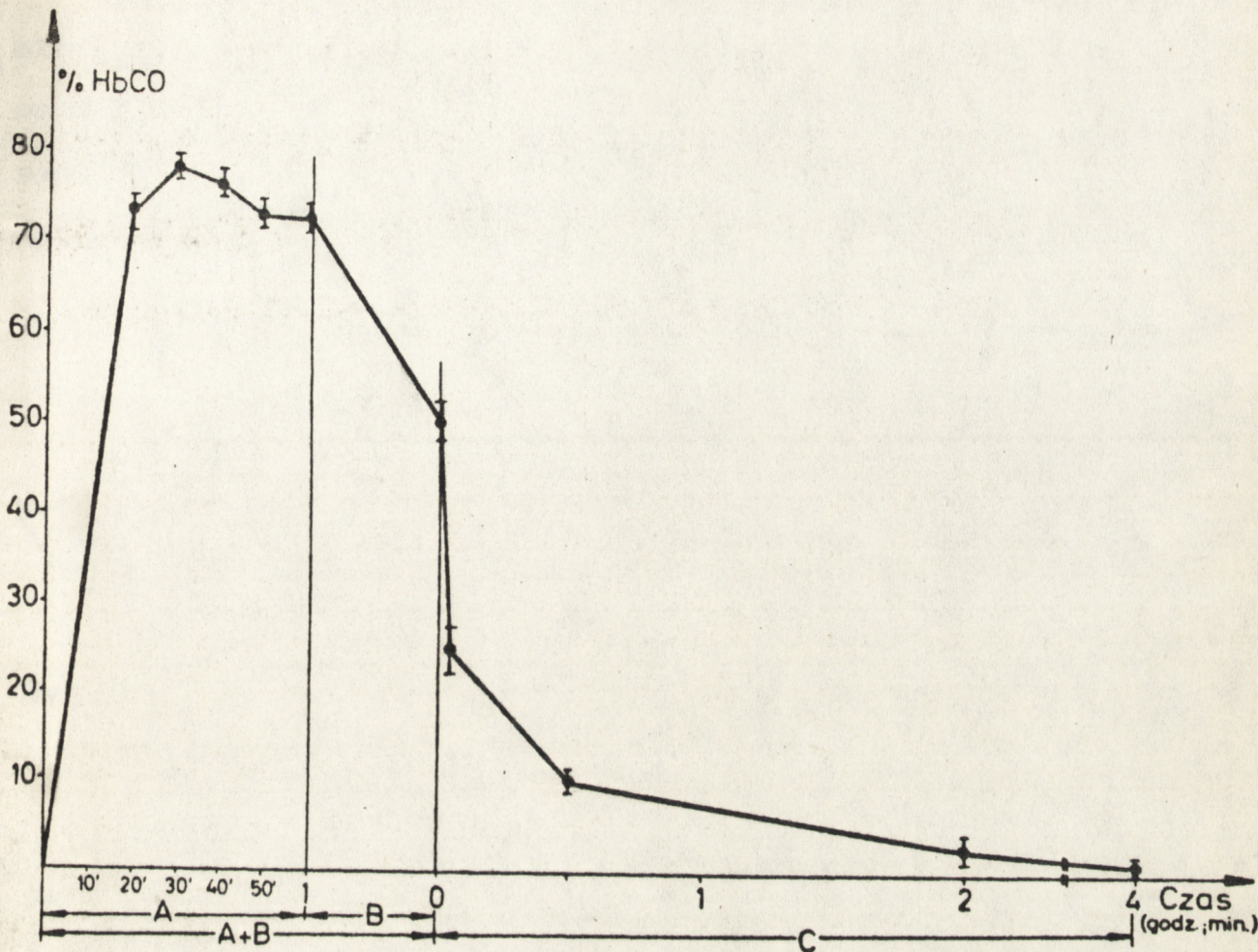
W miarę przebywania w komorze zachowanie zwierząt zmieniało się. Najwcześniej przyspieszał się oddech z 80 oddechów/min do około 120-130/min. Po upływie 10 min. przebywania w komorze

obserwowało się stopniowe obniżanie aktywności ruchowej, pojawienie się zaburzeń statyki zwierząt oraz spowolnienie oddechu. Po około 17 min. od rozpoczęcia zatruwania zwierzęta przewracały się przyjmując pozycję leżącą. Szybkość oddechów wynosiła 36-40/min. Po około 20 min. zwierzęta przestawały reagować na bodźce, znajdując się w stanie "śpiączki". U większości z nich w okresie tym występował oddech typu Chaynes-Stockesa, U około 10% spośród nich obserwowano oddychanie typu Kussmaula. Jego wystąpienie było prognostycznie niekorzystnym objawem, ponieważ wszystkie zwierzęta w liczbie 43 z tym typem zaburzeń oddechowych padły w czasie doświadczenia wśród objawów niewydolności oddechowo-krążeniowej. Utrzymane przy życiu zwierzęta pozostawały w komorze z zawartością 1% CO przez okres 60 min. Po tym czasie odłączono przepływ tlenu węgla, a zwierzęta przez następne 30 min. przebywały w komorze, przez którą przepuszczano wyłącznie powietrze, obniżając w ten sposób zawartość CO w mieszaninie oddechowej. Już po upływie kilku minut oddech zwierząt ulegał przyspieszeniu. W końcowej fazie tego okresu zwierzęta wychodziły ze stanu śpiączki. Część z nich przyjmowała pozycję siedzącą. Po 90 min. od początku doświadczenia wyjmowano je z komory doświadczalnej i przenoszono do otwartego pomieszczenia laboratoryjnego, gdzie oddychały powietrzem atmosferycznym. Po kilku minutach nawet te szczury, które w komorze nie zdołały przyjąć postawy siedzącej, wstawały na cztery łapy. Podczas zmiany pozycji ciała obserwowano osłabienie kończyn tylnych. Po upływie około 30 min. po wyjęciu z komory normalizowała się częstość oddechów. Początkowo mało ruchliwe zwierzęta po upływie 2-3 godz. nie różniły się zachowaniem i wy-

glądem od zwierząt grupy kontrolnej. Nie stwierdzano niedowładów ani porażień, statyka była niezaburzona.

Stopień zatrucia tlenkiem węgla i jego dynamikę kontrolowano przez pomiar stężenia karboksyhemoglobiny we krwi, oznaczanej metodą Whiteheada i Worthingtona /1961/. Pomiar karboksyhemoglobiny przeprowadzano w okresie 60 min. zatrucia w odstępach 10-minutowych, a następnie w 90 min. przebywania w komorze doświadczalnej. Po zatruciu oznaczenia wykonano w 2, 30, 60, 120, 180 i 240 min przebywania poza komorą. Każde z oznaczeń obejmowało grupę 4 zwierząt. Uzyskane wyniki przedstawiono na ryc. 2.

Poziom karboksyhemoglobiny we krwi zatrutowanych zwierząt wzrastał liniźnie do 20 min. od włączenia przepływu mieszaniny powietrza i tlenku węgla. Średnia zawartość HbCO w 20 min. wynosiła około 75%. Przez następnych 40 min. regulowano tak dopływ gazu do komory doświadczalnej, aby utrzymać ją na tym właśnie poziomie. Średnie stężenie HbCO oznaczone łącznie w grupach badanych po 20, 30, 40, 50 i 60 min. wynosiło $76,6 \pm 0,9\%$. Dalsze przebywanie zwierząt w komorze doświadczalnej, przez którą przez 30 min. przepuszczano wyłącznie powietrze bez domieszki CO prowadziło do spadku zawartości karboksyhemoglobiny do poziomu około 50% w 90 min. zatruwania. Po 2 min. przebywania poza komorą doświadczalną spadek zawartości karboksyhemoglobiny do około 25%, a po 30 min. do około 10%. Po upływie 2 godz. stwierdzono jeszcze około 4% HbCO. Po 4 godz. stężenie HbCO zbliżone było do wartości prawidłowej wynosząc około 1%.



Ryc.2. Stężenie HbCO we krwi szczurów w ostrym zatruciu tlenkiem węgla.

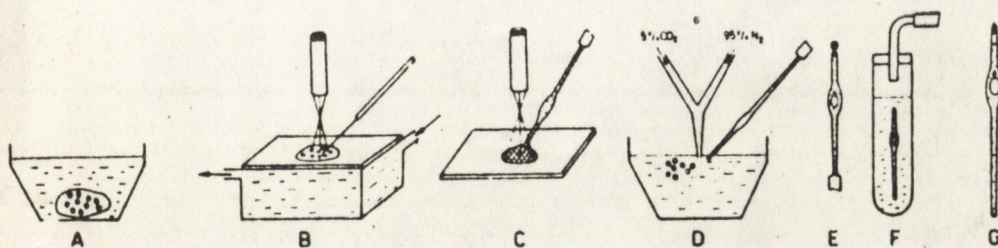
A - okres przepływu powietrza z tlenkiem węgla, B - okres przepływu powietrza, A + B - łączny okres zatruwania
C - okres przetrzymywania zwierząt poza komorą doświadczalną.

Zwierzęta doświadczalne zabijano przez dekapitację w grupach czasowych bezpośrednio po wyjęciu z komory /tzw. czas "0"/, a następnie po upływie 1, 2, 3, 4, 24, 48, 120 i 240 godz.

Technika apułkowego mikronurka Kartezjusza

Izolowanie neuronu. Natychmiast po dekapitacji wyjęte z jamy czaszki mózgowie oraz rdzeń kręgowy zalewano oziębionym do 0°C 0.25 M roztworem sacharozy. Skrawki tkankowe o grubości

około 2 mm, pobrane z odpowiednich okolic ośrodkowego układu nerwowego umieszczano w oziębionym na lodzie 0,25 M roztworze sacharozy. Dalsze etapy postępowania przedstawiono schematycznie na ryc. 3.



Ryc.3. Schemat izolowania neuronu i przygotowania go do badań przy użyciu techniki ampułkowego mikronurka Kartezjusza.

Zgodnie z zaleceniami Hyděna i Pignonia /1960/ oraz Hambergera /1963/ skrawki podbarwiono 2 mM roztworem błękitu metylenowego w 0,25 M roztworze sacharozy, dzięki czemu uwidaczniały się zabarwione na niebiesko komórki nerwowe /Ryc. 3 A/.

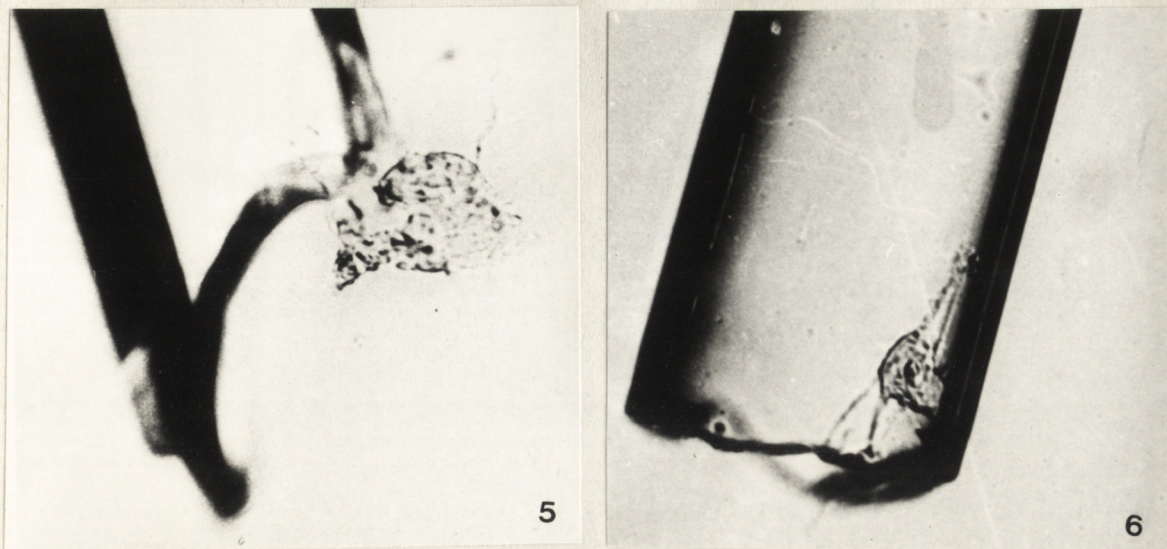
Pojedyncze neurony z odpowiednich struktur ośrodkowego układu nerwowego izolowano mechanicznie z pomocą włókna Kantalaha o przekroju 18 μm przy użyciu mikroskopu stereoskopowego. Naczynie ze skrawkiem przez cały okres manipulacji oziębiane było przez ciągły przepływ wody z kranu /Ryc. 3 B/. Wyizolowaną komórkę nerwową przenoszono na szkiełko podstawowe pokryte 2% żelem agarowym, nakrapiano właściwym medium inkubacyjnym oraz w razie potrzeby oczyszczano z elementów glejowych pod kontrolą mikroskopu świetlnego. Do uprzednio przygotowanego mikronurka ampułkowego nabierano medium inkubacyjnego /Ryc.3 C/.

a po uformowaniu w jego bańce odpowiedniej przestrzeni powietrznej wciągano do jego krótszego ramienia wyizolowaną i oczyszczoną komórkę nerwową /Ryc. 3 D oraz Ryc. 4.5.6/. Następnie



Ryc.4. Wyizolowany neuron jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu. Widoczne zabarwione błękitem metylenowym synapsy. Pow. 200 x.

zatapiano cementem Kothynsky'ego wylot krótszego ramienia mikronurka pozostawiając w jego końcowym odcinku niewielką przestrzeń powietrzną, zabezpieczającą zarówno płyn inkubacyjny jak i neuron przed przegrzaniem /Ryc.3 E/. Tak przygotowany mikronurek z otwartym jego dłuższym ramieniem przenoszono do naczynia z buforem używanym do przygotowania płynu inkubacyjnego /Ryc. 3 F/. Za pomocą różnic ciśnienia wytwarzanych w tym naczyniu formowano w mikronurku odpowiedniej wielkości bańkę powietrzną, tak aby podczas pomiarów w aparacie ciśnienie początkowe nie wykazywało różnicy większej niż ± 50 mm słupa wody w stosunku do ciśnienia atmosferycznego. W wyniku tego postępowania neuron znajdował się w mikronurku, zanurzony w 0,05 μ l płynu inkubacyjnego, położonego ponad większą bańką powietrza wypełniającą ampulkę mikronurka /Ryc. 3 G/. Stosunki przestrzenne poszczególnych środowisk w mikronurku przedstawiono na ryc. 7.



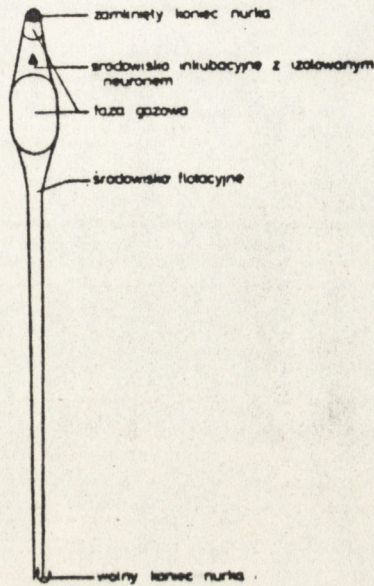
Ryc. 5. Wyizolowany neuron jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu podczas wciągania do mikronurka. Pow. 200 x.

Ryc. 6. Wyizolowany neuron ruchowy rogu przedniego rdzenia kręgowego w początkowym odcinku kapilary mikronurka. Pow. 200 x.

Przygotowanie szklanego mikronurka. Rurka ze szkła Pyrex po dokładnym wymyciu, wypłukaniu wodą demineralizowaną i wysuszeniu służyła do przygotowania kapilar o średnicy 1.5 mm. Następnie z pomocą mikropalnika gazowego formowano mikronurki. Jego łączna długość wynosiła około 15 mm, przy czym górne ramię kapilarne wraz z ampulką mierzyło 5 mm, a dolne około 10 mm. Z kolei przeprowadzono kalibrację mikronurka przez obliczenie współczynnika f dla szkła /stosunek objętości w μl do jego ciężaru w mg/.Wartości te otrzymywano przez ważenie mikronurka wypełnionego wodą i pustego po uprzednim wysuszeniu. Do badań używano mikronurki o ciężarze około 1.5-2 mg i objętości około 1 μl .

Ampułkowy mikro-nurek Kartezjusza

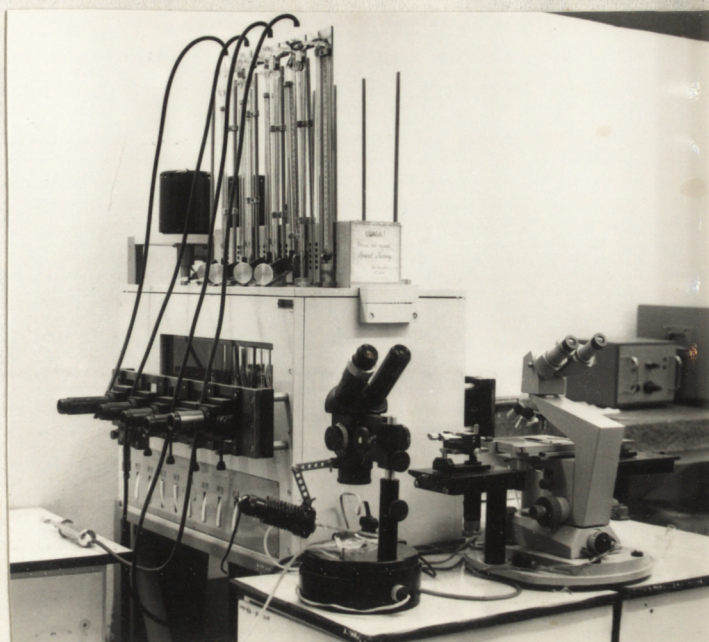
Skala 10:1



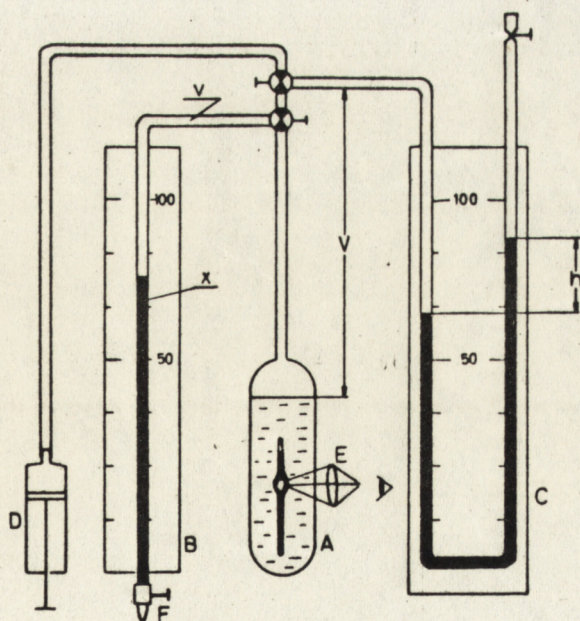
Ryc.7. Schemat szklanego ampułkowego mikronurka Kartezjusza z pojedynczym neuronem.

Aparatura pomiarowa i sposób pomiarów. Do badań zastosowano aparat mikronurka Kartezjusza skonstruowany w oparciu o prototyp Zeuthena /1953/ w Ośrodku Doświadczalnym Instytutu Chemii Fizycznej PAN w Warszawie /Ryc. 8/.

Urządzenie to składało się z ultratermostatu wodnego utrzymującego temperaturę w granicach $38 \pm 0,002^{\circ}\text{C}$ i dwóch mieszadeł do wody. Do bezpośrednich pomiarów gazometrycznych służył zestaw szklany i urządzenia optyczne przedstawione schematycznie na ryc. 9.



Ryc. 8. Zestaw aparatury używanej do badań przy zastosowaniu techniki ampułkowego mikronurka Kartezjusza.



Ryc. 9. Schemat aparatury do pomiarów mikrogazometrycznych.

Mikronurek szklany z neuronem wkładano do naczynia flotacyjnego /A/, zawierającego 10 ml odpowiedniego buforu i 0,2 ml Deconu. Naczynie flotacyjne zostało podłączone z jednej strony do biurety /B/ z drugiej zaś do manometru w kształcie litery U /C/ oraz do strzykawki o pojemności około 50 ml /D/. Cały układ wraz z kranami trójkanałowymi uszczelniano smarem silikonowym. Za pomocą strzykawki wywoływano w układzie ciśnienie h ustawiające mikronurek w pozycji "0" układu optycznego /E/. Ostatecznej precyzyjnej regulacji położenia mikronurka dokonywano przez pokrętło biurety /F/. Układ manometrów wypełniano płynem Brodiego. Mikronurek utrzymywał się w stałym położeniu, gdy jego ciężar właściwy był równy ciężarowi właściwemu środowiska flotacyjnego. Do ultratermostatu zamurzone było wyłącznie naczynie flotacyjne z mikronurkiem.

W zależności od charakteru reakcji zachodzącej w mikronurku zmieniał on swoje położenie w stosunku do wyjściowego - opadał w przypadku zużycia tlenu przez neuron oraz unosił się ku powierzchni płynu flotacyjnego podczas produkcji dwutlenku węgla. Opadanie mikronurka uwarunkowane było zmniejszaniem się bańki powietrza przy zużyciu tlenu i jego obciążeniem płynem flotacyjnym, przedostającym się swobodnie do otwartego jego dolnego ramienia kapilarnego. Produkcja gazu wewnątrz nurka prowadziła z kolei do wypierania płynu flotacyjnego z dolnego ramienia kapilarnego. Mikronurek tracił na ciężarze i przy warunkach stałego ciśnienia w układzie gazometrycznym przemieszczał się w cieczy ku górze.

Każdorazowy odczyt wyniku poprzedzony był wywołaniem takiego ciśnienia za pomocą pokrętła /F/, które sprowadzało

mikronurek do wyjściowej pozycji "0" układu optycznego. Za podstawę obliczenia postępu reakcji enzymatycznej służyła różnica w ciśnieniu zarejestrowana na ramieniu x biurety. Układ manometryczny w tym również biuretę kalibrowano uprzednio za pomocą rtęci metalicznej, oznaczając w ten sposób objętość milimetra sześciennego danej biurety, wyrażoną w mikrolitrach. Przez porównanie ciężaru i objętości rtęci metalicznej uzyskiwano również dokładny pomiar objętości powietrza znajdującego się nad powierzchnią płynu flotacyjnego. Na początku każdego pomiaru określano także ciśnienie h panujące wewnątrz układu pomiarowego naczynia flotacyjnego.

Zużycie tlenu przez neuron obliczano według Zeuthena /1953/ stosując następujący wzór:

$$\frac{\Delta O_2}{\Delta t} = \frac{x \cdot v \cdot g_D \cdot f \cdot (B+h-e) \cdot 273^\circ}{V \cdot 10300 \cdot (273^\circ + t^\circ)}$$

gdzie poszczególne symbole określają następujące parametry

ΔO_2 - mikrolitry zużytego tlenu, t - czas trwania doświadczenia /godz/, x - różnica odczytu w mm/godz., v - $\mu\text{l}/\text{mm}^3$, V - objętość powietrza nad płynem flotacyjnym na początku pomiaru, g_D - ciężar suchego nurka po doświadczeniu /mg/, f - współczynnik szkła oznaczony w wyniku kalibracji / $\mu\text{l}/\text{mg}$ /, B - ciśnienie atmosferyczne = 10 300 mm H_2O , h - początkowe ciśnienie w układzie, e - ciśnienie pary wodnej /stała/, t° - temperatura układu pomiarowego.

W przypadku oznaczania wydzielonego dwutlenku węgla w obliczeniach uwzględniano prawo Henry'ego, biorące pod uwagę współczynnik rozpuszczalności gazów w cieczach. Objętość wytworzonego dwutlenku węgla obliczano według wzoru:

$$\frac{\Delta \text{CO}_2}{\Delta t} = \frac{x \cdot v \cdot V_g \cdot f \cdot (B+h-e) \cdot 273^\circ}{V \cdot 10300 \cdot (273^\circ + t^\circ)} + \frac{v \cdot V_f \cdot \alpha \text{CO}_2 \cdot (B+h-e)}{V \cdot 10300}$$

w którym poszczególne symbole oznaczają następujące parametry:

ΔCO_2 - przyrost objętości CO_2 w μl , αCO_2 - współczynnik rozpuszczalności CO_2 , V_g - objętość gazu pływającego mikronurka
 V_f - objętość płynu w mikronurku. Pozostałe oznaczenia jak i we wzorze poprzednim.

Badanie aktywności oddechowej.

Zużycie tlenu w obecności askrobinianu i cytochromu c.

Badanie aktywności końcowego etapu łańcucha oddechowego w układzie zawierającym egzogeny askorbinian i cytochrom c oznaczano w środowisku inkubacyjnym o następującym składzie: bufor $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7,4 - 37,5 mM, cytochrom c $8,6 \times 10^{-2}$ mM, sodu askorbinian - 12,5 mM, AlCl_3 - 0,5 mM, albumina surowicy wołu 1 mg/ml /Slater, 1949A, Potter, 1957, Hydén, Pigoń, 1960/. Aktywność układu wyrażano w $\mu\text{l O}_2/\text{godz}/\text{neuron}$ i w $\mu\text{l O}_2/\text{godz}/\mu\text{m}^3$ cytoplazmy. Ślepą próbę stanowił układ, który w tych samych warunkach był poddawany analizie zużycia tlenu przez środowisko inkubacyjne bez wprowadzenia neuronu do mikronurka. Wartości te każdorazowo uwzględniano w obli-

zeniach zużycia tlenu. W celu wyrównania temperatury i ciśnienia w układzie inkubacyjnym przed właściwym pomiarem stosowano 20 minutową preinkubację. Następnie w 5-minutowych przedziałach czasowych dokonywano odczytów na podziałce biurety /B/ przez okres 30 minut. Objętość zużytego tlenu przez neuron w ciągu jednej godziny obliczano z prostego odcinka krzywej reakcji.

Zużycie tlenu w obecności bursztynianu. Mieszanina inkubacyjna składała się z: buforu $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7,4-37,5 mM, cytochromu c - $8,6 \times 10^{-2}$ mM, sodu bursztynianu - 25 mM, AlCl_3 - 0,5 mM /Slater, 1949B, Potter, 1957, Hamberger, Hydén 1963/. Po uprzedniej preinkubacji przez okres 20 min. odczyty zużytego tlenu przez neuron przeprowadzono przez okres 1 godziny. W warunkach tego układu autooksydacja cytochromu c w temperaturze $38 \pm 0,002^\circ\text{C}$ była niemierzalna. Zużycie tlenu wyrażano w $\mu\text{l O}_2/\text{godz}/\text{neuron}$ oraz w $\mu\text{l O}_2/\text{godzinę}/\mu\text{m}^3$ cytoplazmy.

Ocena glikolizy w warunkach beztlenowych. Substratem początkowym, inicjującym szereg reakcji biochemicznych łańcucha Parnasa-Embdena-Meyerhoffa w izolowanym neuronie w warunkach beztlenowych była glukoza. Aktywność łańcucha glikolitycznego stymulowano jedynie na etapach reakcji katalizowanych przez glukokinazę, aldolazę i dehydrogenazę mleczanową. W wyniku zakwaszenia środowiska inkubacyjnego przez gromadzący się kwas mlekowy, stanowiący końcowy produkt reakcji dochodziło do wydzielania dwutlenku węgla ze znajdującego się w płynie inkubacyjnym wodorowęglanu.

Przygotowane do oznaczeń mikronurki, w dniu poprzedzającym badanie wkładano do środowiska flotacyjnego, składającego się z równych objętości roztworów 0,025 M KHCO_3 i 0,025 M NaHCO_3 . Płyn inkubacyjny zawierał następujące składniki: sodowy bufor fosforanowy, pH 7,6 - 0,024 M, KHCO_3 - 0,025 M, amid kwasu nikotynowego - 0,04 M, K-ATP - 0,00033 M, K-NAD- 0,0002, sodu fruktozo-1,6-dwufosforan- 0,002 M, glukoza - 0,01M, MgCl_2 - 0,0067 M, sodu pirogronian- 0,005, KF- 0,01 M, KCl - 0,0154 M, sacharoza - 0,1 M /Hamberger, Hydén, 1963/.

Dla usunięcia tlenu ze środowiska inkubacyjnego, przez okres 30 min. przed rozpoczęciem pomiarów przez płyn inkubacyjny przepuszczano mieszaninę 5% CO_2 w N_2 , oczyszczoną uprzednio za pomocą przepływu przez nasycony roztwór pirogallolu. Tę samą mieszaninę gazową przepuszczano przez okres 20 min. poprzedzających doświadczenie przez cały układ manometryczny. Do pomiarów przystępowano po upływie kolejnych 10 min., gwarantujących wyrównanie ciśnień i temperatury. Pomiar przeprowadzano w temp. $38 \pm 0,002^\circ\text{C}$ przez okres 30 min. Wyniki reakcji wyrażano w $\mu\text{l CO}_2/\text{godz}/\text{neuron}$ oraz w $\mu\text{l CO}_2/\text{godz}/\mu\text{m}^3$ cytoplazmy neuronu.

Pomiar objętości cytoplazmy neuronu.

Badania oparto o obrazy z odbiciowego mikroskopu elektro-nowego. Neurony natychmiast po wyizolowaniu z tkanki utrwalono w 3% roztworze aldehydu glutarowego w 0,2 M buforze kaksodylowym, pH 7,4 o temp. $+ 4^\circ\text{C}$ przez okres 1,5 godz., a następnie dotrwalono przez okres 1 godz. w 2 % czterotlenku osmu w tym samym buforze. Następnie neurony zbierano na sączi z

włókna szklanego, przeprowadzono przez szereg mieszanin alkoholu etylowego z acetonem o wzrastającym stężeniu, napyłano węglem i solami złota i oglądano w odbiciowym mikroskopie elektronowym JEM-S 1, firmy JEOL.

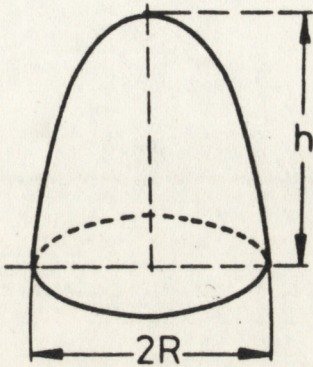
Objętość neuronów pozbawionych wypustek oznaczano w oparciu o dwa wymiary komórek uzyskane z elektronogramów, stosując w zależności od kształtu neuronu wzory na odcinek całkowity lub prosto ścięty paraboloidy obrotowej oraz elipsoidę obrotową i beczkę /ryc. 10/.

W oparciu o podobieństwo kształtów poszczególnych komórek nerwowych do określonych figur geometrycznych, dla oznaczenia ich objętości stosowano różne wzory, i tak objętość komórek Purkinjego kory mózdzku obliczano ze wzoru na elipsoidę obrotową, a komórek nerwowych jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu i motoneuronów rogu przedniego rdzenia kręgowego z wzoru na beczkę i całkowitego odcinka paraboloidy obrotowej. W stosunku do komórek piramidowych stosowano wzór na oznaczenie objętości całkowitego lub prostościętego odcinka paraboloidy obrotowej. Ze względu na zachowane po izolacji jedynie krótkie fragmenty okołoperikaryalnych wypustek neuronów, w obliczeniach objętości poszczególnych komórek uwzględniano jedynie ich część perikaryalną. Przyjętą objętość poszczególnych typów komórek uzyskiwano z uśrednienia objętości 8-15 neuronów każdego typu.

ODCINEK PARABOLOIDY OBROTOWEJ

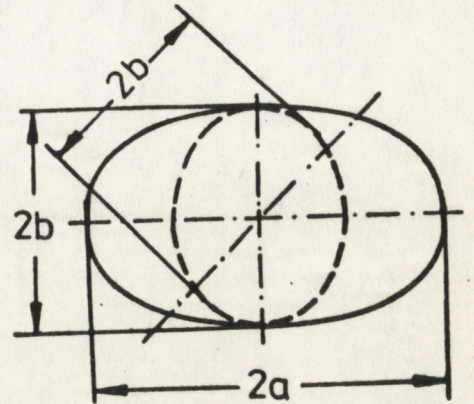
a) całkowity

$$V = \frac{1}{2} \pi R^2 h$$



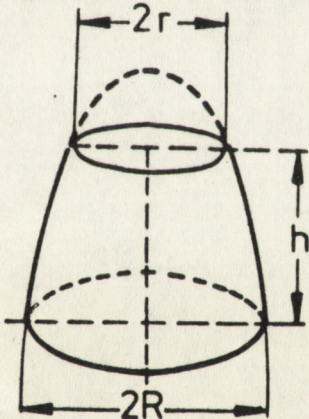
ELIPSOIDA OBROTOWA

$$V = \frac{4}{3} \pi a b^2$$



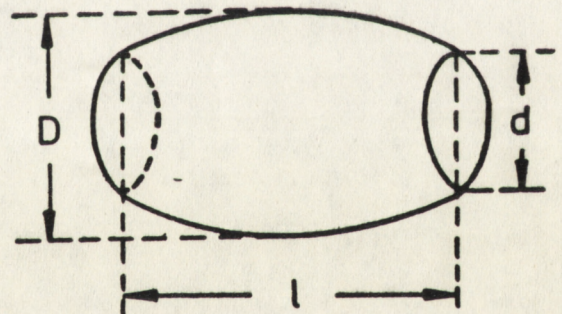
b) prosto ścięty

$$V = \frac{1}{2} \pi h (R^2 + r^2)$$



BECZKA

$$V = \frac{1}{15} \pi l (2D^2 + Dd + \frac{3}{4}d^2)$$



Ryc.10. Wzory i wykres brył geometrycznych, stosowanych do obliczeń objętości cytoplazmy komórek nerwowych /Królikowski, Steckiewicz, 1956/

Objętość jądra komórki obliczano z pomiarów dokonanych na obrazach z transmisyjnego mikroskopu elektronowego, stosując za Enestrómem i Hambergerem /1968/ wzór na elipsoidę $V = Dd^2/6$, gdzie D i d stanowiły dwa wymiary elipsoidy. Uśredniona wartość objętości jądra dla każdego rodzaju komórek nerwowych pochodziła z 5-10 obliczeń.

Przybliżona wartość objętości cytoplazmy komórki, wyrażona w μm^3 stanowiła różnicę objętości komórki i jej jądra.

Elektronowo-mikroskopowa analiza stanu struktur submikroskopowych komórki.

Badania mikroskopowo-elektronowe, przeprowadzone w mikroskopie transmisyjnym służyły zarówno do oceny stanu struktur submikroskopowych badanych komórek jak i do pomiaru ich jąder.

Zwierzęta z poszczególnych grup doświadczalnych jak i kontrolne, w narkozie eterowej poddawano przezsercowej perfuzji 1,5% roztworem aldehydu glutarowego w 0,2 M buforze kakodylowym o pH 7.4. Po wyjęciu utrwalonego mózgowia i rdzenia kręgowego, pobierano bloki tkankowe o objętości około 1 mm^3 z warstwy komórek Purkinjego kory mózdzku, okolicy jądra olbrzymio-komórkowego tworzącego siatkowatego opuszki, z płytki końcowej rogu Amona /sektor H_{4-5} Sommera/ oraz z rogów przednich szyjnego odcinka rdzenia kręgowego. Bloki utrwalano dodatkowo przez 1 godz. w roztworze 2% OsO_4 w buforze kakodylowym o pH 7.4 w temp. $+4^\circ\text{C}$. Po ich przeprowadzeniu w sposób rutynowy przez szereg roztworów, etanolu o wzrastającym stężeniu zatapiano je w Eponie 812. Ultracienkie skrawki krojono na ultramikrotomie LKB III i montowano na siatki. Skrawki kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu i oglądano w transmisyjnym mikroskopie elektronowym JEM-7B, firmy JEOL.

Analiza statystyczna.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej według testu Studenta t .

WYNIKI

Objętość cytoplazmy izolowanych neuronów

Obrazy uzyskane w odbiciowym mikroskopie elektronowym pozwoliły na określenie kształtu i wielkości poszczególnych komórek /Ryc. 11, 12, 13, 14/. Większość komórek po wyizolowaniu z tkanki, utrwaleniu i napyleniu pozbawiona była wypustek, tylko nieznaczna ich część wykazywała krótkie fragmenty wypustek, nie uwzględniane przy pomiarach wielkości neuronu. Zróżnicowany kształt poszczególnych typów komórek nerwowych, zbliżony do różnych figur geometrycznych, pozwolił na zastosowanie do obliczenia ich objętości wzorów właściwych dla każdej z nich.

Największą objętość, wynoszącą $84015 \pm 7235 \mu\text{m}^3$ wykazywały nerwowe komórki ruchowe rogów przednich rdzenia kręgowego. Średnia objętość ich jądra wynosiła $8821 \pm 632 \mu\text{m}^3$. Przybliżona objętość ich cytoplazmy perikarialnej stanowiła przeto $75194 \mu\text{m}^3$. Neurony jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu były mniejsze, ich objętość wynosiła $73498 \pm 6213 \mu\text{m}^3$. Objętość jądra komórkowego stanowiła $6687 \pm 591 \mu\text{m}^3$, a cytoplazmy $66811 \mu\text{m}^3$. Dla komórek Purkinjego wartości te kształtowały się odpowiednio na poziomie $52537 \pm 4618 \mu\text{m}^3$ i $5194 \pm 427 \mu\text{m}^3$. Przybliżona objętość cytoplazmy perikarialnej wynosiła $47343 \mu\text{m}^3$. Ciało komórkowe najmniejszych spośród badanych komórek - neuronów piramidowych rogu Amona - miało przybliżoną objętość równą $20963 \pm 1894 \mu\text{m}^3$, jądro - $6185 \pm 574 \mu\text{m}^3$, a cytoplazma $14778 \mu\text{m}^3$. Dane dotyczące przybliżonych

objętości poszczególnych typów komórek, ich jąder oraz cytoplazmy zestawiono w tab. 1.



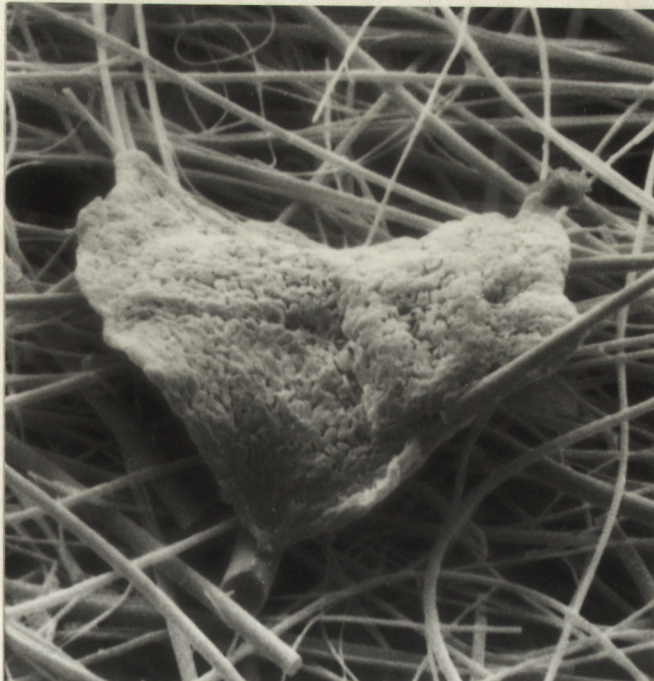
Ryc. 11. Komórka Purkinjego. Odbiciowy mikroskop elektronowy. Pow. 3000 x.



Ryc. 12. Neuron ruchowy rogu przedniego rdzenia kręgowego. Odbiciowy mikroskop elektronowy. Pow. 1800 x.



Ryc. 13. Neuron jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu. Odbiciowy mikroskop elektronowy. Pow. 3000 x.



Ryc. 14. Komórka piramidowa płytki końcowej H₄₋₅ rogu Amona. Odbiciowy mikroskop elektronowy. Pow. 3000 x.

Tab. 1. Średnia arytmetyczna przybliżonej objętości poszczególnych typów komórek nerwowych.

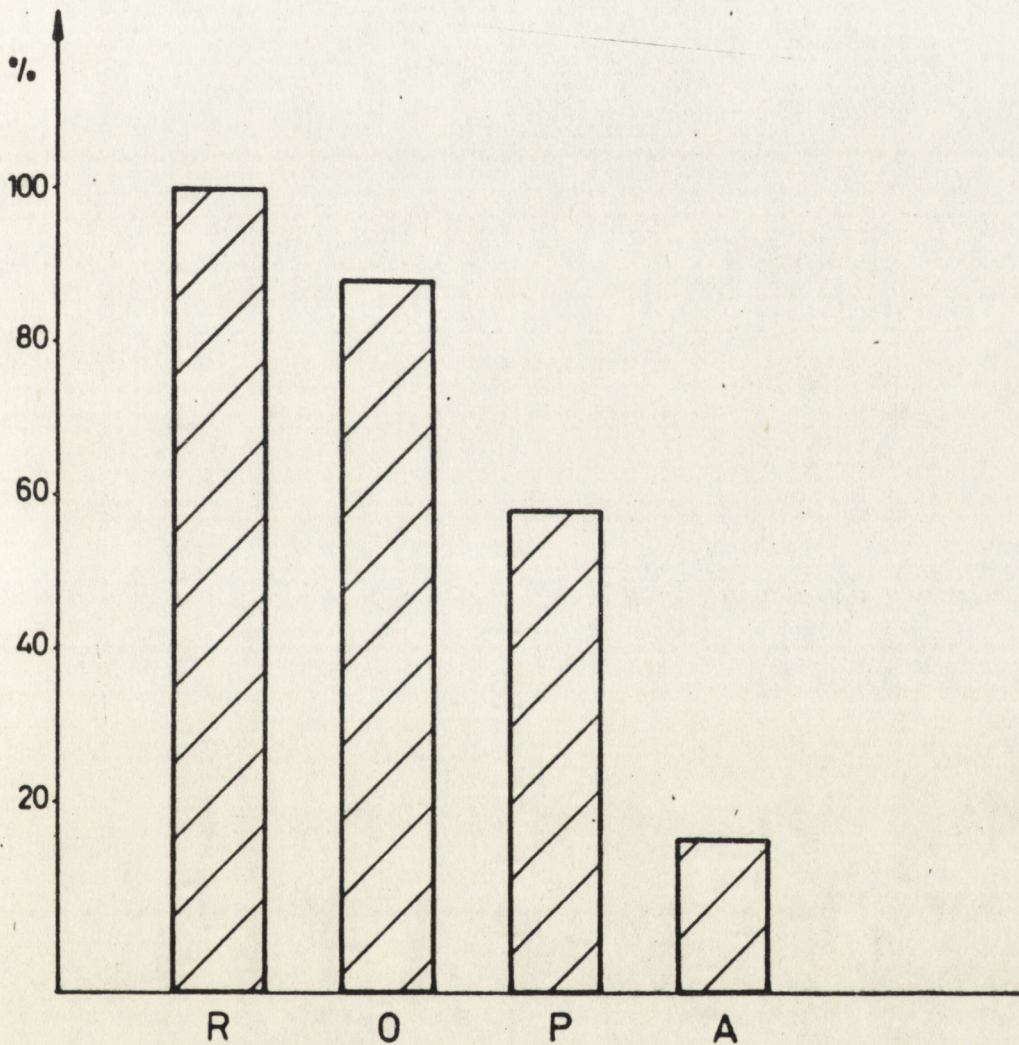
| Rodzaj neuronu | $V \mu\text{m}^3$ $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | $v \mu\text{m}^3$ $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | $v/V \times 100\%$ | $V_c \mu\text{m}^3$ $\bar{x} - \bar{x}$ |
|----------------|---|---|--------------------|--|
| R | 84 015 \pm 7235/10/ ⁿ | 8 281 \pm 632 | 10,5% | 75 194 |
| O | 73 498 \pm 6213/9/ | 6 687 \pm 591 | 9,1% | 66 811 |
| P | 52 537 \pm 4618/8/ | 5 194 \pm 427 | 9,9% | 47 343 |
| A | 20 963 \pm 1894/17/ | 6 185 \pm 574 | 29,7% | 14 778 |

R - neuron ruchowy rogu przedniego rdzenia kręgowego,
 O - neuron jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego,
 P - komórka Purkiniego, A - komórka piramidowa rogu Amona,
 V - objętość ciała neuronu, v - objętość jądra komórkowego,
 V_c - przybliżona objętość cytoplazmy, perikarjalnej \bar{x} , \bar{x}
 średnie arytmetyczne \pm SEM średni błąd średniej, n - liczba neuronów

Stosunki procentowe objętości jądra do objętości ciała neuronu dla pierwszych trzech rodzajów badanych komórek przyjmowały wartość zbliżoną do 10%, a dla komórek piramidowych rogu Amona bliską 30%.

Przyjmując wartość 75 194 μm^3 , stanowiącą przybliżony wykładnik objętości izolowanych neuronów ruchowych rogu przedniego rdzenia kręgowego w stosowanych warunkach doświadczalnych za 100% wielkości średnich, objętości cytoplazmy pozostałych komórek w stosunku procentowym stanowiły 88,8% dla neuronów jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu, 62,2% dla komórek Purkiniego i 19,7% dla komórek piramidowych płytki końcowej rogu Amona.

Dane te ilustruje ryc. 15.



Ryc. 15. Stosunki procentowe objętości cytoplazmy poszczególnych typów neuronów

R. - neuron ruchowy rdzenia kręgowego /przyjęty za 100%/, O - neuron jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu, P - komórka Purkiniego, A - komórka piramidowa rogu Amona.

Aktywność oddechowa izolowanych neuronów w warunkach normoksji

Zużycie tlenu w układzie askorbinian-cytochrom c.

Zużycie tlenu w układzie zawierającym askorbinian i cytochrom c przez poszczególne typy neuronów w warunkach prawidłowych przedstawiono w tabeli 2.

Tab. 2. Zużycie tlenu w obecności askorbinianu i cytochromie c w warunkach normoksji

| Rodzaj neuronu | n | $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-3}/\text{godz}/$ neuron $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-8}/\text{godz.}/$ μm^3 cytoplazmy $\bar{x} \pm \text{SEM}$ |
|----------------|----|---|--|
| A | 6 | 12,91 \pm 1,81 | 87,23 \pm 12,23 |
| P | 7 | 13,50 \pm 1,96 | 28,54 \pm 4,14 |
| O | 10 | 18,06 \pm 1,81 | 27,04 \pm 2,71 |
| R | 5 | 6,47 \pm 1,81 | 8,60 \pm 2,41 |

A - komórki piramidowe rogu Amona, P - komórki Purkinjego
O - neurony jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu, R - neurony ruchowe rogu przedniego rdzenia kręgowego. $\bar{x} \pm \text{SEM}$ - średnia arytmetyczna \pm średni błąd średniej, n - liczba neuronów

Z przedstawionych danych wynika, że zużycie tlenu w przeliczeniu na pojedynczą komórkę nerwową było najwyższe w przypadku komórek jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu, najniższe zaś w komórkach ruchowych rogów przednich rdzenia kręgowego.

Po przeliczeniu uzyskanych danych na $1 \mu\text{m}^3$ cytoplazmy okazało się, że najwyższe zużycie tlenu wykazywały komórki piramidowe rogu Amona. Wynosiło ono $87,23 \pm 12,23 \times 10^{-8} \mu\text{l O}_2/\text{godz}/\mu\text{m}^3$.

Przyjmując tę wartość za 100% stosunki procentowe zużycia tlenu w obecności askorbinianu i cytochromu c w pozostałych neuronach przedstawiały się następująco: dla komórek Purkinjego 32,7%, dla neuronów jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego- 31,0%, a dla motoneuronów rogu przedniego rdzenia kręgowego zaledwie 9,9%.

Zużycie tlenu w obecności bursztynianu

Zużycie tlenu w układzie zawierającym bursztynian przez poszczególne typy komórek nerwowych izolowanych od zwierząt przetrzymywanych w warunkach normoksji przedstawiono w tabelu

Tab. 3. Zużycie tlenu w obecności bursztynianu w warunkach normoksji

| Rodzaj neuronu | n | $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-4}/\text{godz}/\text{neuron}$ $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-9}/\text{godz}/\mu\text{m}^3$ cytoplazmy $\bar{x} \pm \text{SEM}$ |
|----------------|---|--|--|
| A | 5 | $3,14 \pm 0,32$ | $21,22 \pm 2,16$ |
| P | 5 | $6,29 \pm 0,96$ | $13,30 \pm 2,03$ |
| O | 5 | $5,94 \pm 1,36$ | $8,89 \pm 2,04$ |
| R | 5 | $4,07 \pm 0,68$ | $5,41 \pm 0,90$ |

A - komórki piramidowe rogu Amona, P - komórki Purkinjego, O - neurony jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu, R - neurony ruchowe rogu przedniego rdzenia kręgowego, $\bar{x} \pm \text{SEM}$ - średnia arytmetyczna \pm średni błąd średniej, n - liczba neuronów.

Najwyższe zużycie tlenu w układzie zawierającym bursztynian, równe $6.29 \pm 0,96 \times 10^{-4} \mu\text{l O}_2/\text{godz}/\text{neuron}$, przyjęte za 100% wykazywały komórki Purkinjego. Jego zużycie na poziomie 94.4% charakteryzowało komórki nerwowe jądra olbrzymiokórkowego tworzącego siatkowatego, 64,7% motoneurony rogów przednich rdzenia kręgowego i 49,9% komórki piramidowe rogu Amona.

Przeliczenie uzyskanych danych na $1 \mu\text{m}^3$ cytoplazmy komórki zmieniało w sposób istotny powyższe proporcje. Najwyższe zużycie tlenu wynoszące $21,22 \times 10^{-9} \mu\text{l O}_2/\text{godz}/\mu\text{m}^3$ było znamienne dla komórek piramidowych rogu Amona. Przy przyjęciu tej wartości za 100% - zużycie tlenu przez komórki Purkinjego kształtowało się na poziomie 62,7%, neurony jądra olbrzymiokórkowego tworzącego siatkowatego - 42,0%, a neurony ruchowe rogu przedniego rdzenia kręgowego - 25,5%.

Glikoliza w warunkach beztlenowych

Wartości charakteryzujące metabolizm glukozy w warunkach beztlenowych w poszczególnych typach komórek nerwowych izolowanych od zwierząt przebywających w warunkach normoksji przedstawiono w tabeli 4.

Tab. 4. Glikoliza w warunkach beztlenowych

| Rodzaje neuronu | n | $\mu\text{l CO}_2 \times 10^{-3}/\text{godz}/\text{neuron}$ $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | $\mu\text{l CO}_2 \times 10^{-8}/\text{godz}/\mu\text{m}^3$ cytoplazmy $\bar{x} \pm \text{SEM}$ |
|-----------------|---|---|--|
| A | 6 | $1,55 \pm 0,28$ | $10,47 \pm 1,89$ |
| P | 5 | $5,75 \pm 0,89$ | $12,16 \pm 1,88$ |
| O | 7 | $8,69 \pm 0,72$ | $13,01 \pm 1,08$ |
| R | 6 | $2,36 \pm 0,43$ | $3,14 \pm 0,57$ |

A - komórki piramidowe rogu Amona, P - komórki Purkinjego, O - neurony jądra olbrzymiokórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu, R - neurony ruchowe rogu przedniego rdzenia kręgowego, $\bar{x} \pm \text{SEM}$ - średnia arytmetyczna \pm średni błąd średniej, n - liczba neuronów.

Najwyższą aktywność glikolityczną, wynoszącą $8,69 \pm 0,72 \times 10^{-3} \mu\text{l}/\text{CO}_2/\text{godz.}$ neuron wykazywały komórki nerwowe jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu. Przyjmując tę wartość za 100% - aktywność glikolityczna pozostałych neuronów kształtowała się na poziomie 69% w przypadku komórek Purkinjego, 25% w neuronach ruchowych rdzenia kręgowego i tylko około 18% w komórkach piramidowych rogu Amona.

Na podstawie przeliczenia wyników na $1 \mu\text{m}^3$ cytoplazmy neuronów najwyższą aktywność glikolityczną wykazano w neuronach jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego $/13,01 \pm 1,08 \mu\text{l CO}_2/\text{godz}/\mu\text{m}^3 \text{cytoplazmy}/$. Przy przyjęciu tej wartości za 100%, aktywność glikolityczna komórek Purkinjego wynosiła 93,1%, komórek piramidowych rogu Amona - 80,8%, a motoneuronów rogów przednich rdzenia kręgowego 23,9%.

Aktywność oddechowa izolowanych neuronów bezpośrednio po zatruciu tlenkiem węgla

Zużycie tlenu w układzie askorbinian-cytochrom c.

Zużycie tlenu w obecności askorbinianu i cytochromu c przez poszczególne typy komórek nerwowych izolowane z ośrodkowego układu nerwowego zwierząt bezpośrednio po zatruciu tlenkiem węgla przedstawiono w tabeli 5.

Tab. 5. Zużycie tlenu w obecności askorbinianu i cytochromu c bezpośrednio po zatruciu tlenkiem węgla.

| Rodzaj neuronu | Grupa zwierząt | n | $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-3}/\text{godz}$ neuron $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-8}/\text{godz}$ μm^3 cytoplazmy $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | p |
|----------------|-----------------------------|----|--|--|--------|
| A | Kontrolna. Doświadczalna | 10 | $12,91 \pm 1,81$ | $87,23 \pm 12,23$ | <0,05 |
| | | 5 | $5,93 \pm 1,07$ | $40,07 \pm 7,23$ | |
| P | Kontrolna. Doświadczalna | 7 | $13,50 \pm 1,96$ | $28,54 \pm 4,14$ | <0,01 |
| | | 5 | $4,49 \pm 1,07$ | $9,49 \pm 2,26$ | |
| O | Kontrolna. Doświadczalna | 10 | $18,06 \pm 1,81$ | $27,04 \pm 2,71$ | <0,001 |
| | | 5 | $3,90 \pm 1,57$ | $5,84 \pm 2,35$ | |
| R | Kontrolna. Doświadczalna | 5 | $6,47 \pm 1,81$ | $8,60 \pm 2,41$ | <0,01 |
| | | 5 | $2,03 \pm 0,21$ | $2,70 \pm 0,28$ | |

A - komórki piramidowe kory amonalnej, P - komórki Purkinjego, O - neurony jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego, R - neurony ruchowe rogu przedniego rdzenia kręgowego n - liczba neuronów, $\bar{x} \pm \text{SEM}$ - średnia arytmetyczna \pm średni błąd średniej p - prawdopodobieństwo obliczone w/g testu t Studenta.

W porównaniu z neuronami izolowanymi z ośrodkowego układu nerwowego zwierząt kontrolnych, neurony od zwierząt zatrutych tlenkiem węgla wykazywały spadek zużycia tlenu w układzie zawierającym askorbinian i cytochrom c.

Zużycie tlenu przez komórki piramidowe rogu Amona, wynoszące odpowiednio $5,93 \pm 1,07 \times 10^{-3} \mu\text{l O}_2/\text{godz}/\text{neuron}$ i $40,07 \pm 7,23 \times 10^{-8} \mu\text{l O}_2/\text{godz}/\mu\text{m}^3$ cytoplazmy stanowiło 45,9% wartości kontrolnych. W przypadku komórek Purkinjego

uzyskane wartości $4.49 \pm 1.07 \times 10^{-3} \mu\text{l O}_2/\text{godz}/\text{neuron}$ i $9.49 \pm 2.26 \times 10^{-8} \mu\text{l O}_2/\text{godz}/\mu\text{m}^3$ cytoplazmy/ wynosiły 33,3%, neuronów jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego $3.90 \pm 1.57 \times 10^{-3} \mu\text{l O}_2/\text{godz}/\text{neuron}$ i $5.84 \pm 2.35 \times 10^{-8} \mu\text{l O}_2/\text{godz}/\mu\text{m}^3$ cytoplazmy/ - zaledwie 21.6%, a motoneuronów rdzenia kręgowego $2.03 \pm 0,25 \times 10^{-3} \mu\text{l O}_2/\text{godz}/\text{neuron}$ i $2.70 \pm 0,28 \times 10^{-8}/\text{godz}/\mu\text{m}^3$ cytoplazmy/ - 31,4%.

Zużycie tlenu w obecności bursztynianu

Dane liczbowe dotyczące zużycia tlenu w układzie zawierającym bursztynian przez poszczególne typy komórek nerwowych, pochodzące od zwierząt bezpośrednio po zatruciu tlenkiem węgla zawarto w tabeli 5.

Tab. 6. Zużycie tlenu w obecności bursztynianu bezpośrednio po zatruciu tlenkiem węgla

| Rodzaj neuronu | Grupa zwierząt | n | $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-4}/\text{godz}/\text{neuron}$ $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-9}/\text{godz}/\mu\text{m}^3$ cytoplazmy $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | p |
|----------------|-----------------------------|---|--|---|-------|
| A | Kontrolna. Doświadczalna | 5 | $3,14 \pm 0,32$ | $21,22 \pm 2,16$ | <0,05 |
| | | 5 | $5,75 \pm 1,06$ | $38,85 \pm 7,16$ | |
| P | Kontrolna. Doświadczalna | 5 | $6,29 \pm 0,96$ | $13,30 \pm 2,03$ | >0,05 |
| | | 6 | $8,42 \pm 0,64$ | $17,80 \pm 1,35$ | |
| O | Kontrolna. Doświadczalna | 5 | $5,94 \pm 1,36$ | $8,89 \pm 2,04$ | >0,05 |
| | | 5 | $5,45 \pm 0,35$ | $8,16 \pm 0,52$ | |
| R | Kontrolna. Doświadczalna | 5 | $4,07 \pm 0,68$ | $5,41 \pm 0,90$ | >0,05 |
| | | 5 | $4,62 \pm 1,04$ | $6,14 \pm 1,38$ | |

A - komórki piramidowe kory amonalnej, P - komórki Purkinjego, O - neurony jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego, R - neurony ruchowe rogu przedniego rdzenia kręgowego, n - liczba neuronów, $\bar{x} \pm \text{SEM}$ - średnia arytmetyczna - średni błąd średniej, p - prawdopodobieństwo w/g testu t Studenta.

Zmiany w zużyciu tlenu w obecności bursztynianu w neuronach ośrodkowego układu nerwowego zwierząt zatrutych tlenkiem węgla były zróżnicowane w porównaniu do warunków kontrolnych. Statystycznie znamiennej zmianie / $p < 0,05$ / ulegało jedynie oddychanie neuronów piramidowych płytki końcowej rogu Amona, wzrastając do 183,1% wartości kontrolnej. Odchylenia w pozostałych grupach komórek nerwowych wynoszące odpowiednio dla komórek Purkiniego 133,9%, dla neuronów jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego 91,8%, a dla motoneuronów rogów przednich rdzenia kręgowego 113,5% wartości kontrolnej nie miały cech znamienności statystycznej, / $p > 0,05$ /.

Glikoliza w warunkach beztlenowych

Dane liczbowe dotyczące metabolizmu glukozy w warunkach beztlenowych w poszczególnych grupach komórek nerwowych izolowanych z ośrodkowego układu nerwowego zwierząt zatrutych tlenkiem węgla przedstawiono na tabeli 7.

Tab. 7. Glikoliza beztlenowa bezpośrednio po zatruciu tlenkiem węgla.

| Rodzaj neuronu | Grupa zwierząt | n | $\mu\text{l CO}_2 \times 10^{-3}/\text{godz}$ neuron $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | $\mu\text{l CO}_2 \times 10^{-8}/\text{godz}$ μm^3 cytoplazmy $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | p |
|----------------|----------------|---|---|---|----------|
| A | Kontrolna. | 6 | $1,55 \pm 0,28$ | $10,47 \pm 1,89$ | $>0,05$ |
| | Doświadczalna | 5 | $1,74 \pm 0,45$ | $11,76 \pm 3,04$ | |
| P | Kontrolna. | 5 | $5,73 \pm 0,89$ | $12,11 \pm 1,88$ | $<0,01$ |
| | Doświadczalna | 7 | $2,25 \pm 0,48$ | $4,76 \pm 1,01$ | |
| O | Kontrolna. | 7 | $8,69 \pm 0,72$ | $13,01 \pm 1,08$ | $<0,001$ |
| | Doświadczalna | 5 | $1,02 \pm 0,26$ | $1,53 \pm 0,39$ | |
| R | Kontrolna. | 6 | $2,36 \pm 0,43$ | $3,14 \pm 0,57$ | $>0,05$ |
| | Doświadczalna | 5 | $1,70 \pm 0,24$ | $2,26 \pm 0,32$ | |

A - komórki piramidowe kory amonalnej, P - komórki Purkiniego, O - neurony jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego, R - neurony ruchowe rogu przedniego rdzenia kręgowego, $\bar{x} \pm \text{SEM}$ - średnia arytmetyczna \pm średni błąd średniej, p - prawdopodobieństwo w/g testu t Studenta.

Dane przedstawione w tabeli wskazują, że aktywność glikolityczna komórek piramidowych płytki końcowej rogu Amona, bezpośrednio po zatruciu tlenkiem węgla wyrażała się wartościami $1.74 \pm 0.45 \times 10^{-3} \mu\text{l CO}_2/\text{godz}/\text{neuron}$ i $11.76 \pm 3.04 \times 10^{-8} \mu\text{l CO}_2/\text{godz}/\mu\text{m}^3$ cytoplazmy, co stanowiło 112,3% dwutlenku węgla wytworzonego przez te neurony w przypadku zwierząt kontrolnych. Ilość wydzielanego w tych samych warunkach CO_2 przez komórki Purkinjego kory mózdzku wynosiła $2.25 \pm 0.48 \times 10^{-3} \mu\text{l CO}_2/\text{godz}/\text{neuron}$ oraz $4.76 \pm 1.01 \times 10^{-8} \mu\text{l CO}_2/\text{godz}/\mu\text{m}^3$ cytoplazmy. Odpowiadała ona zaledwie 39,3% wartości kontrolnych. Jeszcze wyższy spadek ilości wytwarzanego CO_2 odnotowano w przypadku neuronów jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu. Sięgał on 11,7% wartości kontrolnych, odpowiadając w liczbach bezwzględnych $1.02 \pm 10^{-3} \mu\text{l CO}_2/\text{godz}/\text{neuron}$ i $1.53 \pm 0.39 \times 10^{-8} \mu\text{l CO}_2/\text{godz}/\mu\text{m}^3$ cytoplazmy. Aktywność glikolityczna komórek ruchowych rdzenia kręgowego stanowiła z kolei 73% kontrolnej i wyrażała się ilościowo wytwarzaniem $1.70 \pm 0.24 \times 10^{-3} \mu\text{l CO}_2/\text{godz}/\text{neuron}$ oraz $2.26 \pm 0.32 \times 10^{-8} \mu\text{l CO}_2/\text{godz}/\mu\text{m}^3$ cytoplazmy. Znamienność statystyczna występowała jedynie w przypadku obniżenia aktywności glikolitycznej w komórkach Purkinjego i w neuronach jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego. Pozostałe zmiany nie miały cech znamienności statystycznej.

Aktywność oddechowa izolowanych neuronów w okresie zejścia procesu patologicznego po zatruciu tlenkiem węgla.

Komórki piramidowe płytki końcowej rogu Amona.

Zużycie tlenu w układzie zawierającym askorbinian i cytochrom c.

Dane liczbowe charakteryzujące zużycie tlenu przez komórki rogu Amona w okresie od czasu "0" /moment wyjęcia zwierząt z komory doświadczalnej/ do 240 godz. po zatruciu przedstawiono w tabeli 8.

Tab. 8. Zużycie tlenu przez komórki piramidowe rogu Amona w układzie askorbinian-cytochrom c po zatruciu tlenkiem węgla.

| Grupa zwierząt | n | $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-3} / \text{godz} /$ neuron $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-8} / \text{godz} /$ μm^3 cytoplazmy $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | % aktywności kontrolnej | p |
|--|---|--|--|----------------------------|--------|
| Kontrola | 6 | 12,91 \pm 1,81 | 87,23 \pm 12,23 | 100 | |
| Grupa doświadczalna Czas po zatruciu /godz/ | | | | | |
| 0 | 5 | 5,93 \pm 1,07 | 40,07 \pm 7,23 | 45,9 | <0,05 |
| 2 | 6 | 4,41 \pm 0,25 | 29,80 \pm 1,69 | 34,2 | <0,01 |
| 4 | 6 | 6,11 \pm 0,99 | 41,28 \pm 6,69 | 47,3 | <0,05 |
| 24 | 5 | 5,76 \pm 0,96 | 38,92 \pm 6,94 | 44,6 | <0,01 |
| 48 | 6 | 2,14 \pm 0,98 | 14,46 \pm 6,62 | 16,6 | <0,001 |
| 72 | 5 | 2,23 \pm 0,31 | 15,07 \pm 2,09 | 17,3 | <0,001 |
| 120 | 5 | 5,65 \pm 0,74 | 38,18 \pm 5,00 | 43,8 | <0,01 |
| 240 | 5 | 4,31 \pm 0,50 | 29,12 \pm 3,38 | 33,4 | <0,001 |

$\bar{x} \pm \text{SEM}$ - średnia arytmetyczna \pm średni błąd średniej

n - liczba neuronów

p - prawdopodobieństwo w/g testu t Studenta

Spadek zużycia tlenu w obecności askorbinianu i cytochromu c, występujący bezpośrednio po zatruciu /czas "0"/ przedłużał się na cały okres obserwacji trwający do 10 dnia. Wyrażał się on w 2 godz. 34.2% jego zużycia przez neurony kory amonalnej, izolowane od zwierząt przetrzymywanych w warunkach normoksji, a w 4 i 24 godz. odpowiednio 47.3% i 44.3% tej wartości. W trzecim i piątym dniu po zatruciu ulegał on pogłębieniu do poziomu 16.6% i 17.3% wartości kontrolnych. Mimo nieznacznego wzrostu w dalszych przedziałach czasowych, w 10 dniu po zatruciu ilość zużywanego tlenu przez komórki piramidowe kory Amona wynosząca $4.31 \pm 0.50 \times 10^{-3}$ $\mu\text{l O}_2/\text{godz}/\text{neuron}$ i $29.12 \pm 3.38 \times 10^{-8}$ $\mu\text{l O}_2/\text{godz}/\mu\text{m}^3$ cytoplazmy stanowiła zaledwie 33,4% kontroli. We wszystkich przedziałach czasowych spadek zużycia tlenu miał cechy znamienności statystycznej.

Zużycie tlenu w układzie zawierającym bursztynian.

Dane liczbowe dotyczące zużycia tlenu przez komórki piramidowe rogu Amona w obecności bursztynianu w przedziale czasowym od godz. 0 do 10 dnia po zatruciu przedstawiono w tabeli 9.

Dane przedstawione w tabeli 9, wskazują na istotne zwiększenie zużycia tlenu w obecności bursztynianu we wszystkich przedziałach czasowych obserwacji po zatruciu tlenkiem węgla. W 2 i 4 godz. było ono zbliżone do wartości uzyskanych w tzw. czasie "0", wyznaczającym zakończenie zatrucia i stanowiło odpowiednio 188.2% i 186,3% wartości charakterystycznych dla neuronów pochodzących od zwierząt kontrolnych. Po 24 godz.

Tab. 9. Zużycie tlenu przez komórki piramidowe rogu Amona w układzie zawierającym bursztynian po zatruciu tlenkiem węgla.

| Grupa doświadczalna | n | $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-4} / \text{godz} / \text{neuron}$ $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-9} / \text{godz} / \mu\text{m}^3 \text{ cytoplazmy}$ $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | % aktywności kontrolnej | p |
|-------------------------|---|--|---|-------------------------|---------|
| Kontrola | 5 | 3,14 \pm 0,32 | 21,22 \pm 2,16 | 100 | |
| Grupa doświadczalna | | | | | |
| Czas po zatruciu /godz/ | | | | | |
| 0 | 5 | 5,75 \pm 1,06 | 38,85 \pm 7,16 | 183,1 | < 0,05 |
| 2 | 5 | 5,91 \pm 0,83 | 39,93 \pm 5,61 | 188,2 | < 0,05 |
| 4 | 5 | 5,85 \pm 0,61 | 39,53 \pm 5,61 | 186,3 | < 0,05 |
| 24 | 5 | 8,55 \pm 1,15 | 57,77 \pm 7,77 | 272,2 | < 0,01 |
| 48 | 7 | 13,73 \pm 2,19 | 92,77 \pm 14,80 | 437,2 | < 0,001 |
| 72 | 5 | 9,32 \pm 0,86 | 62,97 \pm 5,81 | 296,8 | < 0,001 |
| 120 | 7 | 9,92 \pm 1,14 | 67,03 \pm 7,70 | 315,9 | < 0,01 |
| 240 | 5 | 8,08 \pm 1,20 | 54,59 \pm 8,11 | 257,3 | < 0,01 |

$\bar{x} \pm \text{SEM}$ - średnia arytmetyczna \pm średni błąd średniej

n - liczba neuronów

p - prawdopodobieństwo w/g testu T Studenta

obserwowało się dalszy przyrost konsumpcji tlenu sięgający 272.2% kontroli. Najwyższe zużycie tlenu w tym układzie występowało w 48 godz. po zatruciu, osiągając 437,2% wartości typowej dla zwierząt z grupy kontrolnej. Dalsze przedziały czasowe przyniosły obniżanie się zużycia tlenu, jednakże nawet po upływie 10 dni odpowiadało ono 257.3% kontroli. Wszystkie stwierdzone odchylenia od normy w zużyciu tlenu miały cechy znamienności statystycznej.

Glikoliza w warunkach beztlenowych. Dane liczbowe charakteryzujące przemiany glikolityczne w warunkach beztlenowych komórek piramidowych rogu Amona do 10 dnia po zatruciu tlenkiem węgla przedstawiono w tabeli 10.

Tab. 10. Aktywność glikolityczna w warunkach beztlenowych komórek piramidowych rogu Amona po zatruciu tlenkiem węgla.

| Grupa zwierząt | n | $\mu\text{l CO}_2 \times 10^{-3} / \text{godz} /$ neuron $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | $\mu\text{l CO}_2 \times 10^{-8} / \text{godz}$ μm^3 cytoplazmy $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | % aktywności kon- trolnej | p |
|---|---|---|---|---------------------------------|---------|
| Kontrola | 6 | 1,55 \pm 0,28 | 10,47 \pm 1,89 | 100 | |
| Grupa doświadczalna Czas po zatruciu /godz/ | | | | | |
| 0 | 5 | 1,74 \pm 0,45 | 11,76 \pm 3,04 | 112,3 | $>0,05$ |
| 2 | 6 | 1,82 \pm 0,39 | 12,30 \pm 2,64 | 117,5 | $>0,05$ |
| 4 | 5 | 2,59 \pm 0,54 | 17,50 \pm 3,65 | 167,1 | $>0,05$ |
| 24 | 5 | 2,55 \pm 0,60 | 17,23 \pm 4,05 | 164,6 | $>0,05$ |
| 48 | 5 | 2,56 \pm 0,60 | 17,30 \pm 4,05 | 165,2 | $>0,05$ |
| 72 | 5 | 3,01 \pm 0,67 | 20,34 \pm 4,53 | 194,3 | $>0,05$ |
| 120 | 9 | 3,61 \pm 0,70 | 24,40 \pm 4,73 | 233,2 | $<0,05$ |
| 240 | 5 | 1,54 \pm 0,25 | 10,41 \pm 1,69 | 99,4 | $>0,05$ |

\bar{x} - \pm SEM - średnia arytmetyczna \pm średni błąd średniej

n - liczba neuronów

p - prawdopodobieństwo w/g testu t Studenta

Uzyskane dane wskazują, że począwszy od zakończenia zatrucia /czas "0"/ aż do 120 godz. po zatruciu aktywność glikolityczna w komórkach piramidowych rogu Amona wykazywała postępującą tendencję do narastania, mimo to, że jej wartości nie wykazywały cech znamienności statystycznej w stosunku do kontroli. Wzrost aktywności glikolitycznej w 120 godz. po zatruciu, osiągający poziom 233,2% do wartości kontrolnej miał cechy znamienności statystycznej. Na zakończenie obserwacji, w 10 dniu po zatruciu aktywność glikolityczna powracała do poziomu charakterystycznego dla komórek nerwowych kory amonalnej zwierząt niezatrutowanych.

Komórki Purkinjego kory mózdzku

Zużycie tlenu w układzie zawierającym askorbinian i cytochrom c.

Dane liczbowe charakteryzujące zużycie tlenu przez komórki Purkinjego w okresie do 120 godz. po zatruciu przedstawiono w tabeli 11.

Tab. 11. Zużycie tlenu przez komórki Purkinjego w układzie zawierającym askorbinian i cytochrom c po zatruciu tlenkiem węgla.

| Grupa zwierząt | n | $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-3} / \text{godz} /$ neuron $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-8} / \text{godz} /$ μm^3 cytoplazmy $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | % aktywności kontrolnej | p |
|-------------------------|---|--|--|-------------------------------|---------|
| Kontrola | 7 | 13,50 \pm 1,96 | 28,54 \pm 4,14 | 100 | |
| Grupa doświadczalna | | | | | |
| Czas po zatruciu /godz/ | | | | | |
| 0 | 5 | 4,49 \pm 1,07 | 9,49 \pm 2,26 | 33,3 | < 0,01 |
| 2 | 5 | 4,70 \pm 0,60 | 9,94 \pm 1,27 | 34,8 | < 0,01 |
| 4 | 5 | 2,79 \pm 0,20 | 5,90 \pm 0,42 | 20,7 | < 0,001 |
| 24 | 5 | 7,57 \pm 0,86 | 16,00 \pm 1,82 | 56,1 | < 0,001 |
| 48 | 5 | 6,70 \pm 0,77 | 14,16 \pm 1,63 | 49,6 | < 0,05 |
| 72 | 5 | 7,13 \pm 0,61 | 15,07 \pm 1,29 | 52,8 | < 0,05 |
| 120 | 5 | 9,46 \pm 0,93 | 20,00 \pm 1,97 | 70,1 | > 0,05 |

$\bar{x} \pm \text{SEM}$ - średnia arytmetyczna \pm średni błąd średniej

n - liczba neuronów

p - prawdopodobieństwo w/g testu t Studenta

Spadek zużycia tlenu zaobserwowany bezpośrednio po zatruciu utrzymywał się na tym samym poziomie w 2 godz. od zakończenia doświadczenia, wyrażając się wartością 34,8% kontroli. Był on najgłębszy w 4 godz. po zatruciu, gdy zużycie tlenu spadało do 20,7% wartości kontrolnych. Od tego czasu obserwowano się stopniowy wzrost konsumpcji tlenu, kształtujący się do 72 godz. na poziomie około 50% ilości charakterystycznej dla komórek Purkiniego izolowanych z mózdzku zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym. Zmiany w oddychaniu neuronów do 72 godz. po zatruciu miały cechy znamienności statystycznej. W 120 godz. po zatruciu obserwowano dalsze zwiększenie zużycia tlenu, stanowiące 70,1% wartości kontrolnej. W tym czasie oddychanie komórek pochodzących od zwierząt zatrutych nie różniło się w sposób statystycznie znamienny od komórek izolowanych z mózgowia zwierząt przebywających w warunkach normoksji.

Zużycie tlenu w układzie zawierającym bursztynian. Dane liczbowe charakteryzujące zużycie tlenu przez komórki Purkiniego w okresie od 0 do 120 godz. przedstawiono w tabeli 12.

Komórki Purkiniego pobierane z mózdzku zwierząt doświadczalnych we wczesnym okresie po zatruciu wykazywały wahania w zużyciu tlenu. Stwierdzone w tym czasie zaburzenia, wyrażające się w czasie 0 i w 2 godz. wzrostem jego zużycia do poziomu 133,8% i 136,5% wartości kontrolnej, oraz jego obniżeniu do 75% w 4 godz., nie miały cech znamienności statystycznej. W dalszych przedziałach czasowych, a mianowicie w 24, 72 i 120 godz. po zakończeniu zatrutowania aktywność oddechowa komórek Purkiniego

zbliżała się do wartości charakteryzujących oddychanie w obecności bursztynianu neuroony pochodzące od zwierząt nie poddanych zabiegom doświadczalnym.

Tab. 12. Zużycie tlenu przez komórki Purkiniego w układzie zawierającym bursztynian po zatruciu tlenkiem węgla.

| Grupa zwierząt | n | $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-4} /$ godz/neuron $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-9} /$ godz/ μm^3 cytoplazmy $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | % aktywno- ści kon- trolnej | p |
|-------------------------|---|---|---|--------------------------------------|--------|
| Kontrolna | 5 | $6,29 \pm 0,96$ | $13,30 \pm 2,03$ | 100 | |
| Grupa doświadczalna | | | | | |
| Czas po zatruciu /godz/ | | | | | |
| 0 | 6 | $8,42 \pm 0,64$ | $17,80 \pm 1,35$ | 133,8 | > 0,05 |
| 2 | 5 | $8,59 \pm 1,38$ | $18,16 \pm 2,92$ | 136,5 | > 0,05 |
| 4 | 5 | $4,72 \pm 0,45$ | $9,98 \pm 0,95$ | 75,0 | > 0,05 |
| 24 | 6 | $6,10 \pm 0,81$ | $12,90 \pm 1,71$ | 97,0 | > 0,05 |
| 72 | 5 | $6,87 \pm 0,72$ | $14,52 \pm 1,52$ | 109,2 | > 0,05 |
| 120 | 6 | $6,68 \pm 0,69$ | $14,12 \pm 1,46$ | 106,2 | > 0,05 |

$\bar{x} \pm \text{SEM}$ - średnia arytmetyczna \pm średni błąd średniej

n - liczba neuronów

p - prawdopodobieństwo w/g testu t Studenta

Glikoliza w warunkach beztlenowych. Dane liczbowe charakteryzujące aktywność glikolityczną komórek Purkiniego w poszczególnych przedziałach czasowych do 120 godz. po zatruciu przedstawiono w tabeli 13.

Tab. 13. Aktywność glikolityczna komórek Purkiniego po zatruciu tlenkiem węgla.

| Grupa zwierząt | n | $\mu\text{l CO}_2 \times 10^{-3} /$ godz/neuron $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | $\mu\text{l CO}_2 \times 10^{-8} /$ godz/ μm^3 cytoplazmy $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | % aktywno- ści kon- trolnej | p |
|---|---|--|--|--------------------------------------|--------|
| Kontrolna | 5 | 5,73 \pm 0,89 | 12,11 \pm 1,88 | 100 | |
| Grupa doświadczalna czas po zatruciu godz/ | | | | | |
| 0 | 7 | 2,25 \pm 0,48 | 4,76 \pm 1,01 | 39,3 | < 0,01 |
| 2 | 7 | 2,51 \pm 0,52 | 5,31 \pm 1,10 | 43,9 | < 0,01 |
| 4 | 5 | 3,07 \pm 0,39 | 6,49 \pm 0,82 | 53,6 | < 0,05 |
| 24 | 5 | 3,05 \pm 0,54 | 6,45 \pm 1,14 | 53,3 | < 0,05 |
| 48 | 6 | 3,30 \pm 0,96 | 6,98 \pm 2,03 | 57,4 | > 0,05 |
| 72 | 5 | 4,28 \pm 0,39 | 9,05 \pm 0,82 | 74,7 | > 0,05 |
| 120 | 8 | 5,35 \pm 0,81 | 11,31 \pm 1,71 | 93,4 | > 0,05 |

$\bar{x} \pm \text{SEM}$ - średnia arytmetyczna \pm średni błąd średniej

n - liczba neuronów

p - prawdopodobieństwo w/g testu t Studenta

Aktywność glikolityczna komórek Purkiniego obniżona bezpośrednio po zatruciu do poziomu 39,3% wartości kontrolnych, w dalszych przedziałach czasowych podwyższała się stopniowo, osiągając w 120 godz. wartości zbliżone do właściwych dla komórek izolowanych z mózdzku zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym. Obniżenie ilości wytwarzanego dwutlenku węgla w grupach 2-24 godzinnych miało cechy znamienności statystycznej w stosunku do kontroli. Wartości uzyskane w 48 i 72 godz., jakkolwiek niższe od kontrolnych, nie różniły

się od nich w sposób statystycznie istotny.

Neurony jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu

Zużycie tlenu w układzie askorbinian-cytochrom c.

Tabela 14 zawiera dane liczbowe charakteryzujące zużycie tlenu w obecności askorbinianu i cytochromu c przez komórki nerwowe jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu w okresie do 72 godz. po zatruciu tlenkiem węgla.

Tab. 14. Zużycie tlenu w układzie zawierającym askorbinian i cytochrom c przez komórki nerwowe jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu po zatruciu tlenkiem węgla.

| Grupa zwierząt | n | $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-3} / \text{godz}/\text{neuron}$ $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-8} / \text{godz}/\mu\text{m}^3$ cytoplazmy $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | % aktywności kontrolnej | p |
|--|----|--|--|-------------------------------|---------|
| kontrolna | 10 | 18,06 \pm 1,81 | 27,04 \pm 2,71 | 100 | |
| Grupa świdralna czas po zatruciu godz/ | | | | | |
| 0 | 5 | 3,90 \pm 1,57 | 5,84 \pm 2,35 | 21,6 | < 0,001 |
| 2 | 5 | 4,31 \pm 1,36 | 6,45 \pm 2,04 | 23,9 | < 0,001 |
| 4 | 5 | 8,97 \pm 3,36 | 13,43 \pm 5,03 | 49,7 | < 0,05 |
| 24 | 8 | 10,14 \pm 1,00 | 15,18 \pm 1,50 | 56,1 | < 0,001 |
| 48 | 5 | 10,99 \pm 2,61 | 16,45 \pm 3,91 | 60,8 | < 0,05 |
| 72 | 5 | 15,31 \pm 1,99 | 22,92 \pm 2,98 | 84,8 | > 0,05 |

$\bar{x} \pm \text{SEM}$ - średnia arytmetyczna \pm średni błąd średniej

n - liczba neuronów

p - prawdopodobieństwo w/g testu t Studenta

Zużycie tlenu obniżone do poziomu 21.6% wartości kontrolnej bezpośrednio po zatruciu, w kolejnych przedziałach czasowych podwyższało się, osiągając w 72 godz. poziom odpowiadający 84.8 kontroli, nie różniący się od niej w sposób statystycznie znamienne. Zużycie tlenu w 2 godz. po zatruciu nie różniło się praktycznie od stwierdzonego w momencie wyjęcia zwierząt z atmosfery tlenku węgla. Wartości zużycia tlenu stwierdzone w 4, 24, 48 godz. po zatruciu, wynoszące odpowiednio 49,7%, 56,1%, 60,8% kontroli, różniły się od niej w sposób statystycznie istotny.

Zużycie tlenu w układzie zawierającym bursztynian. Dane
liczbowe charakteryzujące oddychanie neuronów jądra olbrzymio-
komórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu w obecności burszty-
nianu w poszczególnych przedziałach czasowych do 120 godz. po
zatruciu przedstawiono w tabeli 15.

W żadnym z przedziałów czasowych po zatruciu nie stwierdzono statystycznie znamienych różnic w zużyciu tlenu w obecności bursztynianu w stosunku do poziomu kontrolnego, charakteryzującego neurony jądra olbrzymio-
komórkowego tworzącego siatkowatego pochodzące od zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym. Jedynie w 24 i 72 godz. po zatruciu zaznaczył się spadek zużycia tlenu do poziomu 74.5% i 61.8% wartości kontrolnych, nie miał on jednak cech znamienności statystycznej

Tab. 15. Zużycie tlenu przez komórki nerwowe jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu w układzie zawierającym bursztynian po zatruciu tlenkiem węgla.

| Grupa zwierząt | n | $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-4}$ godz/neuron $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-9}$ / godz/ μm^3 cytoplazmy $x \pm \text{SEM}$ | % aktywności kontrolnej | p |
|---------------------|---|---|---|-------------------------------|-------|
| Kontrola | 5 | 5,94 \pm 1,36 | 8,89 \pm 2,04 | 100 | |
| Grupa doświadczalna | | | | | |
| Czas po zatruciu | | | | | |
| /godz/ | | | | | |
| 0 | 6 | 5,45 \pm 0,35 | 8,16 \pm 0,52 | 91,8 | >0,05 |
| 2 | 6 | 6,33 \pm 0,72 | 9,48 \pm 1,08 | 106,6 | >0,05 |
| 4 | 7 | 5,64 \pm 0,43 | 8,44 \pm 0,64 | 94,9 | >0,05 |
| 24 | 7 | 4,42 \pm 0,25 | 6,62 \pm 0,37 | 74,5 | >0,05 |
| 48 | 6 | 3,67 \pm 0,47 | 5,49 \pm 0,70 | 61,8 | >0,05 |
| 72 | 5 | 6,15 \pm 0,76 | 9,21 \pm 1,14 | 103,6 | >0,05 |
| 120 | 6 | 5,32 \pm 0,39 | 7,96 \pm 0,58 | 89,5 | >0,05 |

$\bar{x} \pm \text{SEM}$ - średnia arytmetyczna \pm średni błąd średniej

n - liczba neuronów

p - prawdopodobieństwo w/g testu t Studenta

Glikoliza w warunkach beztlenowych. Wartości charakteryzujące metabolizm glukozy w warunkach beztlenowych w komórkach nerwowych jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego w poszczególnych przedziałach czasowych do 120 godz. po zatruciu zestawiono w tabeli 16.

Tab. 16. Aktywność glikolityczna w warunkach beztlenowych komórek nerwowych jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu po zatruciu tlenkiem węgla.

| Grupa zwierząt | n | $\mu\text{l CO}_2 \times 10^{-3} / \text{godz}/\text{neuron}$ $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | $\mu\text{l CO}_2 \times 10^{-8} / \text{godz}/\mu\text{m}^3$ cytoplazmy $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | % aktywności kontrolnej | p |
|--|---|---|---|-------------------------|---------|
| Kontrola | 7 | 8,69 \pm 0,72 | 13,01 \pm 1,08 | 100 | |
| Grupa doświadczalna Czas po zatruciu /godz/ | | | | | |
| 0 | 5 | 1,02 \pm 0,26 | 1,53 \pm 0,39 | 11,8 | < 0,001 |
| 2 | 5 | 5,02 \pm 0,38 | 3,02 \pm 0,57 | 23,2 | < 0,001 |
| 4 | 6 | 1,53 \pm 0,38 | 2,29 \pm 0,57 | 17,6 | < 0,001 |
| 24 | 5 | 2,27 \pm 0,29 | 3,40 \pm 0,43 | 26,1 | < 0,001 |
| 48 | 6 | 2,60 \pm 0,36 | 3,89 \pm 0,54 | 29,9 | < 0,001 |
| 72 | 5 | 2,57 \pm 0,35 | 3,85 \pm 0,52 | 29,6 | < 0,001 |
| 120 | 5 | 5,67 \pm 0,81 | 8,49 \pm 1,21 | 65,3 | > 0,05 |

$\bar{x} \pm \text{SEM}$ - średnia arytmetyczna \pm średni błąd średniej

n - liczba neuronów

p - prawdopodobieństwo w/g testu t Studenta

Zahamowanie aktywności glikolitycznej neuronów jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu, stwierdzone bezpośrednio po zatruciu utrzymywało się na poziomie statystycznej znamienności do 72 godz. Najniższe wytwarzanie dwutlenku węgla występujące w czasie "0" /11.8% kontroli/ wzrastało w kolejnych przedziałach czasowych osiągając w 120 godz. po zatruciu poziom 65,3% wartości kontrolnych, który aczkolwiek niższy nie różnił się od nich w sposób statystycznie znamienny.

Neurony ruchowe rogu przedniego rdzenia kręgowego

Zużycie tlenu w układzie askorbinian-cytochrom c.

Wyniki charakteryzują zużycie tlenu w obecności askorbinianu i cytochromu c przez motoneurony rdzenia kręgowego w poszczególnych przedziałach czasowych do 72 godz. po zatruciu tlenkiem węgla zestawiono w tabeli 17.

Zużycie tlenu w obecności askorbinianu, obniżone bezpośrednio po zatruciu do poziomu 31.4% wartości kontrolnych, wzrastało w 1 godz. do 64.3%, będąc nadal znamienne niższe niż w motoneuronach rdzenia kręgowego zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym. W 2 godz. po zatruciu wzrastało ono znamienne do poziomu 146,2% kontroli, by w 3 godz. i w dalszych osiągnąć poziom nie odbiegający od niej w sposób statystycznie istotny.

Tab. 17. Zużycie tlenu przez komórki ruchowe rogów przednich rdzenia kręgowego w układzie zawierającym akсорbinian i cytochrom c po zatruciu tlenkiem węgla.

| Grupa zwierząt | n | $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-3} / \text{godz}/\text{neuron}$ $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-3} / \text{godz}/\mu\text{m}^3$ cytoplazmy $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | % aktywności kontrolnej | p |
|---|---|--|--|-------------------------------|-------|
| kontrola | 5 | 6,47 \pm 1,81 | 8,60 \pm 2,41 | 100 | |
| Grupa świadczyma czas po zatruciu (godz/) | | | | | |
| 0 | 5 | 2,03 \pm 0,21 | 2,70 \pm 0,28 | 31,4 | <0,01 |
| 1 | 5 | 4,16 \pm 0,72 | 5,53 \pm 0,96 | 64,3 | <0,05 |
| 2 | 8 | 9,45 \pm 0,75 | 12,57 \pm 1,00 | 146,2 | <0,05 |
| 3 | 5 | 5,62 \pm 0,84 | 7,47 \pm 1,12 | 86,9 | >0,05 |
| 4 | 5 | 5,47 \pm 0,29 | 7,27 \pm 0,39 | 84,5 | >0,05 |
| 4 | 5 | 5,35 \pm 0,84 | 7,11 \pm 1,12 | 82,7 | >0,05 |
| 8 | 5 | 6,49 \pm 0,25 | 8,63 \pm 0,33 | 100,4 | >0,05 |
| 2 | 5 | 5,07 \pm 0,55 | 6,74 \pm 0,73 | 78,4 | >0,05 |

$\bar{x} \pm \text{SEM}$ - średnia arytmetyczna \pm średni błąd średniej

n - liczba neuronów

p - prawdopodobieństwo w/g testu t Studenta

Zużycie tlenu w układzie zawierającym bursztynian. Charakterystykę liczbową oddychania komórek ruchowych rdzenia kręgowego w obecności bursztynianu w poszczególnych przedziałach czasowych do 72 godz. po zatruciu zawiera tabela 18.

Aktywność oddechowa w obecności bursztynianu komórek ruchowych rdzenia kręgowego do 3 godz. po zatruciu nie różniła się w sposób statystycznie znamieny od charakterystycznej dla tych samych neuronów pochodzących do zwierząt grupy kontrolnej. Od 4 do 48 godz. wzrastała ona znamiennie do wartości 270,1%, 214,2% i 201,9% kontroli, by w 72 godz. powrócić do poziomu zbliżonego do normy.

Tab. 18. Zużycie tlenu przez komórki ruchowe rogów przednich rdzenia kręgowego w układzie zawierającym bursztynian, po zatruciu tlenkiem węgla.

| Grupa zwierząt | n | $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-4} / \text{godz}/\text{neuron}$ $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-9} / \text{godz}/\mu\text{m}^3$ cytoplazmy $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | % aktywności kontrolnej | p |
|---|---|--|--|-------------------------------|----------|
| Kontrola | 5 | 4,07 \pm 0,68 | 5,41 \pm 0,90 | 100 | |
| Grupa doświadczalna Czas po zatruciu /godz/ | | | | | |
| 0 | 5 | 4,62 \pm 1,04 | 6,14 \pm 1,38 | 113,5 | $> 0,05$ |
| 1 | 6 | 4,94 \pm 0,28 | 6,57 \pm 0,37 | 121,4 | $> 0,05$ |
| 2 | 5 | 4,01 \pm 0,55 | 5,33 \pm 0,73 | 98,5 | $> 0,05$ |
| 3 | 5 | 5,35 \pm 1,02 | 7,11 \pm 1,36 | 131,4 | $> 0,05$ |
| 4 | 5 | 10,99 \pm 2,11 | 14,61 \pm 2,81 | 270,1 | $< 0,01$ |
| 24 | 5 | 9,81 \pm 2,36 | 13,05 \pm 4,14 | 214,2 | $< 0,01$ |
| 48 | 6 | 8,21 \pm 0,82 | 10,92 \pm 1,09 | 201,9 | $< 0,01$ |
| 72 | 5 | 5,17 \pm 0,63 | 6,88 \pm 0,84 | 127,2 | $> 0,05$ |

$\bar{x} \pm$ - SEM - średnia arytmetyczna \pm średni błąd średniej

n - liczba neuronów

p - prawdopodobieństwo w/g testu t Studenta

Glikoliza w warunkach beztlenowych. Metabolizm glukozy w warunkach beztlenowych komórek ruchowych rdzenia kręgowego w poszczególnych przedziałach czasowych do 72 godz. po zatruciu charakteryzują dane liczbowe zawarte w tabeli 19.

Tab. 19. Aktywność glikolityczna neuronów ruchowych rdzenia kręgowego po zatruciu tlenkiem węgla.

| Grupa zwierząt | n | $\mu\text{l CO}_2 \times 10^{-3} /$ godz/neuron $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | $\mu\text{l CO}_2 \times 10^{-8} /$ godz/ μm^3 cytoplazmy $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | % aktywności kontrolnej | p |
|---|---|--|--|-------------------------------|----------|
| Kontrola | 6 | 2,36 \pm 0,43 | 3,14 \pm 0,57 | 100 | |
| Grupa doświadczalna Czas po zatruciu /godz/ | | | | | |
| 0 | 5 | 1,70 \pm 0,24 | 2,26 \pm 0,32 | 72,0 | $> 0,05$ |
| 1 | 6 | 1,52 \pm 0,28 | 2,02 \pm 0,37 | 64,3 | $> 0,05$ |
| 2 | 5 | 1,30 \pm 0,31 | 1,73 \pm 0,41 | 55,1 | $> 0,05$ |
| 3 | 5 | 1,49 \pm 0,35 | 1,98 \pm 0,47 | 63,1 | $> 0,05$ |
| 4 | 5 | 1,40 \pm 0,26 | 1,86 \pm 0,35 | 59,2 | $> 0,05$ |
| 24 | 5 | 1,44 \pm 0,19 | 1,91 \pm 0,25 | 60,8 | $> 0,05$ |
| 48 | 6 | 1,81 \pm 0,28 | 2,41 \pm 0,37 | 76,6 | $> 0,05$ |
| 72 | 5 | 2,19 \pm 0,35 | 2,91 \pm 0,47 | 92,7 | $> 0,05$ |

$\bar{x} \pm \text{SEM}$ - średnia arytmetyczna \pm średni błąd średniej

n - liczba neuronów

p - prawdopodobieństwo w/g testu t Studenta

Aktywność glikolityczna komórek ruchowych rdzenia kręgowego poczynając od czasu "0" aż do 48 godz. po zatruciu wykazywała tendencję do obniżenia, jakkolwiek wartości wytworzonego dwutlenku węgla w żadnym przedziale czasowym nie wykazywały

statystycznie znamiennej różnicy w stosunku do kontrolnych. Największe zahamowanie aktywności glikolitycznej odnotowano w 2 godz. po zatruciu - ilość wytworzonego CO_2 odpowiadała 55,1% kontrolnej, Wyniki uzyskane w 72 godz. kształtowały się na poziomie 92% wartości kontrolnych.

OBRAZ MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWY

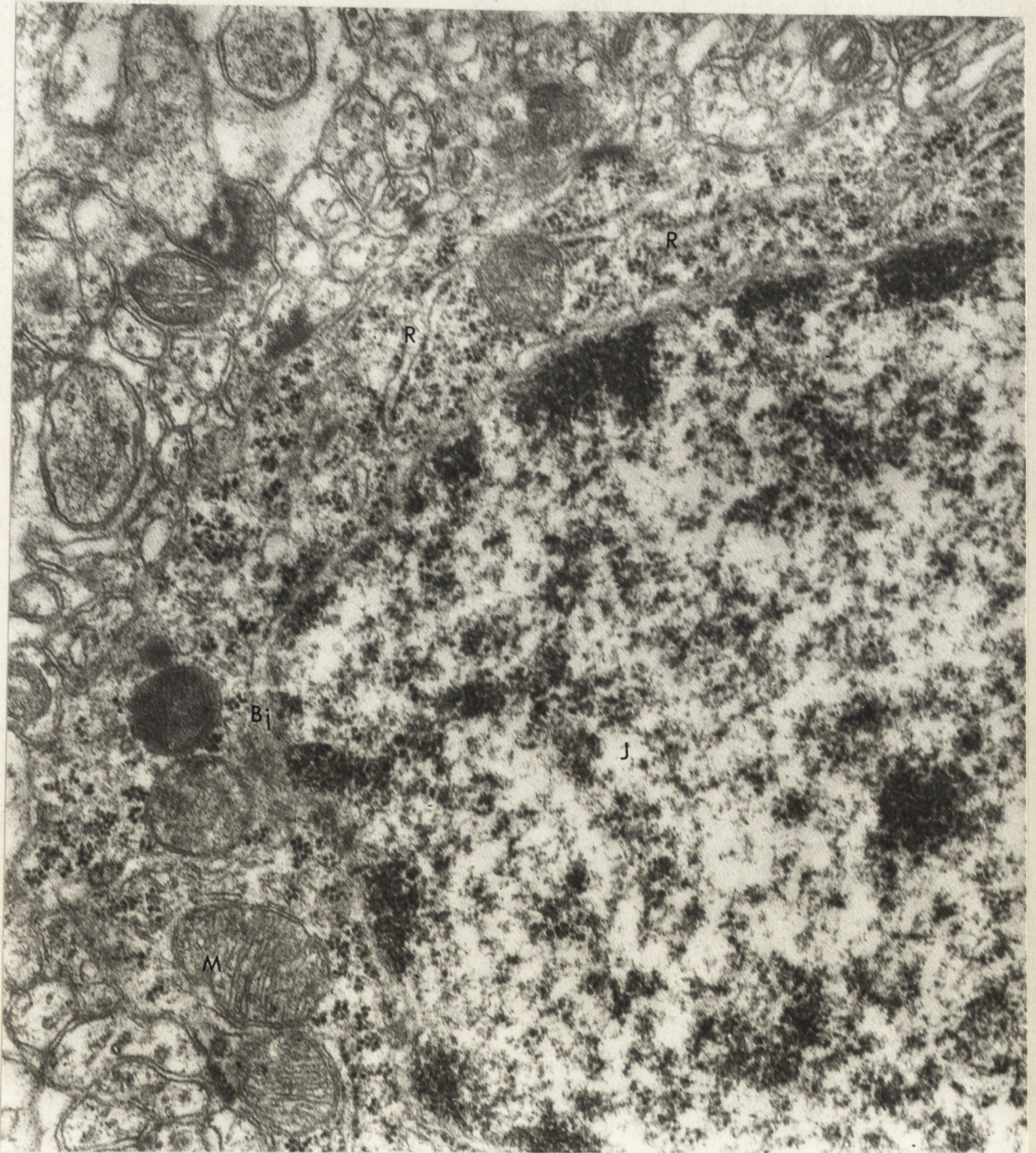
Obraz mikroskopowo-elektronowy poszczególnych ugrupowań komórek nerwowych oceniany w tych samych przedziałach czasowych po zatruciu tlenkiem węgla, co badanie aktywności oddechowej wykazywał zróżnicowanie w swoim natężeniu i rozległości nieprawidłowości strukturalnych.

Najmniej nasilone w stosunku do normy /Ryc. 16/ zmiany spostrzegano w komórkach ruchowych rogów przednich rdzenia kręgowego. W 4 godz. po zatruciu tylko w nielicznych spośród nich występowało niewielkiego stopnia poszerzenie kanałów szorstkiej siatki śródplazmatycznej i zespołów Golgiego. Pojedyncze mitochondria wykazywały cechy obrzmienia, wyrażające się skróceniem się grzebieni i przejaśnieniem macierzy. W pozostałych przedziałach czasowych obraz mikroskopowo-elektronowy struktur subkomórkowych perikarionów neuronów ruchowych rdzenia nie odbiegał zasadniczo od stwierdzonego u zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym.

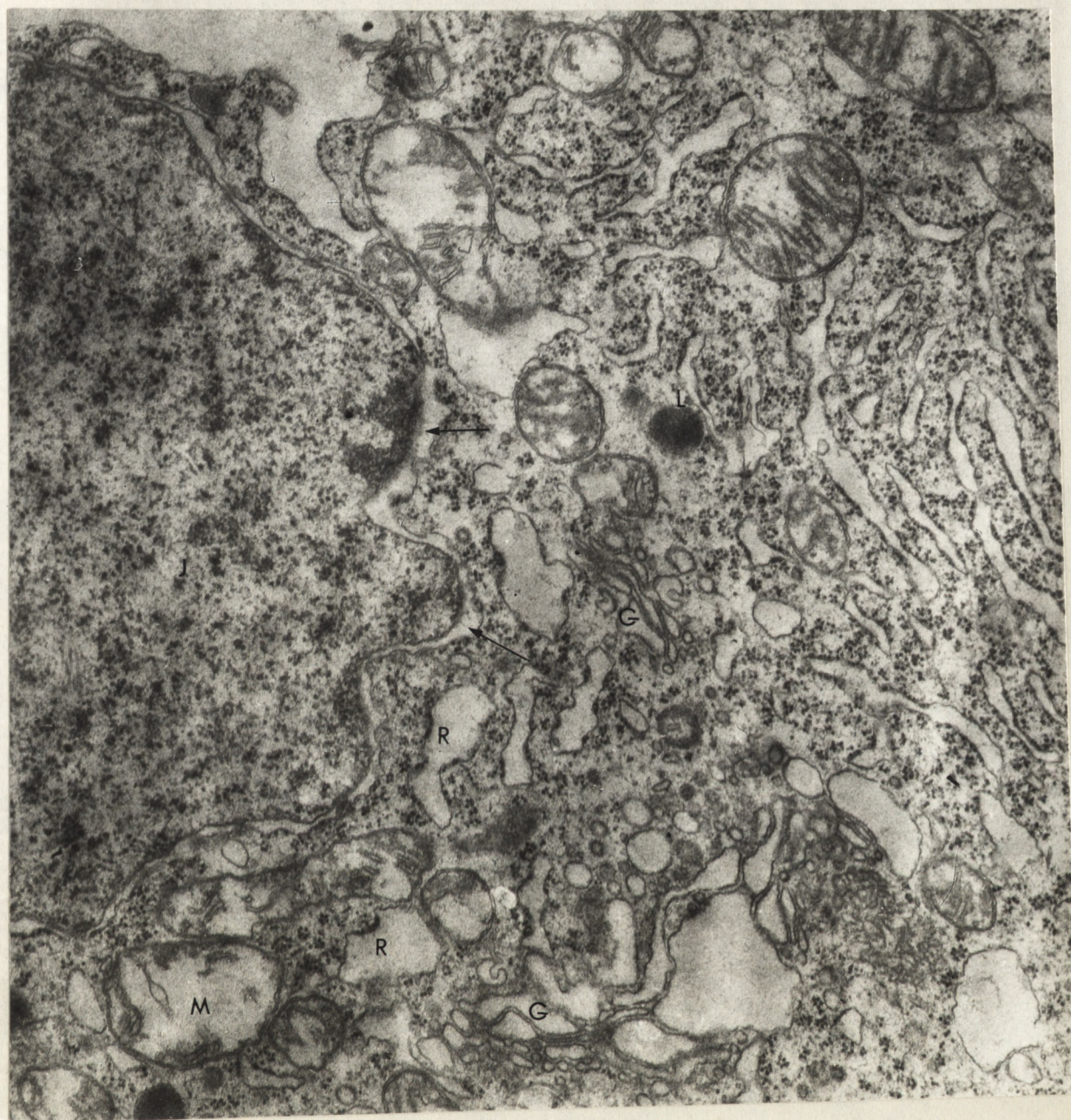
Nieprawidłowości strukturalne w komórkach Purkiniego i w neuronach jądra olbrzymiokomórkowego tworzą siatkowatego pnia mózgu miały podobny charakter i były bardziej nasilone niż w motoneuronach rdzenia kręgowego oraz utrzymywały się

przez dłuższy okres czasu po zatruciu, W 4 godz. występowało bardzo znaczne poszerzenie kanałów szorstkiej siatki śródplazmatycznej i zbiorników aparatu Golgiego. Większość mitochondriów wykazywała cechy zaawansowanego obrzmienia, wyrażającego się znacznym uszkodzeniem grzebieni i przejaśnieniem macierzy. W licznych komórkach stwierdzono poszerzenie przestrzeni okołojądrowej, zawartej między wewnętrzną i zewnętrzną błoną otoczki jądrowej /Ryc. 17/. Po 48 godz. od zatrucia w obu grupach neuronów, przy prawidłowym obrazie siatki śródplazmatycznej i większości zespołów Golgiego utrzymywało się nadal zaawansowane obrzmienie mitochondriów. W niektórych neuronach, zwłaszcza komórkach Purkinjego stwierdzono nieregularne rozrzedzenia i zagęszczenia szorstkiej siatki śródplazmatycznej i wolnych rybozomów /Ryc. 18/. W 72 i 120 godz. po zatruciu następowała normalizacja obrazu mikroskopowo-elektrowego obu grup komórek nerwowych. Najgłębsze zmiany strukturalne stwierdzono w komórkach piramidowych płytki końcowej rogu Amona. Po 4 godz. od zatrucia we wszystkich neuronach występowało bardzo znaczne obrzmienie mitochondriów, poszerzenie zbiorników aparatu Golgiego oraz kanałów szorstkiej siatki śródplazmatycznej /Ryc. 19/. W licznych komórkach obserwowano zubożenie szorstkiej siatki śródplazmatycznej i wolnych rybozomów. Nieprawidłowości te pogłębiały się w dalszych przedziałach czasowych po zatruciu. W grupie czasowej po 48, 72, 120 i 240 godz. od zatrucia

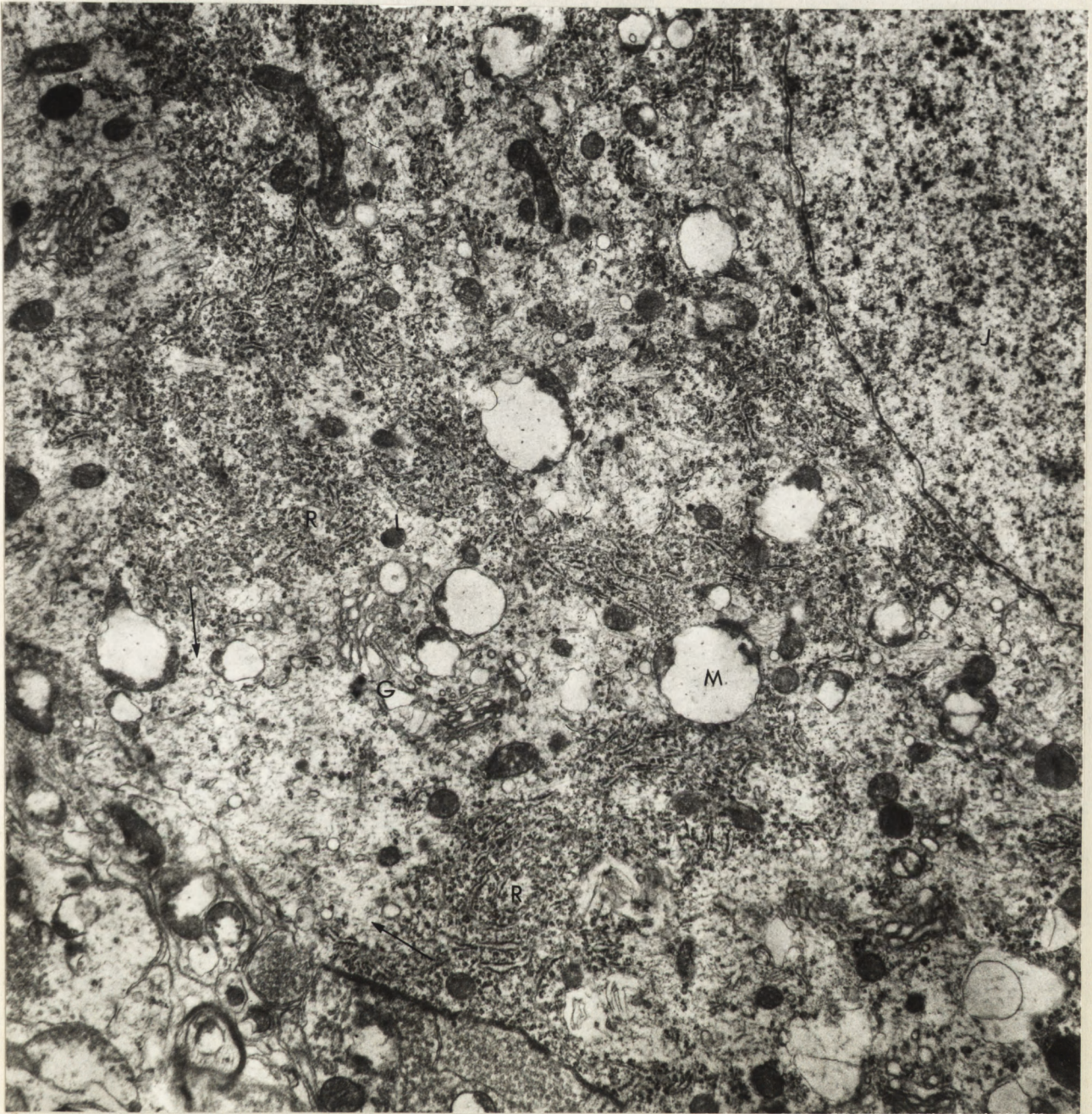
w licznych neuronach obecne były cechy ich dezintegracji strukturalnej. Stwierdzono zubożenie ziarnistości chromatynej i jej nieregularne rozmieszczenie w karioplazmie. Zarysy osłonki jądrowej były nieostre. W cytoplazmie występowało zmniejszenie liczby mitochondriów, a zachowane wykazywały cechy zaawansowanego obrzmienia, Kanały i zbiorniki zubożonej siatki śródplazmatycznej były poszerzone. Ilość rybozomów zarówno związanych z siatką śródplazmatyczną jak i wolnych była zmniejszona. Zbiorniki i kanały aparatu Golgiego były bardzo znacznie poszerzone /Ryc. 20/.



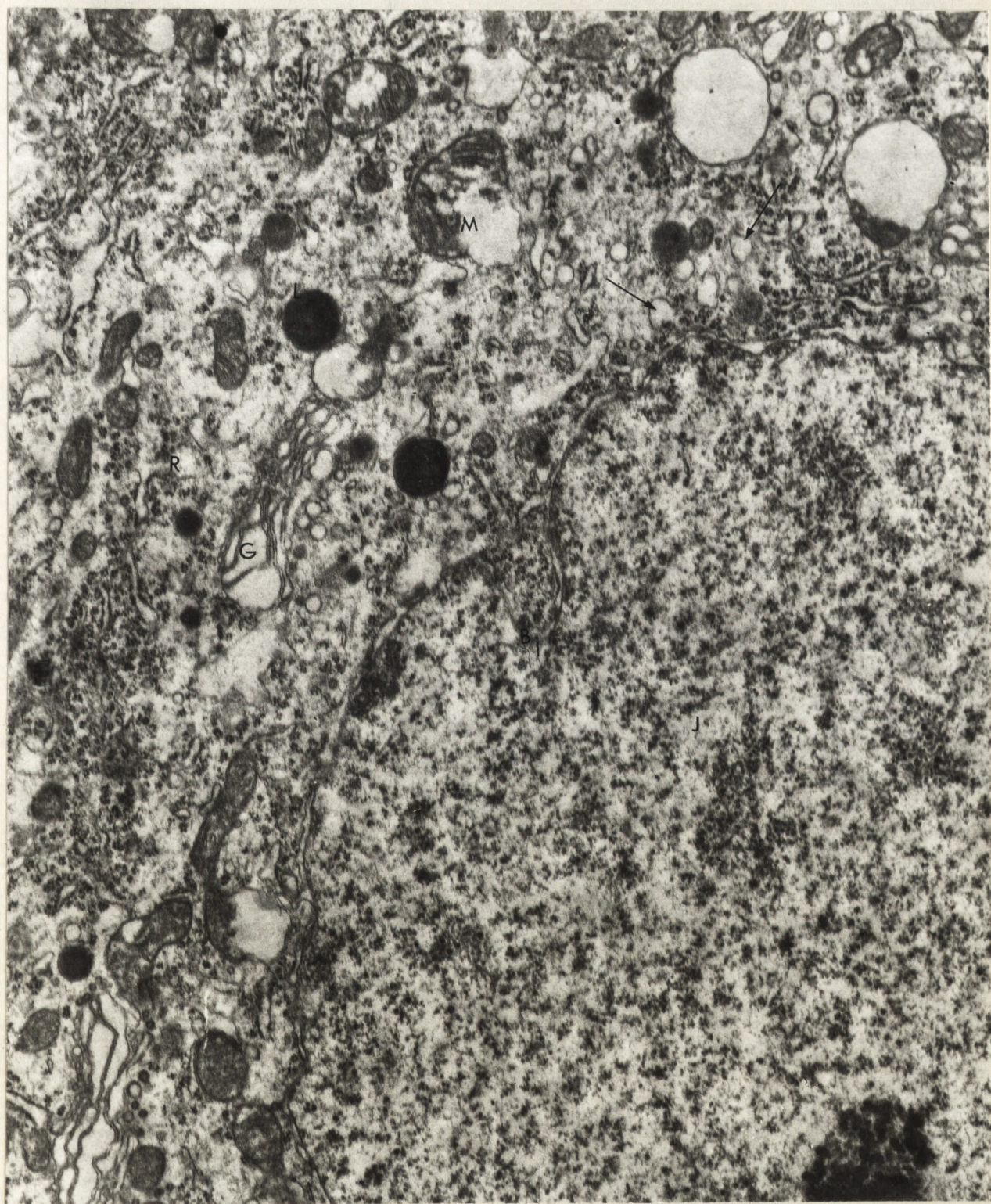
Ryc.16. Prawidłowy obraz mikroskopowo-elektronowy komórki ruchowej rogu przedniego rdzenia kręgowego. J- jądro, Bj - błona jądrowa, M - mitochondria, R - szorstka siatka śródplazmatyczna.
Pow. 4900 x



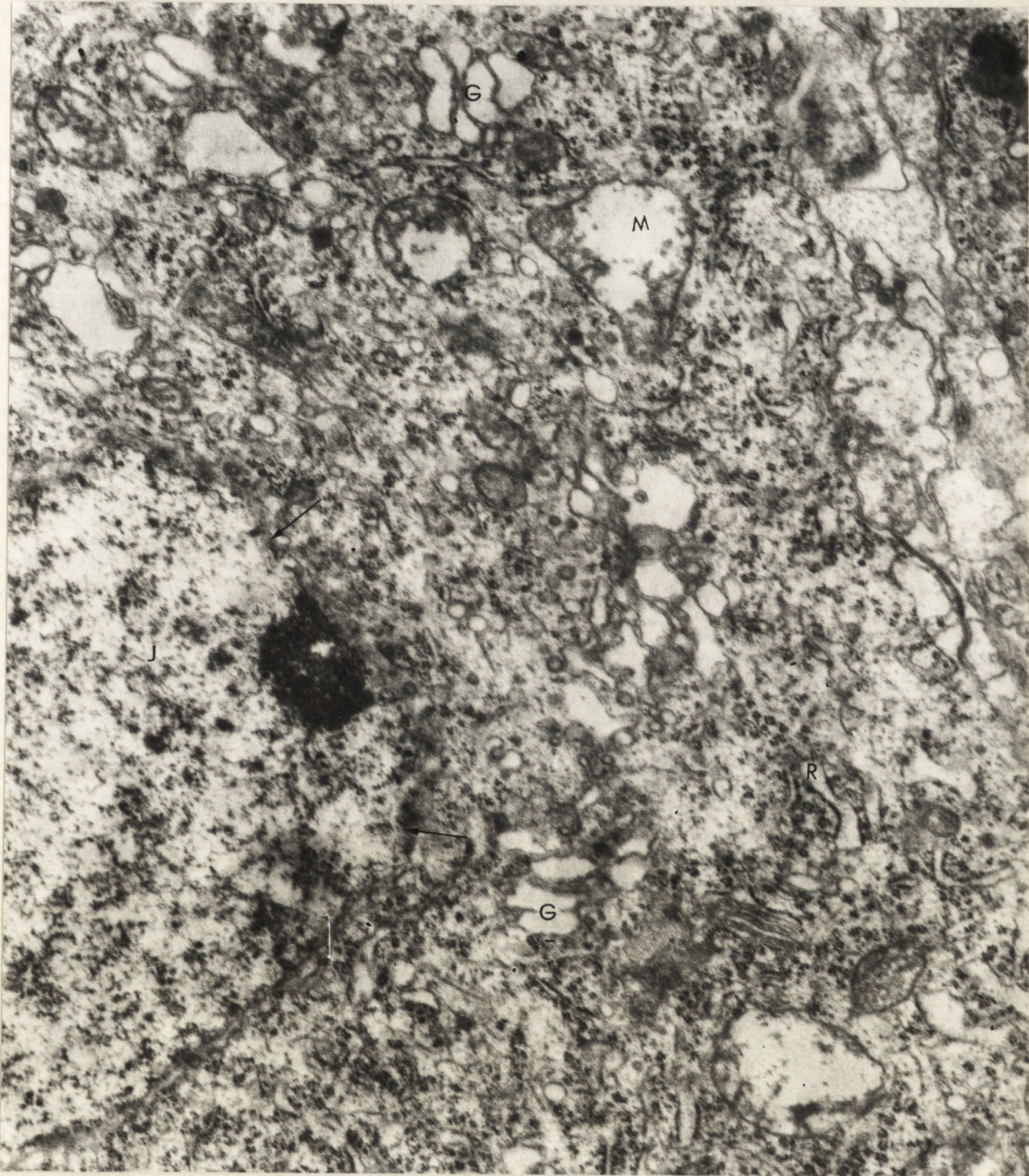
Ryc.17. Fragment neuronu jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu 4 godz. po zatruciu tlenkiem węgla. Znaczne poszerzenie kanałów szorstkiej siatki śródplazmatycznej /R/ oraz umiarkowane zbiorników aparatu Golgiego /G/. Obrzmienie mitochondriów /M/ i poszerzenie przestrzeni okołojądrowej /strzałki/. J - jądro, L - lizosom. Pow. 7600 x.



Ryc. 18. Fragment komórki Purkiniego w 48 godz. po zatruciu tlenkiem węgla. Znaczne obrzmienie mitochondriów /M/ oraz pola zagęszczeń i zubożenia szorstkiej siatki śródplazmatycznej /strzałki/. J - jądro, G - aparat Golgiego, L - lizosom, R - szorstka siatka śródplazmatyczna. Pow. 4200 x.



Ryc. 19. Fragment komórki piramidowej płytki końcowej rogu Amona w 4 godz. po zatruciu. Znaczne obrzmienie mitochondriów /M/ oraz poszerzenie zbiorników aparatu Golgiego /G/ i kanałów siatki śródplazmatycznej /R/, częściowo pozbawionej rybozomów /strzałki/. J - jądro, L - lizosom, Bj - wgłobienie błony jądrowej. Pow. 4600



Ryc. 20. Fragment komórki piramidowej płytki końcowej rogu Amona w 240 godz. po zatruciu tlenkiem węgla. Cechy dezintegracji strukturalnej komórki: zmniejszenie zawartości ziarnistości chromatyny w jądrze /J/. Zubożenie szorstkiej siatki śródplazmatycznej /R/, o poszerzonych kanałach. Zmniejszenie ilości wolnych i związanych rybozomów. Obrzmienie i rozpad mitochondriów /M/. Zatarcie rysunku i poszerzenie zbiorników aparatu Golgiego /G/. Zatarcie zarysów otoczki jądrowej /strzałki/. Pow. 6300 x.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Metoda mikronurka Kartezjusza, ze względu na swoje ograniczenia techniczne i wynikające z nich pewne źródła błędu, pozwala jedynie na przybliżone określenie aktywności oddechowej komórek nerwowych wyizolowanych z uformowanej tkanki. Jak dotąd jest jednak, jedynym sposobem ilościowej oceny zużycia tlenu, bądź wytwarzania dwutlenku węgla z buforu węglanowego przez kwaśne produkty glikolizy beztlenowej w przebiegu metabolizmu glukozy w pojedynczym neuronie.

Podstawowe źródła błędu stanowi sam zabieg mechanicznej izolacji komórek nerwowych z tkanki, w czasie którego dochodzi do oderwania części lub wszystkich wypustek komórkowych. Stanowią one, a zwłaszcza dendryty wysoce aktywne środowisko metaboliczne, którego objętość w przypadku niektórych neuronów, takich na przykład jak komórki Purkinjego równa się lub przewyższa objętość cytoplazmy perikarialnej. Stąd też przy zastosowanej technice, jedynej możliwej zresztą, uzyskiwane wartości mikrogazometryczne określają aktywność oddechową nie całego neuronu rozumianego jako jednostka cytofizjologiczna, lecz tylko jego części perikarialnej. Ścisłość i tego sformułowania podważa skądinąd fakt, że przy perikariach poszczególnych komórek pozostają różnej wielkości fragmenty wypustek, które w sposób oczywisty rzutować mogą na uzyskiwane wyniki ilościowe nawet w przypadku neuronów tej samej grupy, podobnie zresztą jak niemożliwe do uniknięcia w czasie izolacji uszkodzenia komórek, prowadzące do zróżnicowanej utraty ich cytoplazmy.

Proces mechanicznego izolowania komórek i związane z nim ich drażnienie, o różnej intensywności i różnym czasie trwania, może mieć wpływ na ich aktywność metaboliczną i rzutować na jej ilościowe wykładniki stanowiące przedmiot pomiarów. Obserwacje Hambergera i Hydéna /1963/ na izolowanych neuronach jądra Deitersa, wykazały w sposób niebudzący wątpliwości, możliwość ilościowego zróżnicowania oddychania komórkowego pod wpływem stymulacji ich funkcji.

Podbarwienie błękitem metylenowym może również budzić zastrzeżenia metodyczne, ponieważ sam barwnik stymuluje zużycie tlenu przez komórkę /Rapaport, Müller, 1974/. Jednakże niestosowanie barwnika jest możliwe jedynie przy izolacji neuronów z organotypowej hodowli pozaustrojowej, w której dokonuje się identyfikacji poszczególnych komórek i ich typów pod kontrolą mikroskopu świetlnego /Śmiałek, Kraśnicka, 1975/. Natomiast wyizolowanie neuronu ze skrawka niezabarwionej uformowanej tkanki jest w chwili obecnej niemożliwe.

Wykonywanie oznaczeń w tych samych warunkach zarówno w grupach kontrolnych jak i doświadczalnych oraz przeprowadzenie ich na dostatecznie obfitym materiale, pozwalającym na prawidłową analizę statystyczną, eliminują przynajmniej w części omówione powyżej niedogodności i ograniczenia interpretacyjne metody. Jej przewaga w stosunku do innych metod biochemicznych w badaniach metabolizmu ośrodkowego układu nerwowego polega z jednej strony na wysokiej czułości, z drugiej zaś na możliwości określenia różnic w przemianach poszczególnych ugrupowań komórkowych, nie dających się wyodrębnić podczas preparowania całego mózgowia lub jego części.

Wartości pomiarów mikrogazometrycznych uzyskiwane z pojedynczej komórki, nie uwzględniają ich zależności od jej rozmiarów. Różnice objętości poszczególnych neuronów, należących do tego samego ugrupowania anatomicznego wpływają na odchylenia ilościowe uzyskiwanych wyników /Śmiałek, 1977/. Jest to czynnik jeszcze ważniejszy w badaniu heterogennych populacji neuronalnych. Nie istnieje dotychczas możliwość bezpośredniego skorelowania objętości badanego neuronu z danymi ilościowymi charakteryzującymi jego aktywność oddechową. Objętość komórki nerwowej po inkubacji w środowisku doświadczalnym ulega zmianie, co wyklucza możliwość wykorzystania jej do oznaczenia rozmiarów. Z tego też powodu przeprowadza się korelacje pośrednie, wykonując pomiary objętości na innej grupie komórek należących do tej samej formacji anatomicznej niż używane do badań mikrogazometrycznych. W przeliczeniach uwzględnia się uzyskaną średnią arytmetyczną.

Dla ilościowej charakterystyki aktywności oddechowej stosowano dotychczas różnorodne układy odniesienia. Hydén i Pigoń /1960/ przeliczali parametry pomiarów mikrogazometrycznych na jednostkę objętości komórki, którą określali przy zastosowaniu promieni X. Inni autorzy, między innymi Eneström i Hamberger /1968/ do przeliczeń pomiarów gazometrycznych wykorzystywali wskaźnik objętości mitochondriów. Bardziej doskonałym sposobem ujednoczenia wyników badań biochemicznych jest ich przeliczenie na zawartość białka w neuronie, przy użyciu mikrografu elektronowego, stosowanego do pomiaru gęstości cytoplazmy. We wszystkich stosowanych metodach, nie wyłączając ostatniej, nie jest możliwe wykonanie obu oznaczeń na tej samej komórce.

Każda z dotychczas wykorzystywanych technik pozwala jedynie na uzyskiwanie przybliżonych danych. W badaniach własnych zastosowano przeliczenie ilości zużytego tlenu oraz wytworzonego dwutlenku węgla na jednostkę $/1 \mu\text{m}^3/$ uśrednionej objętości cytoplazmy komórki. Okazało się to istotne, ponieważ poszczególne grupy neuronów różniły się od siebie nie tylko ogólną objętością perikariów, lecz również stosunkiem objętości jądra do cytoplazmy, rzutującym niewątpliwie na objętość środowiska komórkowego, w którym zachodzą procesy oddychania i przemiany glukozy. Wykazano bowiem, że podczas gdy w komórkach Purkinjego, neuronach jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu i motoneuronach stosunek objętości jądra do cytoplazmy perikarialnej wyrażał się stosunkiem 1:9, to w komórkach piramidowych płytki końcowej rogu Amona wynosił on około 3:7.

Zastosowanie wspólnego przelicznika, mimo że nie uwzględniał on zróżnicowania zawartości mitochondriów, umożliwiało porównanie stopnia wrażliwości na działanie tlenu węgla poszczególnych ugrupowań komórek nerwowych, należących do różnych formacji anatomicznych, różniących się rozmiarami, stosunkiem objętości jądra do cytoplazmy, funkcją i podatnością na wpływ czynników uszkodzających. W analogiczny sposób Hydén i Pigoń /1960/ oraz Hamberger /1963/ określali zróżnicowanie aktywności oddechowej w niedotlenieniu w gleju okołonaczyniowym i okołoneuronalnym oraz w neuronach.

Do pomiarów ogólnej objętości części perikarialnej komórki nerwowej wykorzystano obrazy z odbiciowego mikroskopu elektro-

nowego, który stwarzał warunki określenia jej kształtów i wymiarów przestrzennych. Obliczenia przeprowadzano z wzorów na objętość odpowiednich brył geometrycznych, do których zbliżony był kształt poszczególnych typów komórek. Objętość jądra określano w oparciu o pomiary uzyskane z obrazów z transmisyjnego mikroskopu elektronowego w sposób zaproponowany przez Eneströma i Hambergera /1968/. Przybliżoną objętość cytoplazmy wyrażana w mikrometrach sześciennych stanowiła różnicę między uśrednioną objętością całego perikarionu komórki i jej jądra.

Przedstawiony powyżej sposób dokonywania przeliczeń, oparty o dane z utrwalonego materiału biologicznego i przybliżone podobieństwo kształtu komórek do określonych brył geometrycznych nakazuje daleko idącą ostrożność w stosunku do bezwzględnych wartości danych przeliczonych na jednostkę objętościową cytoplazmy. Wobec zastosowania tego samego sposobu, obarczonego identycznym błędem, w stosunku do całości badanego materiału, stwarzał on warunki porównywalności wyników.

Przeprowadzone badania wykazują istotne zróżnicowanie aktywności oddechowej w czterech badanych poddanych analizie grupach komórek nerwowych /ryc. 21/

Komórki piramidowe rogu Amona, pochodzące z sektora H₄₋₅ charakteryzują się najwyższym zużyciem tlenu, zarówno w układzie zawierającym askorbinian i cytochrom c, stanowiącym wykładnik metabolizmu w łańcuchu oddechowym na etapie kontrolowanym przez oksydazę cytochromową, jak i w środowisku zawierającym egzogenny bursztynian, przyjętym za wyznacznik aktywności

przemian w cyklu kwasów trójkarboksylowych. Wartości zużycia przez nie tlenu w obu układach doświadczalnych, najwyższe spośród wszystkich uzyskanych w badanym materiale, przyjęto za 100%, do których odnoszono parametry mikrogazometryczne charakteryzujące pozostałe komórki nerwowe. Neurony tej grupy znamionuje również stosunkowo wysoka aktywność glikolityczna w warunkach beztlenowych, stanowiąca 80,8% maksymalnej, typowej dla komórek nerwowych jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu.

Na przeciwległym biegunie znajdują się motoneurony rogu przedniego rdzenia kręgowego, wyróżniające się najniższym zużyciem tlenu w obu układach oraz najniższą aktywnością glikolizy w warunkach beztlenowych. Ich wartości zużycia tlenu wynoszą odpowiednio około 10% aktywności oddechowej neuronów kory amonalnej w układzie zawierającym askorbinian i cytochrom c oraz około 25% w obecności bursztynianu. Aktywność glikolityczna stanowi zaledwie około 24 % maksymalnej, występującej w neuronach jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu.

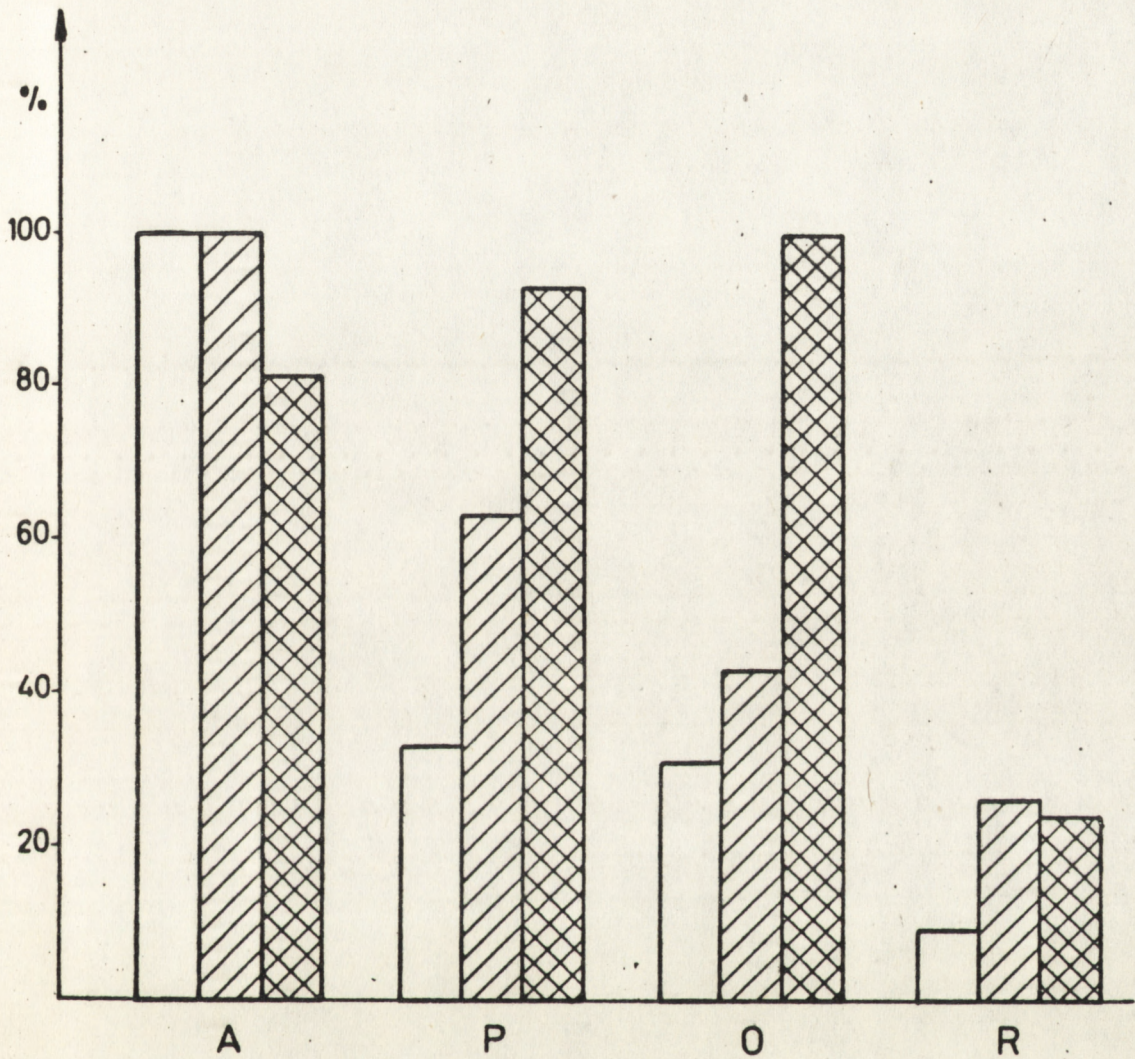
Pośrednie miejsce zajmują komórki Purkiniego kory mózdzku i neurony jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego. Charakteryzuje je umiarkowane zużycie tlenu w obu badanych układach i najwyższa aktywność glikolityczna w warunkach beztlenowych. Zużycie tlenu przez komórki Purkiniego w układzie zawierającym askorbinian i cytochrom c stanowi zaledwie około 30% maksymalnej wartości właściwej komórkom kory amonalnej, a w środowisku zawierającym bursztynian około 63% analogicznej

wartości. Te same parametry dla neuronów jądra olbrzymiokomórkowego tworzą siatkowatego stanowią odpowiednio około 30% i 42%. Aktywność glikolityczna komórek jądra olbrzymiokomórkowego jak wspomniano poprzednio, jest najwyższa. Przyjęto ją za 100% aktywności glikolitycznej badanych neuronów. W komórkach Purkinjego kształtuje się na poziomie około 93% tej wartości.




Podkreślić należy, że wartości charakteryzujące aktywność glikolityczną komórek Purkinjego, neuronów jądra olbrzymiokomórkowego oraz komórek piramidowych sektora H_{4-5} rogu Amona były do siebie zbliżone. Porównawczą charakterystykę aktywności oddechowej wszystkich badanych ugrupowań komórkowych przedstawia w układzie zbiorczym rycina 21.

Na podstawie uzyskanych wyników można sądzić, że spośród badanych populacji komórkowych najwyższe zapotrzebowanie na tlen wykazują neurony płytki końcowej rogu Amona, niższe na zbliżonym do siebie poziomie komórki Purkinjego i neurony jądra olbrzymiokomórkowego tworzą siatkowatego, a najniższe komórki ruchowe rogów przednich rdzenia. Na podkreślenie zasługuje przy tym fakt, że trzy pierwsze grupy neuronów charakteryzuje wysoka aktywność glikolityczna przy niskiej w grupie motoneuronów rdzenia.

Zróżnicowany jest również charakter reakcji metabolicznej poszczególnych ugrupowań komórkowych na zatrucie tlenkiem węgla. Bezpośrednim efektem zatrucia jest we wszystkich typach komórek nerwowych obniżenie zużycia tlenu w układzie zawierającym askorbinian i cytochrom c, sięgające 21% wartości kontrolnych w neuronach jądra olbrzymiokomórkowego tworzą siatkowatego i 41 % w komórkach piramidowych rogu Amona.



Ryc. 21. Względne procentowe różnice aktywności oddechowej przeliczone na μm^3 cytoplazmy poszczególnych ugrupowań komórek nerwowych w normoksji.

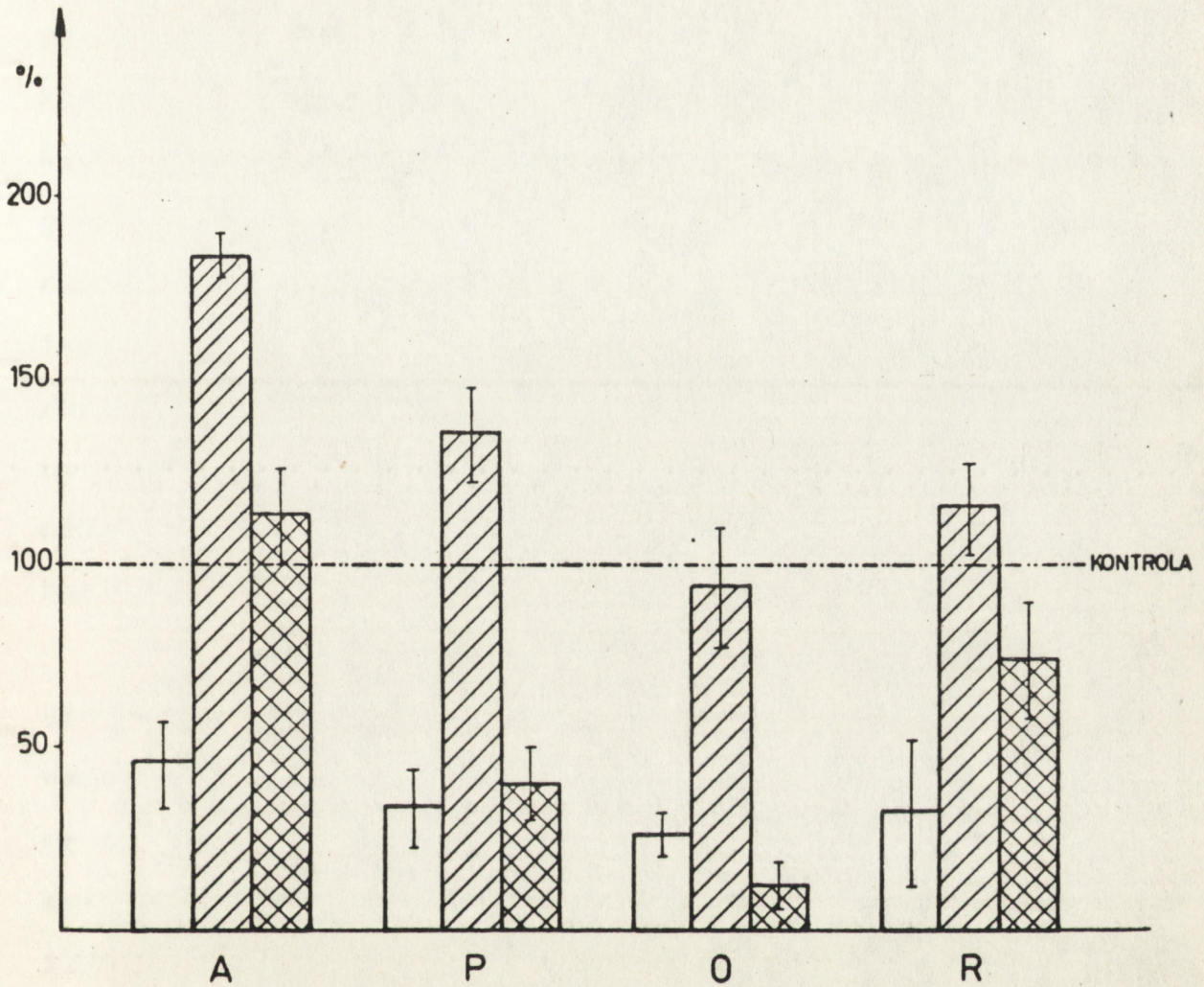
-  - układ askorbinian-cytochrom c
-  - układ zawierający bursztynian
-  - glikoliza w warunkach beztlenowych

A - komórki piramidowe płytki końcowej rogu Amona,
P - komórki Purkiniego, O - neurony jądra olbrzymio-
komórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu, R - neurony
ruchowe rogu przedniego rdzenia kręgowego.

Zmiany w zużyciu tlenu w obecności bursztynianu, w postaci jego wzrostu do poziomu 181% kontroli ujawniają się jedynie w komórkach kory amonalnej, nie występując w ogóle w pozostałych neuronach. Spadek aktywności glikolitycznej znamionuje z kolei tylko komórki Purkinjego i neurony jądra olbrzymio-komórkowego tworzącego siatkowatego, jest on przy tym najgłębszy w tych ostatnich, cechujących się najwyższą aktywnością glikolityczną w warunkach normoksji. Zmiany w aktywności glikolitycznej neuronów kory amonalnej i motoneuronów rdzenia, jakkolwiek zauważalne były statystycznie nieistotne. Porównawczą charakterystykę zmian aktywności oddechowej w badanych grupach komórek nerwowych zestawiono zbiorczo na rycinie 22.

Jeszcze większe zróżnicowanie charakteryzuje późne zmiany aktywności oddechowej i glikolitycznej w okresie zejścia procesu patologicznego po zatruciu tlenkiem węgla. Są one skorelowane w czasie z nieprawidłowościami obrazu mikroskopowo-elektronowego neuronów, dotyczącymi przede wszystkim tych struktur subkomórkowych, które odpowiedzialne są za procesy oddychania komórkowego.

Najgłębsze i najbardziej długotrwałe, a w istocie rzeczy nieodwracalne zaburzenia występują w komórkach piramidowych płytki końcowej rogu Amona, w których przez cały okres obserwacji stwierdza się bardzo znaczne zahamowanie zużycia tlenu w układzie zawierającym askorbinian i cytochrom c, jego wzrost w obecności bursztynianu oraz narastającą tendencję zwyżki aktywności glikolitycznej, osiągającej w 120 godz. po zatruciu wartości statystycznie znamienne.



Ryc. 22. Aktywność oddechowa po przeliczeniu na μm^3 cytoplazmy poszczególnych grup neuronów bezpośrednio po zatruciu tlenkiem węgla.

□ - układ zawierający askorbinian i cytochrom c

▨ - układ zawierający bursztynian

▩ - glikoliza w warunkach beztlenowych

A - komórki piramidowe płytki końcowej rogu Amona

P - komórki Purkiniego

O - neurony jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu

R - neurony ruchowe rogu przedniego rdzenia kręgowego.

Nieprawidłowości strukturalne, pogłębiające się w kolejnych przedziałach czasowych dotyczą zarówno mitochondriów i szorstkiej siatki śródplazmatycznej jak i innych elementów subkomórkowych neuronu i prowadzą ostatecznie do jego całkowitej dezintegracji. Warto przy tym podkreślić, że charakter i sekwencje narastania zmian mikroskopowo-elektronowych przypominają kolejne fazy uszkodzenia komórek w różnych stanach hipoksyjnych /Brierley, 1976/. Najwcześniej obserwowane nieprawidłowości ultrastruktury komórki odpowiadają obrazowi mikrowakuolizacji, późniejsze łączą cechy typowe dla schorzenia ischemicznego i homogenizacyjnego /Brown, Brierley, 1973/.

Charakter zaburzeń aktywności oddechowej w komórkach Purkinjego i w neuronach jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego są identyczne w swoim podstawowym wzorcu. Polegają one na przejściowym obniżeniu zużycia tlenu w układzie zawierającym askorbinian i cytochrom c, normalizującego się odpowiednio po 120 i 72 godz., oraz spadku aktywności glikolitycznej, cofający się w komórkach Purkinjego już po 48 godz., a w neuronach jądra olbrzymiokomórkowego po 120 godz. W obu typach neuronów nie występują w ogóle statystycznie znamienne zaburzenia oddychania w układzie katalizującym utlenianie bursztynianu.

Zwraca uwagę fakt, że parametry gazometryczne charakteryzujące metabolizm łańcucha oddechowego normalizują się wcześniej w neuronach jądra olbrzymiokomórkowego niż w komórkach Purkinjego. Kolejność normalizacji glikolizy beztlenowej jest odwrotna. Nieprawidłowości ultrastrukturalne, ograniczone do

znacznego obrzmienia mitochondriów oraz poszerzenia kanałów szorstkiej siatki śródplazmatycznej i zbiorników aparatu Golgiego, odpowiadających wstępnej fazie uszkodzeń hipoksyjnych według Brierleya /1976/ cofają się w obu typach neuronów po upływie 72 godz. od zatrucia.

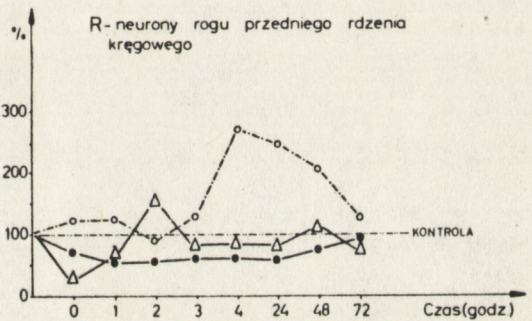
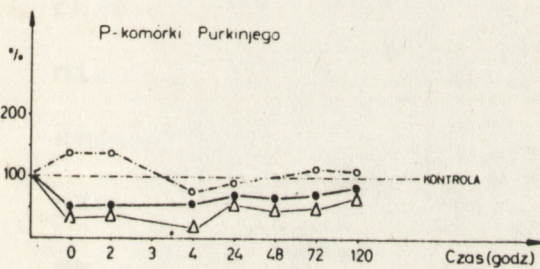
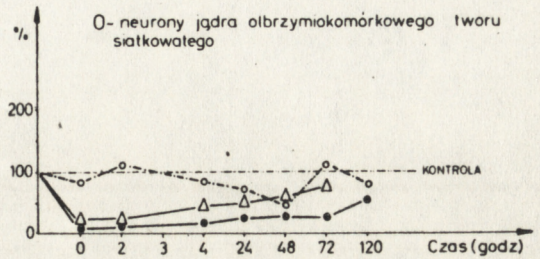
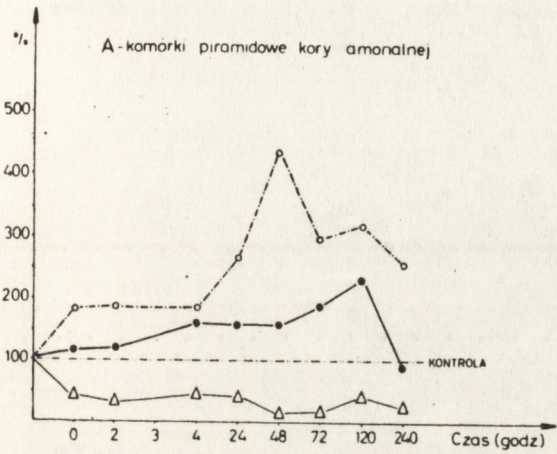
Najmniej nasilone i najbardziej krótkotrwałe zmiany metaboliczne w porównaniu do wszystkich pozostałych grup neuronów występują w komórkach ruchowych rogów przednich rdzenia kręgowego. Ograniczają się do przejściowego spadku zużycia tlenu w obecności askorbinianu i cytochromu c w 1 godz. po zatruciu z jego następczym wzrostem w 2 godz. i normalizują w 3 godz., oraz odwracalnego choć znacznego zaktywizowania układu katalizującego utlenianie bursztynianu w okresie między 4 a 48 godz. Aktywność glikolityczna, jakkolwiek nieco obniżona w żadnym przedziale czasowym po zatruciu nie osiąga spadku statystycznie znamiennego. Z najmniejszym nasileniem zaburzeń procesów metabolicznych w tej grupie komórek nerwowych korelują dobrze, naj słabiej wyrażone w nich nieprawidłowości strukturalne. Są one w istocie ograniczone do niewielkiego poszerzenia kanałów szorstkiej siatki śródplazmatycznej i zbiorników aparatu Golgiego, przy dyskretnym obrzmieniu tylko części mitochondriów, występujących jedynie w 4 godz. po zatruciu. Ta dyskrepancja między uogólnionymi zmianami siatki śródplazmatycznej i ograniczonymi mitochondriów wyróżnia obraz mikroskopowo-elektronowy motoneuronów rdzenia kręgowego nie tylko w stosunku do pozostałych grup badanych neuronów, lecz również wobec powszechnie

przyjętych kryteriów ultrastrukturalnych następstw hipoksji /Brierley, 1976/. Odrębnego podkreślenia wymaga wystąpienie w nich krótkotrwałego, przejściowego hiperkompensacyjnego wzrostu zużycia tlenu w układzie zawierającym askorbinian i cytochrom c, po jego uprzednim spadku we wczesnym okresie po zatruciu. Zjawisko to uznane za wykładnik aktywacji przemian w łańcuchu oddechowym obserwowano również w neuronach młodych hodowli pozaustrojowych, przetrzymywanych w warunkach anoksji /Śmiałek, Kraśnicka, 1975/ oraz w komórkach nerwowych mózgu płodów szczurzych, zatrutowanych tlenkiem węgla drogą transłożyskową /Dydyk i wsp. 1975/. Uznawane jest ono za typowe dla komórek nerwowych opornych na działanie czynników uszkadzających.

Zróżnicowane zaburzenia metaboliczne w poszczególnych grupach komórek nerwowych w okresie zejścia procesu patologicznego po zatruciu tlenkiem węgla zestawiono zbiorczo w rycinie 23 /wykres 5/.

Zestawienie wyników badań biochemicznych i spostrzeżeń mikroskopowo-elektronowych pozwala na uszeregowanie badanych neuronów w dwie grupy, różniące się od siebie wrażliwością na zatrucie CO, a mianowicie:

1. Neurony o nieodwracalnych zaburzeniach procesów biologicznych reprezentowane przez komórki piramidowe sektora H₄₋₅ rogu Amona.
2. Neurony o odwracalnych zaburzeniach metabolicznych i strukturalnych, do których należą pozostałe grupy komórek nerwowych.



- △—△ - układ askorbinian-cytochrom c
- - układ katalizujący utł. bursztynianu
- - glikoliza beztlenowa

Ryc. 23. Aktywność oddechowa izolowanych neuronów OUN szczura w następstwie zatrucia CO /średnie arytmetyczne/

Różnice w dynamice cofania się nieprawidłowości metabolizmu komórkowego i morfologii komórek po zatruciu tlenkiem węgla stanowią podstawę do wyodrębnienia w grupie drugiej dwóch podgrup

- a. neurony o krótkim okresie powrotu do stanu prawidłowego /komórki ruchowe rogów przednich rdzenia kręgowego/,
- b. neurony o przedłużonym okresie powrotu do normy /komórki Purkinjego i neurony jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu/.

W oparciu o całokształt przeprowadzonych badań można stwierdzić, że największą wrażliwość na zatrucie tlenkiem węgla charakteryzowała neurony o wysokiej aktywności procesów utleniania komórkowego zarówno w łańcuchu oddechowym jak i w cyklu kwasów trójkarboksylowych oraz o wysokiej aktywności glikolitycznej. Na zatrucie CO reagowały one trwałym spadkiem procesów metabolicznych kontrolowanych przez oksydazę cytochromową oraz wzrostem zarówno aktywności układu katalizującego utlenianie bursztynianu jak i glikolizy beztlenowej. Najmniejszą natomiast wrażliwość na zatrucie tlenkiem węgla wykazywały neurony o najniższej aktywności procesów metabolicznych - zarówno aktywności oddechowej jak i glikolitycznej. Na zatrucie reagowały one krótkotrwałym spadkiem metabolizmu na poziomie łańcucha oddechowego i towarzyszącym nieznacznym obniżeniem glikolizy w warunkach beztlenowych. Pośrednie miejsce we wrażliwości zajmowały neurony, w których zatrucie wywoływały zaburzenia metaboliczne mieszczące się w granicach pełnej odwracalności.

Dotyczyło to tych komórek nerwowych, które w warunkach fizjologicznych znamionowała umiarkowana aktywność procesów utleniania oraz wysoka aktywność glikolityczna. Ich reakcja na zatrucie wyrażała się równoczesnym obniżeniem procesów metabolicznych w łańcuchu oddechowym na etapie kontrolowanym przez oksydazę cytochromową oraz aktywności glikolizy beztlenowej.

Na uwagę zasługuje fakt, że neurony o odwracalnym charakterze zaburzeń metabolicznych i strukturalnych wyróżniają się dodatkowo przejściowym gromadzeniem w ich cytoplazmie złogów glikogenu w okresie po zatruciu tlenkiem węgla/Korthals i wsp. 1973/. Analogiczne zjawisko w tych samych ugrupowaniach komórkowych opisywano w innych typach niedostatku tlenowego /Mossakowski i wsp. 1968, Long i wsp. 1972, Mossakowski, Zelman, 1979/. Być może deponowany w ich cytoplazmie glikogen stanowi w okresie cofania się zmian dodatkowe źródło zasobów energetycznych, ułatwiających pełną restytucję biologiczną komórki /Mossakowski i wsp. 1968/. W neuronach uszkodzonych nieodwracalnie zjawisko to nie występuje. Sprawę otwartą pozostaje natomiast zagadnienie w jakiej mierze o nieodwracalności uszkodzeń komórek kory amonalnej decydują zaburzenia ich metabolizmu wywołane działaniem tlenku węgla, a w jakiej dodatkowe czynniki związane np. z nieprawidłowościami lokalnego ukrwienia tej okolicy mózgu. Mossakowski /1975/ wykazał, że róg Amona jest tą strukturą ośrodkowego układu nerwowego, w której w sposób powtarzalny zatrucie tlenkiem węgla wywołuje głębokie zmiany w mikrokrążeniu. Za decydującą rolę czynników uwarunkowanych właściwościami metabolicznymi komórki przemawiać może wybiórczość uszkodzeń

komórkowych w poszczególnych strefach Sommera, do których należy również płytka końcowa, przy cechach niedokrwienia obejmujących całą strukturę.

Wyjaśnienie złożonych procesów zachodzących podczas zatrucia tlenkiem węgla i w jego następstwie w komórkach nerwowych, wykazujących głębokie zróżnicowanie fizjologicznej aktywności oddechowej jest bardzo trudne, a próba interpretacji poszczególnych czynników decydujących o odwracalnym lub nieodwracalnym charakterze ich uszkodzeń w oparciu o uzyskane wyniki wręcz niemożliwe. Stwierdzone zmiany odnoszące się do poszczególnych układów oddychania komórkowego stanowią niewątpliwie tylko jedno z ogniw złożonego łańcucha patogenetycznego uszkodzeń komórkowych. Odzwierciedlają one bowiem jedynie stan zaburzeń aktywności oddechowej i glikolitycznej w określonych stadiach zatrucia i okresu po zatruciu, nie wyjaśniając w żadnej mierze ich mechanizmu ani następstw metabolicznych. Dotychczasowe badania Chance'a i wsp. /1970/, Rollestona /1972/, Norberga i Siesjö /1974^A/, Bachelarda /1974/, Sikorskiej i wsp. /1975/, McMillana /1975, 1977/ i innych wskazują, że zatrucie tlenkiem węgla wywołuje wielokierunkowe, zróżnicowane w czasie, nieprawidłowości różnych szlaków metabolicznych ośrodkowego układu nerwowego, które w sposób bezpośredni lub pośredni rzutować mogą na aktywność procesów oddechowych w jego elementach komórkowych. Rolę czynnika uszkadzającego odgrywać mogą w równej mierze hipoksydoza komórkowa wywołana zatruciem tlenkiem węgla, jego bezpośrednie działanie cytotoksyczne na wewnątrzkomórkowe układy enzymatyczne, niewyjaśnione zresztą jednoznacznie w stosunku do tkanki nerwowej w warunkach *in vivo* oraz towarzyszące zatruciu zaburzenia mikrokrążenia jak wreszcie i wyzwolone

przez działanie wymienionych wyżej czynników, wtórne nieprawidłowości metabolizmu komórkowego.

Cechą wspólną dla wszystkich ugrupowań komórkowych, niezależnie od odwracalnego bądź nieodwracalnego charakteru ich uszkodzeń jest obniżenie zużycia tlenu w układzie zawierającym askorbinian i cytochrom c, świadczące o obniżeniu aktywności oddechowej w łańcuchu oddechowym na etapie kontrolowanym przez oksydazę cytochromową, przy czym spadek ten osiągał najniższy poziom w komórkach nerwowych jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego, wykazujących odwracalny charakter zmian, a nie w nieodwracalnie uszkodzonych komórkach piramidowych kory amonowej. Stan ten wiązać można zarówno z procesem hipoksydozy tkankowej /Thews, 1963/ jak i z upośledzeniem aktywności oksydazy cytochromowej na skutek kompleksowego wiązania CO z cytochromem a_3 . Pomimo poddawania w wątpliwość możliwości penetracji tlenu węgla z krwi do tkanek przez nieuszkodzoną barierę krew-mózg /Graziani, Guariano, 1965, Weinreich i wsp. 1978/ i braku we wczesnych stadiach zatrucia obrzęku mózgu, który miałby tę penetrację ułatwiać /Rap i wsp. 1974/ wydaje się, że nie można wyłączyć udziału cytotoksycznego działania CO w mechanizmie zaburzeń metabolicznych obserwowanych w badanym materiale. Przemawia za tym jak już wspomniano poprzednio głębszy spadek aktywności oksydazy cytochromowej od występującego w odpowiednim stopniu niedotlenieniu hipoksyjnym /Śmiałek i wsp. 1973/ oraz utrzymywanie się zmian przez kilkugodzinny lub kilkudniowy okres po zatruciu, przy oddychaniu normalnym powietrzem atmosferycznym.

Jakościowe i ilościowe zróżnicowanie zaburzeń aktywności oddechowej i glikolitycznej w poszczególnych ugrupowaniach komórek skłania do ich odrębnego omówienia.

Wydaje się uzasadnione, przyjąć, że narastające zaburzenia metaboliczne i pogłębiające się zmiany strukturalne, prowadzące w końcu do całkowitej dezintegracji struktur komórkowych w neuronach piramidowych kory amonalnej związane są z ich wysokim fizjologicznym zapotrzebowaniem na tlen. Trwale utrzymujące się po zatruciu nieprawidłowości metaboliczne, wyrażające się równoczesnym obniżeniem zużycia tlenu w końcowym etapie przemian łańcucha oddechowego oraz narastaniem wykładników aktywacji glikolizy beztlenowej były identyczne ze zmianami typowymi dla wczesnej fazy niedotlenienia hipoksyjnego /Norberg, Siesjö, 1975/ lub niedotlenienia niedokrwiennego /Folbergrová i wsp. 1974/. Można założyć, że wraz ze spadkiem zużycia tlenu w układzie akso-bian-cytochrom c dochodziło do spowolnienia oksydacyjnej fosforylacji i następczego obniżenia puli wysokoenergetycznych fosforanów, podobnie jak ma to miejsce w przypadku niedokrwienia mózgu /Levy, Duffy, 1977; Kobayashi i wsp. 1977/. W warunkach obniżonego poziomu ATP zanika mechanizm ujemnego zwrotnego sprzężenia w stosunku do ciągu glikolitycznego na etapie aktywności fosfofruktokinazy. Niski poziom ATP sprzyja również narastaniu obrzmienia mitochondriów, obecnego i pogłębiającego się przez cały okres po zatruciu. To z kolei mogło pogłębiać pierwotne zaburzenia funkcji łańcucha oddechowego. Zwraca uwagę, że neurony kory amonalnej mimo głębokich uszkodzeń strukturalnych, przez długi okres, bo aż do 10 dnia obserwacji zachowywały swoje funkcje życiowe. Przypuszcza się,

że komórki nerwowe są zdolne do utrzymania niskiej puli związków wysokoenergetycznych nawet w warunkach całkowitej anoksji. Tę ich właściwość uważa się za podstawowy mechanizm adaptacyjny umożliwiający przeżycie krótkotrwałego, całkowitego niedoboru tlenu /Härkönen i wsp. 1968/. W zatruciu tlenkiem węgla komórki nerwowe płytki końcowej rogu Amona, wykazywały cechy charakterystyczne dla wielogodzinnego niedostatku tlenu lub upośledzenia jego zużycia. Musiało to w konsekwencji prowadzić do przyrostu NADH i $FADH_2$ /Norberg, Siesjö, 1974B/, Folbergrová wsp. 1974/. Stwarzało to wspólnie ze wzrostem puli mleczanu i pirogronianu, jako następstwa wzmożonej glikolizy beztlenowej, warunki kwasicy wewnątrzkomórkowej /Eklöf, Siesjö, 1972; Nilson i wsp. 1975/. Warunki te łącznie z uszkodzeniem błon mitochondrialnych mogą prowadzić do rozprężenia oksydacyjnej fosforylacji. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji można przypuszczać, że to biochemiczne uszkodzenie występowało przez cały 240-godzinny okres po zatruciu, Wskazuje na to podwyższone w tym przedziale czasowym zużycie tlenu w obecności bursztynianu /cecha rozprężenia mitochondriów/. Długotrwałe zaburzenia funkcji łańcucha oddechowego oraz upośledzenie odnowy ATP prowadziło do znacznego ograniczenia zużycia glukozy, wyczerpania rezerw energetycznych komórki i jej dezintegracji. Następstwem tak zaburzonych procesów metabolicznych mogła być martwica selektywna kory amonalnej, obejmująca sektory H_2 i H_{4-5} , opisana w analogicznych warunkach doświadczalnych przez Korthalsa i wsp. /1973/. Podstawową rolę w rozwoju zmian martwiczych odgrywałoby więc z jednej strony zakwaszenie śródkomórkowe, związane z nieekonomicznym zużyciem glukozy w szlaku glikolizy beztlenowej,

z drugiej zaś jej upośledzona utylizacja. Taki właśnie mechanizm martwicy selektywnej, stanowiącej następstw destrukcji strukturalnej neuronów zakładają Yamaguchi i wsp. /1971/ Hayakawa i Waltz /1975/ oraz Ginsberg i wsp. /1976/ w interpretacji ogniskowych uszkodzeń jąder podstawy w niedokrwieniu mózgu.

Postępujący w czasie rozpad pewnej części komórek nerwowych stwarza dodatkowe niekorzystne warunki dla neuronów utrzymanych przy życiu. Dochodzi wówczas między innymi do wzrostu stężenia pozakomórkowego potasu, uważanego za istotny czynnik uszkadzający tkankę nerwową /Cameron, Segal, 1972/. Lokalny niedostatek ATP przy prawidłowym w okresie po zatruciu dopływie tlenu, oraz działanie produktów rozpadu tkankowego sprzyjają rozwojowi obrzęku tkanki i regionalnych zaburzeń krążenia, wraz ze wzrostem ciśnienia żylnego. Czynniki te mogły stanowić zamykający się krąg patogenetyczny, prowadzący do dalszych nieodwracalnych uszkodzeń komórkowych i tkankowych /Wade i wsp. 1975/.

Na odrębne wyjaśnienie zasługują zmiany w zużyciu tlenu w układzie zawierającym bursztynian, stanowiące składniki zaburzeń metabolicznych w cyklu kwasów trójkarboksylowych.

Nie wydaje się, aby aktywacja utleniania bursztynianu w warunkach komórek kory amonalnej po zatruciu tlenkiem węgla mogła stanowić następstwo zwiększonej syntezy zespołu enzymów uczestniczących w tym procesie. Zatrucie tlenkiem węgla już we wczesnym okresie prowadzi do znacznego obniżenia biosyntezy białka, zwłaszcza w populacji komórek nerwowych /Albrecht,

1973; Albrecht, Śmiałek, 1975/.

Wydaje się, że wzrost utleniania bursztynianu w warunkach zatrucia tlenkiem węgla, przynajmniej w przypadku neuronów płytki końcowej rogu Amona, należy rozpatrywać przede wszystkim jako wykładnik uszkodzenia strukturalnego mitochondriów i rozprężenia oksydacyjnej fosforylacji /Green, Fleischer, 1960/.

Istnieją dane wskazujące, że w warunkach niedotlenienia ośrodkowego układu nerwowego dochodzi do zwiększenia stacjonarnych stężeń niektórych metabolitów cyklu kwasów trójkarboksylo- wych. Między innymi Folbergerová i wsp. /1974/ opisali zwiększoną zawartość jabłczanu i bursztynianu w mózgu w warunkach niedotlenienia hipoksyjnego, a McMillan /1977/ w zatruciu tlenkiem węgla wykazał nagromadzenie jabłczanu. Można przypuszczać, że w warunkach *in vivo* w niedotlenieniu lub zatruciu tlenkiem węgla, w wyniku zwiększenia puli bursztynianu wzrasta szybkość jego utleniania w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę bursztynianową. Wydaje się, że *in vivo* ten typ regulacji metabolicznej może spełniać rolę mechanizmu adaptacyjnego wyrównując częściowo straty energetyczne w odnowie ATP /Saz, 1971/. Być może ten proces warunkuje długotrwałe utrzymanie funkcji biologicznych przez ciężko uszkodzone, w następstwie zatrucia CO, komórki piramidowe kory amonalnej. Trudno jednak tym mechanizmem regulacyjnym, który może mieć miejsce w warunkach *in vivo*, tłumaczyć zaobserwowane efekty zużycia tlenu w obecności bursztynianu w układach doświadczalnych *in vitro*, w których stosuje się względnie wysokie stężenia substratu.

Nie można natomiast wykluczyć, że obserwowany w zastosowanych warunkach doświadczalnych wzrost zużycia tlenu w obecności bursztynianu związany jest ze zwiększoną dostępnością egzogen-

nego substratu ze środowiska inkubacyjnego do enzymu na skutek zmian w przepuszczalności błon komórkowych, w tym również błon mitochondrialnych /Kozik, 1970, 1976/. Na taką możliwość wskazują stwierdzone przez cały okres obserwacji i narastające mikroskopowo-elektronowe cechy uszkodzenia mitochondriów.

W komórkach nerwowych płytki końcowej rogu Amona nie wystąpiły warunki nagromadzenia glikogenu w związku ze zużyciem dostarczanej glukozy w zaktywizowanym ciągu glikolitycznym.

W oparciu o uzyskane wyniki badań można przypuszczać, że odwracalny charakter zaburzeń aktywności oddechowej i zmian strukturalnych w komórkach Purkinjego i neuronach jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego pnia mózgu związany jest z obniżeniem aktywności łańcucha glikolitycznego, generującego mleczan, towarzyszącym zahamowaniu przemian tlenowych w łańcuchu oddechowym. Nieprawidłowości metaboliczne występujące w obu tych grupach neuronów przypominają zmiany opisane w tkankach całego mózgu w późniejszych /20-60 min/ okresach po zatruciu tlenkiem węgla, charakteryzujące się między innymi przyrostem glukozy-6-fosforanu, spadkiem fruktozo-1,6-dwufosforanu i zahamowaniem aktywności fosfofruktokinazy /McMillan, 1977/. Dzięki zahamowaniu aktywności łańcucha glikolitycznego nie dochodziło w nich zapewne do znacznego zakwaszenia śródkomórkowego. Zaistniał natomiast czynnik sprzyjający metabolizowaniu dostarczonej do komórki glukozy w kierunku G-1-P → glikogen, czego wyrazem było gromadzenie się wielocukru w cytoplazmie komórek, obserwowane przez Śmiałka i wsp. /1973/ już w 4 godz. po zatruciu prowadzonym w identycznych warunkach doświadczalnych. Czynnikiem tym był zapewne wzrost rezerwy glukozy-6-fosforanu /McMillan, 1977/, stanowiącego między innymi zarówno

substrat jak i katalizator w ciągu reakcji zaangażowanych w syntezę glikogenu. Nie należy przy tym przypuszczać, aby w stosowanych warunkach doświadczalnych zaistniały w obu typach komórek nerwowych zaburzenia fosforylacji glukozy, gdyż jak wykazali Sikorska i wsp. /1974/ w badaniach tkanek całego mózgu występuje w nich nawet wzrost puli ATP a Rolleston /1972/ we wcześniejszych badaniach stwierdził wzrost aktywności heksokinazy. Gromadzący się glikogen, jako zapasowy materiał energetyczny mógł przy przejściu w warunki normoksji stanowić rezerwy dla odnowy funkcji biologicznych komórki, zapewniając ich normalizację w 5 dniu po zatruciu zarówno w komórkach Purkinjego jak i w neuronach jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego.

Neurony ruchowe rogów przednich rdzenia kręgowego wyróżniają się najszybszym metabolicznym i strukturalnym powrotem do stanu prawidłowego. Dwa zjawiska metaboliczne występujące w nich w okresie cofania się procesu patologicznego po zatruciu zasługują na odrębne omówienie.

Pierwszym z nich jest obserwowany w 2 godz. po zatruciu przejściowy wzrost zużycia tlenu w układzie zawierającym askorbinian i cytochrom c. Zjawisko to występujące jedynie w motoneuronach rdzenia kręgowego można ze znacznym prawdopodobieństwem uznać za proces kompensacyjny, analogiczny do opisywanych w innych typach niedotlenienia przez Spatz i wsp. /1974/, Betza i wsp. /1974/ oraz Spatz i Klatzo /1976/. Być może było ono związane z odsłonięciem aktywnych centrów oksydazy cytochromowej w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, w następstwie uszkodzenia

ich struktury. Jest znanym faktem, że aktywności licznych enzymów związanych z błonami, w tym również oksydazy cytochromowej, można ujawnić w pełni po odsłonięciu ich aktywnych centrów, tak jak to ma miejsce w przypadku eksperymentalnego przerwania ciągłości błon mitochondriów.

Należy przypuszczać również, że w czasie wystąpienia hiperkompensacyjnego wzrostu utleniania w łańcuchu oddechowym doszło już do rozpadu kompleksu cytochrom-CO, na co może wskazywać między innymi fakt, że poziom karboksyhemoglobiny we krwi był w tym okresie bliski prawidłowemu.

Drugim zjawiskiem wymagającym omówienia jest obserwowany w przedziale czasowym 4-48 godz. po zatruciu wzrost zużycia tlenu w układzie zawierającym bursztynian. Było ono wspólne dla dwóch typów neuronów - **nieodwracalnie** uszkodzonych komórek piramidowych kory amonalnej i najmniej zmienionych motoneuronów rdzenia. Wydaje się jednakże, że mechanizm jego w obu przypadkach był zasadniczo różny. Na podstawie uzyskanych wyników nie ma podstaw przypuszczać aby w motoneuronach dochodziło do rozprężenia oksydacyjnej fosforylacji. W 4 i dalszych godzinach po zatruciu procesy utleniania komórkowego w łańcuchu oddechowym w komórkach ruchowych ulegały całkowitej normalizacji, a obraz mikroskopowo-elektronowy struktur subkomórkowych, poza nieznacznym obrzmieniem części mitochondriów stwierdzonym wyłącznie w 4 godz. nie różnił się od prawidłowego. W przeciwieństwie do tego w komórkach kory amonalnej przyrost zużycia tlenu w układzie zawierającym bursztynian towarzyszył głębokiemu spadkowi aktywności łańcucha oddechowego na etapie kontrolowanym przez oksydazę cytochromową, a w obrazie mikroskopowo-elektro-

nowym stwierdzano ciężkie uszkodzenia struktur subkomórkowych, w tym przede wszystkim mitochondriów, które mogły korelować z całkowitym rozprężeniem oksydacyjnej fosforylacji. W oparciu o obraz mikroskopowo-elektronowy komórek ruchowych rdzenia kręgowego trudno również przypuścić by rozciągający się na okres 4-48 godz. wzrost zużycia tlenu w układzie zawierającym bursztynian uwarunkowany był tylko zwiększoną dostępnością substratu do enzymu w następstwie zmienionej po zatruciu przepuszczalności błon komórkowych. Można założyć natomiast, że podstawowym czynnikiem odpowiedzialnym za wzrost aktywności układu utleniającego bursztynian w motoneuronach rdzenia kręgowego jest zwiększenie obrotów enzymu, być może w wyniku zmian w konformacji enzymu występujących po zatruciu tlenkiem węgla.

Glikoliza beztlenowa, niska w warunkach prawidłowych, po zatruciu utrzymywała się na obniżonym, choć w sposób statystycznie nieznamiennej poziomie. Nie stwarzało to warunków do rozwoju kwasicy śródkomórkowej.

Krótkotrwałe obniżenie zużycia tlenu w układzie zawierającym askorbinian i cytochrom c, występujące bezpośrednio po zatruciu, przy niskiej w ogóle, a obniżonej przy zatruciu aktywności glikolitycznej mogło stwarzać analogiczne jak w komórkach Purkinjego i w neuronach jądra olbrzymiokomórkowego łożyska siatkowatego warunki do syntezy glikogenu. Podkreślić przy tym należy, że nieprawidłowe złogi glikogenu w neuronach ruchowych rdzenia kręgowego pojawiają się wcześniej niż w innych ugrupowaniach komórkowych /Mossakowski, Zelman, 1979/, Można

równocześnie sądzić, że wczesne kompensacyjne zużycie glukozy w warunkach tlenowych i przypuszczalny wzrost generacji ATP były czynnikami sprzyjającymi szybkiemu powrotowi do normy zaburzonych szlaków metabolicznych i stanu struktur submikroskopowych komórek ruchowych rdzenia po zatruciu CO.

Zagadnienie zróżnicowanej wrażliwości poszczególnych elementów komórkowych ośrodkowego układu nerwowego na działanie różnych czynników szkodliwych, w tym niedotlenienia i jego szczególnej postaci jaką jest zatrucie tlenkiem węgla, wymaga niewątpliwie dalszych wielokierunkowych badań w aspekcie ich fizjologicznych różnic metabolicznych i odrębności reakcji metabolicznej w warunkach patologicznych. Te właśnie odrębności w charakterze zmian patologicznych wskazują, że zjawisko selektywnych uszkodzeń poszczególnych topistycznych struktur ośrodkowego układu nerwowego rozpatrywać należy nie tylko pod kątem przemian w całej komórce, lecz również w jej poszczególnych elementach podkomórkowych, które mogą ulegać odmiennym uszkodzeniom w różnych rodzajach komórek /Korthals. i wsp. 1973, Hoppe, 1974/.

WNIOSKI

- 1/ Poszczególne neurony ośrodkowego układu nerwowego, należące do różnych układów czynnościowych charakteryzuje ilościowe zróżnicowanie aktywności oddechowej i glikolitycznej.
- 2/ Wybiórczą wrażliwość na działanie tlenku węgla wykazują neurony, wyróżniające się wysokim zużyciem tlenu w warunkach fizjologicznych.
- 3/ Okres odnowy funkcji biologicznych neuronów ośrodkowego układu nerwowego po zatruciu tlenkiem węgla jest najkrótszy w komórkach o najniższym zużyciu tlenu w warunkach fizjologicznych.
- 4/ Zatrucie tlenkiem węgla powoduje we wszystkich neuronach ośrodkowego układu nerwowego obniżenie zużycia tlenu w układzie askorbinian-cytochrom c, co może wskazywać na zahamowanie łańcucha oddechowego na etapie kontrolowanym przez oksydazę cytochromową.
- 5/ Stymulacja oddychania neuronów oznaczanego w obecności bursztynianu w następstwie zatrucia tlenkiem węgla występuje wyłącznie w neuronach o najwyższym metabolizmie tlenowym i jest prawdopodobnie wykładnikiem uszkodzenia struktury błon mitochondrialnych i zaburzeń w oksydacyjnej fosforylacji.
- 6/ Spadek aktywności glikolitycznej mierzonej w warunkach beztlenowych w następstwie zatrucia tlenkiem węgla występuje tylko w niektórych ugrupowaniach neuronów ośrodkowego układu nerwowego. W neuronach o wysokim zużyciu tlenu obniżenie aktywności glikolitycznej może być jednym z czynników warunkujących mniejsze uszkodzenie komórek.

Spis piśmiennictwa

1. Albrecht J.: Effect of carbon monoxide intoxication on individual steps of protein synthesis in rat brain. *J. Neurochem.*, 1973, 21, 1563-1566.
2. Albrecht J., Śmiałek M.: Effect of hypoxia, ischemia and carbon monoxide intoxication on in vitro protein synthesis in neuron and glia enriched fractions from rat brain. *Acta neuropath./ Berl /* 1975, 31, 257-262.
3. Bachelard H.S., Lewis L.D., Pontén U, Siesjö B.K.; Mechanisms activating glycolysis in the brain in arterial hypoxia. *J. Neurochem.* 1974, 22, 395-401.
4. Ball E.G., Strittmatter C.F., Copper O.: The reaction of cytochrome oxidase with carbon monoxide. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 635-647.
5. Barth L.G., Kirk P.L.: *J. Gen. Physiol.* 1942, 25, 663, za pracą: Bicz W., Koj A., Zgliczyński J.M.: Metoda nurków Kartezjusza w badaniach metabolizmu gazowego komórek. *Postępy Bioch.* 1960, 6, 213-237.
6. Bartko D.: *Experimental Brain hypoxia.* Univ. Park Press. Baltimore, London, Tokyo, 1971.
7. Betz A.L., Gilboe D.D., Drewes L.R.: Effects of anoxia on net uptake and unidirectional transport of glucose into the isolated dog brain. *Brain Res.* 1974, 67, 307-316.
8. Bicz W.: Zastosowanie metody Kartezjusza do badania przemiany gazowej komórek zwierząt stałocieplnych. *Acta Bioch. Pol.*, 1956, 3, 183-196.
9. Bicz W.: The influence of carbon dioxide tension on the respiration of normal and leucemic human leucocytes. I. Influence on endogenous respiration. *Cancer Res.* 1960, 20, 184-190.

10. Bicz W., Koj A., Zgliczyński J.M.: Metoda nurków Kartezjusza w badaniach metabolizmu gazowego komórek. Postępy Bioch. 1960, 6, 213-237.
11. Bradford H.F.: Carbohydrate and energy metabolism. Applied Neurochem. Ed. A.N. Davis, Dobbing J. Blackwell Sc. Publ. Oxford and Edinburgh, 1968, 5, 222-250.
12. Brierley J.B.: Cerebral hypoxia. Greenfield's Neuropathology, Ed. W. Blackwood, J.A. Corselis, E. Arnold. Edinburgh. 1976, 43-86.
13. Broniszewska - Ardelt B., Sikorska M.: High-energy phosphate compounds and some glycolytic substrate in rat brain during hypoxia. Neurochem. Res. 1979, w druku
14. Brown A.W., Brierley J.B.: Evidence for early anoxic-ischaemic cell damage in the rat brain. Experientia, 1966, 22, 546-560.
15. Brown A.W. Brierley J.B.: The earliest alterations in rat neurons and astrocytes after anoxia-ischaemia. Acta Neuropath. /Berl./ 1973, 23, 9-22.
16. Brucher J.M.: Neuropathological problems posed by carbon monoxide poisoning and anoxia. Progress in Brain Research. Ed. H. Bour and Mc A. Ledingham, Amsterdam, 1967. 111-127.
17. Cameron I.R., Segal M.B.: The effect on pial arteriole diameter of local changes in potassium concentration. Eur. Neurol. 1972, 6, 100-106.
18. Chance B., Erecińska M., Wagner M.: Mitochondrial responses to carbon monoxide toxicity. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1970, 174 193 204.

19. Chance B., Holmes W., Higgins J.: Localization of interaction sites in multi-component transfer systems: theorems derived from analogues. *Nature*, 1958, 182, 1190-1193.
20. Coburn R.F.: The carbon monoxide body stores. *Ann.N.Y.Acad. Sci.* 1970, 174, 11-22.
21. Cooper D.Y., Schleyer H, Rosenthal O.: Some chemical properties of cytochrome P₄₅₀ and its carbon monoxide compound /P₄₅₀.CO/. *Ann.N.Y. Acad.Sci.* 1970, 174, 205-217.
22. Cooper H.K., Zalewska T, Kawakami S., Hossmann K-A, Kleihues P.: The effect of ischemia and recirculation on protein synthesis in the rat brain. *J. Neurochem.* 1977, 28, 929-934.
23. Cunningham B., Kirk P.L.: *J.Cell Comp. Physiol.*, 1942, 20, 119, za pracą: Bicz W., Koj.A., Zgliczyński J.M.: Metoda nurków Kartezjusza w badaniach metabolizmu gazowego komórek. *Post.Bioch.* 1960, 6, 213-237.
24. Dawes G.S. - Comments about brain circulation, oxygen supply and anoxic survival. Selective vulnerability of the brain in hypoxaemia. Schade J.P., McMenemey W.H. Blackwell, Sci. Publ. Oxford, 1963, 37-40.
25. Dąbaska M., Dydyk L., Liebhardt M., M. Roszkowski I., Szamborski J.: Zmiany w mózgu noworodków w następstwie uszkodzenia zespołu płód-łożysko. *Neuropat. Pol.* 1977, 15, 119-128.
26. Domańska-Janik K.: Doświadczalne niedotlenienie a niektóre zagadnienia tlenowego metabolizmu glukozy w ośrodkowym układzie nerwowym *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 17-43.

27. Duffy T.E., Nelson S.R., Lowry O.H.: Cerebral carbohydrate metabolism during acute hypoxia and recovery, *J. Neurochem.* 1972, 19, 959-977.
28. Dydyk L., Śmiałek M., Dąbwska, M.: Cytochrome oxidase activity and ultrastructure of the giant cells from the rat brain stem following carbon monoxide intoxication. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 389-396.
29. Eastbroock R.W., Franklin M.R., Hildebrandt A.G.: Factors influencing the inhibitory effect of carbon monoxide on cytochrom P - 450 - catalyzed mixed oxidation reactions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1970, 174, 218 - 232.
30. Eklöf B., Siesjö B.K.: The effect of bilateral carotid artery ligation upon acid-base parameters and substrates levels in the rat brain. *Acta Physiol. Scand.* 1972, 86-528-538.
31. Elliott K.A.C.: za Hydénem H. The neuron in The Cell. Eds. Brachet J., Mirsky A.E. New York, Academic Press, 1960, 4, 215-325.
32. Eneström S., Hamberger A.: Respiration and mitochondrial content in single neurons of the supraoptic nucleus. *J. Cell. Biol.* 1968, 38, 483-493.
33. Folbergerová J., Lowry O.H., Passonneau J.V.: Changes in metabolites of the energy reserves in individual layers of mouse cerebral cortex and subjacent white matter during ischemia and anaesthesia. *J. Neurochem.* - 1970, 17, 1155-1162.
34. Folbergerová J., McMillan V., Siesjö B.K.: The effect of moderate and marked hypercapnia upon the energy state and upon the cytoplasmic NADH/NAD⁺ ratio of the brain. *J. Neurochem.* 1972, 19, 2497-2505.

35. Folbergrová J., Ljunggren B., Norberg K, Siesjö B.K.: Influence of complete ischemia on glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates, and associated amino acids in the rat cerebral cortex. *Brain. Res.* 1974, 80, 265-279.
36. Forbes W.H.: Carbon monoxide uptake via lungs. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1970, 174, 72-75.
37. Friede R.L.: Histochemical investigations on succinic dehydrogenase in the central nervous system. I. The postnatal development of brain. *J. Neurochem.* 1959, 4, 101-110.
38. Geiger A. Gombos G., Otzuki S.: The effect of hypoxaemia on the metabolic pattern of the perfused brain on cats. Selective vulnerability of the brain in hypoxaemia. Schade J.P., McMenemey H.W. *Blackwell Sci Publ Oxford*, 1963, 295-304.
39. Ginsberg M.D., Reivich M., Frinak S.: Pyridine nucleotide redox state and blood flow of the cerebral cortex following middle cerebral artery occlusion in the cat. *Stroke*, 1976, 7, 125-131.
40. Green D.E., Fleischer S.: The mitochondrial system of enzymes w *Metabolic Pathways* ed. D.M. Greenberg, Academic Press, New York, London, 1960, 1, 41-96.
41. Graziani G., Guariano A.: Il sistema nervosa centrale nella intossicazione acuta sperimentale da CO. *Fol. Med. Napoli.* 1965, 39, 457-470.
42. Hallervorden J. Spatz H.: za Opalskim A. *Histopatologia układu nerwowego PZWL*, Warszawa, 1949.
43. Hamberger A.: Oxidation of tricarboxylic acid cycle intermediates by nerve cell bodies and glia cells. *J. Neurochem.* 1961, 8, 31-35.

44. Hamberger A.: Differences between isolated neuronal and vascular glia with respect to respiratory activity. *Acta Phys. Scand.* 1963 suppl. 203, 1-58.
45. Hamberger A., Hydén H.: Inverse enzymatic changes in neurons and glia during increased function and hypoxia. *J. Cell Biol.* 1963, 16, 521-525.
46. Hayakawa T., Waltz A.G.: Immediate effects of cerebral ischemia. Evolution and resolution of neurological deficits after experimental occlusion of one middle cerebral artery in unconscious cats. *Stroke*, 1975, 6, 321-327.
47. Härkönen M.H.A., Passonneau J.V., Lowry O.H.: Relationships between energy reserves and function in rat superior cervical ganglion. *J. Neurochem.* 1969, 16, 1439-1450.
48. Hess H.H.: The rates of respiration of neurones and neuroglia in human cerebrum. In: *Regional Neurochemistry* Eds. Kety S., Elkes L. Oxford, Pergamon Press, 1961.
49. Hinzen D.H., Müller U., Sobotka P., Gebert E., Lang R., Hirsch H.: Metabolism and function of dogs brain recovering from longtime ischemia. *Am. J. Physiol.* 1972, 226, 1158-1164.
50. Holter H.: Technique of the Cartesian diver. *C.r.Trav. Lab. Carlsberg. Ser. chim.* 1943, 24, 399-478.
51. Hoppe B.: Obraz zmian strukturalnych i histochemicznych gleju hodowanego in vitro poddanego działaniu tlenku węgla. *Neuropat. Pol.* 1974, 13, 371-385.
52. Hossmann K-A, Lechtape - Grüter H., Hossman V.: The role of cerebral blood flow for the recovery of the brain after prolonged ischemia. *Z. Neurol.* 1973, 204, 281-299.

53. Hydén H.: The chemistry of single neurons. A study with new methods. In. Biochemistry of the developing nervous system. Ed. H. Waelsch. Acad. Press. N.Y. 1955, 358-371.
54. Hydén H, Pigoń A.: A cytophysiological study of the functional relationship between oligodendroglial cells and nerve cells of Deiters nucleus, J.Neurochem. 1960, 6, 57-72.
55. Ibrahim MZM., Poscoe E., Alam S., Miquel J.: Glycogen and phosphorylase activity in rat brain during recovery from several forms of hypoxia. Amer. J.Path. 1970, 40, 403-415.
56. Kapuściński A.: Badanie nad ischemiczno-hypoksyjnym obrzękiem mózgu przy użyciu metod izotopowych. Neuropat. Pol. 1976, 14, 137-142.
57. Kety S.S.: The theory of applications of the exchange of inert gas at the lungs and tissues. Phamacol. Rev. 1951, 3, 1-41.
58. Kety S.S. Theory of blood-tissue exchange and its application to measurement of blood flow. Meth.med.Res., 1960, 8, 228-242.
59. Klekowski R.Z., Szuszkina E.A.: Ernährung, Atmung, Wachstum und Energie-Umformung in Macrocylops albidus /Jurine/ Verh.int. Ver. Limnol. 1966, 16, 399-418.
60. Kobayashi M., Lust W.D., Passonneau J.V.: Concentrations of energy metabolites and cyclic nucleotides during and after bilateral ischemia in the gerbil cerebral cortex. J.Neurochem. 1977, 29, 53-59.
61. Koj. A. Zgliczyński J.M., Bicz W.: Wpływ erytrocytów na oddychanie leukocytów ludzkich. Acta Bioch.Pol. 1958, 5, 177-188.

62. Kolisko A.: Beiträge zur Kenntnis der Blutversorgung der Grosshirnganglien. Wien, lin.Wschr. 1893, 6, 191-195.
63. Korthals J., Mossakowski M.J., Śmiałek M.: Obraz histologiczny i ultrastrukturalny doświadczalnej encefalopatii tlenkowej, Neuropat. Pol. 1973, 11, 278-300.
64. Kozik M.: Histochemical studies on degenerative lesions in neurocytes. Ann. Med.Sec. Pol.Acad. Sc. 1970, 15, 71-97.
65. Kozik M.: Pośmiertlna aktywność enzymów oddechowych w mózgu. XI Dzień Neurochemii Klinicznej. Zielona Góra, 1976.
66. Környey St. Histopatologie und klinische Symptomatologie der anoxisch - vasalen Hirnschädigungen, Akad. Kiadó, Budapest, 1955,.
67. Környey St.: Anoxisch-vasale Hirnschädigung als Komplikation chirurgischer Eingriffe. Stud. Cercet. Neurol. 1960, 5, 265-272.
68. Környey St.: Patterns of CNS vulnerability in CO, cyanide and other poisoning, 1963, Selective vulnerability of the brain in hypoxaemia, 165-176, Blackwell, Sc. Publ. Oxford, 1963.
69. Krebs H.A.: Control of metabolic process. Endeavour, 1957, 16, 125-132.
70. Królikowski J, Steckiewicz C.: Matematyka, wzory, definicje i tablice, 1956, W-wa, Wyd. Kom. 84-85.
71. Lapresle J., Fardeau M.: The central nervous system and carbon monoxide poisoning II. Anatomical study of brain lesions following intoxication with carbon monoxide /22 cases/. Progress in Brain Research. Ed. H.Bour, Mc A. Ledingham, Amsterdam, 1967, 24, 96-110.

72. Lavyne M.H. Moskowitz M.A. Larin F. Brain H³ -catecholamine metabolism in experimental cerebral ischemia. Neurology. Minneap. 1975, 25, 483-485.
73. Levine S.: Anoxic-ischemic encephalopathy in rats, Amer. J. Path. 1960. 36, 1-17.
74. Levy D.E. Duffy T.E.: Cerebral energy metabolism during transient ischemia and recovery in the gerbil. J. Neurochem. 1977, 28, 63-70.
75. Levy D.E., Duffy T.E.: Effect of ischaemia on energy metabolism in the gerbil cerebral cortex J. Neurochem. 1975, 24, 1287-1289.
76. Lindenberg R.: Compression of brain arteries as pathogenic factor for tissue necroses and their areas of predilection. J. Neuropath. exp. Neurol., 1955, 14, 223-243.
77. Lindenberg R.: The pathology of the arterial border zones of the brain. J. Neuropath. exp. Neurol. 1959, 18, 348-349.
78. Lindenberg R.: Patterns of CNS vulnerability in acute hypoxaemia, including anaesthesia accidents. W: Selective vulnerability of the brain in hypoxaemia. Ed. Schadé J.P., McMenemey W.N. Blackwell, Oxford, 1963, 189-209.
79. Linderström-Lang K.: Principle of the Cartesian diver applied to gasometric technique. Nature, London, 1937, 140, 108-118.
80. Linderström-Lang K.: On the theory of the Cartesian diver microrespirometer. C.r.Trav.Lab.Carlsberg.Ser. Chim., 1943, 24, 333-398.
81. Ljunggren B, Norberg K. Siesjö B.K.: Influence of tissue acidosis upon restitution of brain energy metabolism following total ischemia. Brain Res. 1974, 77, 173-186.

82. Long D.M., Mossakowski M.J., Klatzo I.: Glycogen accumulation in spinal cord motor neurons due to partial ischaemia. *Acta Neuropath.* 1972, 20, 335-347.
83. Lust W.D., Mrsulja B.B., Mrsulja B.J.: Putative neurotransmitters and cyclic nucleotides in prolonged ischemia of the cerebral cortex. *Brain Res.* 1975, 98, 394-399.
84. Lust W.D., Passonneau J.V.: Cyclic nucleotides in murine brain: Effect of hypothermia on adenosine 3',5' monophosphate glycogen phosphorylase, glycogensynthetase and metabolites following maximal electroshock or decapitation. *J. Neurochem.* 1976, 26, 11-16.
85. MacMillan V.: The effect of acute carbon monoxide intoxications on the cerebral energy metabolism of the rat. *Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, 1975, 53, 354-362.
86. MacMillan V.: Cerebral carbohydrate metabolism during acute carbon monoxide intoxication. *Brain Res.*, 1977, 121, 271-286.
87. MacMillan V., Siesjö B.K.: Intracellular pH of the brain in arterial hypoxaemia, evaluated with the CO₂ method and from the creatine phosphokinase equilibrium. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 1972, 30, 117-125.
88. Miller J.R., Myers R.E.: Neurological effects of systemic circulatory arrest in the monkey. *Neurology*. Minneap. 1970, 20, 715-724.
89. Mossakowski M.J.: Zaburzenia ukrwienia mózgu w ostrym zatruciu tlenkiem węgla. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 241-248.
90. Mossakowski M.J. Cerebral circulation disturbances in various hypoxic conditions: *Advances in Neurol*, Ed. J. Cervos - Navarro et al Raven Press., New York, 1978, 20, 161-171.
91. Mossakowski M.J. Long D.N. Myers R.E., de Curet H.R., Klatzo I.: Early histochemical changes in perinatal asphyxia. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1968, 1968, 27, 500-516.

92. Mossakowski M.J., Zelman I.B.: Odkładanie się glikogenu w mózgu jako wykładnik zaburzeń przemiany glukozy w następstwie działania różnych czynników uszkadzających. *Neuropat. Pol.* 1979, 17, 85-96.
93. Mrsulja B.B., Lust W.D., Mrsulja B.J., Passonneau J.V., Klatzo I.: Post-ischemic changes in certain metabolites following prolonged ischemia in the gerbil cerebral cortex, *J. Neurochem.* 1976, 26, 1099-1103.
94. Mrsulja B.B., Mrsulja B.J., Ito U., Walker Jr. J.T., Spatz M., Klatzo I.: Experimental cerebral ischemia in Mongolian Gerbils. II. Changes in carbohydrates. *Acta Neuropath. /Berl/.* 1975, 33, 91-103.
95. Müller U., Isselhard W., Hinzen D.H., Geppert E.: Regionaler Energiestoffwechsel in Kaninchengehirn während kompletter Ischämie in Normothermie. *Pflüger Arch. ges. Physiol.* 1970, 320, 168-170.
96. Nilsson B., Norberg K., Siesjö B.K.: Biochemical events in cerebral ischemia *Br. J. Anaesth.* 1975, 47, 751-760.
97. Norberg K., Quistorff B., Siesjö B.K.: Effect of short-term hypoxia on energy metabolism in the cerebral cortex of unanaesthetized rats. In: K. Norberg /Ed/ *Cerebral Metabolic Changes induced by Hypoxia, Hypoglycemia and Variations in Arterial Carbon Dioxide Tension*, Thesis, University of Lund, 1975.
98. Norberg K., Siesjö B.K.: Quantitative measurement of blood flow and oxygen consumption in the rat brain. *Acta Physiol. Scand.* 1974A, 91, 154-164.

99. Norberg K. Siesjö B.K.: Metabolism of oxygen, glucose, lactate and pyruvate in the rat brain in situ. *J. Neurochem.* 1974B, 22, 1127-1129.
100. Norberg K. Siesjö B.K.: Cerebral metabolism in hypoxic hypoxia. I. Pattern of activation of glycolysis: A re-evaluation. *Brain Res.* 1975, 86, 31-44.
101. Oman S. Brzin M.: The magnetic diver microgasometr. *Anal. Biochem.* 1972, 45, 112-127.
102. Osetowska E.: Encefalopatia - CO. *Neuropat. Pol.* 1964, 2, 159-172.
103. Pearse A.G.E.: *Histochemistry*, 1960, Boston, Little, Brown.
104. Potter V.R.: The homogenate technique In; *Manometric Techniques*. Ed. W.W. Umbreit. R.H. Burris, Stauffer J.F. Burgess, Minneapolis, 1957, 170-187.
105. Preziosi T.J. Lindenberg R. Levy D, Christensen M.: An experimental investigation in animals of the functional and morphologic effects of single and repeated exposure to high and low concentrations of carbon monoxide, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1970, 174, 369-384.
106. Rapaport J.M. Müller M.: The influence of methylene blue on the reticulocyte. *Eur. J. Bioch.* 1974, 46, 335-340.
107. Rap Z.M., Kapuściński A., Sikorska M.: Ocena stanu bariery krew-mózg i zawartość wody w mózgu w ostrym doświadczalnym zatruciu tlenkiem węgla. *Neuropat. Pol.*, 1974, 12, 403-412.
108. Raybourn M.S., Cork Ch., Schimmerling W., Tobias C.A.: An in vitro electrophysiological assessment of the direct cellular toxicity of carbon monoxide. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1978, 46, 769-779.

109. Rolleston F.S.: A theoretical background to the use of measured concentrations of intermediates in study of the control intermediate metabolism In. B.K. Horecker and E.R. Stadtman. Current topics in cellular regulation Vol. 5. Acadm Press. N.Y. 1972, 47-75.
110. Romanowa H.P.: Patologoanatomiczeskije izmenenyja w gołownom mozgu sobak posle terminalnych sostojanii wyzwanymy nych ostroj krwopotierej i otrawieniem okisju uglewoda. Awtoreferat dissertacji na soiskanie uczesnaj stepani kandidata medicinskih nauk, Moskwa, 1959.
111. Rose S.P.R.: The biochemistry of neurons and glia. In Applied Neurochemistry. Eds. A.N. Davison, J. Dobbing, Blackwell Scientific Publ. Oxford, Edinburgh, 1968.
112. Rymar J.: Nowotwory, 1958, 8, 221. za pracą: Bicz W. Koj. A. Zgliczyński J.M.: Metoda nurków Kartezjusza w badaniach metabolizmu gazowego komórek. Post. Bioch. 1960, 6, 313-237.
113. Saz H.: Facultative anaerobiosis in the invertebrates: pathways and control system. Amer. Zoologist, 1971, 11, 125-135.
114. Schneider M.: Critical blood pressure in the cerebral circulation. In Selective vulnerability of the brain in hypoxaemia. Ed. Schade J.P. McMenemey W.H. Blackwell, Sci.Publ.Oxford, 1963, 7-20.
115. Schwedenberg T.H.: Leucoencephalopathy following carbon monoxide poisoning. J.Neuropath.exp. Neurol. 1959, 18, 597-608.
116. Siesjö B.K., Johannsson H., Ljunggren B., Norberg K.: Brain dysfunction in cerebral hypoxia and ischemia. In: Brain Dysfunction in Metabolic Disorders. Ed. P.Plum, Ras. Publ. Assoc.Nerv. Ment.Dis.vol. 53, Raven Press N.Y. 1974, 75-112.

117. Sikorska M.: Aktywność cykazy adenyłowej w mózgu szczura w warunkach niedotlenienia, *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 185-195.
118. Sikorska M.: Metabolizm cyklicznego adenozyno- 3',5' mono-fosforanu w mózgu szczura w warunkach niedotlenienia, *Neuropat. Pol.* 1979, w druku.
119. Sikorska M. Bicz W., Śmiałek M., Mossakowski M.J.: ATP, ADP, AMP concentration in rat brain following carbon monoxide intoxication and in experimental ischemia. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 387-395.
120. Sikorska M. Gorzkowski B., Szumańska G., Śmiałek M.: Incorporation of ^{14}C - glucose into glycogen and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in rat brain following carbon monoxide intoxication. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 397-404.
121. Sikorska M., Śmiałek M.: Glycogen level and UDPglucose: glycogen -alfa -4 - glucosyltransferase /EC 2.4. 1.11/ activity in the brains of rabbits after experimental circulatory hypoxia. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 655-664.
122. Slater E.C.: The measurement of the cytochrome oxidase activity of enzyme preparations. *Biochem. J.* 1949A, 44, 305-318.
123. Slater E.C.: A comparative study of the succinic dehydrogenase - cytochrom c system in heart muscle and in kidney. *Bioch.J.* 1949B, 45, 1-8.
124. Spatz M., Go G.K. Klatzo I.: The effect of ischemia on the brain uptake of ^{14}C - glucose analogues and ^{14}C -sucrose, In. J. Cervos - Navarro. Ed. *Pathology of Cerebral Microcirculation*, Walter de Gruyter, Berlin, 1974, 362-366.

125. Spatz M., Klatzo I.: Pathological aspects of brain transport phenomena. In G. Levi, L. Battistin and A.J. Lajtha /Ed. Transport Phenomena in the Nervous System, Plenum Press, N.Y. 1976, 479-495.
126. Spielmeyer W.: Zur Pathogenese örrlich electiver Gehirnveränderungen. Z. Neur. 1925, 99, 757-789.
127. Szumańska G.: Obraz histochemiczny mózgu szczura w ostrym zatruciu tlenkiem węgla. Neuropat. Pol. 1973, 11, 301-314.
128. Szumańska G., Sikorska M., Gadamski R.: Zachowanie się amin katecholowych w mózgu szczura w następstwie zatrucia tlenkiem węgla. Neuropat. Pol. 1976, 14, 75- 84.
129. Śmiałek M.: Cytochrome oxidase activity in isolated giant cell of the reticular formation from the rat brain stem following carbon monoxide intoxication /Cartesian micro- diver technique/ Neuropat. Pol. 1974, 12, 397-401.
130. Śmiałek M.: Respiratory activity of isolated neurons from the rat central nervous system following carbon monoxide intoxication /Cartesian micro-diver technique/. Neuropat. Pol. 1975, 13, 381-388.
131. Śmiałek M.: Aktywność glikolityczna izolowanych neuronów ośrodkowego układu nerwowego szczura po zatruciu tlenkiem węgla. /Metoda mikronurka Kartezjusza/ Neuropat. Pol. 1976, 14, 289-300.
132. Śmiałek M.: Aktywność oddechowa w układzie askorbinian - cytochrom c neuronów kory amonalnej chomika mongolskiego /Meriones unquiculatus/ w doświadczalnym niedokrwieniu mózgu. Neuropat. Pol. 1977, 14, 169-181.

133. Śmiałek M., Hamberger A.: The effect of moderate hypoxia and ischemia on cytochrome oxidase activity and protein synthesis in brain mitochondria. *Brain Res.* 1970. 17, 369-371.
134. Śmiałek M., Kraśnicka Z.: Cytochrome oxidase activity in isolated sensory neurons of spinal root ganglia from chick embryo tissue culture in experimental anoxia. *Excerpta Med. Amst. Akad. Kiadó Budapest*, 1975, 593-596.
135. Śmiałek M., Sikorska M., Bicz W., Mossakowski M.J.: UDPglucose: glycogen - alfa - 4 - glucosyltransferase /EC 2.4.1.11/ and 1,4 - glucan: orthophosphate glucosyltransferase /EC 2.4. 1.1./ activity in rat brain in experimental ischemia. *Acta neuropath. /Berl./* 1971, 19, 242-248.
136. Śmiałek M., Sikorska M., Korthals J. Bicz W. Mossakowski M.J.: The glycogen content and its topography and UDPglucose: glycogen - alfa - 4- glucosyltransferase /EC 2.4.1.11/ activity in rat brain after experimental carbon monoxide intoxication. *Acta neuropath /Berl./* 1973, 24, 222-231.
137. Tashiro S.: *Am. J. Physiol.* 1913, 32, 137 za pracą Bicz W., Koj. A., Żgliczyński J.M.: Metoda nurków Kartezjusza w badaniach metabolizmu gazowego komórek. *Post. Bioch.* 1960, 6, 213-237.
138. Tashiro S.: *J. Biol. Chem.* 1914, 18, 329. za pracą Bicz W. Koj. A., Zgliczyński J.M.: Metoda nurków Kartezjusza w badaniach metabolizmu gazowego komórek, *Post. Bioch.* 1960, 6, 213-237.
139. Thews G.: Implications to physiology and pathology of oxygen diffusion at the capillary level. In. *Selective vulnerability of the brain in hypoxaemia.* Schadé J.P., McMenemy W.H., Blackwell. Sci Publ., Oxford, 1963, 27-35.

140. Thunberg T. Akand. Arch. f. Physiol. 1905. 17, 74, za pracą Bicz W., Koj.A., Zgliczyński J.M.: Metoda nurków Kartezjusza w badaniach metabolizmu gazowego komórki, Post. Bioch. 1960, 6, 213-237.
141. Vogt C.u O.: Erkrankungen der Grosshirnrinde in Lichte der Topistik Patoklise und Pathoarchitektonik. J.f. Psychol. u. Neurol. 1933, 28, 1-21.
142. Wade J.G., Amtorp, O., Sörensen S.C.: Role of increase potassium concentration in brain interstitial fluid. Arch. Neurol. 1975, 32, 381-384.
143. Wartburg O.: Biochem. Zeit. 1924, 152, 51, za pracą: Bicz W., Koj A., Zgliczyński J.M.: Metoda nurków Kartezjusza w badaniach metabolizmu gazowego komórek. Postępy Bioch. 1960, 6, 213-237.
144. Weinreich R., Ritzl F., Feinendegen L.E., Schnippering H.G., Stöcklin G.: Fixation, retention and exhalation of carrier-free ¹¹C-labeled carbon monoxide by man. Rad. and Environm. Biophys. 1975, 12, 271-280.
145. Welsh F.Am, O'Connor M.J., Langfitt T.W.: Regions of cerebral ischemia located by pyridine nucleotide fluorescence. Science, 1977, 198, 951-953.
146. Whitehead T.P., Worthington N.: The determination of carboxyhemoglobin. Clin. Chir. Acta. 1961, 6, 356-358.
147. Wierzba T.: Wpływ niedotlenienia na mikrokrążenie w mózgu szczura. Neuropat. Pol. 1977, 15, 183-191.
148. Yamaguchi T., Waltz A.G., Okazaki H.: Hyperemia and ischemia in experimental infarction. Correlation of histopathology and regional blood flow. Neurology, Minneap. 1971, 21, 565-578.

149. Yanagihara T.: Experimental Stroke in Gerbils: Correlation of clinical, pathological and electroencephalographic findings and protein synthesis. *Stroke*, 1978, 9, 155-159.
150. Zander R., Schmidt, Schönbein H.: Intracellular mechanisms of oxygen transport in flowing blood, *Resp. Physiol.* 1973, 19, 279-289.
151. Zelman I.B., Mossakowski M.J.: Some aspects of the pathomechanism of nerve tissue lesions in acute carbon monoxide intoxication. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 375-380.
152. Zeman W.: Histochemical and metabolic changes in brain tissue after hypoxaemia. In *Selective vulnerability of the brain in hypoxaemia*. Schädé J.P. McMenemey W.H., Blackwell, Sci. Publ. Oxford, 1963, 327-438.
153. Zervas N.T., Hori H., Negora M.: Reduction in brain dopamine following experimental cerebral ischemia. *Nature*, 1974, 247, 283-284.
154. Zeuthen E. Cartesian diver balance weighting reduced weights /RW/ with an accuracy of $\pm 0,01$. *C.R. Lab. Carlsberg. Ser. chim.* 1948, 26, 243-266.
155. Zeuthen E.: Growth as related to the cell cycle in single cell cultures of *Tetrahymena piriformis*. *J.Embryol. exp. Morph.*, 1953, 1, 239-249.
156. Zülch J.: Magdeldurchblutung an der Grenzzone zweier Gefassgebiete als Ursache bisher ungeklärter Rückenmarkschädigungen. *Dtsch.Ztschr.f. Nervenk.* 1954, 172, 81-101.
157. Zülch J.: On circulatory disturbances in borderline zones of cerebrum and spinal cord. *Proc. III Intern. Congr. Neurol. Excerpta Med.* 1955, 894-895.