

Zakład Neurofizjologii  
Instytut - Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
Polskiej Akademii Nauk  
w Warszawie

BADANIA ŚRODOWISKA TLENOWEGO TKANEK METODĄ ROZCIEŃCZANIA  
WSKAŹNIKÓW Z UŻYCIEM STABILNEGO IZOTOPU TLENU,  $^{18}\text{O}$

PAWEŁ GRIEB

Praca na stopień doktora habilitowanego nauk przyrodniczych

Warszawa, 1986



Niniejsza rozprawa jest oparta na wynikach badań prowadzonych w latach 1979-1983 w Department of Physiology, University of Pennsylvania School of Medicine w Filadelfii, USA. Wyniki te wykorzystane zostały w następujących publikacjach:

1. P. Grieb, R.E. Forster, P.C. Pape /1983/ Oxygen indicator-dilution curves of the canine cerebral circulation. Adv. Exp. Med. Biol. 159: 103-117.
2. P.C. Pape, R.E. Forster, P. Grieb, C.W. Goodwin, S. Nioka, L. Labatte /1983/ Distribution of  $^{18}\text{O}_2$ ,  $\text{C}_2\text{H}_2$  and tritiated water /THO/ in dog skeletal muscle studied by indicator dilution. Fed. Proc. 42: 487.
3. P. Grieb, R.E. Forster, D. Strome, C.W. Goodwin, P.C. Pape /1985/  $\text{O}_2$  exchange between blood and brain tissues studied with  $^{18}\text{O}_2$  indicator dilution technique. J. Appl. Physiol. 58: 1929-1941.
4. P. Grieb, P.C. Pape, R.E. Forster, C.W. Goodwin, S. Nioka, L. Labatte /1985/ Oxygen exchanges between blood and resting skeletal muscle: a Shunt-Sink hypothesis. Adv. Exp. Med. Biol. 191: 309-322.

Streszczenie rozprawy zostało opublikowane w czasopiśmie Kosmos, 1985, 2: 269-286.



	Strona
Wstęp .....	1
1. Środowisko tlenowe tkanek .....	4
1.1. Metody badawcze .....	4
1.1.1. Pomiaru bezpośrednie .....	5
1.1.2. Metody pośrednie /raport konsumenta/ .	7
1.1.3. Metody uzupełniające .....	13
1.2. Charakterystyka środowiska tlenowego tkanek - wybrane problemy .....	18
1.2.1. Normoksja i hipoksja tkankowa .....	20
1.2.2. Tkankowe bariery dyfuzyjne dla tlenu .	22
2. Metody rozcieńczania wskaźników: podstawy teore- tyczne i zasady interpretacji wyników .....	24
2.1. Teoria średnich czasów tranzytu i zasada objętości centralnej .....	32
2.2. Krzywe ekstrakcji i ich interpretacja: przepuszczalność włóściwkowa, bariery dyfuzyjne, heterogenność tkankowa .....	40
2.3. Zastosowanie metody rozcieńczania wskaźników do tlenu: założenia pracy .....	47
3. Metody pomiaru krzywych rozcieńczania $^{18}\text{O}_2$ i wskaźników odniesienia .....	54
3.1. Znakowanie krwi .....	56
3.2. Pobieranie próbek .....	59
3.3. Pomiar żylnego profilu wskaźnika tlenowego przy pomocy spektrometrii masowej .....	61
3.4. Krzywe odniesienia i ich normalizacja .....	68
3.5. Masa wskaźników pobierana przez układ próbku- jący, średnie czasy tranzytu i krzywe ekstrakcji .....	71



4. Krzywe rozcieńczenia tlenu w krążeniu mózgowym ...	72
4.1. Metody .....	72
4.2. Wyniki .....	75
4.3. Dyskusja .....	81
4.3.1. Procesy nie związane z włóściwkowo- tkankową wymianą $^{18}\text{O}_2$ .....	81
4.3.2. Mechanizm separacji krzywej tlenowej od krzywej odniesienia .....	90
4.3.3. Tkankowa przestrzeń dystrybucji tlenu a środowisko tlenowe tkanek .....	97
4.3.4. Model matematyczny wymian $^{18}\text{O}_2$ między krwią a tkanką .....	99
4.3.5. Średnie wewnątrzkomórkowe $\text{P}_{\text{O}_2}$ w mózgu: limity i interpretacja fizjologiczna .	104
5. Krzywe rozcieńczenia tlenu w krążeniu mięśniowym .	109
5.1. Metody .....	111
5.1.1. Kontrola stopnia uszkodzenia badanego preparatu .....	114
5.1.2. Rejestracja krzywych rozcieńczenia swobodnie dyfundujących wskaźników metabolicznie inertnych .....	115
5.2. Wyniki .....	120
5.2.1. Wyniki oparte na integracji i ekstrapolacji krzywych rozcieńczenia .	127
5.2.2. Krzywe ekstrakcji tlenu- $^{18}$ i inertnych wskaźników swobodnie dyfundujących .....	131



5.3. Dyskusja .....	135
5.3.1. Przewidywana i wyznaczona tkankowa przeźren dystrybucji tlenu .....	137
5.3.2. Rola mioglobiny w transporcie tlenu do mitochondriów .....	140
5.3.3. Mięśniowe krzywe rozcieńczenia wskaźników jako odbicie heterogenności ukrwienia tkanek .....	147
5.3.4. Model "Przeciek-Odpływ" środowiska tlenowego tkanek mięśniowych w spoczynku. Interpretacja krzywych rozcieńczenia znakowanego tlenu .....	159
5.3.5. Porównanie trzech modeli środowiska tlenowego tkanek mięśniowych .....	163
Piśmiennictwo .....	173



## W S T Ę P

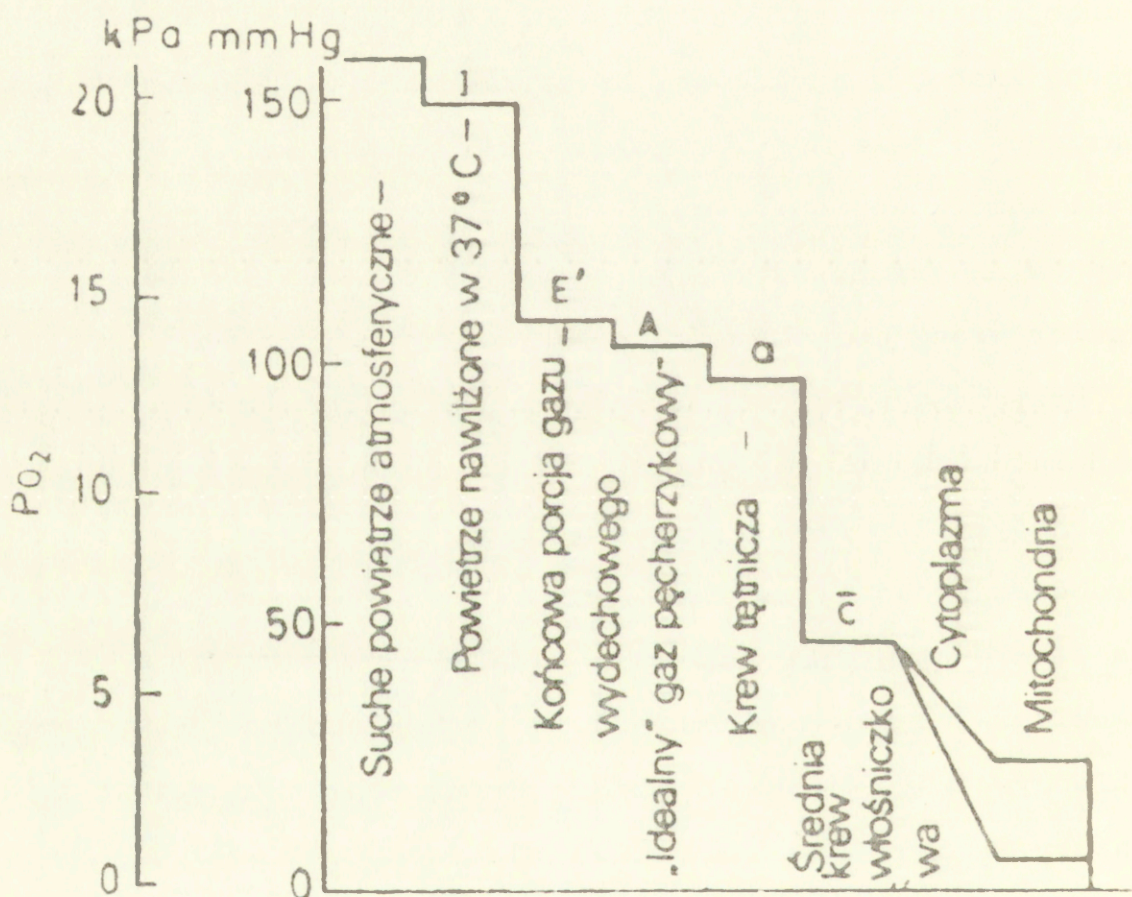
Badania transportu tlenu w organizmie, środowiska tlenowego tkanek i metabolicznych funkcji tlenu zajmują w fizjologii szczególnie ważne miejsce. Sieć szlaków metabolicznych w ustroju jest niezwykle bogata. W reakcjach katabolicznych utlenianiu mogą ulegać cukry, tłuszcze, alkohole, ketony, a nawet białka, zależnie od dostępności substratu i uwarunkowań funkcjonalnych /enzymy tkankowe/. Natomiast charakterystyczną cechą znacznej większości zwierząt, oraz znacznej większości narządów i tkanek zwierzęcych jest ogromna zależność energetyki komórkowej od tlenu. W niektórych przypadkach /np. mózg ssaków lądowych, w tym człowieka/ zależność ta przybiera charakter wręcz dramatyczny.

Przyczyną wyselekcjonowania w procesie ewolucji tlenowego schematu utleniania substratów jako podstawowego procesu energetyki komórkowej jest nieporównywalna z żadnym innym procesem wydajność energetyczna. Oparcie energetyki tkankowej na tlenie otworzyło nowe perspektywy rozwoju ewolucyjnego, umożliwiając powstanie sprawnych, lecz jednocześnie energochłonnych układów przetwarzania informacji, kontroli temperatury, ruchu, itp. Jednocześnie powstał wydajny i niezawodny układ transportu i dystrybucji tlenu. Układ ten jest przedstawiany schematycznie jako tzw. "kaskada tlenowa" /ryc. 1/.

U kręgowców lądowych "kaskada tlenowa" jest złożona z czterech głównych etapów: transportu tlenu z atmosfery do wnętrza pęcherzyków płucnych, dyfuzji tlenu z powietrza pęcherzykowego do krwi, transportu utlenowanej krwi do tkanek,



oraz dyfuzji tlenu z krwi włosniczkowej do tkankowych miejsc jego zuzywania /głównie mitochondriów/. Pierwsze trzy etapy są obecnie w miarę dobrze poznane. Nie można tego powiedzieć o ostatnim etapie, pomiędzy krwią a mitochondriami.



Ryc. 1. "Kaskada tlenowa" /Schemat wg Nunna, 1979/.



Tematem niniejszej rozprawy jest metoda badania wymiany tlenu pomiędzy krwią a tkankami przy pomocy stabilnego izotopu tlenu,  $^{18}\text{O}$ . Metoda ta jest adaptacją techniki rozcieńczenia wskaźników, stosowanej od ponad stu lat do badań różnych aspektów wymiany substancji pomiędzy krwią a tkankami.

Pierwsza część pracy zawiera przegląd metod badania środowiska tlenowego tkanek, oraz wybranych problemów dotyczących jego charakterystyki. W drugiej części omówione są techniki rozcieńczenia wskaźników. Polegają one na badaniu kinetyki wymiany substancji wskaźnikowych pomiędzy krwią i tkankami. Rozpatrzone są również teoretyczne podstawy użycia znakowanego tlenu jako substancji wskaźnikowej do badania środowiska tlenowego tkanek. Część trzecia poświęcona jest opisowi technik doświadczalnych rejestracji krzywych rozcieńczenia tlenu- $^{18}$  przy pomocy spektrometrii masowej, wraz z odpowiednimi krzywymi odniesienia. Pozostałe dwie części przedstawiają wyniki doświadczeń, przeprowadzonych przy pomocy opisanej metody na mózgu i na preparacie kończyny tylnej psa. Przedstawione są również wnioski dotyczące środowiska tlenowego badanych narządów, które można sformułować na podstawie uzyskanych wyników.



## 1. ŚRODOWISKO TLENOWE TKANEK

Termin ten jest w niniejszej pracy używany do określenia przestrzennego rozmieszczenia stężeń i ciśnień parcjalnych tlenu w tkankach oraz kształtujących je procesów fizycznych, chemicznych i fizjologicznych.

Kompletny i spójny opis oraz charakterystyka środowiska tlenowego tkanek są możliwe jedynie w oparciu o modele matematyczne. Pierwszy i w zasadzie do chwili obecnej aktualny model tego typu sformułował August Krogh /1919/. Natomiast wyniki doświadczalne, zgromadzone w ogromnej ilości przy pomocy bardzo różnorodnych metod nie są spójne ani konkluzywne.

Poniżej omówione są metody badania i wnioskowania o środowisku tlenowym tkanek, oraz wybrane problemy, których rozwiązanie przy pomocy dotychczas stosowanych technik doświadczalnych nie wydaje się możliwe.

### 1.1. Metody badawcze

Doświadczalne badania środowiska tlenowego tkanek in vivo przeprowadzane są przy pomocy dwóch typów metod. Typ pierwszy polega na bezpośrednim pomiarze tlenu w tkance. Typ drugi, który można za Chancem, Hasselgrovem i Barlowem /1981/ określić mianem "raportu konsumenta", polega na badaniu parametrów metabolizmu tkankowego zależnych od tlenu. Uzupełnieniem badań in vivo są badania in situ, przeprowadzane na narządach perfundowanych roztworami pozbawionymi hemoglobiny, oraz badania in vitro, na skrawkach tkankowych, izolowanych komórkach, czy



mitochondriach. W ten sposób uzyskuje się informacje, których często nie można uzyskać badając narządy i tkanki in vivo, ze względu na stopień komplikacji badanego układu lub trudności techniczne. Dalszym uproszczeniem badanej rzeczywistości są badania modelowe, które służyć mogą do przybliżonego wyznaczania niektórych parametrów środowiska tlenowego które nie mogą być bezpośrednio zmierzone, oraz ułatwiają interpretację wyników które nie są intuicyjnie oczywiste.

### 1.1.1. Pomiary bezpośrednie

Podstawową metodą jest użycie elektrod tlenowych /zmodyfikowanych elektrod polarymetrycznych Clarka/. Stosowane są różnych rozmiarów elektrody, od makro umieszczanych na powierzchni badanego narządu /np. Cotev, Lee i Severinghaus, 1968/, do mikroelektrod umieszczanych w przestrzeni śródtkankowej badanego narządu /np. Silver, 1973/, lub we wnętrzu komórek /Whalen, 1971/. Sygnał z elektrody jest proporcjonalny do, i może być kalibrowany w jednostkach ciśnienia parcjalnego tlenu w otoczeniu jej czynnej powierzchni.

Użycie tkankowych mikroelektrod jest metodą inwazyjną i prowadzi do uszkodzenia tkanek i zmian w mikrokrążeniu. Niektórzy badacze implantują mikroelektrody chronicznie /np. Bourgain i wsp., 1981/. Wówczas rejestrować można  $P_{O_2}$  z jednego, a co najwyżej kilku punktów w tkance. Już pierwsze pomiary /Davies i Bronk, 1951/ wykazały, że w tkankach  $P_{O_2}$  zmienia się wraz z odległością od włóscniczki zaopatrującej



tkankę w krew. Było to doświadczalne potwierdzenie teoretycznych przewidywań Krogha /1919/. Kształty i znaczenie fizjologiczne tych gradientów, szczególnie zaś ich relacja do geometrii mikrokrążenia tkankowego są w dalszym ciągu obiektem intensywnych badań i dyskusji /np. Grunewald i Sowa, 1977/.

Ze względu na gradienty tlenu w tkance charakterystyka środowiska tlenowego przy pomocy badań mikroelektrodowych opierać się musi na serii pomiarów w wielu punktach i przedstawieniu danych w postaci histogramu częstości występowania poszczególnych zakresów ciśnień parcjalnych tlenu w tkance.

Wspomnieć należy o innych niż elektrodowe metodach oceny tkankowego  $P_{O_2}$ . Spektrometria masowa in vivo polega na implantacji sond spektrometrycznych do tkanki /Seylaz i Pinard, 1979/. Umożliwia ona rejestrację średniego  $P_{O_2}$  z śródtkankowej powierzchni rzędu  $1 \text{ mm}^2$ . Nie jest metodą popularną, ze względu na trudności techniczne /patrz także str. 55 /.

O środowisku tlenowym tkanek można również wnioskować na podstawie pomiaru tlenu w przestrzeniach, w których  $P_{O_2}$  kształtowane jest przez środowisko tlenowe otaczających tkanek. Przykładem są tu badania tlenu w płynie mózgowo-rdzeniowym /np. Jankowska i Grieb, 1981/ lub w żółci /Watkins i Johnson, 1978/. W interpretacji tego typu wyników uwzględniać należy, niezbyt dobrze zwykle znane, mechanizmy kształtujące  $P_{O_2}$  w badanej przestrzeni czy płynie ciała.

Zupełnie odmienną metodą jest badanie tłumienia fluorescencji kwasu pyrenemasłowego, PBA. Potencjalną możliwość użycia PBA jako nieinwazyjnej sondy stężenia tlenu w roztworach zasugerowali Vaughn i Weber /1970/. Stwierdzili oni, że



wodny roztwór tej substancji pod wpływem światła o długości fali 328-345 nm fluoryzuje w regionie ultrafioletu /375-400 nm/. Obecność tlenu w roztworze ilościowo tłumi sygnał fluorescencji PBA, zgodnie z równaniem Sterna-Vollmera:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K \cdot [O_2] \quad [1.1.]$$

gdzie  $F_0$  jest wielkością sygnału dla zerowego stężenia tlenu, a  $K$  - stałą, którą wyznacza się doświadczalnie.

Longmuir i Knopp /1972/ użyli PBO do pomiaru  $[O_2]$  w zawiesinach hepatocytów, wykazując brak wpływu tej substancji na metabolizm tlenu. Wniosek ten potwierdzili również Jobsis, Mitnick i Snow /1976/, rejestrując sygnały optyczne izolowanych mitochondriów serca inkubowanych z PBA.

Do badań in vivo PBA wykorzystali po raz pierwszy Jobsis i Mitnick /1976/ badając korę mózgową, oraz Longmuir i Knopp /1976/ badając mięśnie. Wyniki badań z użyciem PBA prowadzą niektórych autorów do daleko idących wniosków dotyczących komórkowego środowiska tlenowego /patrz str. 14 /.

#### 1.1.2. Metody pośrednie /raport konsumenta/

Najprostszą metodą tego typu jest pomiar zużycia tlenu przez badany narząd in vivo /metoda "wejście-wyjście", czyli "czarnej skrzynki"/. Wymaga to pomiaru przepływu krwi i tętniczo-żylnej różnicy tlenu. Klasycznym przykładem takiego podejścia jest praca Stainsby'ego i Otisa /1964/. Autorzy ci badali konsumpcję tlenu przez izolowany preparat mięśnia szkieletowego w zależności od zmian przepływu krwi i tętniczego



stężenia tlenu. Przyjęli oni, że spadek zużycia  $O_2$  wyznacza krytyczne warunki dostawy tlenu. Wartości krytyczne dla mięśnia w wysiłku osiągnane były przy niższych żylnych  $P_{O_2}$  niż w stanie spoczynku, co może być konsekwencją zmiany ilości perfundowanych włóścińeczek.

W przypadku narządów krytycznie zależnych od tlenu, głównie mózgu, dodatkowe informacje o bilansie tlenowym uzyskać można z pomiarów tempa metabolizmu glukozy i mleczanu, wskazujących na względny udział szlaków przemian tlenowych i bez-tlenowych w metabolizmie energetycznym /oxygen-glucose index, lactate-glucose index; Cohen i wsp., 1967/.

Metodą umożliwiającą wniknięcie we wnętrze "czarnej skrzynki" i lokalny pomiar tempa zużycia tlenu przez mózg jest technika wykorzystująca sztuczny, pozytronowo-radioaktywny izotop  $^{15}O$ , o czasie półrozpadu 123 s. Używany jest on w dwóch modelach doświadczalnych. Pierwszy polega na dotętnicznym impulsowym wstrzykiwaniu krwi znakowanej tlenem-15 i rejestracji dynamiki wychodzenia izotopu z tkanek. Otrzymuje się wówczas krzywą która, po korekcji na fizyczny rozpad izotopu, ma charakter bieksponecjalny. Jej szybka składowa odzwierciedla odpływ wraz z krwią niezmetabolizowanego radioaktywnego tlenu, a składowa wolna - wychodzenie z tkanki "metabolicznej" wody / $H_2^{15}O$ /. Ekstrapolując sygnał "metabolicznej wody" do czasu wstrzyknięcia izotopu wyznacza się metaboliczną ekstrakcję tlenu przez tkankę /Ter-Pogossian i wsp., 1970/. Drugim modelem, który znalazł zastosowanie w tomografii pozytronowej, jest model równowagowy. Polega on na ciągłym podawaniu do oddychania  $^{15}O_2$  i, w następnym cyklu



pomiarowym,  $H_2^{15}O$ . W obu przypadkach po krótkim czasie dochodzi w badanym narządzie do równowagi pomiędzy aktywnością  $^{15}O$  dochodzącą wraz z krwią tętniczą, aktywnością znikającą w wyniku fizycznego rozpadu i aktywnością wychodzącą z krwią żylną. Różnica sygnałów uzyskanych w wyniku pomiarów podczas inhalacji  $^{15}O_2$  i  $H_2^{15}O$  ilościowo charakteryzuje tempo metabolizmu tlenu w badanym regionie tkanki /Subramanyam i wsp., 1978; Frackowiak i wsp., 1980/.

W przypadkach narządów o wysokim uzależnieniu metabolizmu energetycznego od tlenu pośrednie wnioski dotyczące bilansu tlenowego tkanek wyciągać można na podstawie pomiarów komórkowych stężeń związków wysokoenergetycznych. Odnosi się to szczególnie do mózgu /Siesjo, 1978/. Badanie tego typu przeprowadzane klasycznymi metodami biochemicznymi wymaga próbkowania tkanek i ma ograniczoną użyteczność. Możliwości nieinwazyjnych badań stanu energetyki tkankowej pojawiły się w wyniku rozwoju techniki magnetycznego rezonansu jądrowego, NMR.

Technika ta wykorzystuje własności jąder atomowych o nieparzystej liczbie nuklidów, w tym  $^{31}P$ , głównego naturalnego izotopu fosforu. Oddziaływanie na takie jądra umieszczone w stałym polu magnetycznym falami radiowymi o odpowiednio dobranej częstotliwości prowadzi do absorpcji energii i przejścia jąder ze stanu niskoenergetycznego do stanu wysokoenergetycznego /wzbudzenia/. Częstotliwość rezonansowa dla danego jądra zależy od natężenia pola magnetycznego działającego na to jądro. W spektroskopii NMR wykorzystuje się mikrozaburzenia pola magnetycznego wprowadzane przez środowisko molekularne badanych jąder. Ponieważ w tkance jądra  $^{31}P$  znajdują się



w różnych typach /populacjach/ cząsteczek, to po umieszczeniu próbki w jednorodnym polu magnetycznym na jądra znajdujące się w różnych typach cząsteczek oddziałują pola o nieco różnym natężeniu. Po wzbudzeniu jąder częstotliwością rezonansową ich rotacja w polu magnetycznym indukuje prąd w cewce detekcyjnej, działającej na zasadzie prądnicy. Używając impulsowego pola radiowego obserwować można powrót wzbudzonych jąder do stanu podstawowego, przy czym emitowana częstotliwość różni się od częstotliwości pobudzającej o wartość rzędu  $\pm 20$  części na milion. Różnica ta wynika z wspomnianych mikrozaburzeń pola i jest charakterystyczna dla poszczególnych typów cząsteczek. W ten sposób można mierzyć m.in. stężenia ATP i fosfokreatyny in vivo, "licząc spiny" /Ackerman i wsp., 1980; Chance, Eleff i Leigh, 1980; Meyer, Kushmerick i Brown, 1982/.

Kolejną grupą pośrednich metod badania środowiska tlenowego komórek są sondy optyczne stanu redoks pigmentów /enzymów i koenzymów/ komórkowych, a głównie mitochondrialnych. Prototypem technik tego typu był Millikan /1937/, który mierzył spektrofotometrycznie utlenowanie mioglobiny in situ /patrz str. 141/. Do mitochondriów spektrofotometrię absorpcyjną zastosował Chance /1951; 1954/.

Metodą tą można badać stan redoks wielu składników komórkowych związanych z łańcuchem przenośników elektronów w mitochondriach, wykorzystując różnice maksimów absorpcji dla formy utlenionej i zredukowanej. Użyteczne maksima absorpcji leżą w zakresie 830-290 nm i wynoszą: dla grupy prostetycznej cytochromu a 830 nm, dla grup hemowych zredukowanej oksydazy



cytochromowej / $aa_3$ / 605 nm, dla flawoproteiny 460 nm, dla NADH 340 nm i dla ubichinonu 290 nm /Chance, Hasselgrove i Barlow, 1981/.

Do badania flawoproteiny i NADH użyć można metody spektrofлуorymetrii odbiciowej. Fluorochromy te, naświetlone łukiem rtęciowym lub ksenonowym emitują charakterystyczne długości fali /odpowiednio 520 i 450 nm/.

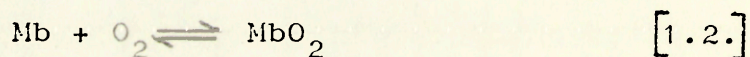
Początkowo sondy optyczne stanu redoks używano do badań izolowanych mitochondriów. Następnie zaczęto mierzyć sygnały mitochondrialne *in vivo*. Jest to trudne, gdyż czynnikiem zakłócającym jest widmo absorpcyjne hemoglobiny. Pomiar wymaga korekcji rejestrowanego sygnału absorpcji lub emisji na tło tkankowe. Korekcję przeprowadza się przy pomocy metod subtrakcyjnych, polegających na odejmowaniu od sygnału związanego z badanym pigmentem mitochondrialnym sygnału absorpcji lub emisji pochodzącego z tkanki. Sygnał ten jest elektronicznie przetworzonym sygnałem rejestrowanym równolegle w takim zakresie widma, w którym nie ma absorpcji lub emisji pochodzącej od badanego pigmentu /Chance i wsp., 1973; Jobsis i wsp., 1977/.

Wśród mitochondrialnych sygnałów optycznych szczególnie bliskie odniesienie do tkankowego, a właściwie mitochondrialnego środowiska tlenowego posiada maksimum absorpcji 605 nm, związane z oksydazą cytochromową, która jest ostatnim etapem łańcucha oddechowego i przenosi elektrony na tlen. O ile stan redoks pozostałych pigmentów mitochondrialnych zależy również od innych parametrów środowiska /np. stosunek NAD/NADH zależy także od pH/, stan redoks cytochromu  $aa_3$  zależy w zasadzie



jedynie od tlenu /Chance i Williams, 1955/. Tak więc o ile sygnały pochodzące z "wyższych pięt" łańcucha przonośników elektronów obciążone są trudnościami interpretacyjnymi przypominającymi problemy interpretacji innych metod pośrednich /patrz niżej/, to prawidłowa rejestracja stanu redoks oksydazy cytochromowej powinna jednoznacznie charakteryzować dostępność tlenu do tego białka.

Unikalną metodę badania środowiska tlenowego mięśni opracowali Coburn i Mayers /1971/. Metoda ta posiada zaletę podobną jak spektrofotometria absorpcyjna cytochromu  $a_3$ : wynik badania zależy wyłącznie od tlenu. Polega ona na wykorzystaniu tlenku węgla /CO/ jako sondy średniego wewnątrzkomórkowego  $P_{O_2}$ , a dokładniej  $P_{O_2}$  w równowadze chemicznej z mioglobina. Tlen i tlenek węgla są konkurencyjnymi ligandami mioglobiny /Mb/. Ich reakcje:



charakteryzowane są przez stałe równowagi:

$$K_{O_2} = \frac{[O_2] \cdot [Mb]}{[MbO_2]} \quad [1.4.]$$

$$K_{CO} = \frac{[CO] \cdot [Mb]}{[MbCO]} \quad [1.5.]$$

gdzie  $[O_2]$  jest stężeniem tlenu rozpuszczonego w tkance w otoczeniu mioglobiny,  $[Mb]$  jest stężeniem mioglobiny wolnej, a  $[MbO_2]$  i  $[MbCO]$  - stężeniami mioglobiny utlenowanej i karboksymioglobiny. Dzieliąc przez siebie równania stałych równowagi i przedstawiając stężenia gazów w postaci ich



ciśnien cząstkowych otrzymujemy:

$$P_{O_2} / [MbO_2] = M_{Mb} \cdot P_{CO} / [MbCO] \quad [1.6.]$$

gdzie  $M_{Mb}$  względna stała równowagi CO/O<sub>2</sub> wynosi 24,9 /Coburn i Mayers, 1971/.

W celu wykonania pomiaru obiektowi eksperymentu podaje się <sup>14</sup>CO w układzie zamkniętym /zapobiegającym ucieczce tlenu węgla z badanego systemu/. Dane dotyczące równowagi MbO<sub>2</sub>/MbCO uzyskać można na podstawie analizy zawartości CO w tkance, z uwzględnieniem zawartości karboksyhemoglobiny w tkance jako poprawki. W tym układzie metoda wymaga biopsji tkanki mięśniowej. Wykorzystano jednak fakt, że ponad 95% CO w organizmie związane jest z mioglobina bądź hemoglobina.

Z tego względu w układzie zamkniętym zmiany zawartości CO w krwi związane być muszą ze zmianami utlenowania Mb w mięśniach. Stąd, śledząc zmiany MbCO w trakcie doświadczenia, wnioskować można o zmianach zachodzących w mięśniowym środowisku tlenowym. Taka modyfikacja metody MbCO jest nieinwazyjna i wykorzystana została w badaniach przeprowadzonych na ludziach /Clark i Coburn, 1975/.

### 1.1.3. Metody uzupełniające

Badania in vitro i modele matematyczne stanowią uzupełnienie bezpośrednich i pośrednich metod badania środowiska tlenowego tkanek. Oto kilka przykładów wyników takich badań.

Wiele badań in vitro poświęcono zagadnieniu ułatwiania dyfuzji tlenu przez mioglobina /Wittenberg, 1970; problematyka



ta jest omówiona w rozdziale 5.2./. Zagadnienie to nie dotyczy jednak tylko mięśni. Na podstawie pomiarów kinetyki konsumpcji tlenu przez skrawki tkankowe niektórzy autorzy /Longmuir i McCabe, 1964; Longmuir, 1976; 1977/ postulują obecność mechanizmu ułatwionej dyfuzji w tkankach nie zawierających mioglobiny. Rolę wewnątrzkomórkowego nośnika tlenu mógłby pełnić np. cytochrom P-450, który według niektórych badaczy wspomaga dyfuzję tlenu w płucach i w łożysku /Burns i Gurtner, 1973/.

Wyniki badań pojedynczych dużych komórek z użyciem metody PBA zinterpretowano jako dowód na wewnątrzkomórkową mikroheterogenność stężeń tlenu w komórkach /Longmuir i wsp., 1981/. Na tej podstawie Longmuir /1981/ dowodzi istnienia kanałów transportujących tlen, łączących powierzchnię komórek z mitochondriami, charakteryzujących się wysoką rozpuszczalnością dla  $O_2$ , oraz stref /o powierzchni rzędu  $0,25 \mu m^2$ / praktycznie pozbawionych tlenu, ze względu na jego niską rozpuszczalność. Taka cytoarchitektonika rozmieszczenia tlenu zapobiegać miałaoby toksycznemu wpływowi  $O_2$  na enzymy cytosolu. Za różnicami rozpuszczalności iść mają różnice we współczynniku dyfuzji tlenu, który dla całej komórki wynosić ma średnio  $0,3 \cdot 10^{-5}$ , podczas gdy w kanałach przewodzących tlen byłby ponad 20 razy wyższy,  $7,5 \cdot 10^{-5} /cm^2 \cdot s^{-1}$ /. Warto jednak podkreślić, że przy interpretacji tych badań nie brano pod uwagę możliwej mikroheterogenności stężeń PBA wewnątrz komórki. Wiadomo tymczasem, że mitochondria pobierają PBA z roztworu inkubacyjnego /Jobsis, Mitnick i Snow, 1976/. "Kanały tlenowe" mogą być równie dobrze strefami o wysokim stężeniu PBA.



Podczas gdy badania in vitro mogą pomóc w opisie środowiska tlenowego w skali mikro, modele matematyczne umożliwiają jego opis również w skali makro. Klasycznym osiągnięciem w zakresie modelowania środowiska tlenowego tkanek jest model Krogha. Model ten zakłada, że tkanka zbudowana jest z równoległych cylindrycznych jednostek włóściwkowo-tkankowych /ryc. 2/, w których krew płynie w tę samą stronę.

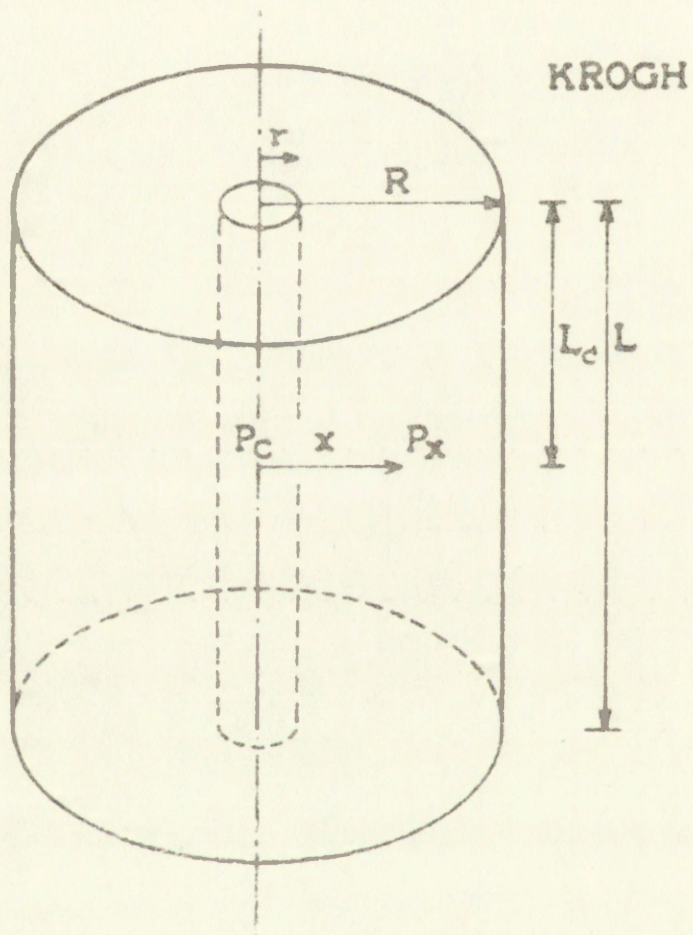
Zakładając, że tlen dyfunduje przez tkankę zgodnie z prawami Ficka, a metabolizm tlenu w tkance,  $\dot{q}_{O_2}$ , jest homogenny, profile tkankowego  $P_{O_2}$  w wybranym planie poprzecznym cylindra tkankowego otrzymać można przy pomocy analitycznego rozwiązania modelu, zwanego równaniem Krogha-Erlanga:

$$P_{tO_2}(x) = P_{cO_2} - \frac{\dot{q}_{O_2}}{2D} \left( R^2 \ln \frac{x}{r} - \frac{x^2 - r^2}{2} \right) \quad [1.7.]$$

gdzie  $P_{tO_2}(x)$  jest ciśnieniem parcjalnym tlenu w odległości  $x$  od środka włóściwki,  $D$  jest tkankowym współczynnikiem dyfuzji tlenu.

Opublikowano liczne modyfikacje modelu Krogha, polegające m.in. na założeniu odmiennej geometrii tkanki i jej perfuzji /np. Reneau i Knisley, 1971/, użyciu innych, np. probabilistycznych metod obliczeniowych /Wilford, Bruley i Artigue, 1981/, uwzględnieniu roli mioglobiny w transporcie tlenu /Meldon i Northey, 1981/, itp. Podstawowe założenia modelu są jednak zawsze takie same. Zostaną one omówione szerzej w rozdziale 5.3.5.





Ryc. 2. Jednostka włośniczkowo-tkankowa /cylinder/  
Krogha.



Przy pomocy modelu Krogha wyznaczono teoretyczne wartości  $P_{cO_2}$  krwi, przy których utlenowanie najdalszych od włosniczek stref tkankowych spada do zera /krytyczne  $P_{cO_2}$ , np. Thews, 1960/. Odmienne ujęcie problemu, polegające na uśrednieniu tkankowego  $P_{cO_2}$ , zaproponowali Kety /1957/ i Tenney /1974/. Średnie  $P_{cO_2}$  w płanie poprzecznym jednostki włosniczko-tkankowej:

$$P_{\bar{t}O_2} = P_{cO_2} + \frac{\dot{q}_{O_2}}{D} \left[ \frac{3(R^2 - r^2)}{8} - \frac{R^4}{2(R^2 - r^2)} \ln \frac{R}{r} \right] \quad [1.8.]$$

/Kety, 1957/. Średnie  $P_{cO_2}$  w całym cylindrze uzyskać można, podstawiając do tego równania wartość średniego włosniczko-wego  $P_{cO_2}$ , która wynosi:

$$P_{\bar{c}O_2} = \frac{1}{[O_2]_a - [O_2]_v} \times \int_{[O_2]_v}^{[O_2]_a} f([O_2]_c) d[O_2]_c \quad [1.9.]$$

gdzie  $P_{cO_2} = f([O_2]_c)$  jest analitycznym opisem krzywej dysocjacji oksyhemoglobiny wzdłuż włosniczki /Tenney, 1974/.

Tak zdefiniowane pojęcie średniego tkankowego  $P_{cO_2}$  jest miarą średniej dostępności tlenu w tkance. Jest to pojęcie statystyczne i jest mylące w odniesieniu do każdej wybranej grupy komórek. Niemniej, jak pisze Tenney /1974/, jest ono warte badań, gdyż stanowi proste, praktyczne i użyteczne podejście do opisu ogólnego zagadnienia utlenowania tkanek. Dotychczas posługiwano się pojęciem średniego tkankowego  $P_{O_2}$  tylko w badaniach modelowych, nie było bowiem doświadczalnej metody pozwalającej na jego pomiar.



## 1.2. Charakterystyka środowiska tlenowego tkanek - wybrane problemy

Obecny stan wiedzy na temat środowiska tlenowego tkanek określić można jako sytuację, w której kontrowersji jest co najmniej tyle, ile metod badawczych. Problemy omówione poniżej są wybrane z punktu widzenia tematyki dalszych części pracy.

Wydawać się może, iż najpewniejsze wyniki powinny dawać rejestracje mikroelektrodowe. Tymczasem występują tu poważne różnice. Dla przykładu, średnie  $P_{O_2}$  w korze mózgowej uzyskane z histogramów mierzonych w stanie normoksji zawiera się od 40 mmHg, poprzez 25 mmHg, aż do 5-10 mmHg /odpowiednio, Silver, 1973; Smith, Guilbeau i Reneau, 1977; Erdmann, Kunke i Krell, 1973/. Przyczyną tych różnic mogą być własności i sposób użycia mikroelektrod, oraz właściwości badanego preparatu /anestezja, różnice międzygatunkowe, itp./. Ze względu na inwazyjność wobec badanego obiektu szczególne zastrzeżenia budzić muszą, nieliczne zresztą, rejestracje wewnątrzkomórkowego  $P_{O_2}$ . Generalnie należy więc przyjąć, że metody mikroelektrodowe dają jedynie jakościowy obraz ciśnienia cząsteczkowego tlenu w płynie śródtkankowym i są szczególnie przydatne do pomiarów dynamiki zmian tkankowego tlenu /stany nieustalone normoksja-hipoksja, itp./ w wybranych punktach tkanki.

Z punktu widzenia środowiska tlenowego tkanek metody pośrednie są niezwykle trudne do interpretacji. Charakteryzowane przez nie parametry tkankowe są w różnym stopniu, często nawet zasadniczo zależne od dostępności tlenu. Nie jest to



jednak zależność całkowita i jednoznaczna. Można więc przy ich pomocy definiować metaboliczny obraz normoksji. Definicja taka niewiele jednak mówi o normoksyjnym środowisku tlenowym i jego charakterystyce. Natomiast spójna interpretacja danych w stanach odmiennych od normy jest wręcz niemożliwa. Szczególnie dobitnych przykładów dostarczają badania mózgu.

Często traktuje się uaktywnienie glikolizy beztlenowej w mózgu jako wyraz niedotlenienia, a więc sytuacji, w której dostawa tlenu do tkanek jest niższa, niż zapotrzebowanie metaboliczne i dostępność tlenu staje się czynnikiem ograniczającym tempo fosforylacji oksydacyjnej. Jednakże produkcja mleczanu może być aktywowana również przez alkalozę /Domonkos i Huszak, 1959/. Z tej przyczyny w dalszym ciągu nie jest jasne, czy hiperwentylacja prowadzi do hipoksji.

Wydaje się natomiast zupełnie oczywiste, że zwiększenie zylnego mózgowego  $P_{O_2}$  powinno poprawiać utlenowanie tkanek. Wzrost tkankowego  $P_{O_2}$  na powierzchni mózgu po podaniu acetalamidu, inhibitora anhidrazy węglanowej, obserwowali Cotev, Lee i Severinghaus /1968/. Tymczasem Laux i Raichle /1978/, na podstawie badań metodą <sup>15</sup>O wnioskują, że inhibicja anhidrazy węglanowej prowadzi, poprzez zniesienie efektu Bohra we włóścioczkach mózgowych, do tkankowej hipoksji manifestującej się przez drastyczny spadek tempa zużycia tlenu przez mózg. Wynik ten nie został potwierdzony metodami standardowymi /Grieb i Forster, 1981/. Natomiast Cohen i wsp. /1967/ stwierdzili w ostrej hipoksji /tętnicze  $P_{O_2} = 35$  mmHg/ wzrost produkcji mleczanu przez mózg, ale zużycie tlenu pozostawało niezmienione. Niekiedy obserwowano nawet wzrost konsumpcji tlenu



przez mózg w hipoksji /Siesjo, 1978/.

Przykładów tego typu można by podać jeszcze bardzo wiele.

Zasadniczym problemem jest definicja tkankowej normoksji i hipoksji z punktu widzenia dostępności tlenu do mitochondriów.

### 1.2.1. Normoksja i hipoksja tkankowa

Na ogół przyjmuje się, że w fizjologicznej normoksji, gdy tkanki są właściwie perfundowane dobrze utlenowaną krwią, ich środowisko tlenowe jest normoksyjne w tym znaczeniu, że dostępność tlenu nie stanowi ograniczenia jego metabolizmu /wykorzystanie tlenu podlega kinetyce zerowego rzędu/.

Jednakże ostatnie badania tkankowych sygnałów optycznych stanu redoks oksydazy cytochromowej mogą być traktowane jako dowód przeciwko tej z pozoru oczywistej tezie.

Badania izolowanych mitochondriów /Chance i Williams, 1956/ wykazały, że cytochromy  $a$  i  $a_3$  są prawie maksymalnie utlenowane we wszystkich warunkach działania łańcucha oddechowego z wyjątkiem anoksji lub prawie-anoksji. Z innych niezależnych od tlenu przyczyn /np. nadmiar lub niedobór ATP/ redukcja cytochromów oksydazy cytochromowej nie przekracza 1-4 %.

Dalsze badania /np. Oshino i wsp., 1974; Starlinger i Lubbers, 1973/ wykazały, że cytochromy te mają tak wysokie powinowactwo do tlenu, że pozostają całkowicie utlenione aż do  $P_{O_2}$  około 0.1 mmHg. Ponieważ izolowane mitochondria wykazują własności metaboliczne identyczne z ich właściwościami w nienaruszonych komórkach /Chance, Hasselgrove i Barlow, 1981/, sygnał optyczny redoks oksydazy cytochromowej rejestrowany in vivo powinien



charakteryzować środowisko tlenowe mitochondriów w podobny sposób, jak charakteryzuje je in vitro.

Tymczasem pomiary sygnałów optycznych oksydazy cytochromowej na powierzchni kory mózgowej wykazują, że w fizjologicznej normoksji pigment ten jest w 65-85% zredukowany /Rosenthal i wsp., 1976; Hempel i wsp., 1977/. Do osiągnięcia jego pełnego utlenienia konieczna jest kombinacja hiperbarii tlenowej 4 Atm i hiperkapnii rzędu ponad 5% CO<sub>2</sub> w mieszaninie oddechowej. Bez tych szczególnych ułatwień w transporcie tlenu do komórek oksydaza cytochromowa jest zawsze zredukowana w stopniu uniemożliwiającym wykorzystanie pełnej wydajności procesów fosforylacji oksydacyjnej. Konkluzją tych badań jest wniosek, że w tkance istnieje continuum relacji pomiędzy tempem metabolizmu a warunkami dostawy i zużycia tlenu przez mitochondria /LaManna i wsp., 1981/. W związku z tym definiowanie krytycznego tkankowego P<sub>O<sub>2</sub></sub> jako sztywnej wartości nie ma sensu.

Jak jednak można wyjaśnić rozbieżność utlenienia oksydazy cytochromowej in vitro i in vivo? W warunkach in vitro natlenienie zawiesiny mitochondrialnej jest zazwyczaj homogenne i nie podlega żadnym lokalnym regulacjom. W warunkach in vivo, zgodnie z ostatnio wysuniętą hipotezą /Kessler i wsp., 1981/, może funkcjonować system lokalnej, zdecentralizowanej regulacji dostawy tlenu do komórek i jego zużycia metabolicznego. Regulacje te, dostosowujące precyzyjnie mikrokązenie tkankowe do zapotrzebowania metabolicznego, oraz tempo metabolizmu tlenu do jego dostawy, zachodziłyby za pośrednictwem hipotetycznych "oksydaz sygnałowych".



Jednakże aby tego typu regulacje na poziomie tkankowym doprowadziły do zaistnienia w komórkach warunków "normalnej hipoksji", to jest ciśnień parcjalnych tlenu powodujących wysoką redukcję oksydazy cytochromowej, ostatni etap kaskady tlenowej, dyfuzja tlenu z krwi do mitochondriów, musiałby być znacznie mniej efektywny, niż to dotychczas przypuszczano.

### 1.2.2. Tkankowe bariery dyfuzyjne dla tlenu

Zakłada się zwykle, że transport tlenu z krwi do mitochondriów polega na swobodnej dyfuzji cząsteczek  $O_2$  fizycznie rozpuszczonych w środowisku tkankowym, a ściany włóścierek i błony komórkowe nie stanowią odczuwalnej bariery dla dyfuzji tlenu w głąb tkanki /Leonard i Jorgensen, 1974/.

W takim przypadku proces dyfuzji tlenu przez całą masę tkanki między włóściwkami a mitochondriami opisywany byłby przy pomocy równań Ficka, co po raz pierwszy zaproponował August Krogh. Jednakże założenie to nie jest całkowicie przekonująco dowiedzione.

Przez długi czas uważano, że woda jest substancją bardzo szybko dyfundującą pomiędzy krwią a tkankami. Późniejsze badania wykazały, że gdy perfuzja tkankowa jest odpowiednio wysoka, dystrybucja wody pomiędzy krwią i tkankami jest dostrzegalnie limitowana przez bariery dyfuzyjne /np. w mózgu, Raichle i wsp., 1976/. Rose, Goresky i Bach /1977/ zasugerowali, że podobne ograniczenie może dotyczyć tlenu. Doświadczalnego potwierdzenia możliwości limitowania dyfuzji  $O_2$  przez ściany włóścierek dostarczyły badania wymian tlenu



zachodzących w izolowanej sieci cudownej /rete mirabile/ węgorka /Rasio i Goresky, 1979/. Bariery ograniczające dyfuzję tlenu znaleziono również w ścianach tętnic /Acker i Lubbers, 1971/ i w kłębkach szyjnych /Acker i wsp., 1973/. Nie można więc zakładać, że wszystkie elementy tkankowe muszą być dobrze przepuszczalne dla tlenu.

Bariera dyfuzyjna dla tlenu, powodując gwałtowny spadek  $P_{C_2}$  na granicy włóścizki-tkanka, lub płyn śródtkankowy-komórki, prowadziłyby do niskiego wewnątrzkomórkowego  $P_{O_2}$ . Mogłoby to wyjaśniać hipotetyczną niską efektywność ostatniego etapu kaskady tlenowej, oraz niektóre obserwacje doświadczalne: niskie wewnątrzkomórkowe  $P_{C_2}$  /Whalen, 1971/ i brak gradientów utlenowania mioglobiny wewnątrz komórek mięśniowych /Honig i wsp., manuskrypt autorów/.



## 2. METODY ROZCIEŃCZANIA WSKAŹNIKÓW: PODSTAWY TEORETYCZNE I ZASADY INTERPRETACJI WYNIKÓW

Dla przedstawienia metod zastosowanych w niniejszej pracy konieczne jest przytoczenie niektórych elementów teorii klasycznych metod rozcieńczania wskaźników. Informacje zawarte w tej części pracy pochodzą w większości z monografii Zierlera /1965/, Lassena i Perla /1979/, oraz pracy Chinarda /1970/.

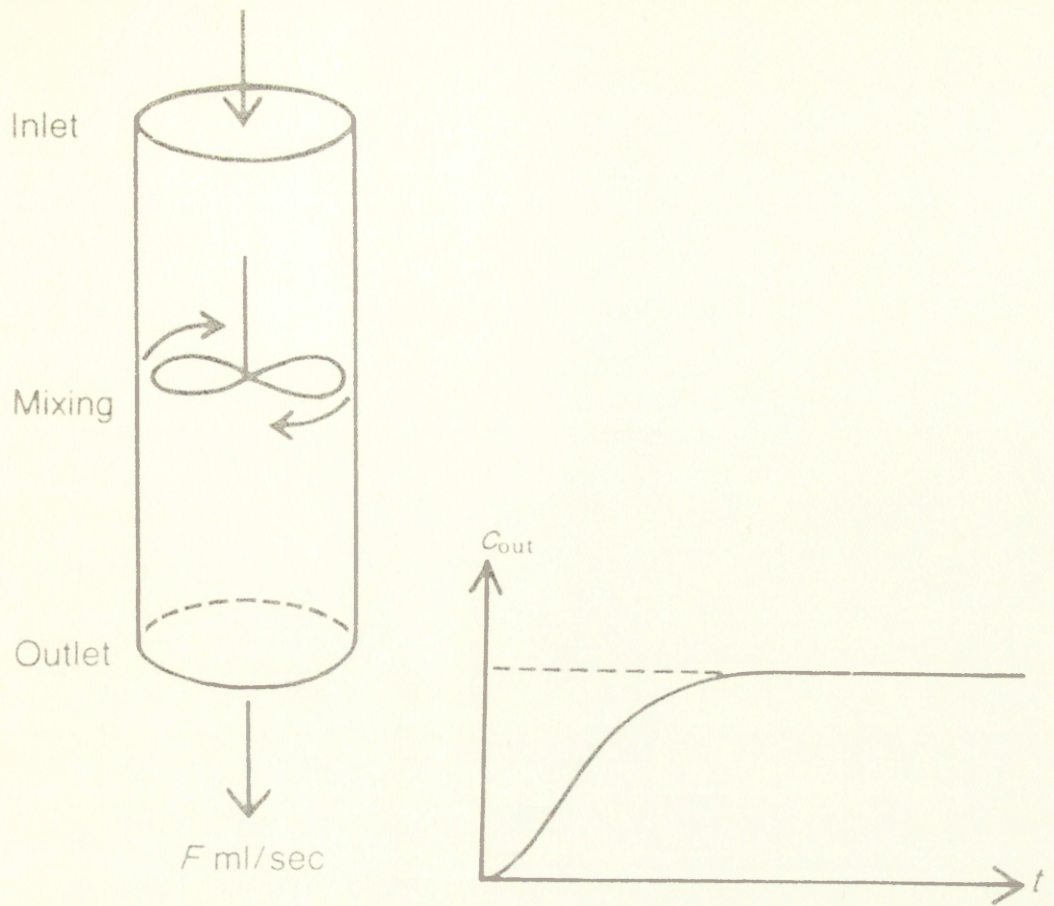
Po raz pierwszy metodę rozcieńczania wskaźników zastosował do badań fizjologicznych Stewart /1879/. Użył on ciągłej powolnej infuzji stężonego roztworu NaCl do pomiaru przepływu krwi w dużych naczyniach krwionośnych. Wprowadzany do krwi wskaźnik podlegał wymieszaniu i rozcieńczeniu. Po krótkim czasie jego stężenie w krwi poniżej miejsca podawania,  $C_{out}$ , osiągało stan ustalony /ryc. 2.1./. Zakładając, że tempo infuzji jest pomijalnie małe w porównaniu z przepływem krwi, ten ostatni wyznaczyć można jako:

$$F = F_i \cdot C_i / C_{out} \quad [2.1.]$$

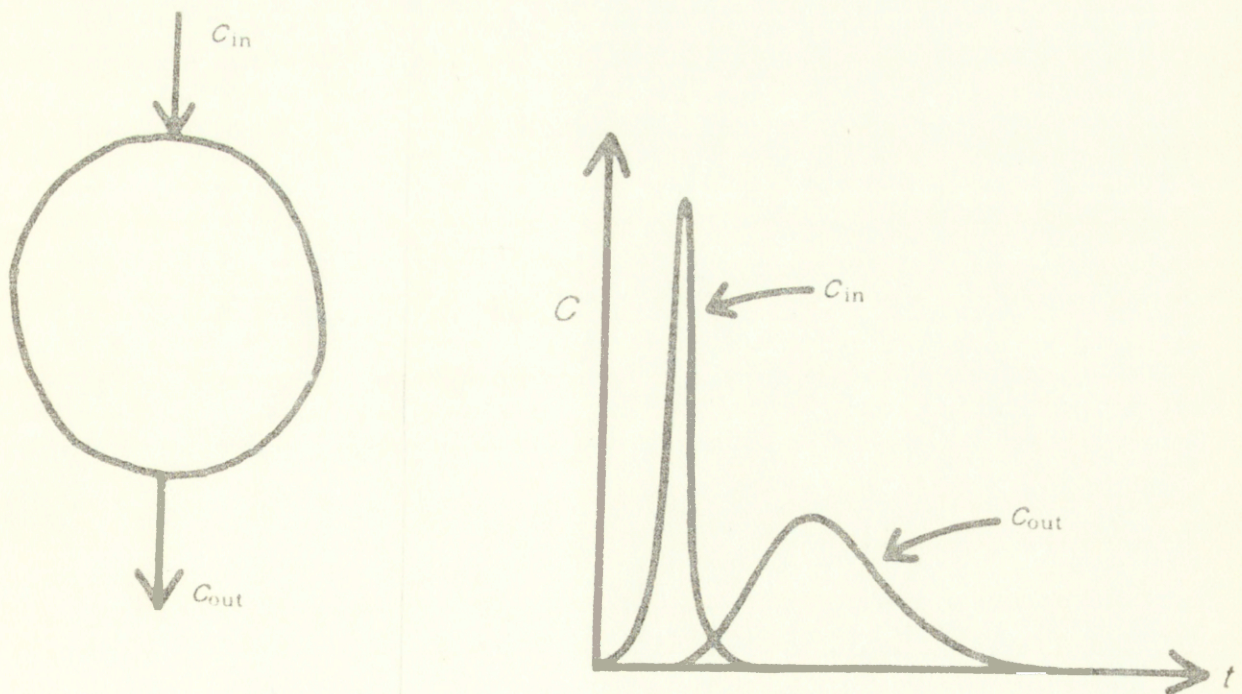
gdzie  $C_i$  jest stężeniem wskaźnika w roztworze wstrzykiwanym z szybkością  $F_i$ .

Henriques /1913/ oraz Hamilton i wsp. /1928/ zmodyfikowali metodę Stewarta: użyli oni /zamiast ciągłej infuzji/ impulsowego wstrzyknięcia znanej dawki wskaźnika  $m_0$ . Wskaźnik mieszał się z krwią, a jego stężenie w krwi poniżej miejsca wstrzyknięcia zmieniało się w czasie  $C(t)$ . Z rejestrowanej w ten sposób krzywej rozcieńczenia wskaźnika /ryc. 2.2./





Ryc. 2.1. Metoda Stewarta /wg Lassena i Perla, 1979/.



Ryc. 2.2. Metoda Henriquesa-Hamiltona /wg Lassena i Perla, 1979/.



wyznacza się przepływ krwi jako:

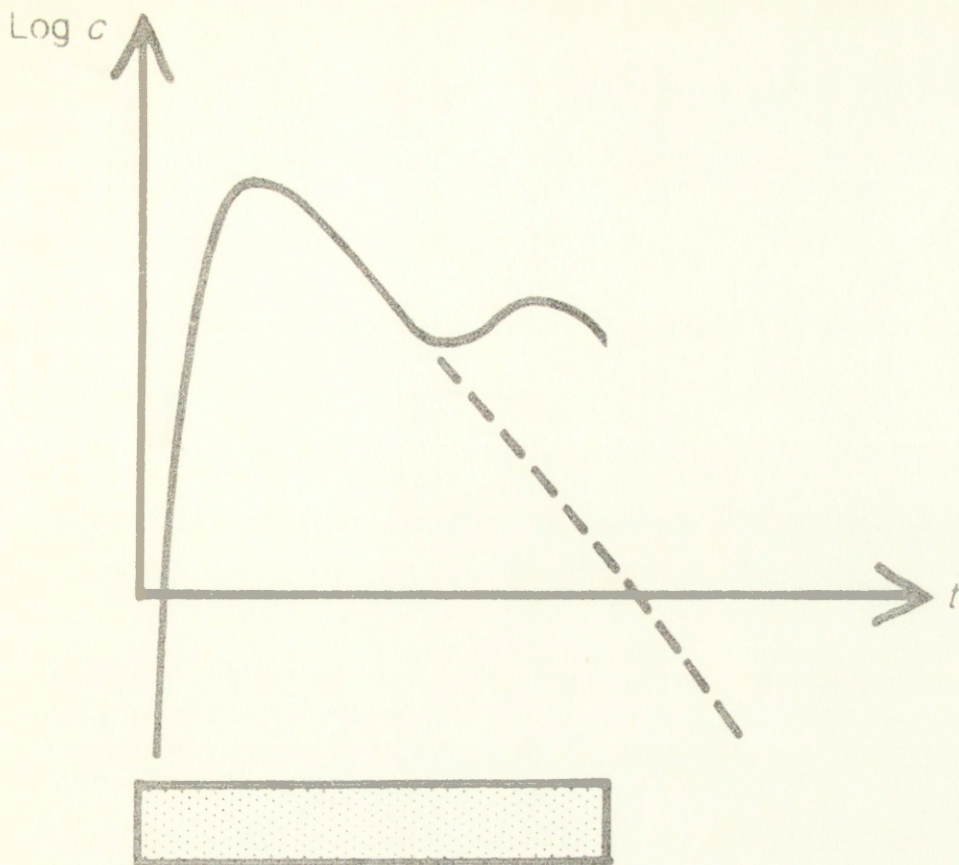
$$F = \frac{m_0}{\int_{0, \infty} C(t) dt} \quad [2.2.]$$

Te dwa modele doświadczalne, ciągłe podawanie i impulsowe wstrzyknięcie, są do dziś stosowane we wszystkich odmianach technik rozcieńczania wskaźników.

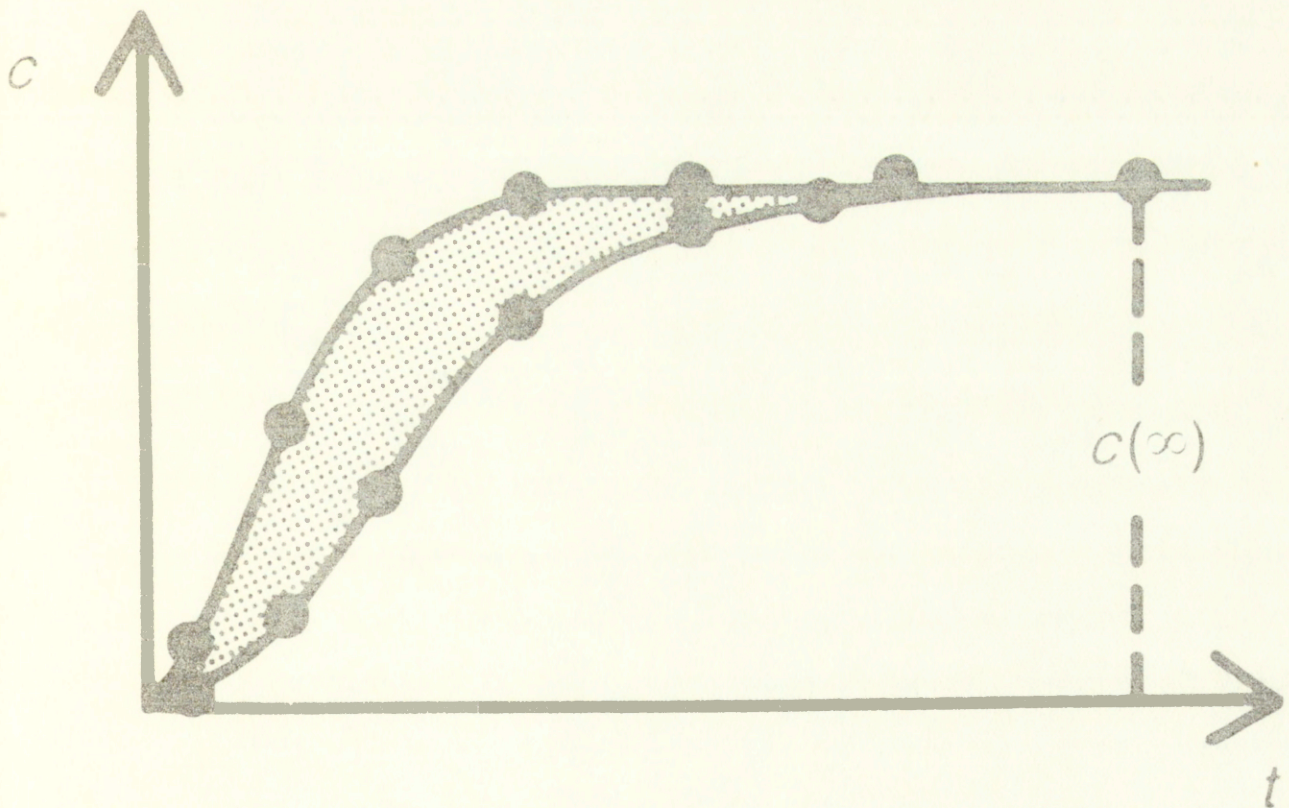
Źródłem zakłóceń przebiegu rejestrowanych krzywych rozcieńczania jest recyrkulacja: po przejściu przez krwioobieg wskaźnik wraca na wejście badanego układu, zmieniając charakter rejestrowanej krzywej. W przypadku eksperymentu typu impulsowego wstrzyknięcia i detekcji stężenia wskaźnika w odpływie gałąź zstępująca niezakłóconej krzywej rozcieńczenia jest zazwyczaj precyzyjnie opisywana funkcją wykładniczą. W takim przypadku wyznaczenie czasu pojawiania się artefaktu recyrkulacji jest proste /ryc. 2.3./, a pole pod krzywą można uzyskać sumując stężenia wskaźnika do momentu recyrkulacji i stężenia ekstrapolowane do czasu nieskończoności.

W eksperymentach Henriquesa i Hamiltona używano wskaźników nie opuszczających układu krwionośnego /czyli niedyfundujących/. Kety i Schmidt /1945/ użyli po raz pierwszy /do pomiaru przepływu krwi przez mózg/ wskaźnika swobodnie dyfundującego pomiędzy krwią włośniczkową a tkankami. Był to  $N_2O$ , metabolicznie obojętny gaz. Podawano go do oddychania. Jest to odmiana układu ciągłego podawania, wymagająca równoczesnej rejestracji krzywej zmian stężenia wskaźnika w czasie na wejściu układu, czyli krzywej  $C_{in}(t)$ , oraz krzywej zmian stężenia wskaźnika w czasie na wyjściu układu, czyli krzywej  $C_{out}(t)$  /ryc. 2.4./. Z uzyskanych krzywych można otrzymać przepływ





Ryc. 2.3. Detekcja recyrkulacji i ekstrapolacja krzywej rozcieńczenia w metodzie Henriquesa-Hamiltona /wg Lassena i Perla, 1979/.



Ryc. 2.4. Metoda Kety-Schmidta /wg Lassena i Perla, 1979/.



krwi na jednostkę objętości tkanki:

$$F/V_T = \frac{\lambda \cdot C(\infty)}{\int_{0, \infty} [C_{in}(t) - C_{out}(t)] dt} \quad [2.3.]$$

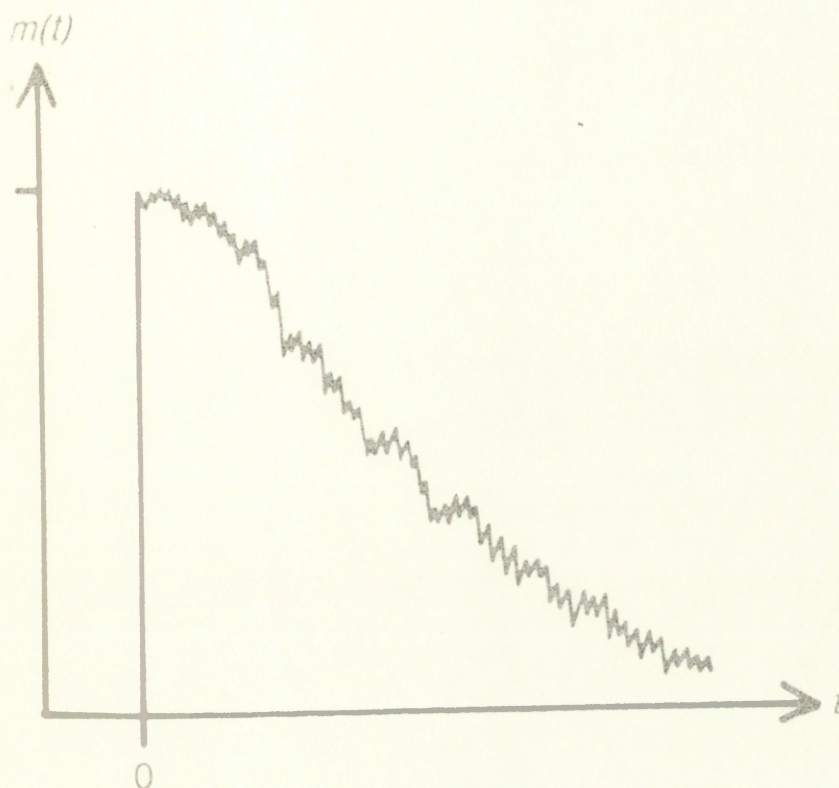
$\lambda$ , współczynnik rozdziału wskaźnika swobodnie dyfundującego, definiowany jest jako stosunek stężeń wskaźnika w tkance i w krwi w stanie równowagi, wyrażany jako (ml wskaźnika/ml tkanki)  $\cdot$  (ml wskaźnika/ml krwi). Jego wartość otrzymuje się z niezależnych badań in vitro.  $C(\infty)$  jest stężeniem wskaźnika w stanie równowagi, a więc gdy  $C_{in} = C_{out}$ .

Lassen i wsp. /1963/ opracowali inną metodę pomiaru przepływu krwi przy pomocy wskaźnika dyfundującego. Polega ona na impulsowym wstrzyknięciu do wejścia naczyniowego badanego narządu roztworu metabolicznie inertnego radioaktywnego wskaźnika /oryginalnie użyty był  $^{133}\text{Xe}$ /. Zamiast stężenia wskaźnika w krwi żyłnej /krzywa  $C(t)$ / rejestruje się jego ilość pozostającą w tkance, również w funkcji czasu /krzywa  $m(t)$ , ryc. 2.5./. Przepływ krwi na jednostkę objętości tkanki otrzymuje się z równania:

$$F/V_T = \frac{\lambda \cdot m_0}{\int_{0, \infty} m(t) dt} \quad [2.4.]$$

Wymienione powyżej trzy alternatywne składniki układu doświadczalnego z rozcieńczaniem wskaźnika, a mianowicie: 1/. ciągle podawanie lub impulsowe wstrzyknięcie; 2/. wskaźnik niedyfundujący /wewnątrznaczyniowy/ lub dyfundujący /tkankowy/ oraz 3/. detekcja stężenia wskaźnika w krwi odpływającej z badanego narządu lub detekcja masy wskaźnika pozostającego w tkance /w obu przypadkach w funkcji czasu/,

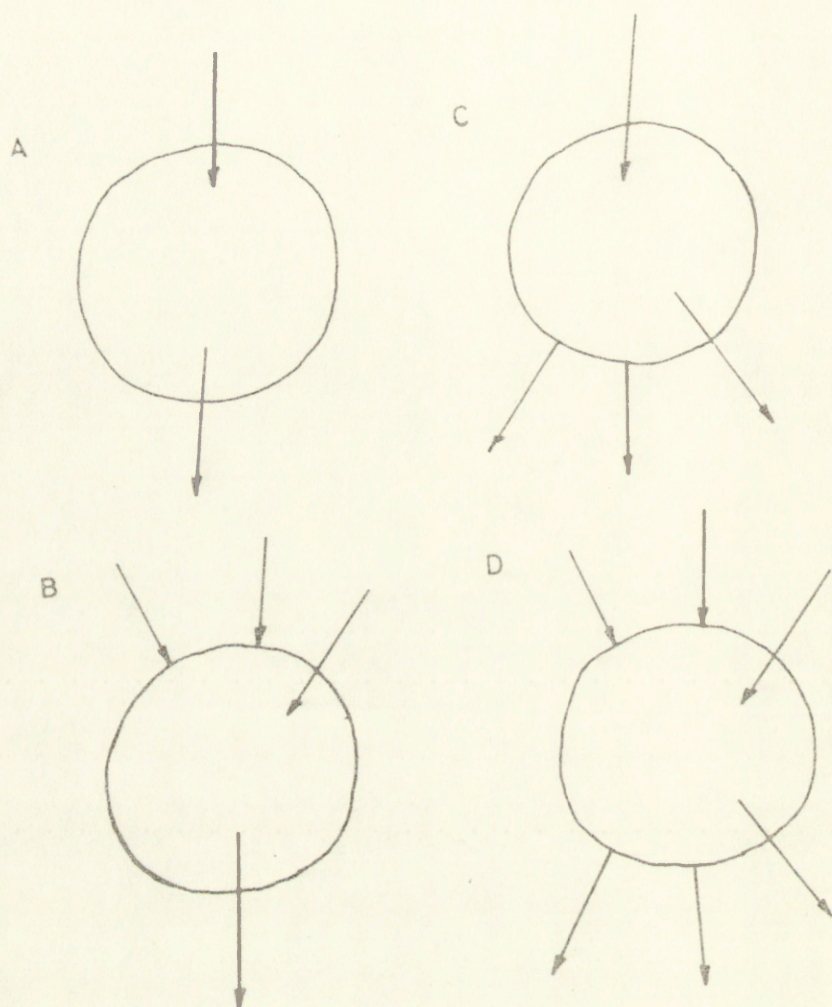




Ryc. 2.5. Metoda Lassena i wsp. /wg Lassena i Perla, 1979/.

używane są w różnych kombinacjach, w zależności od uwarunkowań technicznych i wymagań eksperymentalnych. Jednym z czynników warunkujących stosowalność poszczególnych schematów metody rozcieńczania wskaźników jest sposób mieszania się wskaźników podanych do badanego narządu /ryc. 2.6./.





Ryc. 2.6. Cztery typy systemów badanych metodami rozcieńczenia wskaźników /schemat/.

A - system "jedno wejście - jedno wyjście";

B - system "wiele wejść - jedno wyjście";

C - system "jedno wejście - wiele wyjść";

D - system "wiele wejść - wiele wyjść".

Strzałkami wchodzącymi na teren pola zaznaczono wejścia, którymi podaje się wskaźnik, a strzałkami wychodzącymi z terenu pola - wyjścia, które są próbkowane.



Do badania systemów z jednym wyjściem /A i B/ stosowane są wszystkie schematy bez przyjęcia dodatkowych założeń. System typu Bergnera /C, jedno wejście, wiele wyjść/ może być badany metodą detekcji masy, a system typu wiele wejść - wiele wyjść /D/ - metodą Kety-Schmidta. Aby w przypadku systemu typu wiele wejść - wiele wyjść stosować także inne schematy, w szczególności zaś schemat "impulsowe wstrzyknięcie - detekcja stężenia w odpływie", przyjmuje się założenie o istnieniu w systemie tzw. przekroju idealnie zmieszanego /well mixed cross - section/. Założenie to sprowadza się do warunku, że wybór wejścia do podania wskaźnika, oraz wybór wyjścia do próbkowania krwi żyłnej nie wpływają na odpowiedź systemu /teoremat równoważnego znakowania, equal labelling theorem, Bergner, 1964/.

Jednolite ujęcie teoretycznych podstaw różnych odmian techniki rozcieńczania wskaźników, oraz udowodnienie tożsamości wyników uzyskiwanych w poszczególnych układach doświadczalnych jest możliwe na gruncie teorii średnich czasów tranzytu. Teoria ta umożliwia również zastosowanie techniki rozcieńczania wskaźników do pomiaru masy substancji w badanym układzie.



## 2.1. Teoria średnich czasów tranzytu i zasada objętości centralnej

Bez wchodzenia w ścisłe dowody matematyczne, średni czas tranzytu zdefiniować można najłatwiej na przykładzie impulsowego wstrzyknięcia i detekcji stężenia wskaźnika w odpływie. Dla układu, którego granice definiowane są przez miejsce wstrzyknięcia i miejsce próbkowania, średni czas tranzytu wskaźnika,  $\bar{t}$ , można określić jako średni czas przebywania cząsteczki wskaźnika w układzie.  $\bar{t}$  obliczony być może z krzywej rozcieńczenia wskaźnika przy pomocy formuły:

$$\bar{t} = \frac{\int_{0, \infty} t \cdot c(t) dt}{\int_{0, \infty} c(t) dt} \quad [2.5.]$$

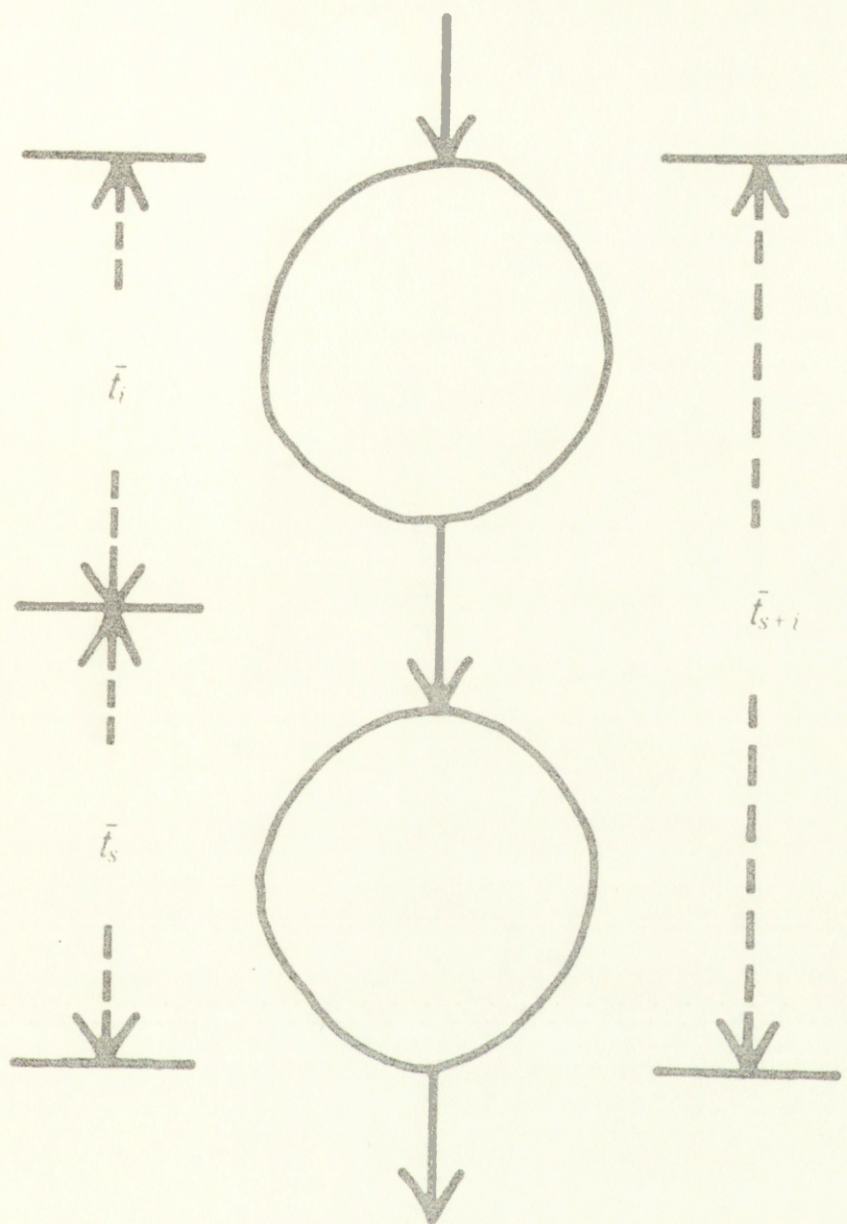
z uwzględnieniem poprawki na recyrkulację i ekstrapolacji do czasu nieskończoności / $t = 0$  jest czasem wprowadzenia impulsu wskaźnika do wejścia badanego układu/.

Średni czas tranzytu jest wielkością addytywną /ryc. 2.7./.

Własność ta jest niezwykle istotna przy rozpatrywaniu teorii pomiarów pozanaczyniowej masy substancji przy pomocy krzywych rozcieńczania kilku wskaźników /patrz poniżej/.

Podstawowe znaczenie w jednolitej teorii rozcieńczania wskaźników posiada pojęcie przetrzeni dystrybucji wskaźnika. Przestrzeń dystrybucji wskaźnika w badanym układzie zdefiniować można ogólnie przy pomocy następującego modelu. Do układu zamkniętego podajemy dawkę  $m_0$  wskaźnika i czekamy, aż nastąpi doskonałe wymieszanie się wskaźnika ze wszystkimi składnikami układu. Następnie wybieramy jeden ze składników układu jako "składnik odniesienia". Mierzymy stężenie





Ryc. 2.7. Addytywność średnich czasów tranzytu /wg Lassena i Perla, 1979/.

wskaźnika w próbce "składnika odniesienia" i otrzymujemy wynik  $C(\infty)$ . Wówczas przestrzeń dystrybucji wskaźnika w układzie:

$$v_d = \frac{m_0}{C(\infty)} \quad [2.6.]$$



Tak zdefiniowana przestrzeń dystrybucji wskaźnika na wymiar jednostki objętości "składnika odniesienia". Dla przykładu, jeżeli do układu krwionośnego podamy  $m_0$  erytrocytów znakowanych chromem - 51, a po dokładnym wymieszaniu zmierzmy w krwi aktywność  $^{51}\text{Cr}$  wynoszącą  $C(\infty)$ , to przestrzeń dystrybucji erytrocytów,  $V_d$ , wyznacza objętość krwi, ponieważ chromowane krwinki są wskaźnikiem niedyfundującym, wewnątrz-naczyniowym.

Generalnie jako "składnika odniesienia" używa się krwi. Wówczas przestrzeń dystrybucji wskaźnika w układzie można zdefiniować jako objętość, którą w układzie zajmowałby badany wskaźnik wówczas, jeżeli jego średnie stężenie byłoby równe stężeniu równowagowemu w krwi.

Pojęcie przestrzeni dystrybucji wskaźnika ma fundamentalne znaczenie dla teorii rozcieńczania wskaźników, ponieważ dla dowolnego typu eksperymentu z rozcieńczaniem wskaźników, jeżeli tylko zachowane zostaną odpowiednie warunki, zachodzi następująca zależność:

$$V_d = F \cdot \bar{t} \quad [2.7.]$$

czyli: przestrzeń dystrybucji = przepływ krwi x średni czas tranzytu wskaźnika. Zależność ta jest określana jako zasada objętości centralnej /central volume principle/. Zasada objętości centralnej pozwala powiązać proces dynamiczny /rozcieńczanie impulsu wskaźnika w badanym układzie, charakteryzowane przez  $\bar{t}$ / z równoważnym mu procesem statycznym /przestrzeń dystrybucji wskaźnika w badanym układzie, definiowana poprzez jego stężenie równowagowe,  $C(\infty)$  /.

Umożliwia to badanie pojedynczych narządów przy zachowanym



krążeniu /np. wyznaczenie zawartości krwi w narządzie metodą dynamiczną używając impulsowego wstrzyknięcia erytrocytów znakowanym chromem/.

Warunki, które muszą być spełnione, aby /zgodnie z klasyczną teorią rozcieńczania wskaźników/ zależność [2.7.] była zachowana, są następujące: 1/. wskaźnik musi być metabolicznie inertny; 2/. układ badany musi być stacjonarny, tzn. powtórzenie tego samego sygnału na wejściu musi dać powtórzenie odpowiedniego sygnału na wyjściu; 3/. układ musi odpowiadać liniowo, tzn. odpowiedź na dwa sygnały wejściowe musi być sumą odpowiedzi oddzielnych.

Używając odpowiednich metod matematycznych /całki splotu i rachunku operatorowego/ udowodnić można, że w każdym schemacie techniki rozcieńczania wskaźników równanie używane do obliczenia  $F$ , lub  $F/V_T$ , m.in. równania [2.2.], [2.3.] i [2.4.], sprowadzają się w istocie do równań [2.6.] i [2.7.] /patrz Lassen i Perl, 1979, tabela 9.1., str. 126-127 /. Każde więc z tych równań może służyć również do wyznaczenia masy wskaźnika - pod warunkiem, że przepływ krwi w układzie jest znany.

Jednym ze schematów doświadczalnych, w których znajduje zastosowanie wyznaczenie masy wskaźnika w badanym układzie jest doświadczenie z jednoczesnym użyciem więcej niż jednego wskaźnika. Ze względu na własności fizykochemiczne wskaźniki używane w klasycznych badaniach z użyciem metody rozcieńczania podzielić można na trzy grupy: 1/. wskaźniki wewnątrz-naczyniowe, czyli niedyfundujące /np. znakowane erytrocyty, makrocząsteczki typu albuminy lub wysokocząsteczkowego



dekstranu/. Zastosowanie takich wskaźników, które nie przechodzą z układu naczyniowego do tkanek, pozwala m.in. na wyznaczenie masy krwi w badanym układzie. 2/. Wskaźniki pozakomórkowe /hydrofilne/, do których należą m.in. mannitol i inulina. Substancje te, o masie cząsteczkowej do kilku tysięcy daltonów, rozpuszczalne w wodzie, przekraczają ściany włóściczek przez pory wypełnione wodą, lecz nie przechodzą przez błony komórkowe. Ich zastosowanie dostarcza informacji dotyczących przestrzeni śródtkankowej badanego narządu.

3/. Wskaźniki swobodnie dyfundujące /lipofilne/, które przechodzą również przez błony komórkowe. Ich dystrybucja dostarcza informacji o całym środowisku tkankowym, wewnątrz i pozakomórkowym. Należą tu m.in. gazy szlachetne i metabolicznie inertne /Xe, Ar, N<sub>2</sub>O, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>/.

Metoda wielu wskaźników może być użyta do wyznaczenia pozanaczyniowej masy niektórych substancji. Przykładem jest pomiar masy wody w badanym narządzie, technika znajdująca zastosowanie kliniczne m.in. do oceny stanu uwodnienia /stopnia obrzęku/płuc /Brigham i wsp., 1971; Goresky, Cronin i Wangel, 1969; Chinard, Enns i Nolan, 1962/.

Pomiar taki przeprowadzany jest przy pomocy pary wskaźników. Jeden z nich podlega dystrybucji identycznie jak substancja badana. Wykorzystuje się w tym celu substancję macierzystą znakowaną izotopowo, lub substancje rozmieszczające się w tkance w sposób podobny do substancji badanej. Np. w przypadku wody używa się jako wskaźnika wody znakowanej trytem /THO/ lub antypiryny. Drugi wskaźnik /zwany wskaźnikiem odniesienia/ jest wskaźnikiem wewnątrznaczyniowym



/niedyfundującym/, ale w przestrzeni naczyniowej podlega dystrybucji identycznej jak badana substancja. Dla substancji, której dystrybucja w krwi ogranicza się jedynie do osocza, wygodnymi wskaźnikami odniesienia są np. radioaktywna jodowana albumina /RISA/, lub zielony indocyjaninowa /ICG/, barwnik wiążący się z białkami osocza. Jeżeli substancja macierzysta jest obecna zarówno w osoczu, jak i w erytrocytach, to ze względu na różne czasy tranzytu tych dwóch składników krwi przez narządowe układy włośniczkowe /Johnson, 1971/ konieczne jest używanie dwóch wskaźników odniesienia /znakowane erytrocyty i wskaźnik rozmieszczający się w osoczu/ i otrzymanie tzw. krzywej kombinowanej, uwzględniającej współczynnik rozdziału substancji macierzystej pomiędzy erytrocytami a osoczem. W pewnych przypadkach konieczne jest również uwzględnienie przepuszczalności błon erytrocytów dla badanej substancji, jako jednego z czynników ograniczających tempo wymiany krew-tkanka /Goresky, Bach i Nadeau, 1975/.

W doświadczeniu z użyciem wielu wskaźników uzyskuje się więc jednocześnie co najmniej dwie krzywe rozcieńczenia, które charakteryzują się odpowiednimi średnimi czasami tranzytu,  $\bar{t}_w$  dla krzywej wskaźnika dyfundującego i  $\bar{t}_{ref}$  dla wskaźnika odniesienia. Ponieważ wskaźnik substancji badanej rozmieszcza się w większej przestrzeni dystrybucji niż wskaźnik odniesienia,  $\bar{t}_w > \bar{t}_{ref}$ .

Chinard zastosował zasadę objętości centralnej do wyznaczenia pozanaczyniowej przestrzeni dystrybucji wskaźnika dyfundującego na podstawie różnicy  $\bar{t}_w - \bar{t}_{ref}$ . Wewnątrznaczyniowa przestrzeń dystrybucji wskaźnika odniesienia wynosi:

$$V_d(v) = F \cdot \bar{t}_{ref} \quad [2.8.]$$



Całkowita przestrzeń dystrybucji wskaźnika badanej substancji, będąca sumą przestrzeni dystrybucji wskaźnika w układzie naczyniowym i w tkance:

$$V_d(w) = V_d(t) + V_d(v) = F \cdot \bar{t}_w \quad [2.9.]$$

Wykorzystując addytywność średnich czasów tranzytu, powyższe równania można odjąć stronami uzyskując:

$$V_d(t) = F \cdot (\bar{t}_w - \bar{t}_{ref}) \quad [2.10.]$$

Tkankowa przestrzeń dystrybucji substancji macierzystej może być wyrażona również jako:

$$V_d(t) = \lambda \cdot V_T \quad [2.11.]$$

gdzie  $\lambda$  jest równowagowym współczynnikiem rozdziału /patrz definicja na str. 28 /.

Ponieważ wskaźniki podlegają identycznej dystrybucji co substancja badana, dla stężeń równowagowych,  $C(\infty)$ :

$$\frac{C_t(\text{wskaźnika})}{C_v(\text{wskaźnika})} = \frac{C_t(\text{substancji})}{C_v(\text{substancji})} = \lambda \quad [2.12.]$$

gdzie  $t$  i  $v$  oznaczają odpowiednio stężenia w tkance i w krwi /tętnicznej lub żyłnej; nie ma to znaczenia ponieważ substancja badana i jej wskaźnik są z założenia metabolicznie inertne/.

Tkankowa przestrzeń dystrybucji substancji macierzystej może więc być wyrażona w terminach średnich czasów tranzytu wskaźników, przy pomocy równania [2.10.] .

Kombinacja równań [2.10.] i [2.11.] pozwala na obliczenie masy substancji badanej w przestrzeni tkankowej:



$$m_t = V_d(t) \cdot C_v = V_T \cdot C_t = F \cdot C_v \cdot (\bar{t}_w - \bar{t}_{ref}) \quad [2.13.]$$

oraz jej średniego stężenia w tkance:

$$C_t = \frac{m_t}{V_T} = \frac{V_d(t)}{C_t} = F/V_T \cdot C_v \cdot (\bar{t}_w - \bar{t}_{ref}) \quad [2.14.]$$

Z powyższych dwóch równań wynika, że pozanaczyniowa, czyli tkankowa masa substancji macierzystej może być otrzymana z różnicy średnich czasów tranzytu wskaźnika substancji badanej i wskaźnika odniesienia pod warunkiem, że znany jest z niezależnego pomiaru przepływ krwi przez badany narząd. Do obliczenia średniego stężenia substancji macierzystej w tkance, potrzebna jest wielkość przepływu na jednostkę objętości tkanki,  $F/V_T$ . W obu przypadkach dystrybucja wskaźników użytych do uzyskania średnich czasów tranzytu musi być identyczna z dystrybucją substancji macierzystej, oraz muszą być zachowane inne warunki umożliwiające zastosowanie metody rozcieńczania wskaźników /patrz str. 35 /.



2.2. Krzywe ekstrakcji i ich interpretacja: przepuszczalność  
włośniczkowa, bariery dyfuzyjne, heterogenność  
tkankowa

Krzywe rozcieńczania pary wskaźników można znormalizować, umieszczając na osi rzędnych nie stężenia substancji w od-  
pływie żylnym, lecz stężenia znormalizowane do masy wstrzyk-  
niętych wskaźników,  $w = C(t)/m_0$ . Tak znormalizowana para  
krzywych służy do konstrukcji krzywej ekstrakcji,  $E(t)$ .

Ekstrakcja w czasie  $t$  :

$$E(t) = \frac{W_{ref}(t) - W_w(t)}{W_{ref}(t)} \quad [2.15.]$$

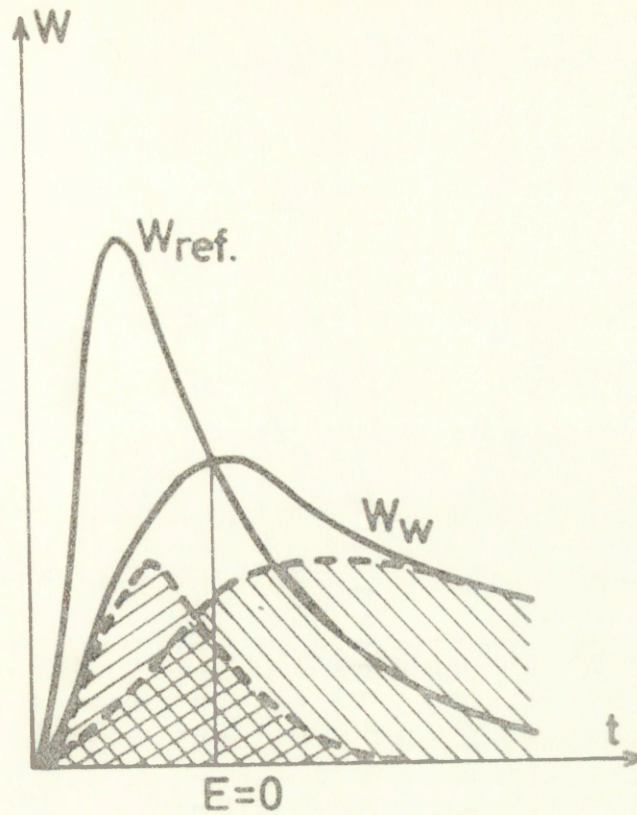
Dla wskaźników metabolicznie inertnych, jeżeli krzywe roz-  
cieńczania są prawidłowo znormalizowane i ekstrapolowane,

$$\int_{0, \infty} E(t) dt = 0 \quad [2.16.]$$

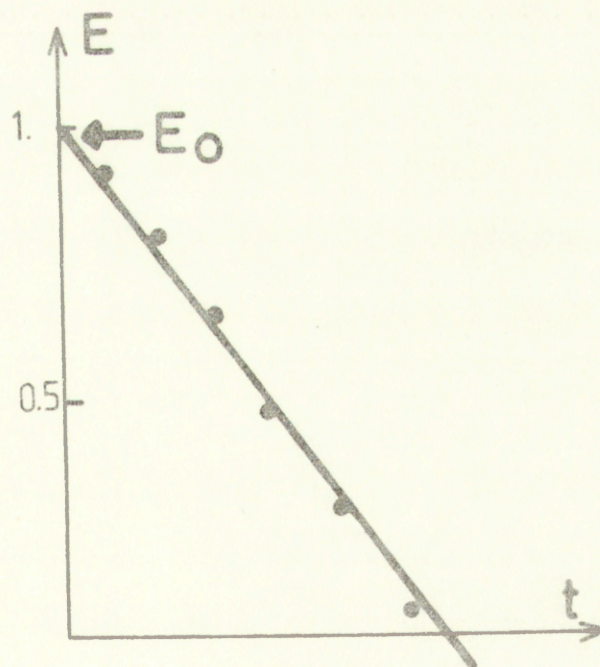
co oznacza, że nie nastąpiła w układzie transformacja żad-  
nego ze wskaźników i sumaryczna ekstrakcja w czasie dążącym  
do nieskończoności dąży do zera.

Przy interpretacji krzywych ekstrakcji należy zwrócić  
uwagę na fakt, że krzywa  $E(t)$  umożliwia niejako oddzielne  
obserwowanie dwóch składowych procesu wymiany wskaźnika  
dyfundującego pomiędzy krwią i tkanką, a mianowicie dyfuzji  
wskaźnika z krwi do tkanki, oraz dyfuzji wskaźnika z tkanki  
do krwi /zwanej dyfuzją wsteczną, backdiffusion/. Początek  
krzywych rozcieńczania odzwierciedla sytuację, gdy wskaźnik  
dyfunduje netto z krwi do tkanki, czego obrazem jest dodatnia  
wartość ekstrakcji /ryc. 2.8./. Po pewnym czasie pozanaczyniowa





Ryc. 2.8. Krzywa rozcieńczenia wskaźnika dyfundującego jako suma składników "throughput" i "exchange" /schemat/.



Ryc. 2.9. Krzywa ekstrakcji w przypadku dystrybucji wskaźnika ograniczanej przepływem /schemat/.



przestrzeń dostępna dla wskaźnika zostaje wypełniona i występuje chwilowa równowaga stężeń wskaźnika pomiędzy krwią a tkanką. Sytuacji tej odpowiada zerowa wartość ekstrakcji, czyli przecięcie się znormalizowanych krzywych rozcieńczenia. W dalszym ciągu procesu przewagę osiąga proces dyfuzji wstecznej i ekstrakcja osiąga wartości dodatnie.

Krzywą rozcieńczania wskaźnika dyfundującego można pojęciowo przedstawić jako sumę dwóch składników: krzywej odzwierciedlającej rozcieńczenie tej części masy wstrzykniętego wskaźnika, która nie opuściła przestrzeni naczyniowej /throughput component/, oraz krzywej odzwierciedlającej rozcieńczenie części podanego wskaźnika w przestrzeni pozanaczyniowej /exchange component/. Pierwszy składnik krzywej wskaźnika dyfundującego /czyli throughput component/ posiada kształt identyczny do kształtu krzywej wskaźnika odniesienia, podczas gdy drugi składnik /czyli exchange component/ jest w stosunku do krzywej odniesienia spłaszczony i przesunięty w czasie /ryc. 2.8./.

Na początku procesu wymiany wskaźnika dyfundującego pomiędzy krwią i tkanką jego stężenie w tkance wynosi zero. Dyfuzja wsteczna wówczas nie występuje. Jeżeli jest możliwa wiarygodna ekstrapolacja krzywych  $E(t)$  do czasu  $t = 0$  /który w tym wypadku jest czasem pojawiania się wskaźników w miejscu próbkowania/, ekstrakcję początkową w czasie zero /appearance time/,  $E_0 = \lim_{t \rightarrow 0} E(t)$ , wykorzystać można do obliczenia estymatu przepuszczalności włóscinkowej dla badanej substancji. Posłużyć się w tym celu można modelem zaproponowanym przez Crone'a /1963/. Model ten zakłada, że gdy nie występuje



dyfuzja wsteczna, tempo przechodzenia wskaźnika dyfundującego z włośniczki do tkanki jest proporcjonalne do jego stężenia pozostającego we włośniczce, na całej jej długości. Można wówczas wykazać, że jeżeli dyfuzja zachodzi zgodnie z prawem Ficka, to iloczyn przepuszczalności włośniczkowej i powierzchni na której zachodzi wymiana:

$$P S = F \cdot \ln \left( C_a / C_v \right) = F \cdot \ln \left( \frac{E}{1-E} \right) \quad [2.17.]$$

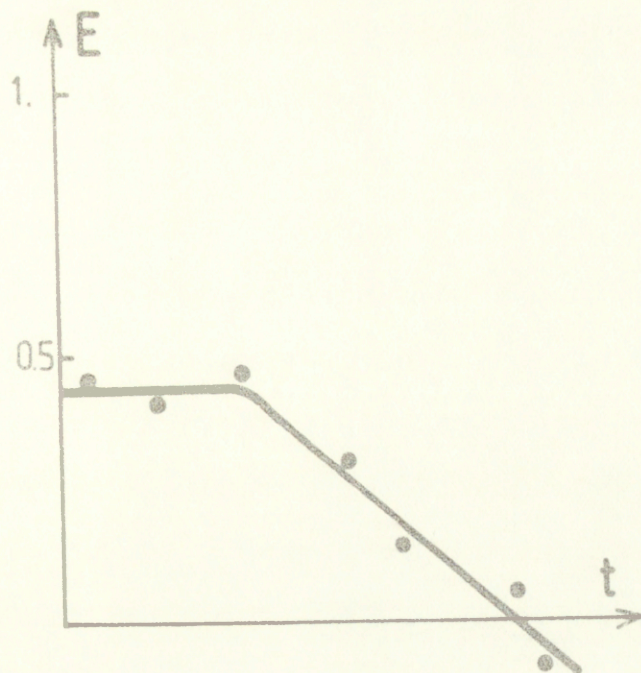
Model Crone'a jest ogromnym uproszczeniem rzeczywistości. Okazał się on jednak przydatny do określania przybliżonych wartości parametru PS dla różnych substancji /Crone i Thompson, 1973; Bolwig i Lassen, 1975; Raichle i wsp., 1976/ a w szczególności do oceny czynników ograniczających tempo procesu przechodzenia substancji z krwi do tkanki. Transfer ten może być limitowany podażą substancji, czyli tempem perfuzji tkankowej /perfusion-limited distribution/, lub przepuszczalnością dyfuzyjną ścian włośniczek lub błon komórkowych /diffusion-limited distribution/. W pierwszym przypadku, gdy dyfuzja jest ograniczana tempem perfuzji, równowaga rozmieszczenia wskaźnika pomiędzy krwią i tkanką następuje prawie natychmiast, a krzywa ekstrakcji,  $E(t)$ , ma charakter krzywej monotonicznie spadającej w czasie /ryc. 2.9./. Oznacza to, że dyfuzja wsteczna rozpoczyna się prawie natychmiast. W tym przypadku wartości początkowe ekstrakcji,  $E_0$ , są wysokie. Przykładem dystrybucji ograniczonej perfuzją jest zachowanie się inuliny podanej impulsowo do tętnicy nerkowej /Crone, 1963/, gdzie  $E_0 = 80\%$ , oraz



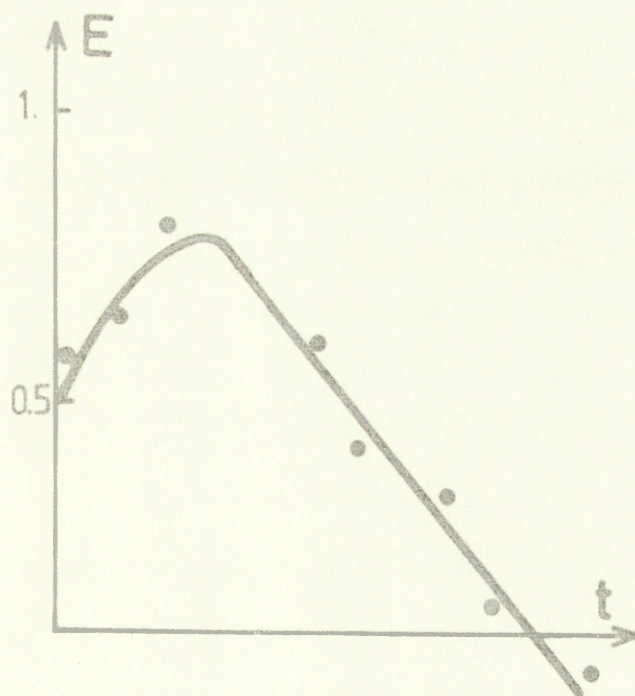
wymiana  $CO_2$  między krwią a mózgiem /Friis, Paulson i Hertz, 1970/.  
W przypadku drugim, gdy dyfuzja substancji z krwi do tkanki ograniczana jest przez przepuszczalność granicy krew-tkanka /bariery dyfuzyjne/, równowagowe rozmieszczenie wskaźnika w początkowej fazie procesu wymiany nie jest osiągnięte, na przeszkodzie stoi bowiem ograniczona /zbyt niska w stosunku do podaży substancji/ przepuszczalność granicy krew - tkanka, czyli bariera dyfuzyjna. Dyfuzja wsteczna nie następuje w tej fazie procesu. Krzywa ekstrakcji rozpoczyna się wówczas od plateau, a wartości ekstrakcji początkowej są znacznie niższe. Krzywe ekstrakcji tego typu /ryc. 2.10/ obserwowano m.in. dla wody w krążeniu mózgowym /Bolwig i Lassen, 1975/.  
W niektórych przypadkach /np. Rose i Goresky, 1976/ rejestrowano krzywe ekstrakcji, w których początkowej fazie zamiast plateau następował wzrost wartości  $E(t)$  /ryc. 2.11./.  
W interpretacji tego zjawiska przyjmuje się, że przy ograniczonej pojemności dyfuzyjnej włóściczek dla wskaźnika dyfundującego jego ekstrakcja z krwi rośnie wraz z czasem kontaktu wskaźnika ze ścianami włóściczek. Włóściczki, przez które krew przepływa dłużej oddają tkance większą frakcję wskaźnika, niż włóściczki, przez które krew przepływa krócej. Obserwowany kształt krzywej ekstrakcji jest więc wynikiem współistnienia bariery dyfuzyjnej i heterogenności włóściczkowych czasów tranzytu krwi.

Niesposób omówić w tym miejscu całości zagadnień związanych z interpretacją krzywych ekstrakcji. Ogólnie nadmienić należy, że oryginalny model Crone'a został następnie zmodyfikowany i znacznie skomplikowany /Goresky, Ziegler i Bach, 1970 ; Rose, Goresky i Bach, 1977/.





Ryc. 2.10. Krzywa ekstrakcji w przypadku dystrybucji wskaźnika ograniczanej dyfuzją /schemat/.



Ryc. 2.11. Krzywa ekstrakcji w przypadku współistnienia heterogenności tkankowej i barier dyfuzyjnych /schemat/.



Warto natomiast poruszyć pewne zagadnienia szczegółowe, związane z zastosowaniem techniki pojedynczego wstrzyknięcia - detekcji w odpływie do pomiarów PS i lokalizacji barier dyfuzyjnych. Po pierwsze, jedną z metod pozwalających stwierdzić, że dystrybucja wskaźnika nie jest limitowana dyfuzją /czyli że bariery dyfuzyjne nie są przeszkodą dla prawie natychmiastowego osiągnięcia równowagi dystrybucji wskaźnika między krwią a tkanką/ jest uzyskanie krzywych rozcieńczenia wskaźnika dla różnych przepływów i ich normalizacja do odpowiednich średnich czasów tranzytu, czyli w skali  $t/\bar{t}$ . Jeżeli tak znormalizowane krzywe nakładają się na siebie, oznacza to, że dystrybucja substancji ograniczana jest jedynie perfuzją /Bassingthwaighte, 1966; Bassingthwaighte i Yipintosi, 1974; Lassen i Perl, 1979/.

Po drugie, procesy mieszania się wskaźnika w krwi, następujące w układzie próbkującym /Goresky i Silverman, 1964/, oraz inne jeszcze procesy zachodzące wewnątrz układu naczyniowego a nie związane z wymianą substancji wskaźnikowej pomiędzy krwią w tkankę /efekt Taylora, p. str. 88 / prowadzą do zniekształcenia rejestrowanych krzywych rozcieńczenia. Odbija się to szczególnie silnie na otrzymanywanych tą drogą krzywych  $E(t)$  i wartościach  $E_0$ . Możliwy wpływ tych czynników musi więc być zawsze brany pod uwagę przy interpretacji krzywych ekstrakcji.

Po trzecie czynnikami zaciemniającymi obraz uzyskiwany przy pomocy metody rozcieńczania wskaźników mogą być przecieki tętniczo-żylne, anatomiczne /zespolenia tętniczo-żylne/, lub fizjologiczne /przeciek dyfuzyjny/. Metoda rozcieńczania



wskaźników może prowadzić do oceny wielkości przecieku tętniczo-żylnego /Sejrosen i Tonnesen, 1972/, ale w przypadku jego obecności celowość analizy krzywych  $E(t)$  może być kwestionowana.

### 2.3. Zastosowanie metody rozcieńczania wskaźników do tlenu: założenia pracy

Użycie metody rozcieńczania wskaźników do badania środowiska tlenowego tkanek przyczynić by się mogło do rozstrzygnięcia niektórych problemów, wobec których dotychczas stosowane techniki badawcze okazują się bezsilne. Zastosowanie analizy średnich czasów tranzytu umożliwiłoby po raz pierwszy pomiar całkowitej tkankowej /pozanaczyniowej, ale wewnątrz i zewnątrzkomórkowej/ zawartości tlenu. Pomiar taki mógłby posłużyć do oceny wewnątrzkomórkowego środowiska tlenowego. Zastosowanie analizy krzywych ekstrakcji umożliwiłoby śledzenie dyfuzji tlenu z krwi do tkanki i, ewentualnie, dyfuzji wstecznej, pozwalając zweryfikować hipotezę dotyczącą obecności barier dyfuzyjnych dla tlenu. Zastosowanie metody rozcieńczania wskaźników mogłoby również stać się wygodną techniką badania fizjologicznej funkcji mioglobiny w mięśniach, szczególnie przydatną do weryfikacji w warunkach in situ hipotezy o ułatwianiu transportu tlenu przez to białko.

We wszystkich dotychczasowych zastosowania metody rozcieńczania wskaźników przyjmowano, że niezbędnym warunkiem umożliwiającym wykorzystanie teorii średnich czasów tranzytu



do analizy krzywych rozcieńczenia jest metaboliczna o-  
jętność użytych wskaźników, czyli zachowanie ich masy przy  
przejściu przez układ naczyniowy badanego narządu. Przy-  
jęcie tego punktu widzenia uniemożliwiłoby zastosowanie  
techniki rozcieńczenia wskaźników do tlenu, bowiem jest on  
substancją metabolizowaną. Ekstrakcja tlenu netto dla po-  
trzeb metabolicznych waha się, w zależności od badanego  
narządu i jego stanu fizjologicznego, od 10% do ponad 80%,  
nie może więc zostać pominięta ani zaniedbana.

Poniżej przedstawiony jest sposób w jaki teoria średnich  
czasów tranzytu może zostać zastosowana do tlenu.

W niniejszym rozdziale rozpatrzone są problemy teoretycz-  
ne, większość zagadnień technicznych omówiona jest w dalszej  
części rozprawy. Aby użyć metody rozcieńczenia wskaźników  
do badania wymiany tlenu między krwią a tkankami, musimy  
dysponować parą odpowiednich substancji wskaźnikowych o  
następujących własnościach. Jedną, wskaźnik odniesienia, w  
układzie naczyniowym badanego narządu podlega identycznej  
dystrybucji jak tlen, ale nie przekracza ścian włóścierek.  
Drugą, wskaźnik "tlenowy", rozmieszcza się pomiędzy krwią  
a tkanką w sposób identyczny, a w tkance ulega identycznym  
przemianom metabolicznym, jak substancja macierzysta, czyli  
tlen. Znalezienie właściwego wskaźnika odniesienia jest  
proste: ponieważ w układzie naczyniowym dominująca część  
tlenu jest związana z hemoglobina w erytrocytach, można  
użyć znakowanych erytrocytów. Jedynym wskaźnikiem "tlenowym",  
którego zastosowanie można rozpatrzeć, jest tlen znakowany,  
czyli izotop tlenu. Dotychczas próby użycia znakowanego tlenu



jako wskaźnika w metodzie rozcieńczania podejmowane były kilkakrotnie. Używano  $^{15}\text{O}_2$  /Ter-Pogossian i wsp., 1970, p. str. 5 / lub  $^{18}\text{O}_2$  /Chinard i wsp., 1967; Forster, Goodwin i Itada, 1976/. Nigdy jednak do analizy wyników nie użyto klasycznych instrumentów teorii rozcieńczania wskaźników, analizy  $\bar{t}$  i  $E(t)$ . Próba taka jest podjęta w niniejszej pracy.

Tlen znakowany spełnia cały szereg kryteriów doskonałego wskaźnika dla tlenu. Jeżeli wykluczmy efekt izotopowy<sup>+</sup>, to dla badanego układu znakowany tlen jest nierozróżnialny od tlenu występującego naturalnie. Jego cząsteczki podlegają identycznym procesom konwekcji, dyfuzji i metabolizmu, co cząsteczki nieznakowanego tlenu. Możemy się więc spodziewać, że frakcja znakowanego tlenu podlegająca metabolizmowi będzie równa /w czasie dążącym do nieskończoności/ metabolizowanej frakcji "zwykłego" tlenu.

Jeżeli badany układ znajduje się w stanie metabolicznie i hemodynamicznie stabilnym, to w każdym elemencie czasu  $dt$  do badanego narządu dociera jednakowa ilość tlenu równa  $F [O_2]_a dt$ . Z tej porcji tlenu, po czasie  $t \rightarrow \infty$ , część  $m = F ([O_2]_a - [O_2]_v) dt$  ulegnie zużyciu metabolicznemu, natomiast pozostałość,  $t = F ([O_2]_v) dt$ , pojawi się na wyjściu naczyniowym układu /czyli w krwi żyłnej/. Jeżeli w wybranym przez nas czasie  $t$  do układu dojdzie element krwi zawierający znakowany tlen, to jego dystrybucja metaboliczna będzie identyczna jak dystrybucja tlenu "zwykłego". Badany

---

<sup>+</sup>Właściwości chemiczne izotopowego tlenu są identyczne, jak jego głównego naturalnego nuklidu,  $^{16}\text{O}$ . Jedyne więc różnice mogą być związane z różnicą mas atomowych. Ta jednak jest nieznaczna; wynosi ona, pomiędzy  $^{16}\text{O}$  a  $^{18}\text{O}$ , 12,5%.

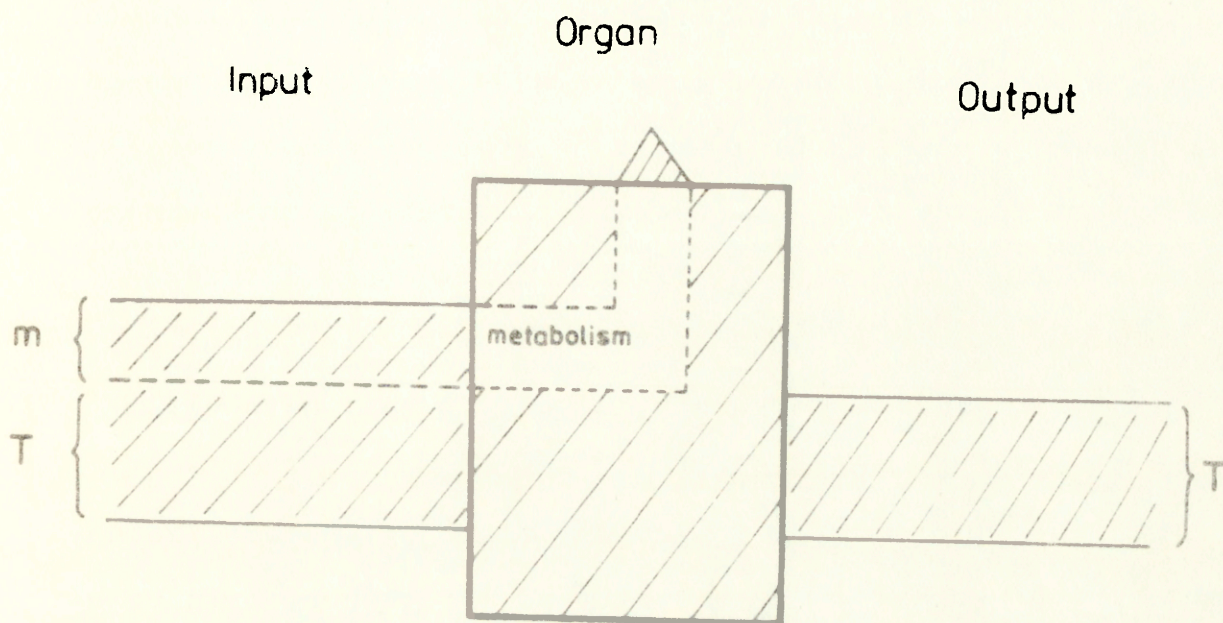


Narząd nie jest bowiem w stanie odróżnić, że w wybranej przez nas chwili na wejściu naczyniowym zamiast kolejnej porcji tlenu "zwykłego" znalazła się porcja tlenu znakowanego. Jednocześnie jednak dynamika procesu wymiany tlenu znakowanego pomiędzy krwią a tkanką może być przez nas obserwowana, jeżeli tylko dysponujemy metodą pozwalającą rozróżnić tlen "zwykły" i znakowany.

Ponieważ znakowany tlen jest metabolizowany, czyli część podanej dawki równa  $[O_2]_a - [O_2]_v / [O_2]_a$  przestaje w pewnej chwili być tlenem cząsteczkowym, proste zastosowanie analizy średnich czasów tranzytu nie jest możliwe. Formalnie musielibyśmy bowiem założyć, że czas tranzytu cząsteczek tlenu, które uległy w tkance zmetabolizowaniu równy jest nieskończoności: do badanego narządu wchodzi cząsteczki  $O_2$ , które nigdy już z niego /jako  $O_2$ / nie wychodzą. Aby ominąć tę trudność można założyć, że z przyczyn wyjaśnionych powyżej wiemy a priori, że frakcja znakowanego tlenu równa  $[O_2]_a - [O_2]_v / [O_2]_a$  zostanie w układzie zmetabolizowana, zaś frakcja równa  $[O_2]_v / [O_2]_a$  przejdzie przez układ w postaci tlenu cząsteczkowego /ryc. 2.12./.

Cząsteczki znakowanego tlenu od momentu wejścia w reakcje metabolizmu komórkowego, które są nieodwracalne, "przystają się liczyć", gdyż od tej chwili nie uczestniczą już w dalszych procesach dystrybucji  $O_2$  /jak np. dyfuzja wsteczna/. Możemy je więc pominąć w obliczeniu średniego czasu tranzytu wskaźnika tlenowego. Natomiast cząsteczki znakowanego tlenu, wchodzące w skład frakcji niemetalizowanej /czyli transmittowanej/ nie wchodzi w tkance w nieodwracalne reakcje, a więc





$$m = F \cdot ([O_2]_a - [O_2]_v) \cdot dt$$

$$T = F \cdot [O_2]_v \cdot dt$$

Ryc. 2.12. "Metaboliczne frakcjonowanie" tlenu w krążeniu badanego narządu.

m - frakcja  $O_2$  metabolizowana w tkance

T - frakcja  $O_2$  transmitowana przez tkankę, która zachowuje się tak, jakby była gazem metabolicznie obojętnym.



pod tym względem zachowują się tak, jakby były cząsteczkami gazu metabolicznie inertnego.

Zastosowanie klasycznej analizy średnich czasów tranzytu i krzywych ekstrakcji do transmitowanej frakcji znakowanego tlenu uzależnione jest również od stosunku czasowego /sekwencji/ zachodzenia procesów rozmieszczania znakowanego tlenu w tkance i jego metabolizmu. Teoretycznie istnieją dwie możliwości: albo tlen jest najpierw rozmieszczany w tkance, a potem metabolizowany, albo dyfuzja i metabolizm tlenu zachodzą równocześnie.

Możliwość pierwsza, że znakowany tlen jest metabolizowany dopiero po zakończeniu jego dystrybucji w tkance, była założeniem pierwszego modelu obliczeniowego zastosowanego do ilościowej analizy krzywych rozcieńczania znakowanego tlenu /Forster, Goodwin i Itada, 1976/. Model ten nie wykorzystywał analizy średnich czasów tranzytu, ani analizy krzywych ekstrakcji, lecz bazował na analizie równania zachowania masy w badanym układzie. Ze względu na przyjęte założenia model ten nie może być uznany za realistyczny.

Możliwość druga, że dyfuzja i immobilizacja wskaźnika tlenowego zachodzą równocześnie, została przyjęta w niniejszej pracy. Prawidłowość tego założenia została zweryfikowana przy pomocy badań modelowych.

Celem podjętych badań było opracowanie bardziej precyzyjnych, niż stosowane poprzednio /np. Forster, Goodwin i Itada, 1976/ metod rejestracji krzywych rozcieńczania znakowanego tlenu, oraz otrzymanie krzywych rozcieńczania wskaźnika tlenowego przez mózg i kończynę tylną psa, jako



przykłady narządów, których tkanki nie zawierają lub zawierają mioglobinę. Uzyskane wyniki posłużyć miały do sformułowania ilościowych wniosków dotyczących środowiska tlenowego badanych tkanek. Przyjęcie założenia, że "transmitowana" przez badany układ frakcja znakowanego tlenu zachowuje się w istocie jak gaz obojętny umożliwia wyznaczenie pozanaczyniowej masy niemetabolizowanego tlenu w układzie. Przez analogię do równań [3.11.] i [3.13.], tkankowa przestrzeń dystrybucji tlenu,

$$V_d(O_2) = \left( [O_2]_{\bar{t}} / [O_2]_v \right) \cdot V_T = F \left[ \bar{t}({}^*O_2) - \bar{t}(\text{ref.}) \right] \quad [2.19.]$$

gdzie  $\bar{t}({}^*O_2)$  jest średnim czasem tranzytu niemetabolizowanej frakcji znakowanego tlenu, a  $[O_2]_{\bar{t}}$  - średnim tkankowym /pozanaczyniowym/ stężeniem tlenu. To ostatnie może zostać wyznaczone jako:

$$[O_2]_{\bar{t}} = F/V_T \cdot [O_2]_v \cdot \left[ \bar{t}({}^*O_2) - \bar{t}(\text{ref.}) \right] \quad [2.20.]$$

W takim ujęciu do wyznaczenia  $[O_2]_{\bar{t}}$  potrzebne są pomiary krzywych rozcieńczenia znakowanego tlenu i wskaźnika odniesienia /chromowanych erytrocytów,  $^{51}\text{Cr-rbc}$ /, oraz wyznaczenie tempa perfuzji na jednostkę objętości tkanki,  $F/V_T$ .



### 3. METODY POMIARU KRZYWYCH ROZCIEŃCZANIA $^{18}\text{O}_2$ I WSKAŹNIKÓW ODNIESIENIA

Zastosowanie techniki rozcieńczenia wskaźników do badania środowiska tlenowego tkanek wymaga użycia izotopu tlenu. Pierwiastek ten posiada pięć izotopów: naturalnie występujący  $^{16}\text{O}$ , towarzyszące mu w śladowych ilościach stabilne  $^{17}\text{O}$  i  $^{18}\text{O}$ , oraz krótkożyjące, radioaktywne, sztuczne izotopy  $^{15}\text{O}$  i  $^{14}\text{O}$ , o czasach półrozpadu odpowiednio 123 s i 17 s.

Zastosowanie izotopów radioaktywnych,  $^{15}\text{O}$  lub  $^{14}\text{O}$  jest niecelowe, ponieważ nie można rozróżnić sygnału pochodzącego z niezmetabolizowanego tlenu od sygnału pochodzącego z wody powstałej w procesach metabolicznych /patrz omówienie metod  $^{15}\text{O}$ , str. 8 /. Pozostaje wykorzystanie nieradioaktywnych izotopów stabilnych, które można oznaczać ilościowo przy pomocy kilku technik.

Tlen-17 może być mierzony przy pomocy magnetycznego rezonansu jądrowego /NMR/, ponieważ posiada nieparzystą ilość nuklidów w jądrze. Jednakże obecne metody NMR są zbyt mało czułe, aby można mierzyć tlen w tkance. Alternatywą jest rozróżnianie stabilnych izotopów tlenu na podstawie ich mas cząsteczkowych. W dotychczasowych badaniach do tego celu wykorzystywano chromatografię gazową /Rose i Goresky, 1982/, lub spektrometrię masową /Lassen i wsp., 1965; Forster, Goodwin i Itada, 1976/.

Idealnym eksperymentem byłoby mierzenie krzywych rozcieńczenia znakowanego tlenu w tkance lub w krwi żyłnej in situ.



Z przyczyn technicznych jest to niemożliwe. Żaden z istniejących układów do spektrometrii masowej gazów w tkankach lub w krwi in situ nie posiada rozdzielczości czasowej i czułości wystarczającej do zarejestrowania dynamiki profilu znakowanego tlenu w tkance lub w krwi po jego dotętnicznym podaniu. Dla przykładu, Seylaz i Pinard /1979/ skonstruowali próbnik tkankowy do spektrometrii masowej gazów w tkankach in situ, którego czas odpowiedzi w fizjologicznym zakresie temperatur wynosi ponad 40 s. Do jego konstrukcji użyta została błona polietylenowa. Użycie błon teflonowych /np. Roberts i Owens, 1972/ prowadzi do uzyskania czasów odpowiedzi od 5 do 20 min. Użycie bardziej przepuszczalnej dla gazów błony silikonowej skraca czas odpowiedzi układu do 8 s, ale powoduje zniekształcenie wyników przez zjawisko deplecji /zubożenia/ badanego środowiska tlenowego /Seylaz i Pinard, 1979/. Należy bowiem zaznaczyć, że pomiar przy pomocy spektrometru masowego wymaga próbkowania badanego gazu i wprowadzenia go do komory jonizacyjnej.

Konieczne więc było użycie metody Off-line, czyli wykonanie eksperymentów w układzie "pojedyncze wstrzyknięcie, detekcja w odpływie żylnym", wymagającym pobierania próbek krwi i późniejszego wykonania pomiarów. Ze względu na anatomiczne ograniczenia dotyczące ilości krwi która może być pobierana w krótkim czasie z odpływu żylnego badanego narządu, wybrana została metoda spektrometrii masowej, która jest bardziej czuła od chromatografii gazowej.

Przyjęte zostały następujące założenia. Po pierwsze, znakowana krew wstrzykiwana dotętniczo nie może powodować



ostrzych zaburzeń hemodynamiki badanego narządu. Po drugie, czasowa rozdzielczość metody musi być lepsza od 1 s, a jej czułość zapewniać rejestrowanie zstępującego ramienia krzywej rozcieńczania tak długo, aby umożliwić poprawną ekstrapolację jej przebiegu do czasu nieskończoności.

Po trzecie, we wszystkich czynnościach ze znakowaną krwią i próbkami konieczne jest zachowanie warunków gazoszczelności, aby zapobiec wymianie izotopowego tlenu z tlenem atmosferycznym.

W eksperymentach użyto tlenu-18, oraz chromu-51 umieszczonego w erytrocytach jako wskaźnika odniesienia. W niektórych doświadczeniach użyto również acetylenu i trytowanej wody /THO/. W celu zachowania warunków anaerobowych znakowaną krew i próbki przenoszono w szklanych gazoszczelnych strzykawkach typu B-D Yale, które posiadają indywidualnie dopasowane tłoczki. Pozostałe szczegóły techniczne, wspólne dla obu układów doświadczalnych, omówione są poniżej.

### 3.1. Znakowanie krwi

Na początku doświadczenia, zwykle przed uśpieniem zwierzęcia, około 30 ml krwi pobierane było z żyły na heparynę. Krew była następnie wirowana w sposób standardowy, aby oddzielić krwinki i osocze.

Krwinki inkubowane były przez 30 min w temperaturze 37°C z solą fizjologiczną zawierającą 150-300  $\mu$ Ci  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  /New England Nuclear/. Następnie dodawano 10 mg kwasu askorbinowego, aby zredukować jony chromianowe i krwinki

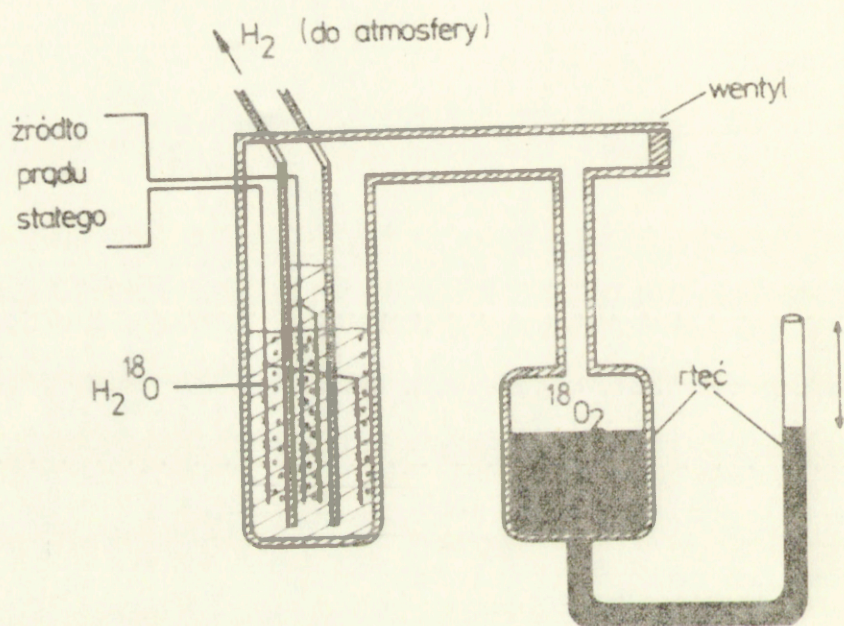


przemywano trzykrotnie roztworem soli fizjologicznej, aby zapewnić usunięcie pozakomórkowego chromu.

Do osocza dodawano barwnika zieleni indocyjaninowej /ICG, Hynson, Wescott and Dunning/ w ilości zapewniającej ostateczne stężenie w znakowanej krwi około  $400 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Następnie znakowane osocze i krwinki, po połączeniu i wymieszaniu, były odtlenowywane w tonometrze w temperaturze  $5-10^{\circ}\text{C}$  przy pomocy mieszaniny  $5\% \text{CO}_2$  w  $\text{N}_2$ . Po sprawdzeniu /przy pomocy elektrody  $\text{P}_{\text{O}_2}$ , patrz poniżej/, że osiągnięte zostało prawie całkowite odtlenowanie znakowanej krwi [ $\text{P}_{\text{O}_2} < 5 \text{ Torr}$ /], krew pobierano z tonometru do gazoszczelnej strzykawki i mieszano z tlenem- $^{18}$ , uzyskanym przy pomocy elektrolizy  $99,5\% \text{H}_2^{18}\text{O}$  /Prochem/. Elektroliza wzbogacanej tlenem- $^{18}$  wody przeprowadzana była w urządzeniu pokazanym na ryc. 3.1.

W większości doświadczeń efektywność znakowania krwi tlenem- $^{18}$  sprawdzano w trakcie znakowania przy pomocy spektrometru masowego /patrz poniżej/. We wszystkich przypadkach po zakończeniu procedury znakowania mierzono  $\text{P}_{\text{O}_2}$  krwi, które wynosiło około  $300 \text{ Torr}$ . Następnie znakowana krew była rozdzielana anaerobowo do dwumilimetrowych gazoszczelnych strzykawek i przechowywana w temperaturze  $0^{\circ}\text{C}$  do momentu użycia.





Ryc. 3.1. Schemat elektrolizera do otrzymywania tlenu-18. Elektrody znajdują się w umieszczonych współosiowo szklanych cylindrach /po lewej stronie schematu/.  $^{18}\text{O}_2$  zbiera się w pojemniku nad rtęcią. Regulując poziom rtęci w pojemniku można w układzie "magazynującym" tlen-18 wywołać podciśnienie /podczas elektrolizy, celem przyspieszenia jej tempa/ lub nadciśnienie /podczas pobierania  $^{18}\text{O}_2$  do gazo-szczelnej strzykawki przez wentyl/.



### 3.2. Pobieranie próbek

We wszystkich eksperymentach stosowano układ pobierający próbki złożony z kateteru rozmiaru 16 /Intracath, 3112, Desert Pharmaceutical Co./ umieszczonego w próbkowanym odpływie żylnym, połączone z pompą perystaltyczną /Sigma/. Wylot pompy połączony był, poprzez przepływową kuwetę densytometru /Waters XG-302/ z beztlenowym kolektorem próbek, który został /wg projektu autora pracy/ wykonany przez p. J. Pili.

Bezettlenowy kolektor próbek /ryc. 3.2./ zbudowany jest z dwóch płaskich walców /dysków/. Górny dysk wykonany jest z Durlenu. Przymocowany jest on do osi silnika elektrycznego, co umożliwia jego ruch obrotowy ze stałą, regulowaną szybkością. Na obrzeżach znajduje się 36 otworów o średnicy 1,5 mm, w które wkładane są metalowymi końcówkami pięciodziałowymi strzykawki B-D Yale. Ze względu na właściwości mechaniczne /dużą elastyczność/ Durlenu złącza końcówek strzykawek z dyskiem są gazoszczelne. Dolny dysk, zbudowany z teflonu, jest nieruchomy i posiada jedną szczelinę, która połączona jest z wylotem kuwety densytometru. Powierzchnie styku dysków są bardzo gładko zeszlifowane. Dodatkowo są one pokrywane smarem próżniowym, aby zmniejszyć tarcie i zapewnić szczelność styku.

Przed uruchomieniem kolektora strzykawki są anaerobowo wypełniane 2,5 do 4 ml płynu Drabkina /roztwór zawierający 4 g saponiny i 7 g żelazicyjanku potasu na litr, zrównoważony azotem do  $P_{O_2} < 1$  Torr, kontrolowane elektrodą tlenową/ i umieszczane w "stacjach" na górnym dysku.

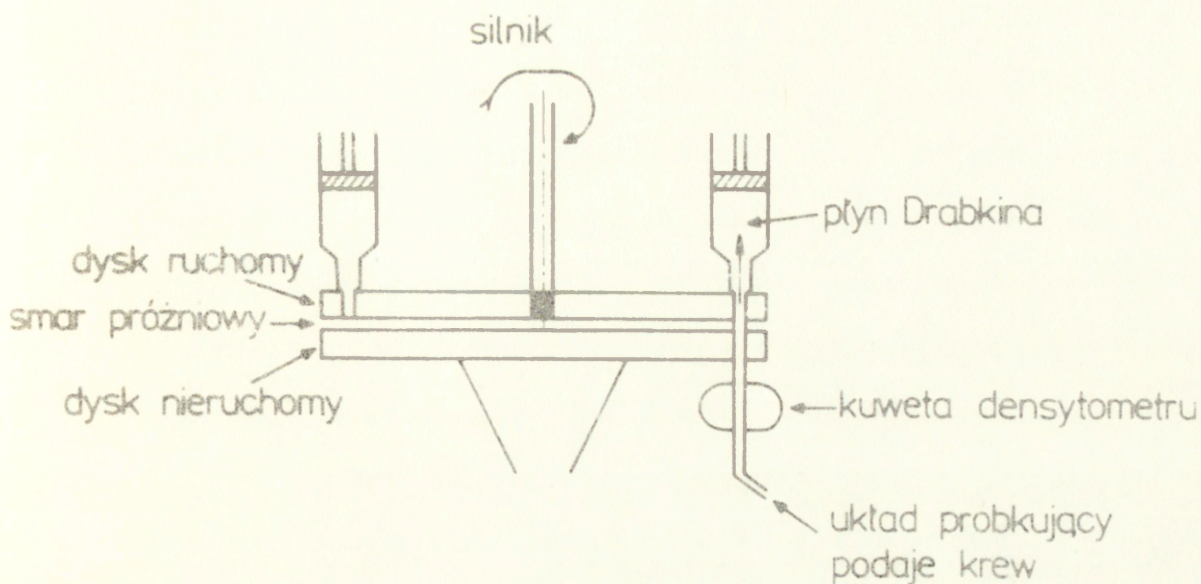


Przed dokonaniem właściwego eksperymentu 2 ml krwi zawierającej ICG wstrzykiwane jest do wejścia tętniczego badanego narządu. W tym czasie krew przepływa przez kolektor /górny dysk jest nieruchomy/ i jest zwracana zwierzęciu. Służy to do wyznaczenia czasu potrzebnego do pojawienia się wskaźników na wejściu do kolektora. Następnie 2 ml krwi znakowanej izotopami wstrzykiwane jest szybko /w ciągu 1-3 s/ do tętnicy, a kolektor uruchamiany jest kilka sekund przed przewidywanym dojściem na jego wejście profilu izotopów.

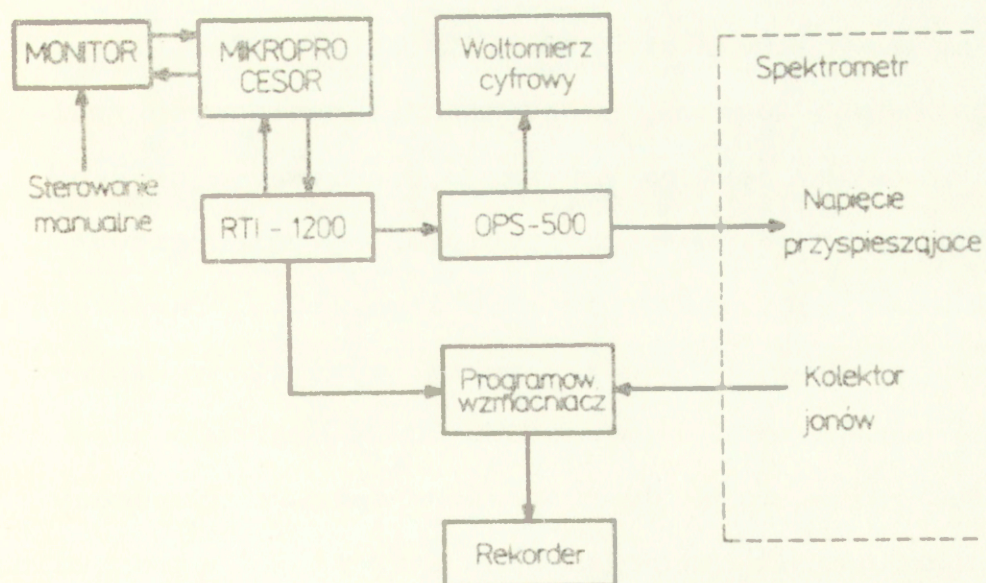
Po włączeniu silnika górny dysk kolektora rotuje nad nieruchomym dolnym dyskiem i krew pompowana jest kolejno do odbierających próbki strzykawek. Zazwyczaj niewielka ilość krwi ulega zatrzymaniu pomiędzy płytami kolektora, ale zawartość krwi jest później oznaczana w próbkach /p. str. 68 /, co umożliwia korekcję na różnice w rozcieńczeniach. Ponieważ połączenia pompy z kolektorem są elastycznymi rurkami, w momencie zmiany "stacji" odbierającej następuje sprężenie krwi na wejściu kolektora, dzięki czemu w momencie nałożenia się szczeliny dysku dolnego z otworem dysku górnego krew jest do strzykawki wtlaczana pod ciśnieniem. Przełamuje to bezwładność tłoczka i zapobiega mieszaniu się próbek między sobą.

Po zakończeniu próbkowania strzykawki są wyjmowane z otworów w górnym dysku, zamykane metalowymi przykrywkami, dokładnie mieszane i umieszczane w temperaturze 0°C w środowisku N<sub>2</sub>, gdzie są przechowywane do momentu wykonania analiz na spektrometrze masowym.





Ryc. 3.2. Anaerobowy kolektor krwi, przekrój poprzeczny /opis w tekście/.



Ryc. 3.3. Schemat blokowy mikrokomputerowego sterowania spektrometrem masowym.



### 3.3. Pomiar żylnego profilu wskaźnika tlenowego przy pomocy spektrometrii masowej

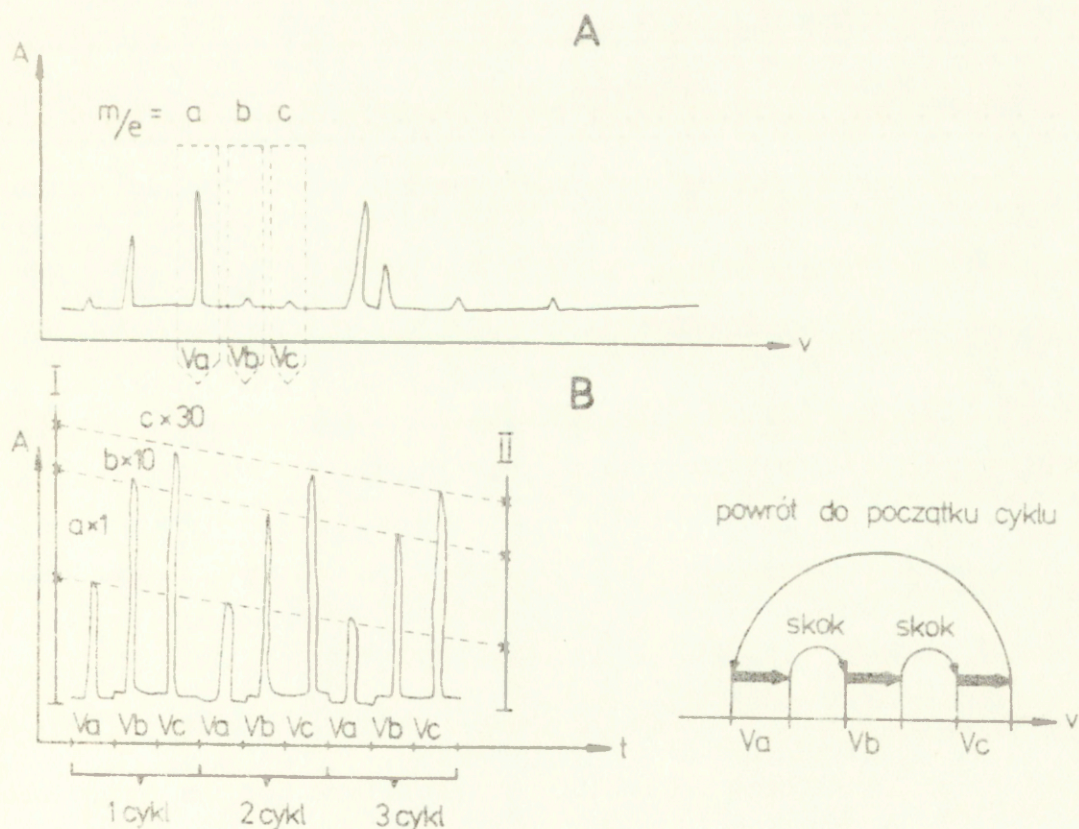
Do pomiaru gazów rozpuszczonych w cieczach zastosowano spektrometr masowy Consolidated Electrodynamics /Du Pont/, model 21-620-A. Urządzenie to działa na zasadzie separacji cząsteczek zjonizowanego gazu w stałym polu magnetycznym, po ich rozpędzeniu przy pomocy regulowanego pola elektrostatycznego /magnetic deflection/. Urządzenie to służy do rejestracji widma rozkładu wartości masa/ladunek,  $m/e$ , w próbce gazu wprowadzonego do układu analizującego. Rejestracja taka wykonywana jest przez powolne zmiany napięcia pola przyspieszającego i zapisywanie prądu w układzie detekcyjnym /kolektor jonów i jego wzmacniacze/ w funkcji napięcia przyspieszającego. Prąd ten jest proporcjonalny do ilości jonów wychwyconych przez kolektor, a wartość  $m/e$  charakteryzowana na podstawie wartości napięcia przyspieszającego i odpowiednich wzorców kalibracyjnych.

Ze względu na niewielką zawartość większości gazów, w tym tlenu, w roztworach wodnych, stosowanie standardowych /wolnych/ czasów analizy jest nieprzydatne, ponieważ zjawisko deplecji ciekłej próbki w wyniku pobierania z niej gazów przez układ próbkujący spektrometru uniemożliwia prawidłową interpretację wyniku. Problem ten został rozwiązany poprzez użycie systemu mikrokomputerowego SBC 80/20 opartego na mikroprocesorze Intel 80-80A, sprzężonego przy pomocy real time interface RTI 1200 /Analog Devices/ z programowalną szybką jednostką generacji mocy OPS-500 /Kepco, Inc./ i programowalnym wzmacniaczem sygnału z kolektora. Dwa ostatnie



elementy układu zastępowały odpowiadające im ręcznie sterowane podzespoły spektrometru masowego. /Konstruktorem układu był dr R. Ader/.

Schemat blokowy układu pomiarowego przedstawiony jest na ryc. 3.3. Zastosowana konfiguracja umożliwiła programowanie systemu pomiarowego tak, aby zmienił on napięcie przyspieszające w sposób szybki i to jedynie w wąskich zakresach odpowiadających rejestrowanym pikom o wybranej wartości  $m/e$ . Ponadto wzmacnienie rejestrowanego sygnału również było programowane, dla każdego pikę oddzielnie /ryc. 3.4./.





Ryc. 3.4. Zasada działania standardowego układu rejestracji widma  $m/e$  w próbce przy pomocy spektrometru masowego /A/, oraz układu sterowanego mikrokomputerem /B/, wraz z ilustracją zasady wyznaczania względnych wysokości pików metodą interpolacji.

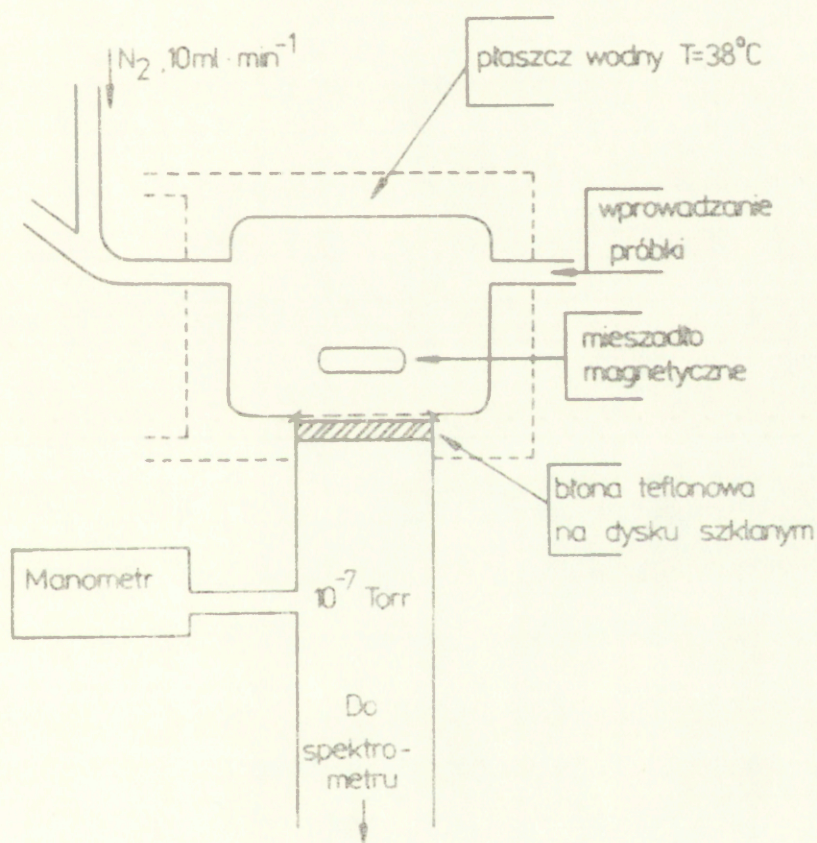
/A/. W układzie standardowym napięcie przyspieszające  $V$  zmienia się w sposób ciągły i powolny, przemiatając /skanując/ cały zakres napięciowy. Sygnał prądowy z kolektora jonów A posiada stałe wzmocnienie dla całego zakresu  $V$ , czyli dla każdego rejestrowanego pików  $m/e$ .

/B/. W układzie sterowanym mikrokomputerem piki odpowiadające wybranym wartościom  $m/e = a, b, c, \dots$ , zapamiętywane są przez układ sterujący jednostką generacji mocy pod postacią charakteryzujących je zakresów napięciowych  $v_a, v_b, v_c, \dots$ , /układ może zapamiętać położenia sześciu różnych pików/. Piki lokalizowane są przy pomocy wzorców. Generator mocy sterowany jest w ten sposób, że generowane napięcie przyspieszające przemiatane jedynie zaprogramowane zakresy napięciowe  $v_a, v_b, v_c, \dots$ , a pomiędzy ich krańcami wykonuje natychmiastowe skoki. Po zakończeniu przemiatania sekwencji pików układ wraca do początku cyklu.

W przypadku badania tlenu piki  $m/e = 32, 34, 36$  przemiatane były cyklicznie trzy do sześciu razy. Mimo że czas przemiatania dla pojedynczego pików był krótki, rzędu 10-15 s, zjawiska deplecji nie udało się uniknąć. Dynamika deplecji z dobrze mieszanej próbki ma charakter wykładniczy, lecz w krótkich odcinkach czasowych może być przybliżona prostą. Frakcję  $^{18}\text{O}_2$  w próbce,  $\alpha$ , wyznaczano przez interpolację prostych przechodzących przez szczyty pików o takiej samej  $m/e$  do arbitralnie wybranych czasów na początku /I/ i na końcu /II/ pomiaru.



Badana próbka umieszczana była w naczyniu pomiarowym /ryc. 3.5./, które jest modyfikacją konstrukcji Itady i Forstera /1977/. Złożone jest ono ze szklanej, termostato- wanej obudowy zamykającej teflonową błonę /50  $\mu\text{m}$  grubości/ opierającą się na płytce z porowatego szkła, która rozdziela próbkę płynu od układu próbkującego spektrometru.



Ryc. 3.5. Naczynie pomiarowe, przekrój poprzeczny. Próbki wprowadzane przy minimalnym nadciśnieniu  $\text{N}_2$  w układzie, aby zapobiec kontaminacji powietrzem atmosferycznym.



Gazy rozpuszczone w próbce zasysane są do komory jonizacyjnej spektrometru przez błonę, której przepuszczalność jest tak niewielka, że w układzie pomiarowym zachowana jest wysoka próżnia  $/10^{-7}$  Torr/. Elementy naczynia pomiarowego są bardzo dokładnie dopasowane i uszczelnione smarem próżniowym. Podczas pomiaru próbka jest energicznie mieszana mieszadłem magnetycznym, aby uniemożliwić powstanie pozbawionej gazów warstwy płynu w bezpośrednim sąsiedztwie błony.

W najczęściej wykonywanej konfiguracji cykl pomiarowy obejmował cykliczne przemiatanie trzech pików tlenu, odpowiadających wartościom  $m/e = 32, {}^{16}O_2; 34, {}^{16}O{}^{18}O$  i  $36, {}^{18}O_2$ . Wzorcem dla lokalizacji pików  $m/e = 32$  było powietrze atmosferyczne. Wzorcem dla lokalizacji pozostałych dwóch pików tlenu była krew wysycana  ${}^{18}O_2$ . Po odpowiednim wzmocnieniu prąd w układzie kolektora jonów rejestrowano przy pomocy ultraczułego rejestratora y-t typu Speedomax /Leeds and Northrup Co./. Przy wzmocnieniach wyższych od 1 sygnał z kolektora był elektronicznie filtrowany. Korekcję na tło układu pomiarowego, ewentualne drobne przecieki tlenu atmosferycznego w układzie próbkującym i pozostałości  $O_2$  w płynie służącym do pobierania próbek przeprowadzano rejestrując piki tlenowe z próbki odtlenionego płynu Drabkina i odejmując wartość tła od wysokości pików. Korekcję na deplecję gazów w próbce przeprowadzano metodą ekstrapolacji /p. ryc. 3.4. B/. Następnie na podstawie wysokości pików wyznaczano frakcję  ${}^{18}O_2$  w próbce,  $\alpha$ , równą:

$$\alpha = \frac{h_{36}}{h_{32} + h_{34} + h_{36}} \quad [3.1.]$$

gdzie  $h$  oznacza wysokość danego pików po korekcji na tło i wzmocnienie.



Wszystkie trzy typy cząsteczek tlenu / $^{16}\text{O}_2$ ,  $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$  i  $^{18}\text{O}_2$ / posiadają identyczną rozpuszczalność w wodzie i w teflonie, oraz bardzo zbliżoną ruchliwość dyfuzyjną. Wynika z tego, że wysokości pików,  $h$ , są proporcjonalne zarówno do ciśnień cząstkowych, jak i do stężeń trzech typów cząsteczek tlenu w próbce, a więc:

$$\alpha = \frac{P_{^{36}\text{O}_2}}{P_{^{32}\text{O}_2} + P_{^{34}\text{O}_2} + P_{^{36}\text{O}_2}} = \frac{[^{36}\text{O}_2]}{[^{32}\text{O}_2] + [^{34}\text{O}_2] + [^{36}\text{O}_2]} \quad [3.2.]$$

Doświadczalnym potwierdzeniem prawdziwości zależności [3.2.] jest obserwacja, że wartości  $\alpha$  obliczone przez ekstrapolację do początku i do końca cyklu /odpowiednio linia I i II na ryc. 3.4.B/ różniły się od siebie o nie więcej niż 5%, przy czym kierunek tej różnicy był przypadkowy.

Ponieważ zawartość krwi, a co za tym idzie, tlenu w próbkach była różna, obliczenie  $[^{18}\text{O}_2]$  w próbkach przeprowadzono w oparciu o założenie, że podczas pomiaru  $[\text{O}_2]_v = \text{const}$  wówczas dla próbki pobranej w czasie  $t$ :

$$[^{18}\text{O}_2]_v(t) = [\text{O}_2]_v \cdot \alpha(t) \quad [3.3.]$$

W ten sposób wyznaczono profil żylny wskaźnika "tlenowego" w jednostkach stężenia tlenu ( $\mu\text{l } ^{18}\text{O}_2/\text{ml}$  krwi)



### 3.4. Krzywe odniesienia i ich normalizacja

Aktywność  $^{51}\text{Cr}$  w próbkach mierzono przy pomocy licznika gamma typu Searle 1185, używając kanału fabrycznie kalibrowanego na zakres energii emisji  $^{51}\text{Cr}$ . Stopień rozcieńczenia krwi w próbkach otrzymywano na podstawie pomiarów gęstości optycznej próbek dla  $\lambda = 512 \text{ nm}$  i krzywej kalibracyjnej uzyskanej przez ilościowe rozcieńczanie krwi roztworem Drabkina. Przeprowadzone badania kontrolne wykazały, że dla tej długości fali rozcieńczona krew posiada maksimum absorpcji liniowo zależne /w zakresie 0-2 jednostki gęstości optycznej/ od  $[\text{Hb}]$  w próbce i nie zakłócające przez widmo absorpcji barwnika ICG. Na podstawie pomiarów gęstości optycznej próbek aktywność  $^{51}\text{Cr}$  przeliczano na /ilość zliczeń/ x /ml krwi/ $^{-1}$ .

Jeżeli izotop chromu podawany był zwierzęciu więcej niż jeden raz, to konieczne było przeprowadzenie korekcji na tło  $^{51}\text{Cr}$  pochodzące z poprzednich wstrzyknięć. W tym celu rejestrowano aktywność chromu w krwi pobranej przed kolejnym podaniem izotopu.

Ponadto mierzono  $\alpha$  i aktywność  $^{51}\text{Cr}$  w nierozcieńczonych próbkach znakowanej krwi. Jednocześnie mierzono  $[\text{O}_2]$  w próbkach znakowanej krwi oraz w próbkach krwi tętniczej i żylniej, pobranych przed i po próbkowaniu krzywych rozcieńczenia, przy pomocy analizatora z komorą redukcyjną Lex-O<sub>2</sub>-con /Lexington Instruments/ kalibrowanego powietrzem atmosferycznym. Pomiar pozostałych parametrów gazometrycznych /P<sub>O<sub>2</sub></sub>, P<sub>CO<sub>2</sub></sub>/ oraz pH przeprowadzano analizatorem BMS-3 /Radiometer/.



Aktywność  $^{51}\text{Cr}$  była normalizowana do  $^{18}\text{O}_2$  przy pomocy wzoru:

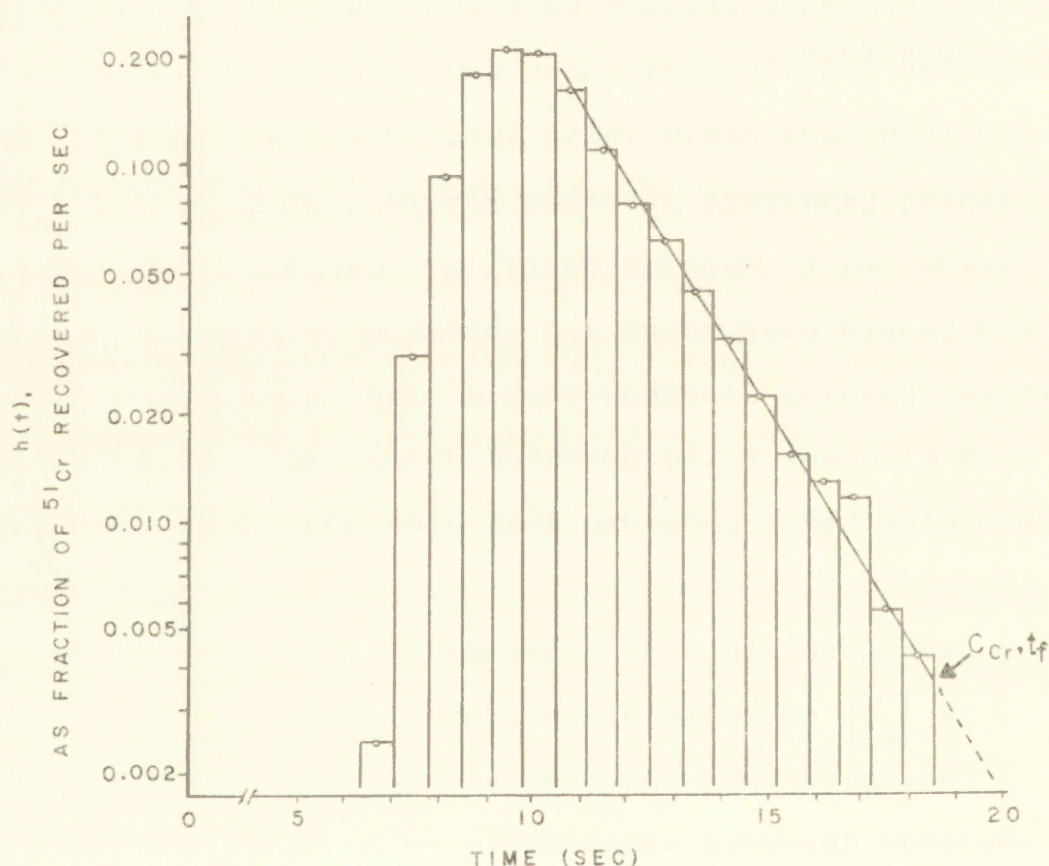
$$\begin{aligned} \left[ ^{51}\text{Cr} \right]_v(t) &= \left( \text{ilość zliczeń} \times \text{ml krwi}^{-1} \right) (t) \times \\ &\times \frac{[O_2]_i \times \alpha_i}{\left( \text{ilość zliczeń} \times \text{ml krwi}^{-1} \right)_i} \end{aligned} \quad [3.4.]$$

gdzie  $\left[ ^{51}\text{Cr} \right]_v(t)$  jest zawartością wskaźnika odniesienia w próbce pobranej w czasie  $t$ , wyrażoną w jednostkach równoważnych  $\mu\text{l}^{18}\text{O}_2 / \text{ml krwi}$ , a wyróżnik  $i$  oznacza znakowaną krew /od injectate/.



### 3.5. Masa wskaźników pobierana przez układ próbkujący, średnie czasy tranzytu i krzywe ekstrakcji

Zasadę integracji krzywych rozcieńczania wskaźników ilustruje ryc. 3.6. Kolejne próbki  $/i = 1, 2, \dots, n./$  pobierane są w równych interwałach czasowych,  $\Delta t$ , wyznaczanych przez szybkość obrotu ruchomego dysku kolektora. Krew próbkowana jest z szybkością  $F_c$   $/\text{ml krwi} \times \text{s}^{-1}/$ .



Ryc. 3.6. Integracja krzywych rozcieńczania wskaźników:  
 $i$  - numer próbki;  $C$  - znormalizowane stężenie wskaźnika;  $C_i$  - stężenie w próbce  $i$ , czyli w czasie  $t = \Delta t/2 + (i-1) \Delta t$ ;  $\Delta t$  - czas pobierania próbki.



Regresję wykładniczą zstępującego ramienia krzywej rozcieńczenia uzyskuje się przez naniesienie wartości  $C_i$  i odpowiadających im czasów na półlogarytmiczny układ współrzędnych. Prostą regresji przeprowadza się ręcznie, a jej nachylenie,  $k$ , wyznacza się na podstawie czasu półzaniku,  $t_{1/2}$ .

Masa wskaźnika pobierana przez układ próbkujący wynosi:

$$R = F_c \cdot \int_{0, \infty} C(t) dt \quad [3.5.]$$

Wartość całki otrzymywana jest przez sumowanie stężeń w próbkach /wszystkich w przypadku  $^{18}O_2$ , a w przypadku  $^{51}Cr$  - do momentu recyrkulacji/ i ekstrapolację do czasu nieskończoności:

$$\int_{0, \infty} C(t) dt = \Delta t \sum_{i=1}^n C_i + \int_{n\Delta t, \infty} C(n\Delta t) \cdot e^{-k(t-n\Delta t)} dt \quad [3.6.]$$

Do obliczenia średniego czasu tranzytu wykorzystuje się wzór [2.5.], gdzie licznik ułamka:

$$\int_{0, \infty} tC(t) dt = \Delta t \sum_{i=1}^n \left[ \Delta t/2 + (i-1)\Delta t \right] \cdot C_i + \int_{n\Delta t, \infty} tC(n\Delta t) \cdot e^{-k(t-n\Delta t)} dt \quad [3.7.]$$

Ekstrakcję wskaźnika tlenowego w czasie  $t$  otrzymuje się ze znormalizowanych krzywych rozcieńczenia tlenu-18 i chromowanych erytrocytów:

$$E(t) = 1 - \frac{[^{18}O_2]_v(t)}{[^{51}Cr]_v(t)} \quad [3.8.]$$



#### 4. KRZYWE ROZCIĘNCZANIA TLENU-18 W KRĄŻENIU MÓZGOWYM

Celem doświadczeń była rejestracja krzywych rozcieńczenia  $^{18}\text{O}_2$  w krążeniu mózgowym, wraz z krzywymi odniesienia, dla wyciągnięcia jakościowych i ilościowych wniosków dotyczących środowiska tlenowego mózgu. Wymagało to wstrzykiwania znakowanej krwi do wejścia tętniczego mózgu bez powodowania poważnych zaburzeń hemodynamiki krążenia mózgowego, oraz niezależnego pomiaru przepływu krwi przez mózg,  $F/V_T$ . Dodatkowo w doświadczeniach zmieniano żyłne mózgowe  $P_{\text{CO}_2}$  jako zmienną niezależną układu.

##### 4.1. Metody

Doświadczenia wykonane zostały na dorosłych psach samcach, mieszańcach o ciężarze ciała 18 - 25 kg. Zwierzęta usypiano wstępnie kotaminą w dawce  $25 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  dożylnie. Następnie wykonywano tracheostomię i wentylowano psy mieszaniną 2,5 vol% halotanu w tlenie, przy pomocy respiratora Harvard, utrzymując końcowo-wydechowy  $\text{CO}_2$  na poziomie około 4%. Kaniulowano żyłę i tętnicę udową /do pomiaru ciśnienia tętniczego, pobierania krwi i podawania płynów/.

Wejście tętnicze mózgu kaniulowane było w sposób nieobstrukcyjny /umożliwiający swobodny przepływ krwi/ przez wprowadzenie kateteru rozmiaru 16 lub 18 /Intracath typ 3112, Desert Pharmaceutical Co./ z tętnicy tarczowej do tętnicy szyjnej wspólnej w okolicę odejścia tętnicy szyjnej wewnętrznej. Wyjście żyłne mózgu kaniulowano przy pomocy podobnego kateteru, umieszczanego w górnych 2/3 zatoki strzałkowej, którą



odsłanianio przez usunięcie skóry i mięśni głowy, oraz kości czaszki. Kateter w zatoce umacniano i uszczelniano przy pomocy wosku chirurgicznego.

Po zakończeniu przygotowania chirurgicznego zwierzęta zwiózczano przy pomocy dożylnego podania  $10 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  galaminy /dawka powtarzana co godzinę/ i stężenie halotanu w mieszaninie oddechowej zmniejszono do 1,5 vol%. Aby przeciwdziałać odwodnieniu i hipowolemii podawano w ciągłym wlewie izotoniczny roztwór dekstrozy-NaCl z szybkością zapobiegającą spadkom ciśnienia tętniczego poniżej 100 mmHg. W razie wystąpienia kwasicy korygowano ją dożylną infuzją wodorowęglanu sodu.

Sposób znakowania krwi i pomiaru krzywych rozcieńczenia opisany jest w rozdz. 3. Przed wykonaniem pomiarów zwierzętom podawano dożylnie 50000 jednostek heparyny.

Żylne mózgowe  $P_{\text{CO}_2}$  zwiększano przez hipowentylację. Wzrost  $P_{\text{aCO}_2}$ , przy utrzymującej się hiperoksji, zwiększał przepływ krwi przez mózg /hiperkapnia jest jednym z najsilniejszych czynników zwiększających mózgowy przepływ krwi, p. Purves, 1972/.

Przepływ mózgowy krwi mierzono przy pomocy metody Kety-Schmidta /Kety i Schmidt, 1948; p. także str. 26 /, używając argonu zamiast  $\text{N}_2\text{O}$ . Modyfikacja ta była związana z użyciem spektrometru masowego do analiz krwi /w używanym typie spektrometru  $\text{N}_2\text{O}$  i  $\text{CO}_2$  nakładają się na siebie jako pik  $m/e = 40$ /. Podczas wykonywania pomiaru zwierzętom podawano do oddychania /na wejście respiratora/ mieszanę gazową zawierającą 20% Ar i 1,5% halotanu w tlenie, przez 15 minut.



Dwumililitrowe próbki krwi tętniczej i żylniej mózgowej pobierano przed podaniem mieszanki argonowej, oraz co dwie minuty po jej podaniu aż do dziesiątej minuty, a następnie w piętnastej minucie, celem wyznaczenia stężenia równowagowego, wskaźnika  $\bar{C}_a = C_v = C(\infty)$ .

Względne stężenia argonu w próbkach krwi mierzono spektrometrem masowym w sposób podobny do opisanego poprzednio /str. 66 / dla tlenu z tym, że do komory pomiarowej wprowadzano próbki nierozcieńczonej krwi. Główny pik argonu,  $m/e = 40$ , posiada stałe tło pochodzące z Ar w powietrzu atmosferycznym, jest ono jednak niewielkie w porównaniu z sygnałem rejestrowanym w krwi po podaniu 20% Ar do oddychania. W wyniku deplecji gazów w próbce wysokości pików Ar podczas pomiaru spadały w tempie rzędu  $5\% \cdot \text{min}^{-1}$ . Wymagało to wprowadzenia korekcji poprzez ekstrapolację wysokości pików do czasu wprowadzenia próbki do naczynia pomiarowego. Ponieważ argon posiada izotop o masie cząsteczkowej 36, którego pik interferuje z pomiarem tlenu-18, pomiar przepływu mózgowego wykonywano zawsze po zakończeniu próbkowań na krzywe rozcieńczenia znakowanego tlenu.

Przepływ krwi na jednostkę objętości tkanki  $/F/V_T/$  obliczano przy pomocy równania [2.3.]. Do obliczeń użyto wartości współczynnika rozdziału mózg/krew,  $\lambda = 1,077 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1} / \text{Ohta, Ar i Farhi, 1979/}$ . Pole pomiędzy tętnicznymi i żylnymi krzywymi [Ar] wyznaczane było przy pomocy reguły trapezoidów.

Oznaczenia gazometryczne i równowagi kwasowo-zasadowej krwi tętniczej i żylniej mózgowej przeprowadzano przy pomocy analizatorów Radiometer BMS-3 i Lex- $\text{O}_2$ -Con w próbkach przed i po zakończeniu cyklu pomiarowego. Wyniki były zbieżne w zakresie 10%.



#### 4.2. Wyniki

Kompletne i nadające się do interpretacji wyniki uzyskano w 7 doświadczeniach wykonanych na 5 zwierzętach i tylko te wyniki poddane są analizie. Komplet wyników złożony jest z pomiaru krzywych rozcieńczania, przepływu mózgowego krwi, żylnego  $[O_2]$  i składu izotopowego znakowanej krwi. Przebiegi krzywych rozcieńczania muszą umożliwiać w miarę dokładną ekstrapolację do czasu nieskończoności.

Tabela 4.1. przedstawia dane dotyczące metabolizmu tlenowego mózgu. We wszystkich przypadkach krew tętnicza była całkowicie utlenowana  $/Pa_{O_2} \approx 250 \text{ mmHg}/$ , podczas gdy żylna mózgowa  $P_{O_2}$  było zróżnicowane, co pociągało za sobą różnice w ekstrakcji tlenu przez mózg.

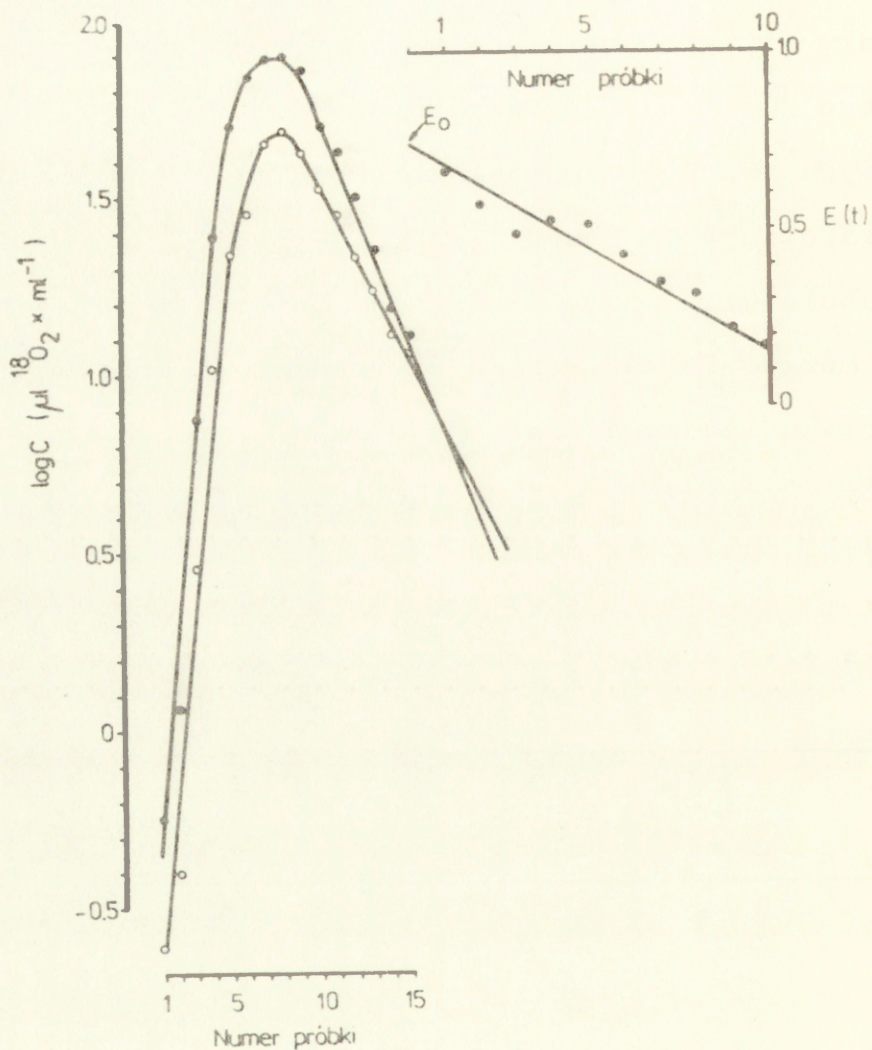
Tabela 4.1. Przepływ krwi przez mózg i metabolizm tlenu.

Dośw. Nr	$[O_2]_a$ /ml·ml <sup>-1</sup> /	$[O_2]_v$ /ml·ml <sup>-1</sup> /	$P_v O_2$ /mmHg/	CBF /ml·g <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> /	CMRO <sub>2</sub> /ml·g <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> /
1	0.145	0.085	57.0	0.71	0.043
2	0.212	0.158	60.0	0.80	0.043
3 <sup>x</sup>	0.228	0.205	113.5	1.10	0.025
5 <sup>x</sup>	0.197	0.154	90.0	1.05	0.045
9 <sup>xx</sup>	0.172	0.102	45.5	0.40	0.028
12 <sup>xx</sup>	0.246	0.186	68.0	0.78	0.047

<sup>x</sup> Doświadczenia w hiperkapnii

<sup>xx</sup> Dwa komplety krzywych rozcieńczenia były rejestrowane kolejno.





Ryc. 4.1. Przykładowy wynik doświadczenia wykonanego na krążeniu mózgowym.  
Strona lewa: znormalizowane krzywe rozcieńczenia tlenu-18 / ○ / i znakowanych erytrocytów / ● / w półlogarytmicznym układzie współrzędnych.  
Strona prawa: krzywa ekstrakcji tlenu-18.  
Czas próbkowania 0,68 s.



Ryc. 4.1. przedstawia przykład zarejestrowanych krzywych rozcieńczenia  $^{18}\text{O}_2$  i  $^{51}\text{Cr-rbc}$ , oraz krzywej ekstrakcji. Wyznaczenie ekstrakcji początkowej jest zagadnieniem rozwiązywanym w różny sposób przez różnych autorów. W analizie obecnych wyników zastosowano dwa podejścia. Pierwsze, którego wyniki zawarte są w tabeli 4.2., kolumny 3 i 4, polegało na założeniu, że  $E(t)$  zmienia się liniowo.  $E_0$  uzyskiwano przez wyliczenie prostej regresji metodą najmniejszych kwadratów i jej ekstrapolację do czasu pojawienia się wskaźników /początek pierwszej próbki/.

Tabela 4.2. Ekstrakcja  $\text{O}_2$  i  $^{18}\text{O}_2$ , oraz ekstrakcja początkowa wskaźnika tlenowego.

Dośw. nr	$E(\text{O}_2)^x$	$E(^{18}\text{O}_2)^{xx}$	$\lim_{t \rightarrow 0} E(^{18}\text{O}_2)(t)$	$r^{xxx}$
	1	2	3	4
1	0.417	0.397	0.639	-0.91
2	0.254	0.319	0.684	-0.90
3	0.104	0.150	0.701	-0.98
5	0.218	0.179	0.612	-0.94
9a	0.402	0.384	0.698	-0.97
9b	0.402	0.414	0.594	-0.91
12a	0.240	0.184	0.654	-0.99
12b	0.240	0.193	0.591	-0.96

$$^x E(\text{O}_2) = 1 - \frac{[\text{O}_2]_v}{[\text{O}_2]_a}$$

<sup>xx</sup> Ze wzoru [3.8.]. Różnica  $E(^{18}\text{O}_2) - E(\text{O}_2)$  wynosi średnio  $+0.07 \pm 0.044$  SD i nie jest znamienna statystycznie /test t dla średnich skorelowanych/

<sup>xxx</sup> Współczynnik korelacji prostych  $E(t)$ .



Do wyliczenia parametrów prostej wykorzystywano wszystkie punkty doświadczalne, dla których rejestrowano pary

$[^{18}\text{O}_2]_v$  i  $[^{51}\text{Cr}]_v$ , za wyjątkiem takich które wyraźnie odbiegały od kształtu krzywych, sugerując błąd pomiarowy.

Ten sposób wyznaczania ekstrakcji początkowej może wzbudzać wątpliwości, jako że na wyliczoną wartość  $E_0$  wpływają w zasadniczym stopniu punkty z końcowych odcinków krzywych.

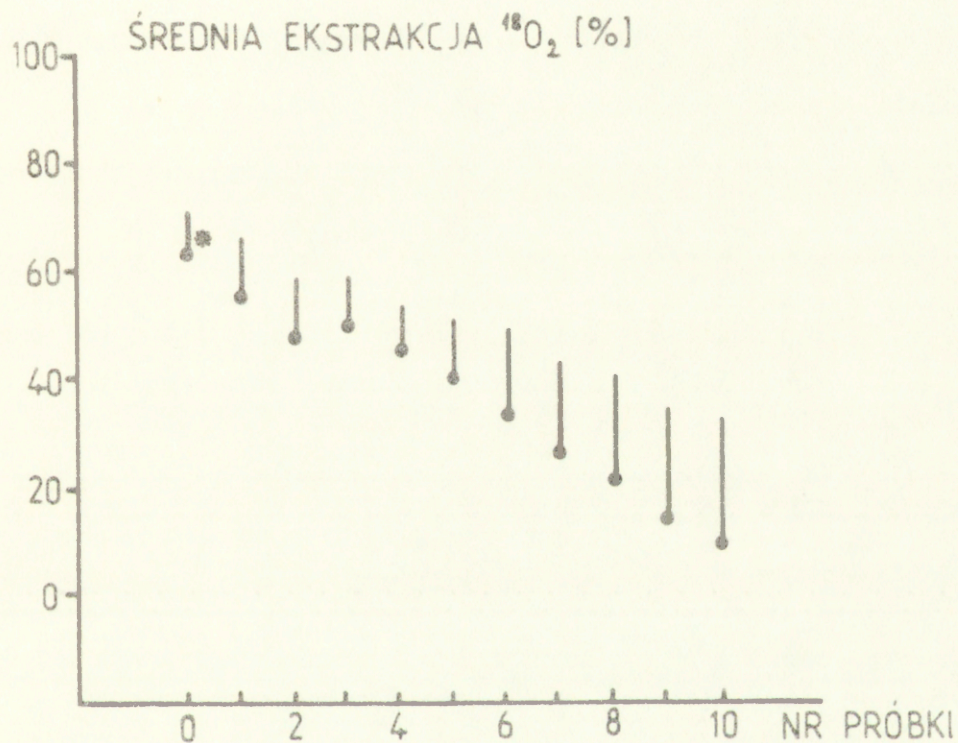
Druga metoda polegała na otrzymaniu średnich ekstrakcji tlenu-18 w pierwszych dziesięciu próbkach, dla wszystkich doświadczeń. Uśrednianie miało za zadanie zniwelowanie błędów pomiarowych, które dla próbek o niskim  $\alpha$  mogą być istotne. Obie procedury dały podobne wyniki. Średnia wartości  $E_0$  obliczonych dla pojedynczych doświadczeń metodą najmniejszych kwadratów wynosi 73,9%, podczas gdy wykres średnich wartości ekstrakcji w poszczególnych próbkach /ryc. 4.2./ sugeruje, że  $E_0$  przyjmuje wartości 60-65%.

Wspólne dla wszystkich krzywych cechy charakterystyczne można określić następująco:

1. Oba wskaźniki pojawiają się na wyjściu żylnym mózgu jednocześnie, a ściślej w ramach tego samego czasu próbkowania  $\Delta t = 0,68$  s;
2. Stosunek próbkowanej masy wskaźnika tlenowego do próbkowanej masy wskaźnika odniesienia jest dla każdej pary krzywych w zasadzie równy stosunkowi  $[^{18}\text{O}_2]_v / [^{18}\text{O}_2]_a$  /tabela 4.2./;
3. W początkowym odcinku krzywych ekstrakcja znakowanego tlenu jest wyższa, niż ekstrakcja tlenu netto.



$E(t)$  spada w czasie, osiągając w niektórych przypadkach wartości nie tylko niższe od  $E(O_2)$ , ale również niższe od zera.



Ryc. 4.2. Uśrednione wartości ekstrakcji  $^{18}O_2$  w krążeniu mózgowym, wraz z odchyleniami standardowymi.



4. Wszystkie krzywe tlenowe są przesunięte /opóźnione/ w stosunku do krzywych odniesienia. Własność tą ilościowo wyraża dodatnia różnica średnich czasów tranzytu,  $\bar{t}(^{18}\text{O}_2) - \bar{t}(^{51}\text{Cr})$  /tabela 4.3., pierwsza kolumna/. Na tej podstawie, posługując się teorią przedstawioną w rozdziale 2.3., a dokładnie równaniem [2.20.], wyznaczony został estymat średniego pozanacyniowego  $[\text{O}_2]$  w tkance mózgowej, oraz średniego mózgowego  $P_{\text{O}_2}$  /tabela 4.3., druga i trzecia kolumna/.

Różnice w kształtach krzywych wynikają prawdopodobnie z różnic w dynamice impulsowego wstrzyknięcia.

Tabela 4.3. Różnica średnich czasów tranzytu i parametry środowiska tlenowego tkanek mózgowych.

Dośw. nr	$\bar{t}(^{18}\text{O}_2) - \bar{t}(^{51}\text{Cr})$	$[\text{O}_2] \bar{t}$	$P_{\text{tO}_2}^x$
	/s/	/ml · g <sup>-1</sup> /	/mmHg/
	1	2	3
1	0.63	$6.35 \times 10^{-4}$	21.1
2	0.59	$12.44 \times 10^{-4}$	41.3
3	0.53	$19.83 \times 10^{-4}$	65.9
5	0.60	$16.12 \times 10^{-4}$	53.6
9a	0.39	$2.68 \times 10^{-4}$	8.9
9b	0.48	$3.30 \times 10^{-4}$	11.0
12a	0.72	$17.50 \times 10^{-4}$	58.1
12b	0.52	$12.64 \times 10^{-4}$	42.0

<sup>x</sup> Obliczone biorąc rozpuszczalność tlenu w tkankach mózgowych  $2.2 \times 10^{-2}$  ml/ml · Atm<sup>-1</sup> /Thews, 1960/ i masę właściwą tkanek mózgowych  $1.04$  g · ml<sup>-1</sup> /Weil, Zeiss i Cleveland, 1931/.



### 4.3. Dyskusja

W doświadczeniu z użyciem wielu wskaźników analiza krzywych rozcieńczania uwzględniać musi procesy, które mogą wpływać na kształty krzywych, nie mając nic wspólnego z wymianą włośniczkowo-tkankową wskaźnika dyfundującego. Z punktu widzenia analizy średnich czasów tranzytu i krzywych ekstrakcji procesy te są artefaktami doświadczalnymi. Ich możliwy wpływ na krzywe rozcieńczania  $^{18}\text{O}_2$  i wskaźnika odniesienia jest omówiony poniżej.

Wykluczenie artefaktów jako przyczyny obserwowanej separacji krzywych tlenowych i krzywych odniesienia pozwala zjawisko to interpretować jako odbicie dwukierunkowej wymiany wskaźnika tlenowego między krwią a tkankami. Różnica średnich czasów tranzytu  $\bar{t}(^{18}\text{O}_2) - \bar{t}(^{51}\text{Cr})$  i krzywe ekstrakcji wskaźnika tlenowego mogą więc posłużyć do sformułowania ilościowych i jakościowych wniosków dotyczących środowiska tlenowego tkanek mózgowych.

#### 4.3.1. Procesy nie związane z włośniczkowo-tkankową wymianą $^{18}\text{O}_2$

Jednym z warunków przeprowadzenia prawidłowego eksperymentu z rozcieńczaniem wskaźników w układzie pojedyncze wstrzyknięcie - detekcja stężenia w odpływie żylnym jest próbkowanie krwi żyłnej pochodzącej z badanego narządu. Ten oczywisty wymóg nie zawsze jest spełniony wobec mózgu, ze względu na bardzo złożony system naczyniowy tego narządu /patrz Purves, 1972/.



W omawianych eksperymentach nie zastosowano metody doświadczalnej oceny stopnia kontaminacji próbkowanej krwi przez źródła pozamózgowe. Można w tym celu było użyć radioaktywnego  $\text{Na}^+$ , który przechodzi z krwi do tkanek mięśniowych i kości, praktycznie zaś nie przechodzi do mózgu. Oznaczałoby to jednak komplikację układu doświadczalnego. W literaturze przedmiotu nagromadzono wystarczającą ilość danych pozwalających sądzić, że krew próbkowana z górnego odcinka zatoki strzałkowej psa jest w zasadzie pozbawiona domieszek pochodzących spoza tkanek mózgowych. Wśród tych danych należy wymienić wyniki Michenfeldera, Messicka i Theye'a /1968/. Autorzy ci wykazali, że górne 2/3 zatoki strzałkowej nie posiada liczących się dopływów prowadzących krew ze źródeł pozamózgowych. D'Alecy i wsp. /1980/ wykazali, również pobierając krew z górnych 2/3 zatoki strzałkowej, że ekstrakcja znakowanego sodu z krwi po przejściu przez tkanki wynosi kilka procent, co wyklucza istotną kontaminację pozamózgową. Odmienny natomiast wynik, wysoką ekstrakcję znakowanego  $\text{Na}^+$ , uzyskali Yudilievich i DeRose /1971/. Wynik ten był prawdopodobnie konsekwencją nadmiernego tempa próbkowania i zasysania krwi również z dolnego odcinka zatoki który posiada dopływy z mięśni i kości /Hertz i Bolwig, 1976/.

W obecnych eksperymentach możliwość nadmiernego w stosunku do przepływu w górnym odcinku zatoki strzałkowej pobierania krwi nie wydaje się prawdopodobna. Zgodnie z Michenfelderem i wsp. /1968/, u psa o ciężarze ciała 16 - 23 kg masa tkanek mózgowych, z których krew żylna prowadzona jest do górnych 2/3 zatoki strzałkowej, wynosi średnio 35 g. Biorąc pod uwagę wyniki pomiarów przepływu krwi przez badaną strefę



mózgu /p. Tabela 4.1. trzecia kolumna/ możemy przyjąć, że próbkowane było nie więcej niż 50% krwi przepływającej przez zatokę. Jedynym wyjątkiem jest eksperyment nr 3, w którym tempo próbkowania jest prawie równe spodziewanej podaży krwi ze źródeł mózgowych /85%/.

Innym źródłem artefaktów jest niedokładność metod analitycznych. Pomiar limitującym dokładność wyznaczenia kształtów krzywych jest niewątpliwie oznaczanie  $\alpha$ , frakcji  $^{18}\text{O}_2$  w próbkach. Pomiar gęstości optycznej, aktywności  $^{51}\text{Cr}$  i zawartości  $\text{O}_2$  w krwi charakteryzują się dokładnościami rzędu  $\pm 1\%$ , jednakowymi dla wszystkich próbek. Pomiar frakcji  $^{18}\text{O}_2$  w próbkach posiada dokładność zmieniającą się wzdłuż krzywej, określaną w istocie przez poziom szumów tła odczytu pików  $m/e = 36$ . W przeliczeniu na ciśnienie cząstkowe  $^{18}\text{O}_2$  błąd ten miał wartość stałą rzędu  $\pm 0,005$  mmHg; natomiast rejestrowana frakcja  $^{18}\text{O}_2$  w próbkach zmieniała się od  $10^{-4}$  na początku /i na końcu/ krzywych do  $7,5 \times 10^{-2}$  w okolicach szczytu. W przeliczeniu na ciśnienie cząstkowe jest to odpowiednio od 0,01 do 7,5 mmHg. Oznacza to, że dla próbek zawierających najmniejszą frakcję tlenu-18, czyli dla próbek wyznaczających granice /początek i koniec/ krzywych, błąd pomiaru w niektórych przypadkach mógł być nawet rzędu 50%. Dla całego przebiegu krzywych błąd ten nie powinien jednak przekraczać kilku procent.

Kolejnym problemem wartym komentarza jest zagadnienie mieszania się i rozdzielania /frakcjonowania/ wskaźników w krążeniu mózgowym, pomiędzy miejscem podania a miejscem próbkowania. Układ naczyniowy mózgu jest bardziej skomplikowany niż układy zazwyczaj analizowane w teorii metod



rozcieńczania wskaźników. Jest on niewątpliwie układem typu wiele wejść - wiele wyjść. W dodatku podanie wskaźników do tętnicy szyjnej wspólnej /co było konieczne ze względu na wymóg uniknięcia obstrukcji dopływu tętniczego/, tętnicy zaopatrującej nie tylko tkanki mózgowe ale i pozamózgowe, powoduje, że tylko część wstrzykniętej masy wskaźników wchodzi do mózgu.

Jeżeli masę wskaźnika podaną do tętnicy szyjnej wspólnej oznaczymy jako  $m_0$ , to możemy przyjąć, że do mózgu dochodzi jedynie część tej masy,  $r \cdot m_0$  / $r < 1$ /. W dodatku dochodzi ona tylko przez jedno z czterech wejść tętnicznych do tego narządu. Praktyczną konsekwencją tej sytuacji jest konieczność zastosowania niezależnej metody wyznaczania tempa przepływu krwi przez mózg /przepływ nie może być wyznaczony z integracji krzywej rozcieńczania, gdyż nie można wyznaczyć wartości  $r$  /.

Z ilości  $r \cdot m_0$  wskaźnika odniesienia docierającej do mózgu jedynie część  $s$ , a więc ilość  $s \cdot r \cdot m_0$  / $s < 1$ / jest próbkowana, reszta bowiem opuszcza mózg za pośrednictwem innych niepróbkowanych wyjść żylnych. Przestrzema dystrybucja wskaźnika odniesienia jest identyczna z dystrybucją wskaźnika "tlenowego", ponieważ zarówno  $^{51}\text{Cr}$ , jak  $^{18}\text{O}_2$  są transportowane prawie wyłącznie przez erytrocyty. Z tego względu do mózgu dociera taka sama część podanej masy chromu 51 i tlenu-18. W tkance tlen-18 jest metabolizowany i można się spodziewać, że jest on metabolizowany w identycznej proporcji, jak tlen nieznakowany /p. str. 50 /.



Należy więc oczekiwać, że całkowita ilość wskaźników pobieranych przez układ próbkujący, uwzględniając poprawkę na recyrkulację i ekstrapolację do czasu nieskończoności, powinna wynosić:

$$R(^{51}\text{Cr}) = r.s.m_o \quad [4.1.]$$

$$R(^{18}\text{O}_2) = r.s. \frac{[O_2]_v}{[O_2]_a} \cdot m_o \quad [4.2.]$$

oraz, że:

$$\frac{R(^{18}\text{O}_2)}{R(^{51}\text{Cr})} = \frac{[O_2]_v}{[O_2]_a} ; E(^{18}\text{O}_2) = E(O_2) \quad [4.3.]$$

Uzyskane wyniki /Tabela 4.2./ są zgodne z tym przewidywaniem.

Zastosowanie w doświadczeniach schematu pojedyncze wstrzyknięcie - detekcja stężenia w odpływie wymaga weryfikacji założenia, że w badanym układzie pomiędzy miejscem podania a miejscem próbkowania istnieje "przekrój dobrze zmieszany" /p. str. 31 /. Spełnienie tego założenia dla mózgu ludzkiego wykazali doświadczalnie Lassen i Hoedt-Rasmussen /1966/. Autorzy ci stwierdzili, że pomiar przepływu mózgowego krwi przy pomocy metody Kety - Schmidta /czyli przez znakowanie wszystkich wejść układu/ daje wynik identyczny z pomiarem przeprowadzonym techniką pojedynczego wstrzyknięcia /w której znakowane jest tylko jedno wejście układu/. Wobec zbliżonej struktury anatomicznej układu naczyniowego mózgu człowieka i psa /w obu przypadkach występuje sieć połączeń tętniczo-tętnicznych, koło Willisa/ zagadnienie to nie wymagało dodatkowej weryfikacji doświadczalnej.

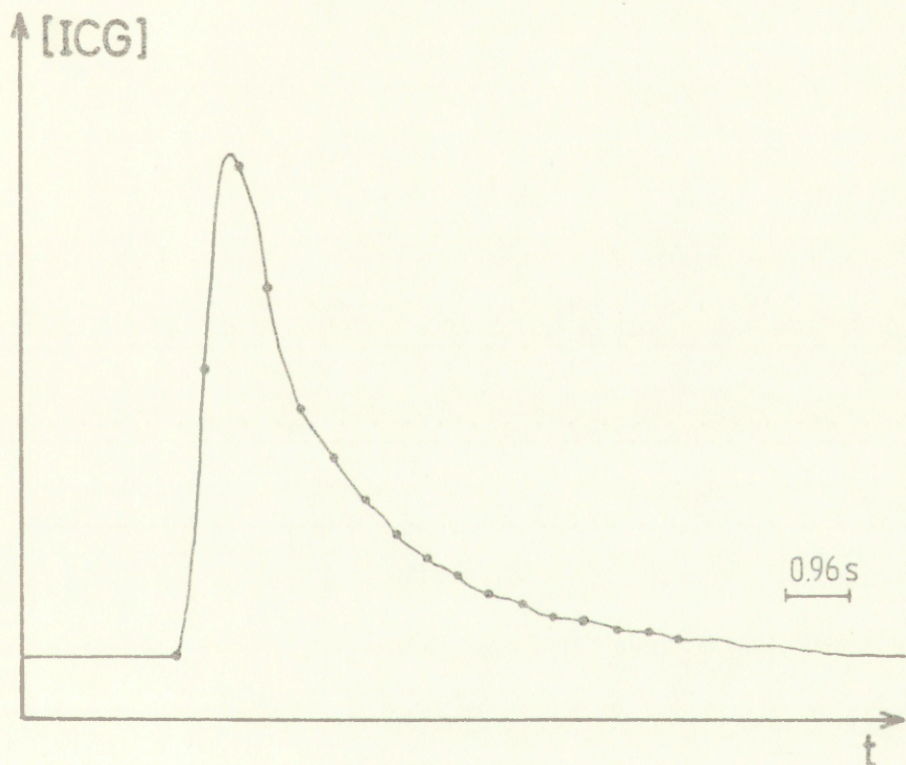


Kolejnym potencjalnym źródłem artefaktów są zjawiska konwekcyjne zachodzące wewnątrz, lub poza układem naczyniowym mózgu, a wpływające na kształt rejestrowanych krzywych rozcieńczania wskaźników. Z punktu widzenia procesów konwekcji chromowane erythrocyty są prawie doskonałym wskaźnikiem dla tlenu-18, który w krwi jest w ponad 98% związany z hemoglobina, a tylko mniej niż 2% jest fizycznie rozpuszczone w osoczu. Tak więc błąd wynikający z separacji osocza i krwinek podczas przepływu przez układ włośniczkowy narządu /erythrocyty przechodzą przez włośniczki szybciej/ nie może być przyczyną obserwowanego we wszystkich doświadczeniach opóźnienia krzywych tlenowych w stosunku do krzywych odniesienia. Błąd ten jest niewielki, znacznie poniżej czułości stosowanej metody, i z tego względu wprowadzenie odpowiedniej poprawki /kombinowanej krzywej odniesienia /p. str. 37/ uznane zostało za zbędne.

Znacznie istotniejszym źródłem zmian kształtu krzywych rozcieńczania są zjawiska mieszania zachodzące w krwi poza włośniczkami mózgowymi, szczególnie w układzie próbkującym. Przepływ krwi przez włośniczki jest przepływem nie mieszającym się. Erythrocyty przechodzą przez włośniczki szeregowo /Skalak i Branemark, 1969/, jest to więc typowy przykład tzw. compartmentalized plug flow /Levenspiel, 1980/. Natomiast w większych naczyniach, oraz w kateterach układu próbkującego procesy mieszania prowadzą do zniekształcenia kształtu krzywych. Hyc. 4.3. pokazuje krzywe uzyskane w wyniku przejścia impulsu wskaźnika /ICG, rejestrowany w sposób ciągły/ przez układ próbkujący. W wyniku mieszania w układzie



próbującym rejestrowana krzywa doświadczalna jest /w swej postaci funkcyjnej/ splotem postaci funkcyjnej krzywej rozcieńczenia na wejściu do układu próbującego i postaci funkcyjnej krzywej mieszania się wskaźników w układzie próbującym. Powoduje to duże zniekształcenie kształtu krzywych.



Ryc. 4.3. Krzywe rozcieńczenia wskaźnika ICG przez układ próbujący.



Ponieważ średnie czasy tranzytu są addytywne, mieszanie wskaźników w krwi poza układem włośniczkowym powoduje jedynie dodanie stałej wielkości do rzeczywistego średniego czasu tranzytu wskaźnika przez badany narząd. Przy wykluczeniu konwekcyjnej separacji wskaźników, jest to wielkość jednakowa dla  $^{18}\text{O}_2$  i  $^{51}\text{Cr}$ . Nie wpływa ona na wynik ostatecznych obliczeń, ponieważ wykorzystuje się do nich jedynie różnicę średnich czasów tranzytu,  $\bar{t}(^{18}\text{O}_2) - \bar{t}(^{51}\text{Cr})$ . Jednakże krzywe ekstrakcji,  $E(t)$ , są w dużym stopniu zaburzone przez artefakt mieszania w układzie próbkującym.

Kolejnym potencjalnym źródłem artefaktów są procesy dyfuzji zachodzące w krwi, lecz nie związane z wymianą włośniczkowo-tkankową, tzw. dyfuzja międzylaminarna, czyli efekt Taylora /Taylor, 1953/. Zjawisko to polega na dyfuzji wskaźnika w poprzek warstw cieczy płynącej przepływem laminarnym. Stwierdzono, że może ono wpływać na wyniki badań techniką rozcieńczania wskaźników. Dyfuzja międzylaminarna odpowiedzialna jest za separację profilu znakowanego  $\text{Na}^+$  od wskaźnika odniesienia podczas przechodzenia bolusa wskaźników przez krążenie mózgowe /Lassen i wsp., 1971/. Separację wskaźników o różnych współczynnikach dyfuzji w kateterach układu próbkującego obserwowali również Baines, Gottschalk i Lasitter /1968/ przy badaniach dystrybucji para-aminohippuranu w nerkach.

W obecnych doświadczeniach dostrzegalny udział efektu Taylora w kształtowaniu położenia krzywych rozcieńczania tlenu względem krzywych odniesienia może być wykluczony. Najdłuższym odcinkiem badanego układu, gdzie spodziewać się można przepływu laminarnego krwi, jest kateter próbkujący, o długości



$L = 30$  cm i średnicy wewnętrznej  $2r = 0,16$  cm. Ponieważ chrom-51, związany z erytrocytami, nie może samodzielnie dyfundować w poprzek warstw płynącej krwi, warunki pojawiania się dostrzegalnego efektu Taylora określane są przez nierówność:

$$L/v_0 \gg r^2/3,8^2 \cdot D \quad [4.4.]$$

/Taylor, 1953/, gdzie  $v_0$  jest maksymalną szybkością przepływu cieczy przez rurę o średnicy  $2r$  i długości  $L$ , a  $D$  jest współczynnikiem dyfuzji wskaźnika dyfundującego interlaminary. Biorąc  $v_0$  jako dwukrotną średnią szybkość przepływu laminarnego /Levenspiel, 1980/, oraz  $D$  dla tlenu w krwi wynoszący  $1,4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  /Hellums, 1971/, otrzymujemy  $L/v_0 = 1,5$  s, a  $r^2/3,8^2 \cdot D = 31,7$  s. Warunek wynikający z nierówności Taylora nie jest więc spełniony. Ponadto dyfuzja międzylaminarna, zmieniając dyspersję wskaźnika w czasie, nie zmienia jego średniego czasu tranzytu /Taylor, 1953/. Obserwowana w obecnych doświadczeniach różnica  $\tau(^{18}\text{O}_2) - \tau(^{51}\text{Cr})$  nie może więc być związana z efektem Taylora.

Innym jeszcze źródłem artefaktów może być przeciek dyfuzyjny tlenu, mogący zachodzić w konsekwencji przeciwprądowej geometrii tkankowego przepływu krwi /Lübbers, 1968/. Jednakże proces ten ma pomijalne znaczenie. W zakresie normalnych wartości przepływu krwi dyfuzyjny przeciek  $^{133}\text{Xe}$  w mózgu wynosi 2-3% wstrzykniętej masy wskaźnika /Brodersen, Sejrsen i Lassen, 1973/. Odnosząc te wyniki do tlenu, dla którego przeciek dyfuzyjny jest proporcjonalnie znacznie mniejszy niż dla  $\text{Xe}$ , ze względu na jego wiązanie się z hemoglobina, widać wyraźnie, że zjawisko to nie może mieć praktycznie żadnego



znaczenia. Ponadto obecne wyniki nie wskazują na obecność znaczącej frakcji  $^{18}\text{O}_2$  omijającej tkanki mózgowe.

#### 4.3.2. Mechanizm separacji krzywej tlenowej od krzywej odniesienia

Powyższe rozważania prowadzą do wniosku, że opóźnienie krzywych  $[^{18}\text{O}_2]_v(t)$  w stosunku do krzywych  $[^{51}\text{Cr}]_v(t)$  nie jest wynikiem błędów analitycznych lub artefaktów doświadczalnych. Zjawisko to należy więc wiązać z dyfuzyjną wymianą tlenu-18 pomiędzy krwią włośniczkową a tkankami mózgowymi.

Interpretacja tego zjawiska, oraz obserwacji, że krzywe ekstrakcji znakowanego tlenu spadają monotonicznie w czasie /wzdłuż profilu wskaźników/ zależy jednak krytycznie od przyjęcia założeń dotyczących współzależności pomiędzy heterogennością tkankowego zużycia tlenu i heterogennością włośniczkowych czasów tranzytu krwi. Zagadnienie to ma fundamentalne znaczenie dla ostatecznej interpretacji wyników, i z tego względu zostanie szczegółowo omówione.

W przypadku wskaźników dyfundujących do tkanek, ale metabolicznie inertnych, interpretacja kształtu krzywych  $E(t)$  jest stosunkowo jednoznaczna /patrz str. 43/. Monotonicznie spadająca w czasie ekstrakcja wskaźnika może być interpretowana jako dowód na brak dyfuzyjnych ograniczeń dystrybucji wskaźnika do tkanek /perfusion-limited distribution/.

Podobna interpretacja dla metabolizowanego wskaźnika tlenowego jest możliwa jedynie wtedy, gdy założymy, że tempo metabolizmu tlenu w tkankach mózgowych, oraz włośniczkowe czasy



tranzytu są dla całego narządu homogenne. wiadomo jednak, że założenia takie są nie do przyjęcia: zarówno tempo metabolizmu tlenu / $CMRO_2$ /, jak i włóściczkowe czasy tranzytu krwi przez mózg wykazują daleko idące zróżnicowanie regionalne /Finkelstein i wsp., 1981; Cremer i Seville, 1983/.

Jeżeli przyjmiemy, zgodnie z danymi doświadczalnymi innych autorów, że w mózgu współistnieje heterogenność zużycia  $O_2$  i heterogenność włóściczkowych czasów tranzytu krwi, to interpretacja monotonicznie spadających w czasie krzywych ekstrakcji wskaźnika tlenowego przestaje być jednoznaczna. Teoretycznie rozpatrywać musimy trzy sytuacje:

1. Włóściczki o najkrótszych czasach tranzytu krwi mają największą metaboliczną ekstrakcję tlenu. Mogłoby to wynikać z szybszego przepływu krwi przez regiony o wyższym metabolizmie. Wówczas na wyjściu żylnym mózgu w pierwszej fazie krzywych pojawiałyby się krew bardziej odtlenowana, a więc obserwowany kształt krzywych ekstrakcji byłby konsekwencją jednokierunkowej dyfuzji  $^{18}O_2$  z krwi do tkanek.
2. Heterogenność czasów tranzytu i heterogenność ekstrakcji tlenu nie są ze sobą skorelowane. W takiej sytuacji wyciąganie wniosków dotyczących środowiska tlenowego mózgu z faktu istnienia dodatniej wartości  $\bar{\tau}(^{18}O_2) - \bar{\tau}(^{51}Cr)$  jest praktycznie niemożliwe.
3. Włóściczki o najkrótszych czasach tranzytu krwi mają najmniejszą metaboliczną ekstrakcję tlenu. Wówczas, co wykazane jest poniżej, ilościowe i jakościowe wnioski dotyczące środowiska tlenowego mózgu są uprawnione.



Uzasadnienie, że w rzeczywistości mamy do czynienia z sytuacją 3., tj. że ekstrakcja metaboliczna tlenu jest proporcjonalna do czasu tranzytu krwi przez włosniczka, wynika z analizy danych innych autorów dotyczących transportu glukozy z krwi do mózgu. Znakowana glukoza jest wskaźnikiem metabolizowanym, lecz jej zachowanie w istotny sposób różni się od tlenu. Po pierwsze, glukoza z krwi do mózgu transportowana jest aktywnie, a jej dyfuzja wsteczna /z tkanki do krwi/ jest nieznaczna /Crone, 1965/. Po drugie, w mózgu w normoksji metabolizm glukozy przebiega praktycznie w 100% szlakiem tlenowym /Cohen i wsp., 1967; Siesjö, 1978/ i należy przypuszczać, że w każdej jednostce włosniczko-tkankowej w normoksyjnym i normoglikemicznym stanie ustalonym zużycie tlenu i glukozy jest proporcjonalne. Po trzecie, mózgowe krzywe ekstrakcji glukozy wykazują heterogenność włosniczkowych czasów tranzytu, gdyż ekstrakcja znakowanej glukozy rośnie wzdłuż pulsu wskaźników /Hertz i Paulson, 1980/.

Wynik ten oznacza, że włosniczki o krótszych czasach tranzytu ekstrahują z krwi mniej glukozy niż włosniczki dłuższe. Skłania to zarazem do wniosku, że podobna zależność dotyczyć musi metabolicznego zużycia tlenu: krótsze włosniczki mają niższą metaboliczną ekstrakcję tlenu, niż włosniczki dłuższe.

Jeżeli dystrybucja znakowanego tlenu byłaby procesem jednokierunkowym, z krwi do tkanki /brak dyfuzji wstecznej/, to biorąc pod uwagę przytoczone powyżej rozumowanie, krzywe  $E(t)$  dla  $^{18}O_2$  powinny być podobne do krzywych  $E(t)$  dla glukozy, tzn. wartości  $E(t)$  powinny wzrastać wzdłuż pulsu wskaźników.



Aby wyjaśnić poczynione obserwacje doświadczalne, założyć musimy, że dystrybucja  $^{18}\text{O}_2$  pomiędzy tkanką a krwią jest procesem dwukierunkowym.

Zgodnie z tą koncepcją mechanizm opóźniania żylnego profilu znakowanego tlenu w stosunku do żylnego profilu wskaźnika odniesienia wygląda następująco. Po impulsowym wstrzyknięciu dotętnicznym krwi znakowanej tlenem-18 i chromem-51 profile obu wskaźników dochodzą do włosniczek tkankowych równocześnie. wskaźnik chromowy nie przechodzi przez ściany włosniczek, natomiast wskaźnik tlenowy dyfunduje z krwi do tkanki. Frakcja  $\frac{[\text{O}_2]_a - [\text{O}_2]_v}{[\text{O}_2]_a}$  tlenu-18 jest metabolizowana. Jednocześnie tlen rozpuszczony w tkance /chodzi tu o cząsteczki  $\text{O}_2$  rozpuszczone fizycznie, bo tkanka mózgowa nie posiada zdolności odwracalnego chemicznego wiązania tlenu/ działa jako "przestrzeń rozcieńczania" /dilution space/ dla cząsteczek  $^{18}\text{O}_2$ , które weszły do tkanki, lecz nie zostały zmetabolizowane.

Zgodnie z tą interpretacją początkowa część krzywych /kiedy ekstrakcja  $^{18}\text{O}_2$  jest większa niż ekstrakcja netto nieznakowanego tlenu/ wskazuje, że więcej tlenu-18 wchodzi do tkanki niż jest metabolizowane. Część wskaźnika tlenowego jest przejściowo "magazynowana" w tkance, gdzie ulega rozcieńczeniu przez nieznakowany tlen. Późniejsza część krzywych /kiedy ekstrakcja znakowanego tlenu spada poniżej wartości ekstrakcji netto/ odzwierciedla dyfuzję wsteczną niezmetabolizowanego  $^{18}\text{O}_2$  z tkanki do krwi.



Tak więc użycie znakowanego tlenu, którego cząsteczki są rozróżnialne in vitro przy pomocy spektrometru masowego, ale in situ podlegają identycznej dystrybucji jak cząsteczki nieznakowanego tlenu, pozwala uwidocznić jednokierunkowe przepływy tlenu z krwi do tkanki i z tkanki do krwi.

Na podstawie wzajemnego położenia krzywych tlenowych i krzywych odniesienia, szczególnie zaś na podstawie krzywych ekstrakcji wskaźnika tlenowego wysunąć można jakościowe i ilościowe wnioski dotyczące środowiska tlenowego mózgu. Wnioski jakościowe dotyczą zagadnienia barier dyfuzyjnych dla tlenu /p. str. 22 /. Jak wspomniano w rozdziale 2, jeżeli istnieje bariera dyfuzyjna dla włóścioczkowo-tkankowej wymiany badanej substancji, to w początkowej fazie przechodzenia bolusa wskaźników przez układ włóścioczkowy badanego narządu dystrybucja równowagowa wskaźnika nie zostanie osiągnięta. Konsekwencje tego są dostrzegalne przy analizowaniu kształtu krzywych ekstrakcji.

W obecnych doświadczeniach nie zaobserwowano zjawisk wskazujących na istnienie uchwytniej bariery dla dyfuzji tlenu z krwi do tkanek. W czterech doświadczeniach krzywe rozcieńczania wskaźnika tlenowego z pewnością nie były krzywymi dwuskładnikowymi i nie było dostrzegalnego plateau na początku krzywych ekstrakcji. Wartości  $E(t)$  były najwyższe w pierwszej próbie i spadały monotonicznie wzdłuż krzywych. Przypadki w których ekstrakcja  $^{18}O_2$  w pierwszej próbie była niższa, niż w drugiej, nie wystąpiły przy najwyższych wartościach przepływu krwi przez mózg i należy je raczej wiązać z błędami pomiaru. Uśrednione wartości  $E(t)$



/ryc. 1.2./ spadają monotonicznie. Nic więc nie wskazuje na istnienie plateau krzywych ekstrakcji w początkowej fazie pulsu wskaźników. Pozwala to wnioskować o nieistnieniu bariery dla dyfuzji tlenu do mózgu.

Elementem pozornie nie pasującym do tej tezy są stosunkowo niskie wartości ekstrakcji początkowej,  $E_0 = 50-70\%$ . Dla innych substancji swobodnie dyfundujących, nawet nie gazowych, /no. alifatyczne alkohole, Raichle i wsp., 1976/ stwierdzano  $E_0$  sięgające prawie 100%. Przy interpretacji stosunkowo niskich  $E_0$  dla  $^{18}O_2$  w mózgu należy zwrócić uwagę na dwie sprawy. Po pierwsze, zniekształcenie krzywych rozcieńczania przez mieszanie w kateterach układu próbkującego prowadzi do zaniżenia  $E_0$ . Wysokie  $E_0$  dla alkoholi uzyskano metodą detekcji pozostałości tkankowej, w której problem zniekształceń nie istnieje. Po drugie, dystrybucja  $^{18}O_2$  między krwią a tkankami jest zupełnie inna, niż chemicznie obojętnych, swobodnie dyfundujących wskaźników takich jak woda, gazy szlachetne i obojętne, czy alifatyczne alkohole.

Odpowiednikiem współczynnika rozdziálu /  $\lambda$  / w przypadku tlenu jest stosunek średniego tkankowego  $[O_2]$  do średniego włosniczkiowego  $[O_2]$ . W obecnych doświadczeniach tętnicze i żyłne  $[O_2]$  przyjmowały wartości rzędu 0,20 i 0,15 ml  $O_2 \cdot (ml \text{ krwi})^{-1}$ . Średnie włosniczkiowe  $[O_2]$ , które równie jest średniej arytmetycznej tętniczego i żyłnego  $[O_2]$  /Tenney, 1978/, wynosi więc około 0,175 ml  $O_2 \cdot (ml \text{ tkanki})^{-1}$ . Przyjmijmy średnie tkankowe  $[O_2]$  jako  $12,5 \times 10^{-4}$  ml  $O_2 \cdot (ml \text{ tkanki})^{-1}$  /jest to średnia z wyników doświadczalnych/.



Z innych badań /np. Sklar, Bourke i Langfitt, 1968/ wiadomo, że objętość krwi w tkance mózgowej in situ wynosi 1-3%.

Biorąc przestrzeń wewnątrznaczyniową jako 2% objętości mózgu, otrzymujemy wewnątrznaczyniową zawartość tlenu rzędu

$$0,02 \times 0,175 = 3,5 \times 10^{-3} \text{ ml } O_2 \cdot (\text{ml tkanki})^{-1}, \text{ a pozanaczyniową zawartość tlenu rzędu } 0,98 \times 12,5 \times 10^{-4} = 1,2 \times 10^{-3} \text{ ml } [O_2] \cdot (\text{ml tkanki})^{-1}.$$

Z obliczeń tych wynika, że stosunek średniego tkankowego  $[O_2]$  do średniego włośniczkowego  $[O_2]$  przyjmuje wartość rzędu 0,007. Mówiąc inaczej, mózgowa przestrzeń naczyniowa dzięki obecności hemoglobiny może zawierać trzy razy więcej tlenu, niż przestrzeń pozanaczyniowa. Biorąc to pod uwagę możemy wnioskować, że  $E_o = 60-70\%$  odzwierciedla dystrybucje równowagową i nie może zostać uznana za potwierdzenie istnienia bariery dyfuzyjnej dla tlenu.

Sformułowanie ilościowych wniosków dotyczących przepuszczalności włośniczkowej dla tlenu okazało się niemożliwe. W przypadku substancji chemicznie inertnych podstawą takiego wnioskowania jest zastosowanie modelu Crone'a /jednolita proporcjonalna ekstrakcja wskaźnika wzdłuż włośniczki, p. str. 43 / celem obliczenia parametru PS. Obliczenie takie dla tlenu jest ogromnie skomplikowane przez konieczność uwzględnienia zależności pomiędzy  $PO_2$  i  $[O_2]$ , czyli fizjologicznej krzywej dysocjacji oksyhemoglobiny we włośniczkach. Ze względu na trudności teoretyczne i techniczne odpowiedni model obliczeniowy nie został sformułowany. Warto jednak wspomnieć w tym miejscu wyniki Friisa i wsp. /1980/, którzy w podobny sposób mierzyli mózgowe krzywe rozcieńczenia



znakowego  $\text{CO}_2$ . Autorzy ci uzyskali wysokie wartości PS /rzędu  $27 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ /. Jest prawdopodobne, że PS dla tlenu przyjmuje podobne wartości.

#### 4.3.3. Tkankowa przestrzeń dystrybucji tlenu a środowisko tlenowe tkanek

W rozdziale 4.2. /wyniki/ zastosowano równanie [2.19.] do obliczenia, na podstawie różnic średnich czasów tranzytu tlenu-18 i wskaźnika odniesienia, tkankowej /pozanaczeniowej/ przestrzeni dystrybucji tlenu. Na tej podstawie obliczono średnie tkankowe  $[\text{O}_2]$  i  $\text{PO}_2$  /p. Tabela 4.3./. Dla fizjologicznej interpretacji tych wyników podstawowe znaczenie ma kluczowe założenie teorii pomiaru /p. str. 50 /, że frakcja niemetabolizowanego wskaźnika tlenowego jest "sondą" tkankowej puli niemetabolizowanego  $\text{O}_2$ , bowiem niemetabolizowana frakcja tlenu zachowuje się tak, jakby wchodzące w jej skład cząsteczki były molekułami substancji metabolicznie obojętnej. Otrzymany w ten sposób estymat tkankowego  $[\text{O}_2]$  jest wartością określającą średnie stężenie tlenu w tkance. Pod tym względem otrzymane na jego podstawie  $P_{\bar{t} \text{O}_2}$  jest wartością jakościowo odmienną od tkankowego  $P_{\text{O}_2}$  uzyskanego metodami mikroelektrodowymi, nie daje bowiem informacji o rozkładzie wartości  $P_{\text{O}_2}$  wewnątrz tkanki. Niedostatek ten kompensowany jest przez fakt, że pomiarem objęta jest zarówno śródtkankowa, jak i wewnątrzkomórkowa pula tlenu. Wynik ten jest doświadczalnie uzyskanym odpowiednikiem wartości wyliczonej przez Tenney'a /1974/ na podstawie modelu Krogha /kombinacja wzorów [1.9.] i [1.8.] /.



Czy metabolizm tlenu wpływa na średni czas tranzytu niemetabolizowanej frakcji wskaźnika tlenowego? Zgodnie z przyjętymi założeniami wpływ ten istnieje, lecz jest on pośredni. Tempo metabolizmu  $O_2$  jest czynnikiem współkształtującym średnie tkankowe  $[O_2]$ , które wpływa na  $\bar{t}$  ( $^{18}O_2$ ).

Użycie we wzorze [2.19.] stężenia tlenu w krwi żyłnej mózgowej może być uznane za dyskusyjne. Z jednej strony pozornie bardziej właściwe wydawać by się mogło użycie w tym wzorze średniego włóścikowego  $[O_2]$ , które łatwo jest wyznaczyć jako  $\frac{[O_2]_a + [O_2]_v}{2}$ . Wówczas stosunek stężeń tlenu tkanka/włóściki ściśle odpowiadałby współczynnikowi rozdziału tkanka/krew  $\lambda$  dla substancji metabolicznie objętej. Jednakże uwzględnienie w obliczeniach także  $[O_2]_a$  pozostawałoby w sprzeczności z założeniem, zgodnie z którym analizowana jest jedynie frakcja niemetabolizowana tlenu.

Natomiast użycie we wzorze [2.19.] wartości  $[O_2]_v$  prawdopodobnie prowadzi do otrzymania zaniżonej wartości  $[O_2]_{\bar{t}}$ . Jest tak w wyniku nie brania pod uwagę cząsteczek  $O_2$ , które znajdują się w tkance i zostaną zmetabolizowane. W momencie przebywania drogi pomiędzy włóścikami a mitochondriami cząsteczki te biorą udział w kształtowaniu tkankowego  $[O_2]$  i  $P_{O_2}$ , lecz ten udział nie jest dostrzegalny przy pomocy rejestracji żylnego profilu złożonego z cząsteczek  $^{18}O_2$ , które nie zostały zmetabolizowane.



4.3.4. Model matematyczny wymian  $^{18}\text{O}_2$  między  
krwią a tkanką

Potwierdzenie prawomocności metody wyznaczania  $[\text{O}_2]$  w tkance z parametrów krzywych rozcieńczenia możliwe byłoby poprzez badanie odpowiedniego modelu matematycznego. Jest to podejście szeroko stosowane do uzupełnienia doświadczalnych technik rozcieńczenia wskaźników. Przedstawiono szereg modeli mających wyjaśnić kształty obserwowanych krzywych rozcieńczenia wskaźników metabolicznie inertnych. Jednakże większość tych modeli /np. Perl i Chinard, 1968; Bassingthwaite, 1974; Goresky, Ziegler i Bach, 1970/ zakłada natychmiastową dyfuzję wskaźnika z włosniczki do tkanki w płaszczyźnie radialnej. Oznaczałoby to nieskończenie wielką wartość współczynnika dyfuzji wskaźnika w tkance. Współczynnik dyfuzji tlenu w tkance ma wartość skończoną i wszystkie modele tkankowej dystrybucji tlenu począwszy od Augusta Krogha /p. Leonard i Jorgensen, 1974/ fakt ten uwzględniają. Większość modeli opisujących dynamikę dystrybucji wskaźników pomiędzy krwią a tkanką zakłada również ich metaboliczną obojętność. Wyjątkiem jest analityczny model /Rose, Goresky i Bach, 1977/ zakładający możliwość metabolicznego zużycia wskaźnika w tkance. Jednakże model ten również zakłada natychmiastową dyfuzję w płaszczyźnie radialnej, a co za tym idzie, brak gradientów stężeń wskaźnika wewnątrz przestrzeni śródtkankowej i wewnątrz przestrzeni śródkomórkowej. Innym wyjątkiem jest model iteracyjny /Bassingthwaite, Knopp i Hazelrig, 1970/, który nie zakłada natychmiastowej dyfuzji



radialnej, ale jednocześnie nie zawiera możliwości metabolicznego zużywania wskaźnika.

Dynamika dyfuzji międzyfazowej, kiedy w jednej z faz dyfundujące cząsteczki wchodzi równocześnie w reakcje chemiczne analizowana była matematycznie przez Cranka /1957/ i Roughtona /1960/. Jednakże dynamika  $^{18}\text{O}_2$  in situ jest ciągle bardziej skomplikowana, ponieważ wskaźnik tlenowy nie wypełnia pustej przestrzeni, lecz jego dystrybucja zależy od stanu ustalonego dystrybucji nieznakowanego tlenu w tkance.

Aby realistycznie opisać dystrybucję wskaźnika tlenowego podczas przechodzenia impulsu wskaźników przez badany układ, konieczne stało się skonstruowanie modelu nowego typu. Model ten jest kombinacją opisu stanu ustalonego dystrybucji nieznakowanego tlenu w tkance /model typu Krogha/, oraz iteracyjnego modelu dynamiki wymiany wskaźnika pomiędzy krwią a tkanką /model typu Bassingthwaighte i wsp., 1970/ z uwzględnieniem równoczesnej częściowej immobilizacji wskaźnika tlenowego w tkance w wyniku nieodwracalnych reakcji chemicznych /model typu Cranka - Roughtona/.

Jego konstrukcja jest następująca:

1°. Rozpatruje się pojedynczą włócnickę otoczoną cylindrem tkanki metabolizującej tlen /jednostkę włócnickowo-tkankową w rozumieniu Krogha/.

2°. Zakłada się homogenność własności fizycznych /rozpuszczalność i dyfuzyjność tlenu/ oraz metabolicznych /tempo zużycia  $\text{O}_2$ / tkanki.



3<sup>o</sup>. Przepływ krwi przez włosniczkę opisywany jest jako strumień dyskretnych, wewnętrznie doskonale zmieszanych i nie mieszających się między sobą elementów /compartmentalized plug flow/.

4<sup>o</sup>. Proces dystrybucji tlenu opisany jest przy pomocy równania dyfuzji Ficka z uwzględnieniem jednoczesnej reakcji chemicznej /zużywania tlenu/ zachodzącej zgodnie z kinetyką zerowego rzędu.

5<sup>o</sup>. Model uwzględnia krzywą dysocjacji hemoglobiny i jej zmiany pod wpływem pH /efekt Bohra/. Zakłada się liniowy spadek pH wzdłuż włosniczki, oraz natychmiastową dysocjację  $O_2$  z  $HbO_2$ .

Badanie modelu przeprowadza się dwustopniowo. Pierwszym krokiem jest symulacja stanu ustalonego dystrybucji nieznanego  $O_2$  na terenie jednostki włosniczko-tkankowej. Krokiem drugim jest zadanie na wejściu modelu założonego profilu znakowanego tlenu i symulacja kształtu tego profilu na wyjściu modelu, po przejściu impulsu znacznika przez jednostkę włosniczko-tkankową.

Obliczenia przeprowadzono używając iteracyjnych technik numerycznych oraz następujących danych liczbowych:

1<sup>o</sup>. Wymiary jednostki włosniczko-tkankowej: średnica włosniczki 6  $\mu m$ , promień cylindra tkankowego 30  $\mu m$ , jego długość 210  $\mu m$ .

2<sup>o</sup>. Siatka obliczeń: cylinder tkankowy podzielony podłużnie na 40 segmentów /dysków/, z których każdy składa się z 5 koncentrycznych warstw. Obliczenia przeprowadzane są we współrzędnych symetrii radialnej.



3°. Stale fizyczne: rozpuszczalność tlenu w tkance  $2,9 \times 10^{-5}$  ml  $O_2$ , STPD  $\times$  (ml tkanki) $^{-1}$   $\times$  mmHg $^{-1}$ , rozpuszczalność fizyczna tlenu w krwi  $3,03 \times 10^{-5}$  ml  $O_2$ , STPD  $\times$  (ml krwi) $^{-1}$   $\times$  mmHg $^{-1}$ , współczynnik dyfuzji tlenu w tkance  $1,7 \times 10^{-5}$  cm $^2$   $\times$  s $^{-1}$ .

4°. Analityczny opis krzywej dysocjacji HbO $_2$  i efektu Bohra wg Rossinga i Caina /1966/.

5°. Zmienne doświadczalne / F/V $_T$ ,  $[O_2]_a$ ,  $[O_2]_v$  / wzięte z wyniku eksperymentu 12 A.

6°. Krzywa doświadczalna  $[^{51}Cr]_v(t)$  przyjęta jako profil tlenu-18 na wejściu modelu. /Jest to uzasadnione, ponieważ zmiany obu krzywych rozcieńczania wskaźników, zachodzące poza włóscinkami wymieniającymi tlen z tkanką są równoważne/.

Profil wyjściowy  $^{18}O_2$  uzyskany w wyniku takiej symulacji ściśle przypomina wynik doświadczalny /krzywą rozcieńczenia znakowanego tlenu/. Co istotniejsze, istnieje wysoka zgodność wyników liczbowych. Średnie tkankowe  $[O_2]$  uzyskane z integracji zawartości nieznakowanego tlenu w elementach modelu /pierwszy stopień symulacji/ dało wynik  $1,92 \times 10^{-3}$  ml  $O_2 \cdot ml^{-1}$ . Wydłużenie średniego czasu tranzytu  $^{18}O_2$  w wyniku symulacji dystrybucji znakowanego tlenu w cylindrze tkankowym /drugi stopień symulacji/ wynosi 0,66 s. Zawartość tlenu w tkance, obliczona na tej podstawie przy pomocy równania [3.20.] wynosi  $1,59 \times 10^{-3}$  ml  $O_2 \cdot ml^{-1}$ . Wynik doświadczalny wynosi odpowiednio 0,72 s oraz  $1,75 \times 10^{-3}$  ml  $O_2 \cdot ml^{-1}$ .

Biorąc pod uwagę niezbyt gęstą siatkę obliczeń i niedokładności metod iteracyjnych, uzyskaną zgodność wyników badania modelu /  $[O_2]_{\bar{t}}$  obliczone na pierwszym i drugim stopniu



symulacji/ i wyniku doświadczalnego można ocenić jako zachęcającą. Nie stanowi to oczywiście dowodu prawomocności równania [3.20.] do wyznaczania średniego tkankowego  $[O_2]$  na podstawie różnicy średnich czasów tranzytu znakowanego tlenu i wskaźnika odniesienia. Jest jednak silnym potwierdzeniem poprawności teorii pomiaru, oraz pozwala traktować równanie [3.20.] jako empirycznie sprawdzone z dokładnością 10%. /Przypomnieć należy, że poza badaniem modelu nie ma alternatywnej metody określenia średniego tkankowego  $[O_2]$  /.

Warto zwrócić uwagę, że  $[O_2]_{\bar{t}}$  obliczone na pierwszym stopniu symulacji jest nieco /o 12%/ wyższe, niż  $[O_2]_{\bar{t}}$  obliczone na drugim stopniu symulacji. Potwierdza to intuicyjny wniosek /p. str. 98 /, że  $[O_2]_{\bar{t}}$  obliczone na podstawie różnicy średnich czasów transzytu jest nieco niższe niż rzeczywiste  $[O_2]_{\bar{t}}$ .



#### 4.3.5. Średnie wewnątrzkomórkowe $P_{O_2}$ w mózgu: limity i interpretacja fizjologiczna

Wyznaczenie średniego tkankowego  $[O_2]$  i  $P_{O_2}$  tkanek mózgowych na podstawie różnicy średnich czasów tranzytu tlenu-18 i chromu-51 dostarcza wyniku jakościowo odmiennego od wyników uzyskiwanych innymi metodami bezpośrednimi. Uzyskana wartość  $[O_2]$  nie dotyczy bowiem przestrzeni śródkankowej /czyli środowiska zewnątrzkomórkowego/, - ale jest ważoną sumą średnich wartości środowiska pozakomórkowego i wewnątrzkomórkowego.

Ponieważ mamy do dyspozycji jedynie wartość średnią, nie możemy na jej podstawie wyciągnąć jednoznacznych wniosków na temat środowiska tlenowego wewnątrz komórek. Możliwe jest jednak wyznaczenie górnego i dolnego limitu średniego wewnątrzkomórkowego  $P_{O_2}$ .

Określmy średnie wartości parametrów przestrzeni pozakomórkowej wyróżnikiem  $\bar{e}$ , a średnie wartości parametrów przestrzeni wewnątrzkomórkowej wyróżnikiem  $\bar{i}$ . Jeżeli przestrzeń pozakomórkowa /płyn śródkankowy/ zajmuje frakcję D objętości tkanki, to średnia rozpuszczalność tlenu w tkance mózgowej może być wyrażona jako ważona suma rozpuszczalności tlenu w środowisku poza- i wewnątrzkomórkowym:

$$S_{\bar{t}O_2} = D \cdot S_{\bar{e}O_2} + (1 - D) \cdot S_{\bar{i}O_2} \quad [4.5.]$$

Podstawiając do tego wzoru wartości parametrów  $S_{\bar{t}O_2} = 3,01 \cdot 10^{-5} \text{ ml} \cdot \text{mmHg}^{-1}$  /Thews, 1960/,  $S_{\bar{i}O_2} = 3,42 \cdot 10^{-5} \text{ ml} \cdot \text{mmHg}^{-1}$  /Zander, 1976/ oraz  $D = 0,35$  /Dawson, 1968/, otrzymamy wartość rozpuszczalności tlenu w płynie śródkankowym,



$S_{\bar{e}O_2} = 2,26 \cdot 10^{-5} \text{ ml} \cdot \text{mmHg}^{-1}$ . Jest to wynik prawdopodobny, jako że rozpuszczalność tlenu w płynie śródtkankowym powinna być zbliżona do rozpuszczalności tlenu w wodzie. Wewnątrzkomórkowa rozpuszczalność tlenu jest wyższa, ze względu na jego wysoką rozpuszczalność w lipidach i wysoką zawartość lipidów w tkankach mózgowych.

Możemy również przyjąć, że średnie wewnątrzkomórkowe  $P_{O_2}$  i średnie zewnątrzkomórkowe /śródtkankowe/  $P_{O_2}$  związane są ze średnim tkankowym stężeniem tlenu równaniem:

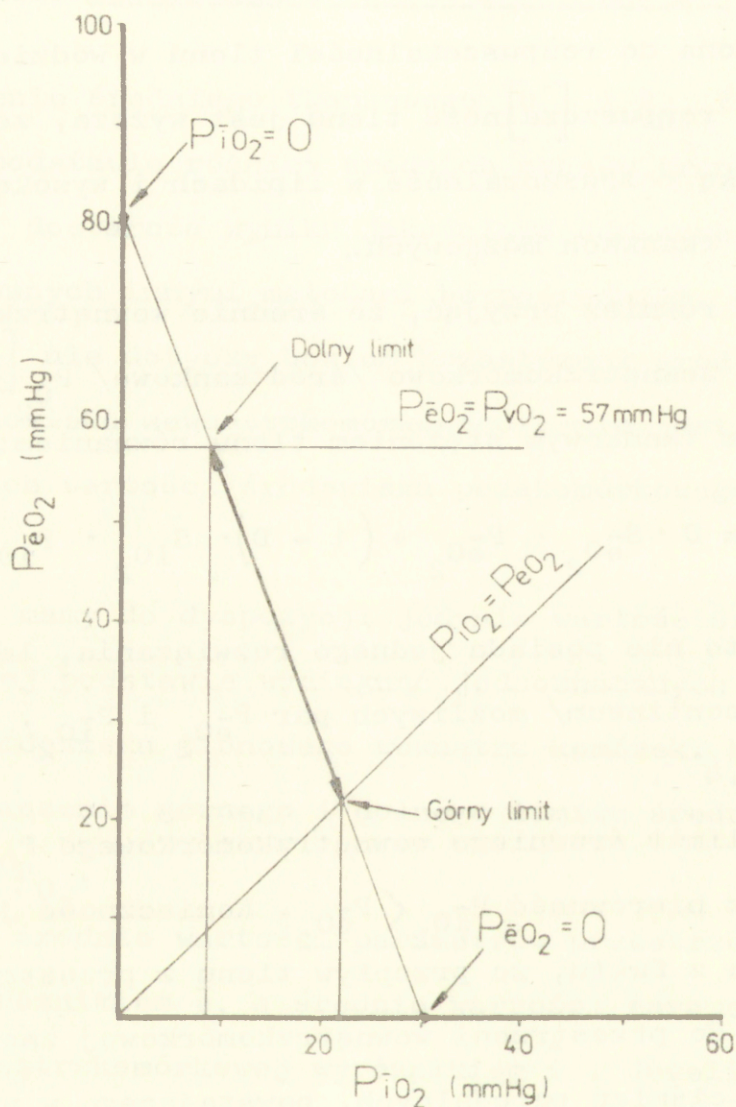
$$[O_2]_{\bar{t}} = D \cdot S_{\bar{e}O_2} \cdot P_{\bar{e}O_2} + (1 - D) \cdot S_{iO_2} \cdot P_{iO_2} \quad [4.6.]$$

Równanie to nie posiada jednego rozwiązania, lecz określa rodzinę /continuum/ możliwych par  $P_{\bar{e}O_2}$  i  $P_{iO_2}$ . Ilustruje to ryc. 4.4.

Górny limit średniego wewnątrzkomórkowego  $P_{O_2}$  wyznaczany jest przez nierówność  $P_{\bar{t}O_2} < P_{\bar{e}O_2}$ . Konieczność jej spełnienia wynika z faktu, że przepływ tlenu z przestrzeni śródtkankowej do przestrzeni wewnątrzkomórkowej zachodzi wzdłuż gradientu ciśnień parcjalnych, powstającego w wyniku zużycia  $O_2$  w procesach metabolicznych wewnątrz komórek.

Dolny limit  $P_{iO_2}$  jest mniej pewny. Możemy jednak wziąć pod uwagę fakt, że większość histogramów  $P_{O_2}$  rejestrowanych w płynie śródtkankowym mózgu daje ocenę średniej wartości  $P_{\bar{e}O_2}$  jako niższej od żylnego mózgowego  $P_{O_2}$ . Możemy więc przyjąć, że dolny limit średniego wewnątrzkomórkowego  $P_{O_2}$  wyznaczany jest przez nierówność  $P_{\bar{e}O_2} < P_{\bar{v}O_2}$ . Uwzględnienie górnego i dolnego limitu  $P_{iO_2}$  znacznie zawęży zakres możliwych





Ryc. 4.4. Wyznaczanie limitów średniego wewnątrzkomórkowego  $P_{O_2}$ . Rodzinę możliwych par średniego wewnątrzkomórkowego  $P_{iO_2}$  i pozakomórkowego  $P_{eO_2}$  określa prosta łącząca punkty  $P_{iO_2} = 0$  /cały tlen w przestrzeni pozakomórkowej/ i  $P_{eO_2} = 0$  /cały tlen wewnątrz komórek/. Górnym limitem  $P_{iO_2}$  jest sytuacja, w której  $P_{O_2}$  wewnątrz komórek i w przestrzeni pozakomórkowej są równe. Dolny limit określa sytuacja, kiedy  $P_{O_2}$  w przestrzeni pozakomórkowej jest równe zylnemu  $P_{O_2}$ .



wartości  $P_{iCO_2}$  i  $P_{eCO_2}$  dla danej  $[O_2]_t$ .

Dla mózgowego żylnego  $P_{O_2} \approx 40$  Torr średnie wewnątrzkomórkowe  $P_{CO_2}$  jest znacząco wyższe, niż krytyczne  $P_{O_2}$  dla enzymów mitochondrialnych. Jednakże za normalną wartość mózgowego żylnego  $P_{CO_2}$  u psa uznać można 30-40 mmHg. W tym zakresie estymaty  $P_{tCO_2}$  i  $P_{iO_2}$ , uzyskane metodą rozcieńczania wskaźników, zbliżają się do zera. Zerowa wartość nie oznacza bynajmniej, że w tkance nie ma tlenu, lecz, że tlen wchodzący do tkanki jest całkowicie zużywany.

Ponieważ kształt krzywych rozcieńczania  $^{18}O_2$ , oraz krzywych ekstrakcji znakowanego tlenu nie potwierdzają istnienia barier dyfuzyjnych, wyjaśnienia silnego stopnia redukcji cytochromów a+a<sub>3</sub> w normoksji poszukiwać należy gdzie indziej. Zgodnie z ostatnimi wynikami grupy Chance'a /Chance, Haselgrove i Barlow, 1981/, wewnątrz zużywających tlen komórek i tkanek istnieją bardzo ostre gradienty  $P_{O_2}$ , rzędu 2 Torr x  $\mu m^{-1}$ . Gradienty te są tak ostre, że przejście od  $P_{O_2} > 0,1$  Torr co zapewnia pełną oksydację mitochondriów, do  $P_{O_2} < 0,01$  Torr pociągającego za sobą ich pełną redukcję zachodzić może na dystansie rzędu 0,05  $\mu m$ , czyli np. w ramach pojedynczego mitochondrium. Generując bardzo ostre gradienty  $P_{O_2}$  w tkance, mitochondria działać mogą jako "doskonale odpływy" /perfect sinks/ dla tlenu.

W tym znaczeniu "zasysanie"  $O_2$  z przestrzeni tkankowej do mitochondriów mogłoby ustanawiać rodzaj bariery dla dyfuzji wstecznej niezmetabolizowanych molekuł tlenu.

W świetle tych wyników silna redukcja cytochromów a+a<sub>3</sub> w korze mózgowej in situ spowodowana by była nie barierami



dla dyfuzji tlenu, lecz ograniczeniem wynikającym z tempa dyfuzji  $O_2$  na samym końcu kaskady tlenowej, w bezpośrednim otoczeniu mitochondriów. Szybkość dyfuzji tlenu przez błony mitochondrialne może być zbyt mała, aby dopływający do ich wnętrza strumień tlenu zapewnił kompletną oksydację pigmentów mitochondrialnych.

Nie należy jednak zakładać z góry, że to "życie na pograniczu hipoksji" jest dla tkanek mózgowych zjawiskiem niekorzystnym. W istocie sytuacja taka może mieć znaczenie dla fizjologii mitochondriów. Po pierwsze, współistnienie w ramach tego samego, lub sąsiednich mitochondriów stanów pełnej oksydacji i pełnej redukcji związane by było z różnymi stanami metabolicznymi błon mitochondrialnych. W strefach utlenianych zachodziłaby fosforylacja oksydacyjna, podczas gdy w strefach zredukowanych - odwrócenie kierunku przepływu elektronów związane ze zużyciem ATP i aktywacja błon dla transportu jonów do wnętrza mitochondriów /Chance, Haselgrove i Barlow, 1981/. Po drugie, jeżeli cytochrom  $a+a_3$  jest w dużym stopniu zredukowany, swobodna energia uwolniona w wyniku zredukowania  $O_2$  /przekazania na tlen protonu i elektronu/ jest znacznie większa niż wówczas, gdy cytochrom ten jest całkowicie utleniony. Wynosi ona bowiem:

$$\Delta F = -2,303 \cdot R \cdot T \cdot \log \left( \frac{\text{cyt. } a a_3 \text{ utleniony}}{\text{cyt. } a a_3 \text{ zredukowany}} \right) \quad [4.7.]$$

W przypadku sytuacji in vitro, gdy cytochromy są zredukowane nieznacznie /około 1%/,  $\Delta F = -2,8$  kcal. In situ, jeżeli stopień redukcji cytochromów wynosi 35%,  $\Delta F = +1,1$  kcal.



Byłaby to więc sytuacja termodynamicznie znacznie bardziej korzystna /Hempel i wsp., 1977/.

Badania mitochondrialnych sygnałów optycznych in situ są jednak bardzo złożone i nie jest pewne, czy interferencję widm Hb/HbO<sub>2</sub> można w takich warunkach skutecznie wyeliminować przez stosowane subtrakcyjne metody korekcyjne /Storey, w: Silver, 1981/. Ponadto, jeżeli estymat P<sub>tO<sub>2</sub></sub> otrzymany metodą rozcieńczania wskaźników jest w istocie zaniżony w stosunku do rzeczywistego średniego tkankowego P<sub>O<sub>2</sub></sub>, w omawianym zakresie normoksji wewnątrzkomórkowe P<sub>O<sub>2</sub></sub> może być wyższe, niż krytyczne P<sub>C<sub>2</sub></sub> dla cytochromu aa<sub>3</sub>. Jakkolwiek wyglądać będzie ostateczne rozstrzygnięcie tych problemów, obecne wyniki mogą być interpretowane jako świadectwo przeciwko barierze dyfuzyjnej dla tlenu w tkance mózgowej, lecz jako potwierdzenie koncepcji mitochondriów jako "doskonałego odpływu" dla tlenu.

Ponadto obserwacja, że P<sub>tO<sub>2</sub></sub> uzyskane przy pomocy metody rozcieńczania wskaźników jest proporcjonalne do mózgowego żylnego P<sub>O<sub>2</sub></sub> potwierdza prawidłowość traktowania P<sub>vO<sub>2</sub></sub> krwi mózgowej jako pośredniego wskaźnika utlenowania mózgu.

W obecnych doświadczeniach zależność ta ma charakter liniowy:

$$P_{tO_2} = 0,84 \cdot P_{vO_2} - 18,4 \quad /r = 0,91/.$$



## 5. KRZYWE ROZCIEŃCZANIA TLENU-18 W KRĄŻENIU MIĘŚNIOWYM

Celem doświadczeń było wykorzystanie metody rejestracji krzywych rozcieńczenia tlenu-18 do badania wymiany tlenu pomiędzy krwią i tkankami mięśniowymi. Komórki mięśniowe /miocyty/ zawierają mioglobinę, białko posiadające zdolność do odwracalnego wiązania się z tlenem. Udział mioglobiny w transporcie tlenu do mitochondriów mięśniowych jest opisany w niemal każdym podręczniku fizjologii; tym niemniej nie ma w tym zakresie konkluzyjnych rozstrzygnięć /p. rozdz. 5.3.1./.

U źródeł doświadczeń wykonanych na preparatach mięśniowych leżała hipoteza, że prześledzenie wymiany znakowanego tlenu pomiędzy krwią a tkankami zawierającymi mioglobinę może dostarczyć informacji dotyczących udziału tego białka w transporcie tlenu w komórkach w warunkach in vivo.

W szczególności przewidywaliśmy, że tkankowa przestrzeń dystrybucji tlenu /wyznaczona z różnicy średnich czasów tranzytu wskaźnika tlenowego i wskaźnika odniesienia/ będzie w przeliczeniu na jednostkę objętości tkanki znacznie większa w preparacie mięśniowym, niż w mózgu. Wyrażałoby się to znacznie większym opóźnieniem krzywych rozcieńczenia znakowanego tlenu w stosunku do krzywych odniesienia, tym bardziej, że przepływ krwi na jednostkę objętości tkanki  $/F/V_T/$  jest w mięśniach w spoczynku znacznie mniejszy, niż w mózgu.

Wyniki doświadczeń nie potwierdziły przewidywań. Rejestrowane krzywe wykazywały bardzo niewielkie różnice średnich czasów tranzytu tlenu i erytrocytów. Aby wyjaśnić przyczyny braku spodziewanej przestrzeni dystrybucji tlenu w preparacie



mięśniowym badania rozszerzone zostały o jednoczesną rejestrację krzywych rozcieńczenia metabolicznie inertych swobodnie dyfundujących wskaźników, trytowanej wody /THO/ i acetyleny.

Prace nad tym tematem obfitowały w błędne hipotezy, źle zaprojektowane eksperymenty i mylne interpretacje, które były eliminowane na poszczególnych etapach. Nie są one uwzględnione w niniejszej rozprawie. Ze względu na wielokrotne modyfikacje modelu doświadczalnego, wprowadzane "na bieżąco" pod wpływem uzyskiwanych wyników, prezentacja materiału jest trudna. Wyniki są ostatecznie przedstawione w postaci dwóch grup doświadczalnych. Grupa pierwsza zawiera doświadczenia, w których tempo perfuzji wyznaczano jedynie w oparciu o metodę Henriquesa-Hamiltona. W grupie drugiej zebrano doświadczenia, w których perfuzja mierzona była również bezpośrednio. Pozostałe, wprowadzane "na bieżąco" modyfikacje modelu doświadczalnego mieszczą się w ramach tych dwu grup. Dyskusja natomiast, chociaż nie ma charakteru "chronologicznego", a więc nie odtwarza w ścisły sposób drogi, która wiodła do finalnego rozstrzygnięcia /hipotezy "przeciek-odpływ"/, ma za zadanie również pokazanie "dynamiki" tematu. Z tego względu włączone tu zostały niektóre analizy dodatkowe /np. dotycząca roli mioglobiny w transporcie tlenu/. Mimo, że zagadnienia te nie wazą na ostatecznej interpretacji wyników, ich dyskusja stanowiła istotny krok na drodze wiodącej do sformułowania końcowej hipotezy.



## 5.1. Metody

Doświadczenia wykonano na dorosłych psach samcach, mieszańcach o ciężarze ciała 16-27 kg. Przed uśpieniem około 40 ml krwi przeznaczonej do znakowania izotopami pobierano z żyły na heparynę. Zwierzęta usypiano przy pomocy dużej /40 mg · kg<sup>-1</sup>/ dawki pentobarbitalu dożylnie. Po intubacji lub tracheostomii psy wentylowano powietrzem wzbogaconym w tlen /pierwsza grupa doświadczalna/ lub powietrzem, przy pomocy respiratora typu Harvard, bez zwiotczenia, utrzymując końcowo-wydechowy CO<sub>2</sub> na poziomie około 4%. W drugiej grupie doświadczalnej w niektórych eksperymentach stosowano przed i podczas rejestracji krzywych rozcieńczenia wentylację mieszkami gazowymi hipoksyjnymi lub hiperkapnicznymi. W przypadku wystąpienia spontanicznych ruchów oddechowych w asynchronii z respiratorem podawano uzupełniające dawki pentobarbitalu, 4 mg · kg<sup>-1</sup> dożylnie. Następnie kaniulowano tętnicę i żyłę udową, i podawano w ciągłym wlewie izotoniczny roztwór dekstrozy-NaCl, monitorując elektromanometrem obwodowe ciśnienie tętnicze i nie dopuszczając do jego spadku poniżej 100 mmHg.

Z przeciwległej kończyny tylnej usuwano powłoki skórne od pachwiny do stopy, koagulując skórne naczynia krwionośne aby zapobiec krwawieniu. Po usunięciu powłok skórnych preparat kończyny owijano gazą zwilżoną solą fizjologiczną. Utracie ciepła zapobiegano przez podgrzewanie promiennikiem podczerwieni. Na granicy stopy i podudzia zakładano opaskę uciskową. Przez odgałęzienie żyłne znajdujące się nieco poniżej dołu



pachwinowego wprowadzono do żyły udowej w kierunku dystalnym kateter probkujący, który był później łączony z opisanym poprzednio /rozd. 4.2./ układem próbkującym. Pozostałe odgałęzienia żyłne, a także odgałęzienia tętnicze, opuszczające naczynia udowe w kierunku narządów jamy brzusznej i miednicy małej, podwiązywano. Znakowaną krew wstrzykiwano do tętnicy udowej przez kaniulę typu Venflon /rozmiar 14/ wprowadzoną przez jedno z odgałęzień tętniczych na wysokości dołu pachwinowego.

Po wykonaniu pierwszych 6 doświadczeń, celem wydłużenia czasu upływającego pomiędzy podaniem impulsu wskaźników i pojawieniem się artefaktu recyrkulacji, zastosowany został "układ perfuzyjny", zawierający na wejściu badanego preparatu "przestrzeń martwą" dla krwi, czyli "linię opóźniającą". W tym układzie obwodowa krew tętnicza pobierana była z łuku aorty przy pomocy dużego drenu /wewnętrzna średnica 0,5 cm/ i podawana przez polietylenowe rury o wewnętrznej średnicy 1,5 cm i długości 50 cm do tętnicy udowej powyżej miejsca wstrzykiwania znakowanej krwi. Objętość "linii opóźniającej" wynosiła około 350 ml. Przepływ przez nią wymuszony był przy pomocy pompy perystaltycznej. "Linię opóźniającą" wypełniano izotonicznym roztworem dekstrozy-NaCl. Po podłączeniu jej wyjścia do proksymalnego odcinka przeciwległej żyły udowej przeprowadzano stopniową hemodilucję. Równocześnie zwierzętom podawano 40 000 jednostek heparyny dożylnie, aby zapobiec krzepnięciu wynaczynionej krwi. Po wyrównaniu hematokrytu pomiędzy krążeniem zwierzęcia i "linią opóźniającą" dokonywano resekcji tętnicy udowej badanego preparatu i wyjście



podłączano do jej dystalnego odcinka, rozpoczynając "perfuzję". Ciśnienie perfuzyjne monitorowano elektromanometrem pomiędzy pompą a tętnicą udową. Ze względu na charakterystykę pompy /przepływ pulsacyjny/ przypominało ono tętnicze ciśnienie obwodowe. Rzut pompy ustawiano na takim poziomie, aby ciśnienie perfuzyjne było nieco /o 10-20 mmHg/ wyższe od obwodowego ciśnienia tętniczego.

Znakowanie krwi, kontrola gazów oddechowych we krwi tętniczej i żyłnej, wstrzykiwanie znakowanej krwi, pobieranie próbek, oraz procedury analityczne i obliczeniowe w zakresie pomiaru i normalizacji krzywych rozcieńczenia tlenu-18 i chromowanych erytrocytów, obliczania średnich czasów tranzytu wskaźników i wyznaczania krzywych ekstrakcji przeprowadzane były w sposób opisany poprzednio /rozdział 3/.

W poszczególnych doświadczeniach pobierano do 45 próbek, oraz stosowano czasy próbkowania od 0.68 do 2,5 s na próbkę. Po zakończeniu doświadczenia określano przybliżony ciężar tkanek badanego preparatu, ważąc tkanki miękkie oddzielone od kości.

W pierwszych 9 doświadczeniach do wyznaczenia przepływu krwi przez badany preparat wykorzystano metodę Henriquesa-Hamiltona /równanie [2.2.], str. 26 /. Ilość podawanego impulsowo izotopu  $^{51}\text{Cr}$  wyznaczano jako iloczyn wstrzykniętej objętości znakowanej krwi /z uwzględnieniem poprawki na "przestrzeń martwą" kaniuli dotętnicznej, wynoszącą 0.12 ml/. Ilość wskaźnika pobieranego przez układ próbkujący wyznaczano przy pomocy sumowania i ekstrapolacji /patrz rozdz. 3.5./.

Po wykonaniu trzech doświadczeń w układzie "perfuzyjnym"



okazało się, że estymaty perfuzji otrzymane metodą Henriquesa-Hamiltona są znacznie niższe, niż spodziewane tempo perfuzji wymuszane pompą. W związku z tym wprowadzono pomiar rzutu pompy tłoczącej krew przez "linię opóźniającą" jako metodę wyznaczania rzeczywistego tempa perfuzji badanego preparatu.

Ponieważ zagadnienie to miało kluczowe znaczenie, pełnej analizie poddano jedynie wyniki doświadczeń, w których perfuzję mierzono bezpośrednio /grupa druga/. Grupa pierwsza traktowana jest jako doświadczenia pilotowe.

#### 5.1.1. Kontrola stopnia uszkodzenia badanego preparatu

Ze względu na inwazyjność przygotowania preparatu do badań pewien stopień uszkodzenia tkanek był nieuchronny. Aby minimalizować rozwijające się w czasie niekorzystne zmiany starano się przeprowadzać pomiary szybko, rozpoczynając je natychmiast po zakończeniu przygotowania chirurgicznego. Cały cykl badań, obejmujący do czterech wstrzyknięć znakowanej krwi, trwał nie więcej niż 2 godziny. W grupie drugiej jako preparaty uszkodzone eliminowano te, które wykazywały w czasie perfuzji znaczny wzrost ciśnienia perfuzyjnego lub tętniczo-żylną różnicę  $[O_2]$ , dostrzegalne oznaki obrzęku /puchnięcie tkanek/, lub brak odpowiedzi hiperemicznej na okluzję wejścia tętniczego. Odpowiedź hiperemiczna uznawana była za prawidłową, jeżeli po trzydziestosekundowej okluzji tętnicy następował spadek oporu naczyniowego prowadzący, po wznowieniu przepływu /przy niezmiennym rzucie pompy/, do przejściowego spadku ciśnienia perfuzyjnego o co najmniej jedną trzecią.



5.1.2. Rejestracja krzywych rozcieńczenia swobodnie dyfundujących wskaźników metabolicznie inertnych

W większości doświadczeń grupy drugiej równocześnie z krzywymi rozcieńczenia  $^{18}\text{O}_2$  i  $^{51}\text{Cr}$ -rbc rejestrowano krzywe rozcieńczenia swobodnie dyfundujących wskaźników, aby poznać zachowanie się w badanym preparacie dobrze dyfundujących substancji hydrofilowych i lipofilowych. Dobór wskaźników podyktowany był względami technicznymi.

Trytowana woda /THO/ jest najczęściej używanym /z oczywistych względów/ wskaźnikiem hydrofilowym. Pomiar THO w próbkach krwi nie nastroczał trudności. Wykorzystano metodę scyntytacji cieczowej /LSC/, używając scyntylatora Omnifluor /New England Nuclear/ i cieczowego licznika scyntyłacyjnego Beckman LS-8000, wyposażonego w mikroprocesor i oprogramowanie umożliwiające korekcję artefaktów fluorescencji, korekcję tłumienia sygnału scyntytacji przez zabarwienie próbek /color quenching/, oraz wykluczenie scyntytacji związanych z obecnością  $^{51}\text{Cr}$  w próbkach /channel crosstalk correction/. Normalizację krzywych THO przeprowadzano podobnie, jak dla krzywych  $^{51}\text{Cr}$ .

Zagadnienie wyznaczenia krzywych rozcieńczenia swobodnie dyfundującego wskaźnika lipofilowego, gazowego, okazało się znacznie trudniejsze. Po pierwsze, ze względu na niewielką objętość próbek niemożliwe było dzielenie ich przed przeprowadzeniem pomiaru przy pomocy spektrometru masowego; natomiast odzyskiwanie próbek z komory pomiarowej spektrometru po



zakończeniu pomiaru nie gwarantowało zachowania składu gazowego próbek. Eliminowało to możliwość użycia stosowanych zazwyczaj w tym celu radioaktywnych izotopów gazów obojętnych, np.  $^{133}\text{Xe}$ . Stosowanie wodoru i elektrody wodorowej zostało zarzucone ze względu na trudności z kalibracją. Ostatecznie zdecydowano się na zastosowanie jednolitej metodyki pomiarów, a więc na pomiar żylnego profilu gazowego wskaźnika metabolicznie inertnego przy pomocy spektrometrii masowej, równocześnie z pomiarem  $^{18}\text{O}_2$ .

Pod kątem przydatności do pomiarów krzywych rozcieńczenia przebadany został szereg gazów i substancji obojętnych: wodór, metan, etan, etylen, acetylen, propan, butan, sześćciofluorek siarki i argon. Z substancji tych przydatny okazał się jedynie acetylen. Inne substancje zostały wyeliminowane ze względu na występowanie co najmniej jednego z następujących zjawisk: szybka deplecja gazu z roztworu w wyniku nadmiernej przepuszczalności błony teflonowej w układzie wejściowym spektrometru masowego /np.  $\text{H}_2$  i metan/, zbyt niska czułość pomiaru w wyniku słabej przepuszczalności błony teflonowej /np.  $\text{SF}_6$ /, zbyt duże tło dla pików o danym m/e /np. propan/, lub interferencja z pomiarami tlenu /Argon/.

Acetylen  $[\text{C}_2\text{H}_2]$  posiada stosunkowo wysoką rozpuszczalność w krwi,  $1,3 \text{ ml} \cdot \text{l} \cdot \text{mmHg}^{-1}$  w  $38^\circ\text{C}$  /Wagner i wsp., 1974/, a jednocześnie przenika wydajnie przez błonę teflonową. Umożliwia to wysoką czułość pomiaru, przy praktycznej eliminacji zjawiska deplecji. Tło pików acetylenów o m/e = 26 nie jest znaczne. Jednakże, ze względu na duże rozcieńczenie tego gazu w próbkach żylnych /znacznie większe, niż



rozcieńczenie  $^{18}\text{O}_2$ , konieczne było przeprowadzenie korekcji odczytu na tło.

Dodatkowym czynnikiem, który musiał być uwzględniony w tych pomiarach, była różnica rozpuszczalności  $\text{C}_2\text{H}_2$  w krwi i w roztworze wodnym. Według danych Wagnera i wsp. /1974/ rozpuszczalność  $\text{C}_2\text{H}_2$  w 5% roztworze wodnym dekstrozy wynosi  $1,14 \text{ ml} \cdot /1 \cdot \text{mmHg}^{-1}$  dla  $38^\circ\text{C}$ . W obecnych badaniach założono, że rozpuszczalność  $\text{C}_2\text{H}_2$  w roztworze Drabkina jest identyczna.

Aby zarejestrować krzywą  $[\text{C}_2\text{H}_2]_v(t)$  krew odtlenowywana była przy pomocy gazu zawierającego 95%  $\text{C}_2\text{H}_2$  i 5%  $\text{CO}_2$ . Umożliwiło to wprowadzenie odpowiedniej ilości acetylenu do krwi. Pozostałe etapy przygotowania znakowanej krwi były identyczne, jak podano poprzednio.

Normalizacja krzywych rozcieńczenia acetylenu jest bardziej złożona, niż normalizacja krzywych tlenowych. Pomiar jest pomiarem stosunku ciśnienia cząstkowego znakowanego tlenu do ciśnienia cząstkowego całkowitego tlenu. Z tego względu ewentualne zmiany czułości układu pomiarowego nie mają wpływu na wynik pomiaru. W przypadku acetylenu czułość układu pomiarowego musi zostać uwzględniona, nie jest to bowiem pomiar względny. Czułość ta zależy nie tylko od prądu jonizacji /który w większości przypadków wynosił  $20 \mu\text{A}$ /, ale również od własności błony teflonowej i szczelności układu. Dwa ostatnie czynniki są trudne do ścisłej kontroli; w szczególności mogą one ulegać niewielkim zmianom w trakcie cyklu pomiarów dużej ilości próbek. Przy bardzo dużym rozcieńczeniu acetylenu nawet niewielkie zmiany czułości mogą w istotny sposób wpływać na wynik.



Ogólnie, wysokość pików  $C_2H_2$  /m/e = 26/, H, wynosi:

$$H = S \cdot [C + M + a \cdot F + (1-a) \cdot B] \quad [5.1.]$$

gdzie S jest współczynnikiem czułości układu pomiarowego umożliwiającym konwersję wysokości pików /w mV/ na jednostki ciśnienia cząstkowego /mmHg/; C jest ciśnieniem cząstkowym acetylenu w próbce, M, F i B określają, odpowiednio, tła pochodzące z układu pomiarowego, z roztworu Drabkina i z krwi /tła te są znormalizowane do jednostek ciśnienia parcjalnego  $C_2H_2$ /; a jest frakcją krwi w próbce, wyznaczaną spektrofotometrycznie.

S wyznaczano poprzez pomiar pików  $N_2$  /m/e = 28/ podczas przedmuchiwania systemu 100%  $N_2$  pomiędzy pomiarami próbek. Ponieważ  $P_{N_2}$  jest stałe, zmiana pików m/e = 28 musi być związana ze zmianą czułości układu. Wysokość pików acetylenu normalizowana ze względu na czułość układu:

$$\frac{H}{S} = \frac{H}{\text{pik m/e} = 28} = C + M + a \cdot F + (1-a) \cdot B \quad [5.2.]$$

Składniki tła, M, F i B, wyznaczano mierząc pik m/e = 26 odpowiednio przy zamkniętym układzie próbkującym po wprowadzeniu do komory pomiarowej płynu Drabkina, oraz krwi pobranej przed podaniem wskaźników. W pierwszym przypadku  $H/S = M$  /bowiem C, F i B = 0/. W drugim przypadku  $H/S = M + F$ , /C i B = 0/, lecz M jest już znane. W trzecim przypadku  $H/S = M + B$ , /C i F = 0/. Należy nadmienić, że F i B są sobie równe. Źródło tego tła nie zostało zidentyfikowane; prawdopodobnie jest nim jakaś substancja obecna w powietrzu atmosferycznym. Wynika z tego, że  $a \cdot F + (1-a) \cdot B = F = B$ , co



upraszcza dalsze obliczenia.

Ostatecznie otrzymujemy:

$$C = \frac{H}{\text{/pik m/e} = 28/} - M - F \quad [5.3.]$$

W kolejnej fazie obliczeń należy uwzględnić różnice rozpuszczalności  $C_2H_2$  w krwi i w płynie Drabkina. Rozpuszczalność acetylenu w próbce zawierającej frakcję  $a$  krwi wynosi:

$$S_{C_2H_2, S} = 1,30 \cdot a + 1,14 \cdot (1-a) \quad [5.4.]$$

gdzie 1,30 i 1,14 są rozpuszczalnościami  $C_2H_2$  w krwi i w wodzie /patrz powyżej/.

Ten ostatni wzór pozwala na konwersję wysokości pików próbki do jednostek zawartości  $C_2H_2$  w próbce, poprzez przekształcenie:

$$[C_2H_2]_S = [1,30 \cdot a + 1,14 \cdot (1-a) \cdot] C_S \quad [5.5.]$$

Wartość ta jest wyrażona w takich samych jednostkach, co zawartość acetylenu w znakowanej krwi:

$$[C_2H_2]_i = 1,30 \cdot C_i \quad [5.6.]$$

$C_S$  i  $C_i$  oznaczają znormalizowane do czułości i skorygowane na tła wielkości pików  $C_2H_2$  w próbkach i w znakowanej krwi.

Jednostki  $C_2H_2$  są arbitralne, ale ich kalibracja do chemicznych jednostek stężenia nie jest konieczna. Normalizację krzywej acetylenowej do krzywej  $^{51}Cr$ -rbc przeprowadza się na podobnej zasadzie, jak normalizację krzywej  $^{18}O_2$ :

$$[C_2H_2]_v(t) = [C_2H_2]_S \cdot \frac{[O_2]_i \cdot \alpha_i}{[C_2H_2]_i} \quad [5.7.]$$

W ten sposób otrzymujemy żylny profil acetylenu,  $[C_2H_2]_v(t)$  wyrażony również w jednostkach proporcjonalnych do  $\mu l$   $^{18}O_2$ /ml krwi.



## 5.2. Wyniki

Kompletne, nadające się do interpretacji wyniki w postaci krzywych rozcieńczenia tlenu-18 i znakowanych erytrocytów uzyskano w ponad 20 doświadczeniach wykonanych na 11 zwierzętach. Tabela 5.1. zawiera wyniki gazometrii krwi tętniczej i żylniej badanych preparatów.

Tabela 5.1. Ciśnienia cząstkowe  $O_2$  i  $CO_2$ , oraz metaboliczna ekstrakcja tlenu przez preparaty kończyny.

Dośw. nr	$Pa_{CO_2}$ mmHg	$Pa_{O_2}$ mmHg	$Pv_{O_2}$ mmHg	$[O_2]_a$ μl/ml	$[O_2]_v$ μl/ml	Ekstrakcja $O_2$ %
1 <sup>a</sup>	-	142.5	61.5	204.5	177.0	13.4
2 <sup>a</sup>	37.0	132.0	64.5	165.0	154.0	6.7
3 <sup>a</sup>	35.0	110.0	56.5	152.5	124.5	18.4
4 <sup>a</sup>	40.5	147.0	59.0	130.0	93.0	28.5
5 <sup>a</sup>	47.0	130.5	65.0	135.5	107.0	20.8
6 <sup>a</sup>	46.5	158.0	65.0	133.5	109.0	18.4
7 <sup>b,c</sup>	93.0	80.0	63.0	147.0	134.0	8.8
8 <sup>b,c</sup>	54.0	125.5	64.5	153.0	131.0	14.4
9 <sup>b,c</sup>	28.0	80.5	60.0	165.0	152.5	7.6
14 <sup>b</sup>	33.0	69.0	32.0	178.0	70.5	39.7
15 <sup>b</sup>	40.0	32.0	10.0	170.0	37.5	78.0
18 <sup>b</sup>	44.0	71.0	61.0	206.0	168.0	18.4
19	60.0	68.0	52.0	146.0	112.0	23.3
20	28.0	79.5	48.5	140.0	120.0	14.3
21	27.5	56.0	41.0	131.0	111.0	15.4
23	35.5	40.0	32.5	99.5	52.5	47.5
25	40.0	91.0	73.0	185.0	170.5	7.9
27	42.5	91.0	63.0	134.0	126.0	6.0
28	44.5	82.5	67.0	96.0	92.5	3.4
29	43.5	73.0	60.5	92.0	77.0	16.4
30 <sup>d</sup>	32.0	75.0	39.5	184.0	126.0	31.5
31 <sup>b</sup>	61.0	68.5	48.0	130.0	107.0	17.6
32 <sup>b</sup>	53.5	90.0	58.5	125.0	82.0	34.4
33 <sup>e</sup>	50.5	93.5	42.0	98.0	37.5	61.2

a doświadczenia "autoperfuzyjne"

b nie mierzono tempa perfuzji.

c nie kontrolowano ciśnienia perfuzyjnego

d krzywa tlenowa nie mogła być ekstrapolowana do czasu nieskończoności

e w tym doświadczeniu badany preparat był prawdopodobnie uszkodzony



W ramach drugiej grupy doświadczalnej, a więc doświadczeń z bezpośrednim pomiarem perfuzji, stosowano w kilku przypadkach wentylację mieszkankami gazowymi o niskim  $O_2$  lub wysokim  $CO_2$ . W czterech przypadkach /dośw. nr 19, 31, 32 i 33/ zwierzęta podczas rejestracji krzywych były hiperkapniczne / $Pa_{CO_2} > 50 \text{ mmHg}$ /, a w trzech /dośw. nr 15, 21 i 23/ - hipoksyjne / $Pa_{O_2} < 60 \text{ mmHg}$ /.

Krzywe rozcieńczenia acetyleny wyznaczono w 10 doświadczeniach, a krzywe rozcieńczenia THO - w czterech. W dwóch eksperymentach zmierzono ponadto krzywe rozcieńczenia  $^{13}CO_2$ , wprowadzanego do znakowanej krwi pod postacią  $^{13}C$ -dwuwęglanu sodowego.

Analiza wyników okazała się bardzo skomplikowana, z następujących względów. Po pierwsze, model doświadczalny był w trakcie badań wielokrotnie modyfikowany. Po drugie, zastosowane techniki były bardzo złożone i błędy, nieuchronnie pojawiające się na poszczególnych etapach "obróbki" próbek niejednokrotnie mogły się kumulować. Niemniej błędy te powinny mieć charakter stochastyczny /przypadkowy/, a więc przy odpowiednio długiej serii doświadczeń średnie wyniki ilościowe i najczęściej pojawiające się konfiguracje jakościowe mogą zostać uznane za odzwierciedlenie zachodzących realnie procesów.

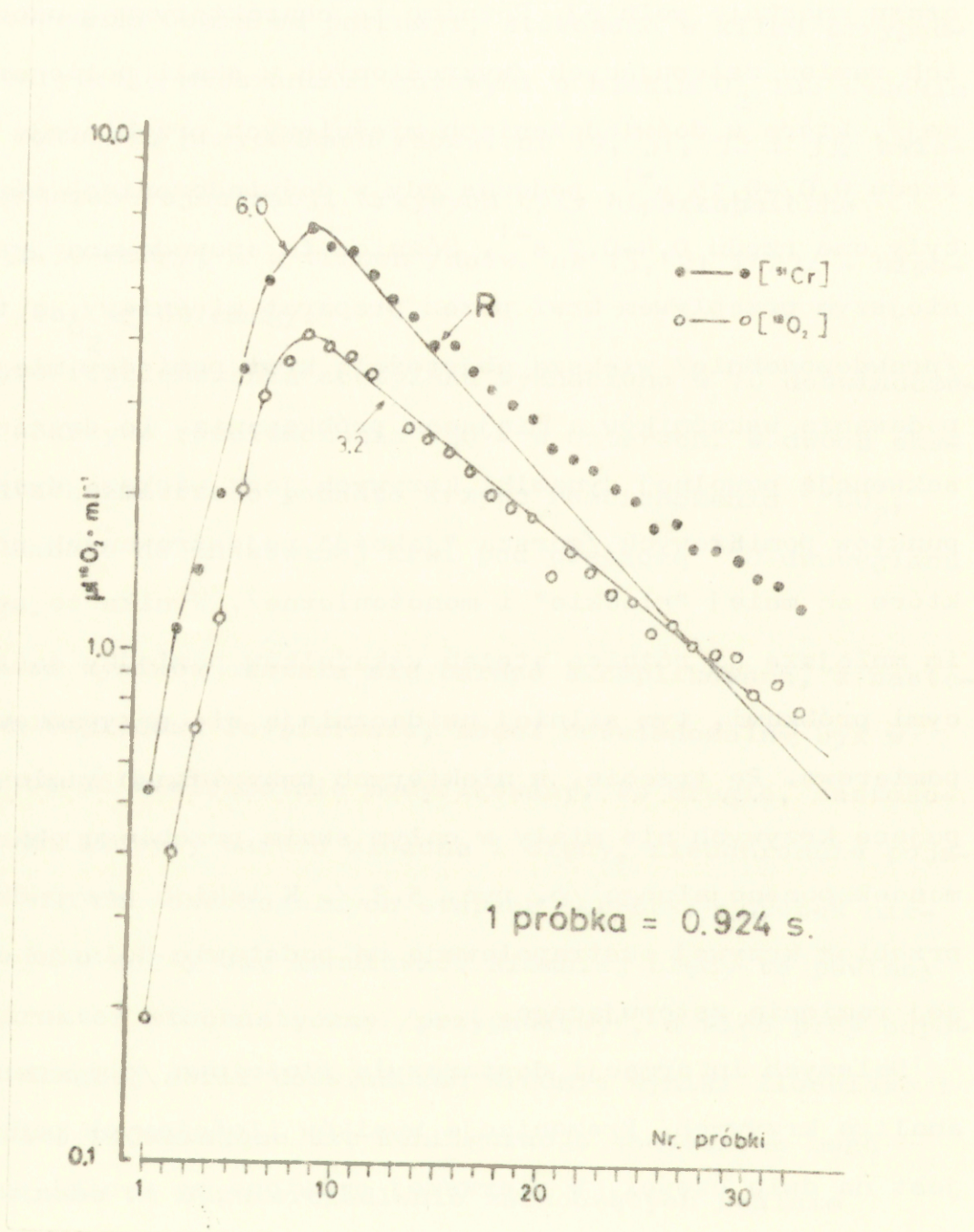
Ryc. 5.1., 5.2., 5.3. przedstawiają przykładowe krzywe rozcieńczenia wskaźników, uzyskane w doświadczeniach "autoperfuzyjnych" i "perfuzyjnych". Pod kilkoma względami krzywe "mięśniowe" różnią się od krzywych "mózgowych".



Po pierwsze, stężenia  $^{51}\text{Cr}$  i  $^{18}\text{O}_2$  zmieniają się w funkcji czasu znacznie wolniej. Różnicę tę charakteryzują nachylenia ich ramion zstępujących /wykreślonych w skali półlogarytmicznej/, które w doświadczeniach mięśniowych przybierają wartość rzędu  $0,07-0,15 \text{ s}^{-1}$ , podczas gdy w doświadczeniach mózgowych były one rzędu  $0,4-0,7 \text{ s}^{-1}$ . Różnica ta spowodowana jest wolniejszym przepływem krwi przez preparat mięśniowy, a także /prawdopodobnie/ większą objętością krwi pomiędzy miejscem podawania wskaźników a miejscem próbkowania. Po drugie, konsekwencją powolnej dynamiki krzywych jest większa dyspersja punktów pomiarowych /gorsza "jakość" rejestrowanych przebiegów, które są mniej "gładkie" i monotoniczne/. Wynika to stąd, że im mniejsze są różnice stężeń wskaźników pomiędzy sąsiadującymi próbkami, tym silniej uwidaczniają się przypadkowe błędy pomiarowe. Po trzecie, w niektórych przypadkach ramiona zstępujące krzywych nie miały w całym swoim przebiegu charakteru monoeksponencjalnego /p. ryc. 5.3./. W takich przypadkach przebieg krzywej ekstrapolowano na podstawie dolnego odcinka jej ramienia zstępującego.

Dalszych informacji dostarczyła ilościowa /obliczeniowa/ analiza krzywych. Prezentacja wyników ilościowych podzielona jest na dwie części. W pierwszej omówione są wyniki uzyskane w oparciu o integrację i ekstrapolację krzywych rozcielenia wskaźników. Druga część poświęcona jest analizie krzywych ekstrakcji.

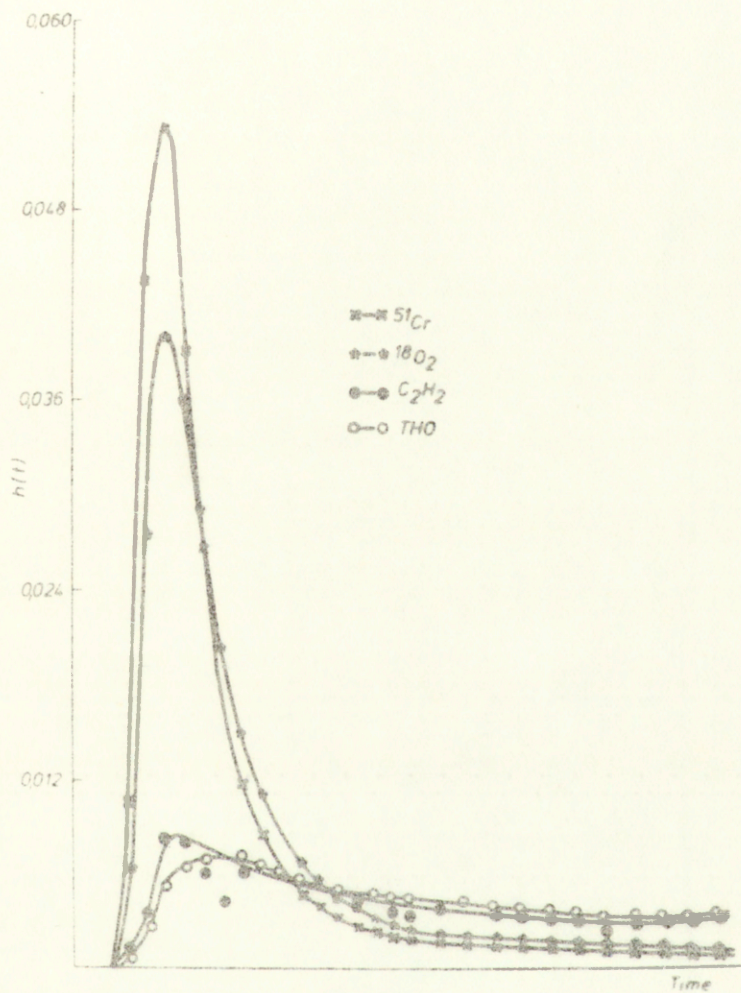




1 próbka = 0.924 s.

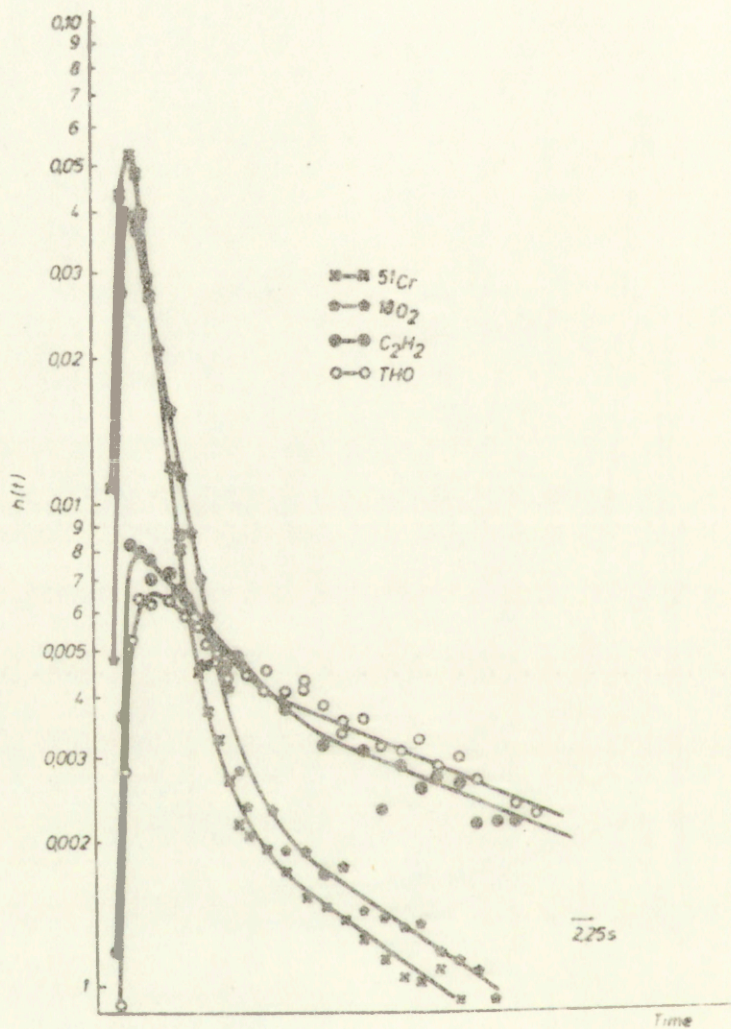
Ryc. 5.1. Krzywe rozcieńczania erytrocytów znakowanych  $^{51}\text{Cr}$  i tlenu-18 w doświadczeniu "autoperfuzyjnym". R oznacza moment wystąpienia artefaktu recyrkulacji. Liczby 6,0 i 3,2 oznaczają wartości dla próbek, w których nie wykonano pomiaru /z przyczyn technicznych/, otrzymane metodą interpolacji.





Ryc. 5.2. Krzywe rozcieńczenia tlenu-18 i wskaźników metabolicznie inertnych / $C_2H_2$  i THO/ w doświadczeniu "perfuzyjnym". Na osi rzędnych jednostki wyrażone są jako frakcja podanej dawki  $q_0$ :  
$$h(t) = q_0 / c(t) \cdot F \cdot \Delta t$$
, gdzie  $c(t)$  jest stężeniem w czasie pobierania próbki,  $F$  - tempem perfuzji,  $\Delta t$  - czasem próbkowania /reprodukowane z pracy Grieb i wsp., Adv. Exp. Med. Biol., 1985, 191, 309-322/. Znacznik czasu podany na ryc. 5.3.





Ryc. 5.3. Krzywe rozcieńczenia z doświadczenia ilustrowanego na poprzedniej rycinie, wykreślone w półlogarytmicznym układzie współrzędnych. Wyraznie ujawnia się bieksponencjalny charakter gałęzi zstępujących krzywych.



### 5.2.1. Wyniki oparte na integracji i ekstrapolacji krzywych rozcieńczenia

Tabela 5.2. zawiera wartości średnich czasów tranzytu wskaźników, wyznaczone w sposób opisany poprzednio /rozdz. 3.5./. Różnica średnich czasów tranzytu tlenu-18 i chromowanych erytrocytów dla doświadczeń grupy drugiej wynosi średnio  $2,61 \text{ s} \pm 2,16 \text{ SD} / n = 14$ , zakres od 0,2 do 5,9 s/. Przyjmuje więc ona wartość podobną jak  $\Delta \bar{t}$  dla czterech nieperfuzyjnych doświadczeń grupy pierwszej, w których krzywe można było "wiarygodnie" ekstrapolować do czasu nieskończoności /średnia  $2,56 \pm 1,53 \text{ SD}$ , zakres od 0,6 do 2,1 s/.

Tabela 5.2. Średnie czasy tranzytu obliczone z "mięśniowych" krzywych rozcieńczenia ekstrapolowanych do czasu nieskończoności.

Dośw. nr	$^{51}\text{Cr-rbc}$	Tlen-18	Acetylen	THO
14	12.7	12.9	---	---
15	8.1	8.6	---	---
18	15.8	17.2	20.8	---
19	18.5	19.2	31.8	---
20	10.9	12.0	12.8	---
21	9.6	11.3	15.1	---
23	17.4	18.2	29.8	---
25	11.8	14.4	32.5	38.3
27	13.3	18.0	46.3	46.8
28	18.5	23.2	---	125.5
29	17.3	20.7	72.6	75.8
30	21.7	26.5	66.2	---
31	23.1	---	---	112.7
32	20.4	26.3	109.9	83.9
33	37.4	41.5	176.2	---



Różnica średnich czasów tranzytu wskaźników swobodnie dyfundujących / $C_2H_2$  i THO/ i  $^{51}Cr$ -rbc waha się w szerokich granicach, od 1,9 s /dośw. nr 20/ do 138,8 s /dośw. nr 33/.

W tym zakresie doświadczenia można podzielić na trzy grupy.

W grupie pierwszej /dośw. od 18 do 21/  $\Delta \bar{t}$  dla tlenu-18 wynosi od 0,7 do 1,7 s, a dla acetylenu od 1,9 do 13,3 s. W

grupie drugiej /dośw. 23, 25 i 27/  $\Delta \bar{t}$  dla znakowanego tlenu wynosi od 0,8 do 4,7 s, a  $\Delta \bar{t}$  dla  $C_2H_2$  i THO zawiera się

między 12,4 a 33,5 s. W grupie trzeciej /dośw. od 29 do 33/

$\Delta \bar{t}$  dla tlenu-18 wynosi od 3,4 do 5,9 s, a  $\Delta \bar{t}$  dla dobrze dyfundujących wskaźników inertynych zawiera się pomiędzy

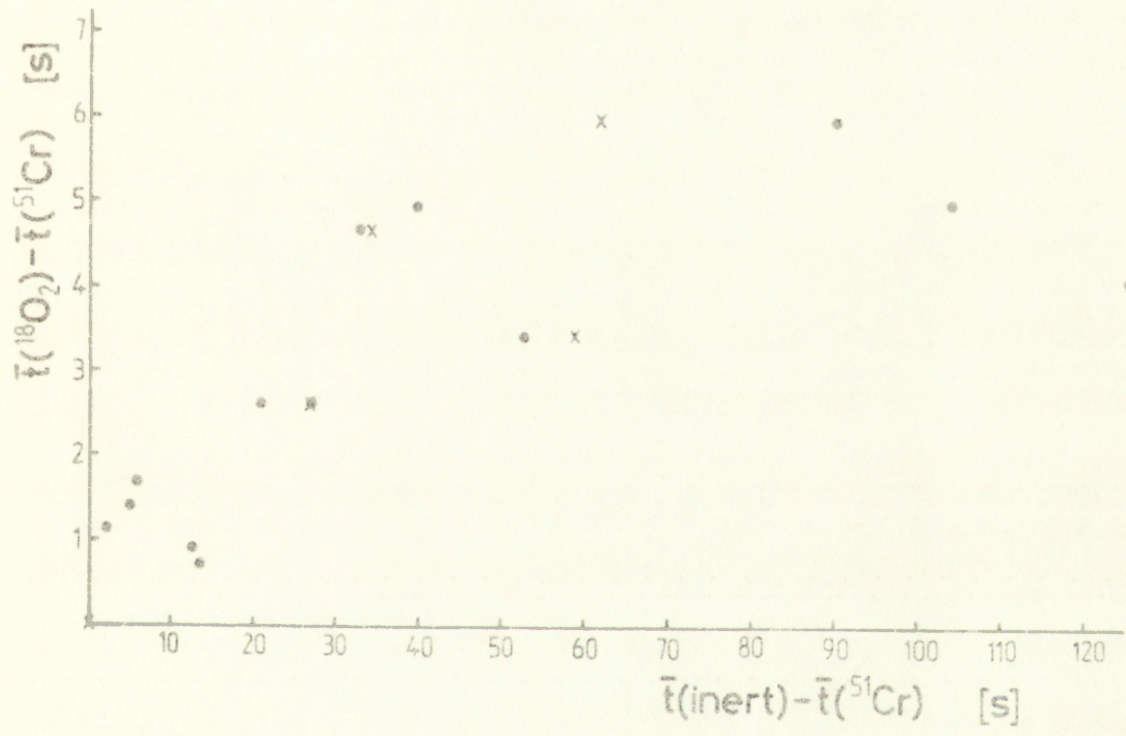
44,5 a 138,8 s. Doprowadziło to do wniosku, że różnica

średnich czasów tranzytu dla tlenu i dla swobodnie dyfundujących wskaźników metabolicznie inertynych jest ze sobą do-

datnio skorelowana /ryc. 5.4./. Wynik ten był prezentowany w postaci komunikatu /Pape i wsp., 1984/.

Późniejsza analiza wykazała, że jedyna zmiana metodyki, której wprowadzenie skorelowane jest ze wzrostem różnic średnich czasów tranzytu wskaźników w trakcie wykonywania tej serii doświadczeń, polegała na stopniowym wydłużaniu czasu próbkowania. W grupie pierwszej wynosiły one  $< 1$  s, w grupie drugiej około 1,5 s, a w grupie trzeciej  $> 2$  s. W ten sposób w kolejnych doświadczeniach rejestrowano coraz dłuższe odcinki krzywych.





Ryc. 5.4. Korelacja pomiędzy różnicą średnich czasów tranzytu tlenu-18 /osę rzednych/, a zarejestrowaną równoczasowo różnicą średnich czasów tranzytu wskaźników metabolicznie inertnych, acetyleny / ● / i trytowanej wody / × / /osę odciętych/.



Tabela 5.3. pokazuje porównanie dwóch estymatów tempa perfuzji badanych preparatów, jednego uzyskanego bezpośrednio z pomiarów rzutu pompy tłoczącej krew przez "linię opóźniającą" /estymat "perfuzyjny"/, drugiego uzyskanego z integracji krzywych  $^{51}\text{Cr}$ -rbc metodą Henriquesa-Hamiltona. Estymat "perfuzyjny" był we wszystkich przypadkach niższy a średnio dwukrotnie niższy od estymatu uzyskanego z integracji krzywych. W tabeli 5.3. podano również tempo zużycia tlenu przez badane preparaty, wyliczone z użyciem "perfuzyjnego" estymatu przepływu krwi.

Tabela 5.3. Estymaty przepływu krwi przez badane preparaty mięśniowe, w ml krwi x (100 g tkanki x min)<sup>-1</sup>, oraz tempo metabolizmu tlenu w tkance w mlO<sub>2</sub> x (100 g tkanki x min)<sup>-1</sup>

Dośw. nr	Estymat "perfuzyjny"	Estymat metodą Hamiltona	Metabolizm tlenu
14	7.4	19.7	0,79
15	7.7	16.2	1.02
19	8.1	13.5	0.28
21	9.5	22.5	0.19
22	9.5	22.5	0.19
23	7.4	24.4	0.35
25	10.0	21.0	0.15
27	15.4	27.8	0.12
28	9.9	49.5	0.03
29	17.6	22.4	0.27
30	9.4	18.0	0.54
31	9.4	8.9	0.22
33	11.8	19.5	0.71
Średnia /n=13/ SD	10.2 3.1	22.1 9.6	0.37 0.30



## 5.2.2. Krzywe ekstrakcji tlenu-1

### wskazników swobodnie dyfundujących

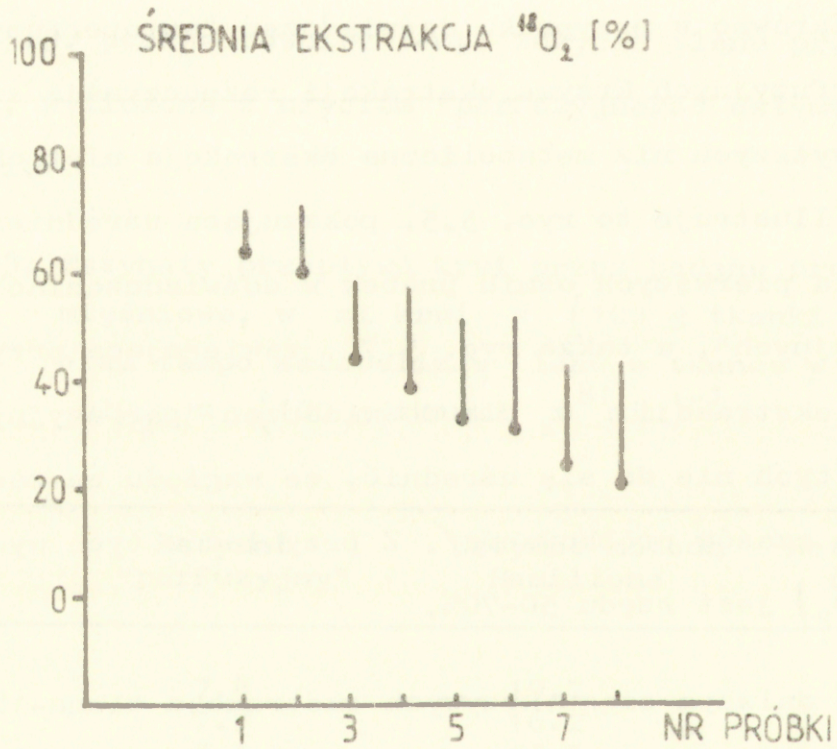
Ze względu na wspomnianą powyżej dużą dyspersję punktów doświadczalnych analiza krzywych ekstrakcji była również utrudniona. Niemniej można z niej wyciągnąć następujące w  $^{18}\text{O}_2$ :

1 Zarówno w przypadku doświadczeń "autoperfuzyjnych", jak perfuzyjnych krzywe ekstrakcji rozpoczynają się od wartości wyższych niż metaboliczna ekstrakcja nieznakowa tego tlenu. Ilustruje to ryc. 5.5 pokazująca uśrednienie wartości  $E(t)$  dla pierwszych ośmiu próbek w doświadczeniach "autoperfuzyjnych", a także ryc. 5.7, zawierająca przykładowe krzywe ekstrakcji dla doświadczeń "perfuzyjnych" /przebiegów tych nie da się uśrednić, ze względu na zastosowanie różnych czasów próbkowania/. Z przykładów tych wynika, że  $E$  jest rzędu 50-70

2 W dalszym ciągu krzywe ekstrakcji tlenu-1 albo spada nieznacznie poniżej, albo zrównuje się z metaboliczną ekstrakcją nieznakowanego tlenu. Krzywe ekstrakcji mają praktycznie jednakowy przebieg dla doświadczeń "autoperfuzyjnych" /ryc. 5.6./ i "perfuzyjnych" /ryc. 5.7./.

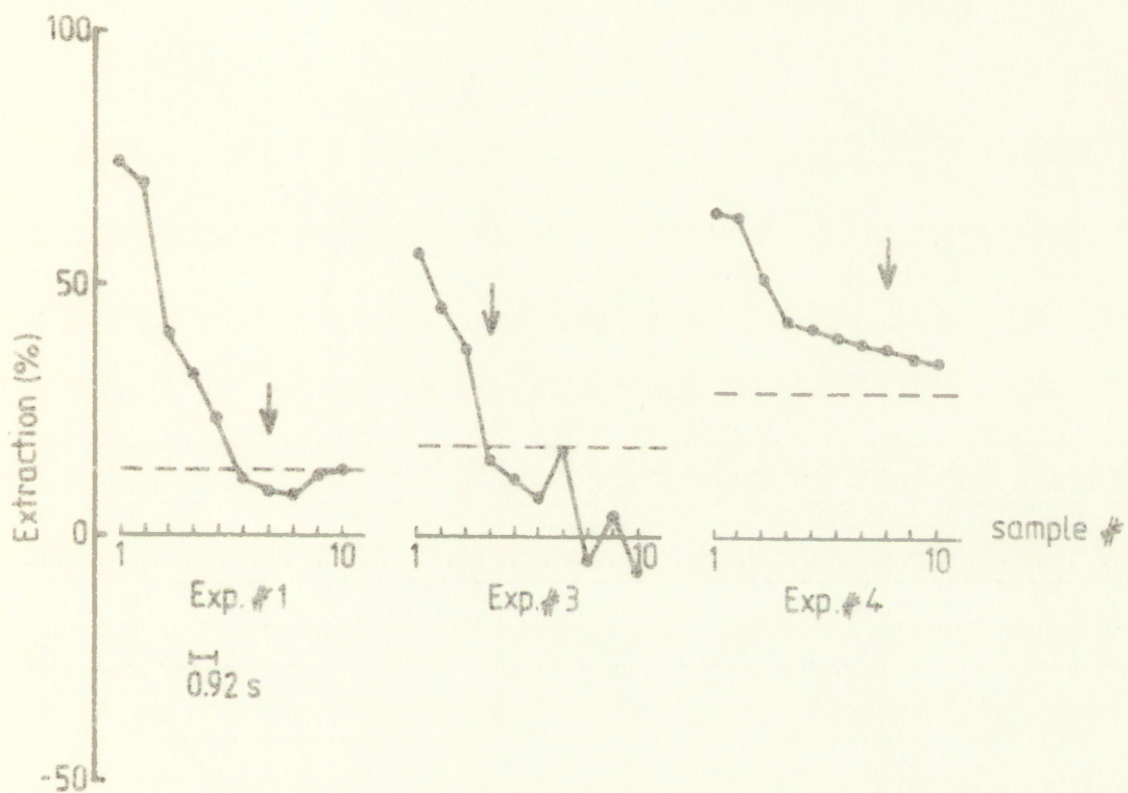
3 Początkowa ekstrakcja dobrze dla wskazań metabolicznie obojętnych /C i G/ wynosi 85-95, a następnie spada monotonicznie. Ilustrują to ryc. 5.8 oraz ryc. 5.9





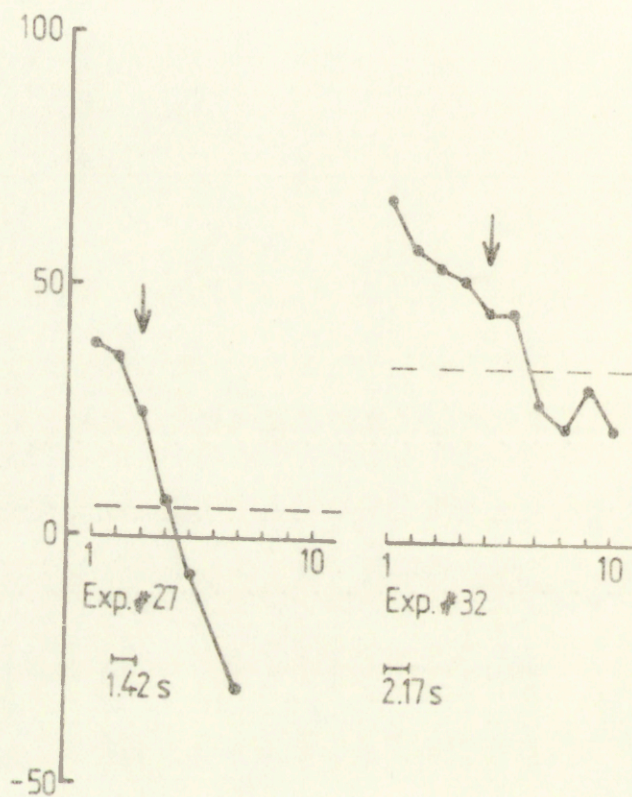
Ryc. 5.5. Uśrednione wartości ekstrakcji  $^{18}\text{O}_2$  w pierwszych 8 próbkach w doświadczeniach "autoperfuzyjnych". Czas próbkowania 0,94 s. /n=6, średnie i ich odchylenia standardowe/.





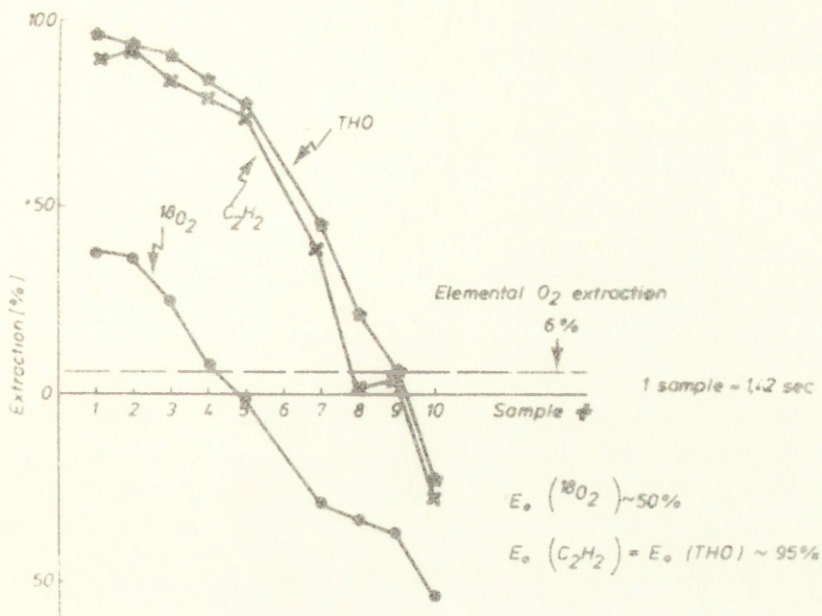
Ryc. 5.6. Przykładowe krzywe ekstrakcji  $^{18}\text{O}_2$  w 3 doświadczeniach 'autoperfuzyjnych' o różnym poziomie ekstrakcji nieznanego tlenu.



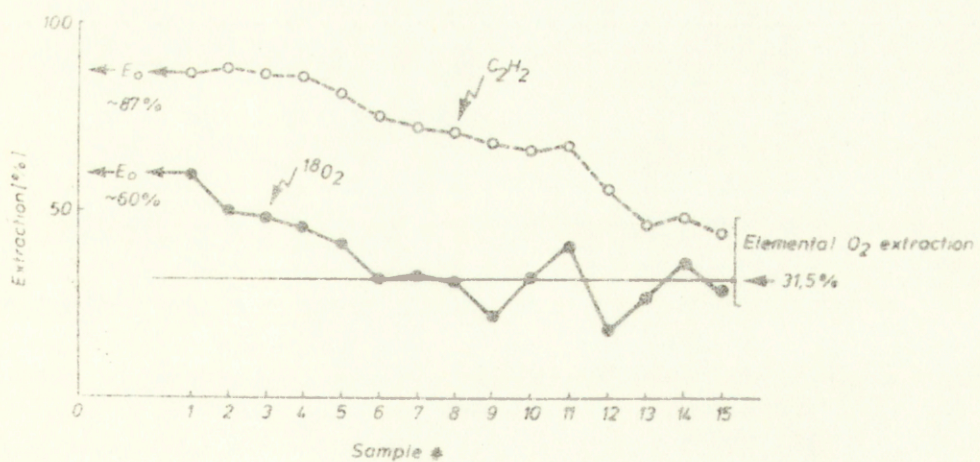


Ryc. 5.7. Przykładowe krzywe ekstrakcji  $^{18}\text{O}_2$  w 2 doświadczeniach "perfuzyjnych" o różnym poziomie ekstrakcji nieznakowanego tlenu.





Ryc. 5.8. Krzywe ekstrakcji  $^{18}O_2$ ,  $C_2H_2$  i THO.  
Doświadczenie nr 27.



Ryc. 5.9. Krzywe ekstrakcji  $^{18}O_2$  i  $C_2H_2$ .  
Doświadczenie nr 30.



### 5.3. Dyskusja

Podstawowy, wspólny dla wszystkich eksperymentów układ doświadczalny, polegający na badaniu preparatu całej kończyny, obarczony jest szeregiem niedostatków, które należy wziąć pod uwagę przy interpretacji wyników.

Wykonanie doświadczeń na preparacie całej kończyny, nie zaś np. na znacznie prostszym do interpretacji preparacie izolowanego mięśnia wynikało z uwarunkowań technicznych, związanych z wybranym sposobem wykonywania pomiarów zawartości znakowanego tlenu w krwi żyłnej. Preparat izolowanego mięśnia nie dostarczyłby wymaganej ilości krwi do próbek /tempo probkowania  $12-15 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ /, którą w dodatku należało wprowadzać pod ciśnieniem do strzykawek z odtlenowanym plynem Drabkina. Stężenie tlenu-18 w próbkach żylnych jest proporcjonalne do objętości wstrzykiwanej krwi, która z kolei musi być w stosunku do perfuzji badanego układu na tyle niewielka, aby można było traktować wstrzyknięcie jako impulsowe, a jednocześnie nie powodować dużych zaburzeń hemodynamiki.

Decydując się na konieczne z przyczyn technicznych badanie preparatu całej kończyny zdawaliśmy sobie w pełni sprawę ze złożoności badanego układu. Aby go uprościć, z powierzchni kończyny usuwana była skóra, będąca siedliskiem anatomicznych zespołów tętniczo-żylnych, przez które przechodzić może do 20% przepływu krwi przez kończynę /Renkin, 1971/.

Podstawową grupę doświadczalną stanowią eksperymenty przeprowadzone z użyciem "linii opóźniającej". Umożliwiło to opóźnienie w czasie występowania artefaktu recyrkulacji wskaźników,



ale jednocześnie było dodatkowym obciążeniem dla zwierzęcia i potencjalnym źródłem uszkodzeń badanego preparatu /zmiany w mikrokrążeniu wynikające z uszkodzeń krwi po jej wynaczeniu, mikrozakrzepy spowodowane aktywacją proteaz układu krzepnięcia, itp./. Porównanie wyników doświadczeń "autoperfuzyjnych" i "perfuzyjnych" prowadzi do wniosku, że obawy o negatywne efekty stosowania "linii opóźniającej" są nieusprawiedliwione. Z punktu widzenia metabolizmu tlenu preparaty "autoperfuzyjne" i "perfuzyjne" były podobne. Metaboliczna ekstrakcja tlenu, która w doświadczeniach z nienaruszonym "naturalnym" zaopatrzeniem badanego preparatu w krew wahała się od 6,7 do 28,5%, w doświadczeniach "perfuzyjnych" wynosiła od 3,4 do 78,0%. Należy jednak zaznaczyć, że największa wartość ekstrakcji tlenu dotyczy eksperymentu przeprowadzonego w ostrej hipoksji /dośw. nr 15,  $P_{a_{O_2}} = 32 \text{ mmHg}$ /, a druga co do wielkości wartość ekstrakcji /61,2%, dośw. nr 33/ zarejestrowana została w preparacie najprawdopodobniej uszkodzonym. Zgodnie z przyjętymi kryteriami /p. str. 114/ była podstawa do jego odrzucenia ze względu na wzrost tętniczo-żylną różnicy  $[O_2]$ . Wynik ten jest wyraźnie odmienny od pozostałych i został zamieszczony jedynie w celu ilustracji efektów uszkodzenia preparatu na charakter badanych krzywych. Jeżeli wyeliminujemy te dwa eksperymenty, to wśród pozostałych, w 8 przypadkach na 13 wartości ekstrakcji tlenu zawierają się w granicach wartości występujących w doświadczeniach "autoperfuzyjnych" /z naturalnym krążeniem/, tylko w czterech jest ona wyższa, a w jednym niższa. Ponadto nie stwierdzono korelacji pomiędzy różnicą średnich czasów tranzytu tlenu-18 i



znakowany erytrocytów a metaboliczną ekstrakcją tlenu  $/r = 0,03/$ , lub tempem zużycia tlenu na jednostkę ciężaru tkanki  $/r = 0,09/$ . Gdyby zaburzenia metaboliczne lub perfuzyjne wpływały na kształty krzywych rozcieńczenia, należałoby spodziewać się wystąpienia takich korelacji.

Powyższe dane skłaniają do wniosku, że stopień uszkodzenia badanych preparatów był na tyle niewielki, że nie wpływał w sposób systematyczny na kształty krzywych rozcieńczenia.

### 5.3.1. Przewidywana i wyznaczona tkankowa przestrzeń dystrybucji tlenu

Jedną z zaskakujących obserwacji było, że różnica średnich czasów tranzytu tlenu-18 i chromowanych erytrocytów, wyznaczona podobnie, jak było to wykonywane w doświadczeniach z krążeniem mózgowym, jest o rząd wielkości niższa, niż można się było spodziewać przy założeniu, że w ciągu pojedynczego przejścia impulsu wskaźników przez sieć naczyniową badanego preparatu tlen związany z mioglobina osiąga równowagę dyfuzyjną z tlenem w krwi.

Spodziewaną wartość dla tlenu w preparacie kończyny można uzyskać przekształcając równanie [2.2.] do postaci:

$$\bar{t} = \frac{[O_2]_{\bar{t}}}{[O_2]_v} \cdot (F/V_T)^{-1} \quad [5.8.]$$

i podstawiając do niego najbardziej prawdopodobne wartości liczbowe znane z literatury, lub zmierzone eksperymentalnie.

Tempo perfuzji badanych preparatów wyrażone na jednostkę ciężaru tkanki w eksperymentach grupy drugiej wynosiło średnio



$10,2 \pm 3,1$  SD ml krwi  $\cdot (100 \text{ g tkanki})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . Wartość ta jest zawyżona, gdyż nie uwzględniono masy kości, ze względu na to, że kości mają znacznie niższe wartości  $F/V_T$ . Zylne  $[O_2]$  wynosiło średnio  $103,5 \pm 45,5$  SD  $\mu\text{l } O_2 \cdot \text{ml krwi}^{-1}$ . Pula tlenu w tkance zawiera tlen rozpuszczony fizycznie i tlen związany z mioglobina. Części miękkie kończyny złożone są z tkanek zawierających Mb /mięśnie czerwone, które stanowią większość masy preparatu/, oraz z tkanek nie posiadających Mb /ścięgna, mięśnie białe, itp./. W obecnych doświadczeniach stężenie Mb nie było oznaczane, ale można tu wykorzystać dane Coburna i Mayersa /1971/,  $5,2 \text{ mg Mb} \cdot (\text{g mokrej masy mięśni})^{-1}$ . Dane te pochodzą z biopsji mięśniowych, a więc w odniesieniu do preparatu całej kończyny wartość ta jest zawyżona. Ciężar cząstkowy Mb wynosi 18500 Daltonów. Wsyceńcie mioglobiny tlenem możemy przyjąć jako 0,65; jest to najniższa z wartości podawanych w literaturze.

Z powyższych danych otrzymujemy stężenie mioglobiny w tkance wynoszące  $2,8 \times 10^{-4} \text{ M}$ , oraz przybliżoną zawartość tlenu w tkance  $[O_2]_t = 4,1 \times 10^{-3} \text{ ml } O_2 \cdot (\text{ml tkanki})^{-1}$  /zawartość tlenu rozpuszczonego fizycznie jest w tym obliczeniu pominięta/. Odpowiednik współczynnika rozdziału tkanka/krew, , dla tlenu,  $[O_2]_t/[O_2]_v$ , wynosi 0,04, a różnica średnich czasów tranzytu tlenu-18 i chromowanych erytrocytów, przewidywana w przypadku równowagi dyfuzyjnej tlenu związanego z mioglobina i hemoglobina, wynosi 23 s.

$\Delta \bar{t}$  obliczona przez integrację i ekstrapolację krzywych rozcieńczenia zarejestrowanych w drugiej grupie doświadczalnej wynosi średnio  $2,61 \pm 2,16$  SD, jest więc o rząd wielkości



niższa od przewidywanej. Najwyższa obliczona z wyników doświadczalnych wartość  $\Delta t$  wynosiła 5,9 s. Tak więc w żadnym doświadczeniu nie osiągnięto wyniku zbliżonego do przewidywanego.

Mimo niedostatków układu doświadczalnego i niedokładności użytych do obliczenia przewidywanego  $\Delta t$  danych liczbowych, rozbieżność rzędu wielkości może być interpretowana w jeden tylko sposób. Wskazuje ona, że pula tlenu związanego z mioglobina w tkankach nie znajduje się w równowadze dyfuzyjnej ze znakowanym tlenem wprowadzonym do krwi. Podczas pojedynczego przejścia impulsu krwi zawierającej tlen-18 jedynie niewielka część znakowanego tlenu, rzędu 10%, równoważy się z tkankową pulą tlenu.

Wniosek ten stanowił punkt wyjścia do rozważań idących w kilku kierunkach. Jednym z nich jest krytyczna analiza stanu wiedzy na temat roli mioglobiny w transporcie tlenu do mitochondriów. Jak już wspomniano poprzednio /str. 109/, rola mioglobiny w ułatwionej dyfuzji tlenu przez tkanki mięśniowe zaliczana być może do tzw. "wiedzy podręcznikowej". Czy w świetle danych doświadczalnych jest do przyjęcia hipoteza, że tlen związany z mioglobina jest dyfuzyjnie inertny? Czy można całkowicie wykluczyć koncepcję, że utlenowanie mioglobiny jest po prostu stanem funkcjonalnym tego białka /przez analogię do fosforylacji lub metylacji innych białek/, nie zaś wyrazem jego funkcji w transporcie tlenu w komórkach?



### 5.3.2. Rola mioglobiny w transporcie tlenu do mitochondriów

Przyjęte jest, że mioglobina spełnia w mięśniach dwie funkcje: komórkowego magazynu tlenu, który uruchamiany jest w razie potrzeby, oraz układu ułatwiającego dostarczanie tlenu mitochondriom. Poglądy te oparte są w istocie na niewiele wynikach doświadczalnych. Często są to ponadto ekstrapolacje obserwacji in vitro na warunki in vivo. W roku 1970 Wittenberg napisał, że funkcja mioglobiny w mięśniach jest dziwnie oporna na natarcie eksperymentatorów. Od tego czasu niewiele się zmieniło.

Z samego faktu odwracalnego łączenia się z tlenem wynika, że mioglobina jest magazynem tlenu. Pytanie, czy, jak i kiedy magazyn ten jest uruchamiany i wykorzystywany, zostało w zasadzie rozwiązane. Pięćdziesiąt lat temu Barcroft /1934/ sądził, że w mięśniach kurczących się rytmicznie /np. w sercu/ Mb może zaopatrywać tkanki w tlen podczas skurczu, kiedy perfuzja jest zmniejszona, a uzupełniać zapas tlenu podczas rozkurczu i zwiększonego przepływu. Podkreślał on jednak spekulatywny charakter tej hipotezy. Podobną koncepcję zaprezentowali później Astrand i wsp. /1960/. Autorzy ci stwierdzili, że podczas wysiłku mleczan w odpływie żylnym z mięśni pojawia się dopiero wtedy, gdy czas pracy mięśni przekracza 10 s. Sądzą oni, że jest to dowód na wykorzystywanie tkankowego zasobu tlenu do utrzymania tlenowego metabolizmu na początku wysiłku, kiedy mięśnie nie uruchamiają jeszcze glikolizy beztlenowej. Przyczyny tego mogą być jednak inne; m.in.



mięśnie dysponują pewnym zasobem związków wysokoenergetycznych /ATP, PCr/, który może być zużywany w pierwszej fazie wysiłku.

Znacznie bardziej przekonujące są wyniki uzyskane przez Millikana /1937/. Mierzył on spektrofotometrycznie zmiany utlenowania Mb w mięśniu szkieletowym kota *in situ*. Zakładał on, że przy niezaburzonej perfuzji mięśnia w spoczynku mioglobina jest w 100% utlenowana. Po okuzji tętnicy doprowadzającej krew do mięśnia wysycenie mioglobiny tlenem spadało w tempie  $1 \cdot s^{-1}$ . W stanie skurczu ciągłego /tetanus/ następował szybszy spadek utlenowania Mb trwający 20-25 s i nie osiągający zera. Okluzja tętnicy podczas skurczu powodowała spadek MbO<sub>2</sub> w tempie  $14\% \cdot s^{-1}$ . /Ponieważ fotometr Millikana był nieliniowy, dane te mają charakter orientacyjny i jakościowy/. Obserwacje te pozwoliły wnioskować, że główną rolą mioglobiny jest zapewnianie zapasu tlenu zużywanego podczas gwałtownych zmian zapotrzebowania metabolicznego lub perfuzji.

Następne badania tego typu wykonane zostały na sercach lub skrawkach mięśni sercowych zwierząt zimnokrwistych /Ramirez, 1959/ i królików /Fabel, 1968; Fabel i Lubbers, 1965/. Celem uzyskania ilościowej oceny utlenowania Mb i uniknięcia interferencji widma absorpcyjnego hemoglobiny mięśnie były perfundowane roztworami krystaloidów. Wyniki nie wniosły jakościowo nowych informacji, poza ustaleniem czasu reakcji odtlenowywania mioglobiny. Zmiany MbO<sub>2</sub> w kurczącym się rytmicznie mięśniu związane są z cyklem pracy mięśniowej. Jeżeli częstość skurczów nie przekracza  $10 \text{ min}^{-1}$  /w sercach zwierząt



zimmokrwistych/, zmiany  $\text{MbO}_2$  w cyklu pracy mięśnia są wyraźnie widoczne. Przy wyższej częstotliwości skurczów amplituda zmian  $\text{MbO}_2$  ulega stłumieniu i osiągnięty zostaje nowy, stały, niski poziom utlenowania mioglobiny. Stwierdzono również, że w stanach nieustalonych dynamika zmian utlenienia cytochromów  $\text{aa}_3$  /Lubbers i Fabel, 1964; Wittenberg, 1970/, oraz fluorescencji nukleotydów pirydynowych /Chance i wsp., 1965/ jest podobna lub identyczna jak dynamika zmian  $\text{MbO}_2$ . Odpowiada jej również dynamika zmian tkankowego  $\text{PO}_2$  mierzonego mikroelektrodami /Fabel, 1968/.

Można więc sądzić, że w sercach kręgowców stałocięplnych i w innych mięśniach kurczących się rytmicznie z częstością  $\geq 10 \text{ min}^{-1}$  mioglobina nie odgrywa roli oscylującego magazynu tlenu, jak proponował Barcroft /1934/. Niższy od całkowitego stopień utlenowania Mb w pracującym mięśniu może natomiast świadczyć o istnieniu gradientu utlenowania mioglobiny w tkance, analogicznego do gradientu  $\text{PO}_2$  /Wittenberg, 1970/.

Pod koniec lat pięćdziesiątych niezależnie od siebie Wittenberg /1959/ i Schollander /1960/ zaproponowali hipotezę ułatwionej dyfuzji tlenu w erytrocytach i w tkankach mięśniowych. W obu przypadkach czynnikiem ułatwiającym dyfuzję tlenu miałyby być obecność białek hemowych, hemoglobiny lub mioglobiny. Fundamentem tej hipotezy jest założenie, że białka łączące się odwracalnie z tlenem posiadają wewnątrz komórek /erytrocytów i miocytów/ zdolność swobodnej dyfuzji pomiędzy powierzchnią komórki a jej wnętrzem. Dzięki temu strumień tlenu dyfundujący przez środowisko komórkowe wzdłuż gradientu  $\text{P}_{\text{O}_2}$  jest sumą strumienia tlenu dyfundującego w postaci



fizycznie rozpuszczony w cytosolu cząsteczek  $O_2$  i strumienia tlenu przemieszczanego za pośrednictwem dyfundujących molekuł  $MbO_2$  lub  $HbO_2$ .

Występowanie zjawiska ułatwionej dyfuzji tlenu w roztworach Mb i Hb zostało doświadczalnie wykazane przez wielu autorów /Schollander, 1960; Hemmingsen i Schollander, 1960; Wittenberg, 1966; p. także Wittenberg, 1970/. Podobne zjawisko występuje dla CO w roztworach hemoglobiny /Mochizuki i Forster, 1962/, jest więc charakterystyczne dla ligandów wiążących się odwracalnie z grupą hemową. Godne podkreślenia jest, że gradient  $P_{O_2}$  nie jest czynnikiem warunkującym zjawisko ułatwionej dyfuzji tlenu w roztworach hemoprotein. Wykazał to Hemmingsen /1965/ posługując się tlenem-18 do wyznaczania tempa dyfuzji tlenu w roztworze mioglobiny o stałym  $P_{O_2}$ .

Zaproponowano liczne modele matematyczne zjawiska ułatwionej dyfuzji ligandów hemoprotein w ich roztworach. Wśród nich wymienić należy model ogólny Wymana /1966/, oraz szczególne rozwiązania /dla pewnych wybranych warunków/, zaproponowane m.in. przez Murray'a /1974/, Kreuzera i Hofda /1970/ i innych autorów /Fox i Landahl, 1965; Snell, 1965; Rubinow i Dembo, 1977/. Wszystkie te modele zakładają, że mechanizm ułatwionej dyfuzji polega na przypadkowych /brownowskich/ ruchach białkowego nośnika tlenu w roztworze. Natomiast dynamiczna równowaga między  $MbO_2$  a  $P_{O_2}$  jest zakładana tylko w niektórych modelach.

Wyniki badań modelowych sugerują, że jeżeli mioglobina w cytosolu komórek mięśniowych zachowuje się tak, jak przewiduje teoria /tzn. jest zdolna do przypadkowej, nieukierunkowanej,



Browna i skądiej dyfuzji/, to obecność Mb w mięśniach powinna w sposób istotny potęgować penetrację tlenu w głąb tkanek. Biorąc pod uwagę niską rozpuszczalność tlenu w roztworach wodnych, stężenie Mb w mięśniach rzędu  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  /Biorck, 1949; Lawrie, 1950/ może być 15 razy większe niż stężenie fizycznie rozpuszczonego  $\text{O}_2$  /dla  $37^\circ\text{C}$  i  $P_{\text{O}_2} = 20 \text{ mmHg}$  jest ono  $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ /. Natomiast ruchliwość dyfuzyjna tlenu rozpuszczonego w wodzie jest tylko 20 razy większa, niż ruchliwość dyfuzyjna Mb w roztworze /Moll, 1968; Riveros-Moreno i Wittenberg, 1972/. Prowadzi to do wniosku, że ułatwiona dyfuzja tlenu przez mioglobinę może teoretycznie zwiększyć tempo jego dyfuzji prawie dwukrotnie /Wittenberg, 1970/. Przed przyjęciem tej teorii warto jednak odnotować następujące spostrzeżenia.

Po pierwsze, fundamentalne założenie teorii ułatwionego transportu tlenu przez mioglobinę głoszące, że cytosol mięśniowy jest roztworem zdolnych do swobodnego przemieszczania się ruchami Browna cząsteczek Mb wydaje się wątpliwe. Metody histochemiczne lokalizacji mioglobiny w komórkach nie przyniosły w tym zakresie jednoznacznych rozstrzygnięć. James /1968/ oraz Morita i wsp. /1969/, używając reakcji benzydyna- $\text{H}_2\text{O}_2$  stwierdzili równomierną dystrybucję Mb w cytosolu. Natomiast Goldfisher /1967/ używając reakcji dwuaminobenzydyna- $\text{H}_2\text{O}_2$ , oraz Kagen i Gurevich /1968/ używając fluoryzujących przeciwciał do wizualizacji Mb wykazali, że mioglobina może być związana z miozyną. Wiadomo natomiast bez wątpliwości, że wewnątrz miocytów jest upakowane błonami. Taka cytoarchitektonika utrudniać musi swobodną dyfuzję Mb wewnątrz



komórek. Z tej racji Fletcher /1980/ zwrócił uwagę, że ułatwienie dyfuzji tlenu przez mioglobinę może odgrywać rolę nie w całej komórce, lecz tylko w bezpośrednim otoczeniu mitochondriów. Jednakże Jones i Kennedy /1982/ stwierdzili, że inaktywacja Mb nie wpływa na gradient tlenu generowany w izolowanych miocytach przez pracujące mitochondria, co przemawia przeciwko jakiegokolwiek roli Mb w transporcie tlenu do mitochondriów.

Po drugie, w wielu pracach starano się udowodnić istnienie ułatwionego transportu tlenu w warunkach fizjologicznych. I w tym zakresie wyniki nie są jednoznaczne i konkluzywne. Cole i wsp. /1982/ stwierdzili, że w systemie złożonym z izolowanych mitochondriów mięśniowych i oczyszczonej mioglobiny, Mb zwiększa pobieranie tlenu na granicy faz, natomiast nie wpływa bezpośrednio na transport tlenu w mikroskopowym sąsiedztwie mitochondriów. Wittenberg i wsp. /1975/ stwierdzili, że w skrawkach mięśniowych perfundowanych in vitro inaktywacja mioglobiny przy pomocy czterech różnych substancji /azotynu, fenyldydrazyny, 2-hydroksyetyldydrazyny i hydroksylaminy/ nie zmienia konsumpcji tlenu w warunkach normoksji, kiedy jego transport za pośrednictwem procesu zwykłej /fickowskiej/ dyfuzji molekuł fizycznie rozpuszczonych w cytosolu jest zapewne wystarczający w stosunku do zapotrzebowania. W hipoksji, uzyskanej przez obniżenie  $P_{O_2}$  perfuzatu, inaktywacja mioglobiny zmniejszała konsumpcję tlenu przez skrawki mięśniowe.

Przeprowadzenie tego typu eksperymentów in vivo jest utrudnione przez fakt, że substancje inaktywujące mioglobinę



pozbawiają jednocześnie hemoglobin zdolności przenoszenia tlenu. Aby ominąć tę trudność przeprowadzano badania na preparatach mięśniowych perfundowanych fluorokarbonami posiadającymi zdolność przenoszenia tlenu w stężeniach podobnych do przenoszonych przez hemoglobinę. W dwóch pracach uzyskano odmienne wyniki. Col /1982/, badając mięsień szkieletowy stwierdził, że obecność natywnego mioglobiny zwiększa zużycie tlenu i siłę skurczu podczas wysiłku wywołanego drażnieniem elektrycznym. Natomiast Cole i wsp. /1978/, badając perfundowany fluorokarbonami mięsień sercowy nie stwierdzili różnic w konsumpcji tlenu przed i po inaktywacji mioglobiny, zarówno w normoksji, jak w hipoksji.

Próby wykazania, że mioglobina ułatwia dyfuzję tlenu w nienaruszonych miocytach podjęli również De Konig i wsp. /19 Autorzy ci badali kinetykę dyfuzji tlenu przez cienki skrawek oddychającego mięśnia, umieszczony w mikro-komorze dyfuzyjnej tak, że z jednej strony jest on w kontakcie z azotem, a z drugiej - z tlenem. Porównywali oni tempo dyfuzji tlenu przez skrawek przed i po zablokowaniu mioglobiny przy pomocy tlenku węgla. Uzyskane wyniki interpretują oni jako potwierdzenie zachodzenia w miocytach dyfuzji tlenu ułatwianej przez Mb. Jednakże krytyczna analiza tych rezultatów /Gross i Grieb, dane nieopublikowane/ wykazała, że obserwowane rzekomo efekty ułatwionej dyfuzji mieszczą się w zakresie błędów metod pomiarowych.

Biorąc pod uwagę przytoczone powyżej wyniki stwierdzić można, że rola mioglobiny w ułatwianiu dyfuzji tlenu z krwi do mitochondriów w warunkach *in vivo* nie jest bynajmniej



udowodniona. Nie znaczy to jednak, że brak spodziewanej różnicy średnich czasów tranzytu wskaźnika tlenowego i chromowego dowodzi, że mioglobina nie odgrywa roli w transporcie tlenu, lub że tlen z nią związany jest istotnie dyfuzyjnie inertny. Wyprowadzenie takiego wniosku wymagałoby wykazania, że obserwowane zjawiska nie wynikają np. z uogólnionych /fizjologicznych lub patologicznych/ zaburzeń lub utrudnień dyfuzji substancji gazowych pomiędzy krwią a tkankami w badanych preparatach. Innymi słowy, należało odpowiedzieć na pytanie, czy inne "swobodnie dyfundujące" substancje /w szczególności gazowe/ zachowują się zgodnie z przewidywaniami, odstępstwo zaś dotyczy tylko tlenu, który jest związany z mioglobina.

### 5.3.3. Mięśniowe krzywe rozcieńczania wskaźników jako odbicie heterogenności ukrwienia tkanek

Na pierwszy rzut oka widać, że swobodnie dyfundujące wskaźniki metaboliczne inertne, acetylen i trytowana woda, zachowują się również wbrew przewidywaniom. Współczynnik rozdziału tkanka/krew dla substancji tego typu wynosi około 1 co oznacza, że w ich przypadku  $\Delta \bar{t}$  powinna wynosić ok. 20 razy więcej, niż przewidywana  $\Delta \bar{t}$  dla tlenu-18, a więc ponad 7,5 min. Tymczasem maksymalna wartość  $\Delta \bar{t}$  wynosi ok. 2 min a średnio ok. 45 s. Mamy więc również do czynienia z różnicą rzędu wielkości. Wynik ten sugeruje istnienie uogólnionego utrudnienia dyfuzji substancji "swobodnie dyfundujących" w badanych preparatach.

Ten z pozoru oczywisty wniosek jest jednak trudny do pogodzenia z obserwowanymi kształtami krzywych ekstrakcji zarówno



tlenu-18, jak wskaźników inertnych. Fakt, że ekstrakcja początkowa jest najwyższa, a następnie spada w czasie wzdłuż impulsu wskaźników, nie pozwala wyjaśnić rzekomych utrudnień dyfuzji pomiędzy krwią a tkankami przy pomocy żadnego z trzech znanych mechanizmów, które mogłyby być za nie odpowiedzialne.

Po pierwsze możemy wykluczyć istotny przeciek dyfuzyjny. /Przeciek dyfuzyjny można interpretować jako zaburzenie dyfuzji, ponieważ część substancji omija tkankę, a więc równowaga dyfuzyjna nie zachodzi/. Zachodzenie takiego zjawiska, w wyniku którego wypadkowy średni czas tranzytu byłby krótszy od przewidywanego, prowadziłoby do pojawiania się profili wskaźników dobrze dyfundujących z wyprzedzeniem w stosunku do profilu wskaźnika wewnątrznaczyniowego. Zjawisko takie obserwowali dla  $^{18}\text{O}_2$  w krążeniu nerkowym Chinard i wsp. /1967/. W żadnym z obecnych doświadczeń zjawisko takie nie wystąpiło.

Po drugie, możemy również wykluczyć istotny stopień "prawdziwego" przecieku tętniczo-żylnego, zachodzącego za pośrednictwem zespołań tętniczo-żylnych. /Z przyczyn podobnych do omówionych powyżej przeciek anatomiczny również można traktować jako utrudnienie dyfuzji/. Możemy bezpiecznie założyć, że tranzyt krwi przez zespolenia tętniczo-żylna byłby szybszy, niż przez włosniczki odżywiającej tkankę. Wystąpienie przecieku anatomicznego manifestowałoby się poprzez obecność /na początku krzywych/ równoczesowych pików wszystkich wskaźników. Takiego zjawiska również nie obserwowano; w przeważającej większości doświadczeń ekstrakcja początkowa wskaźników dyfundujących jest najwyższa, a następnie spada w czasie.



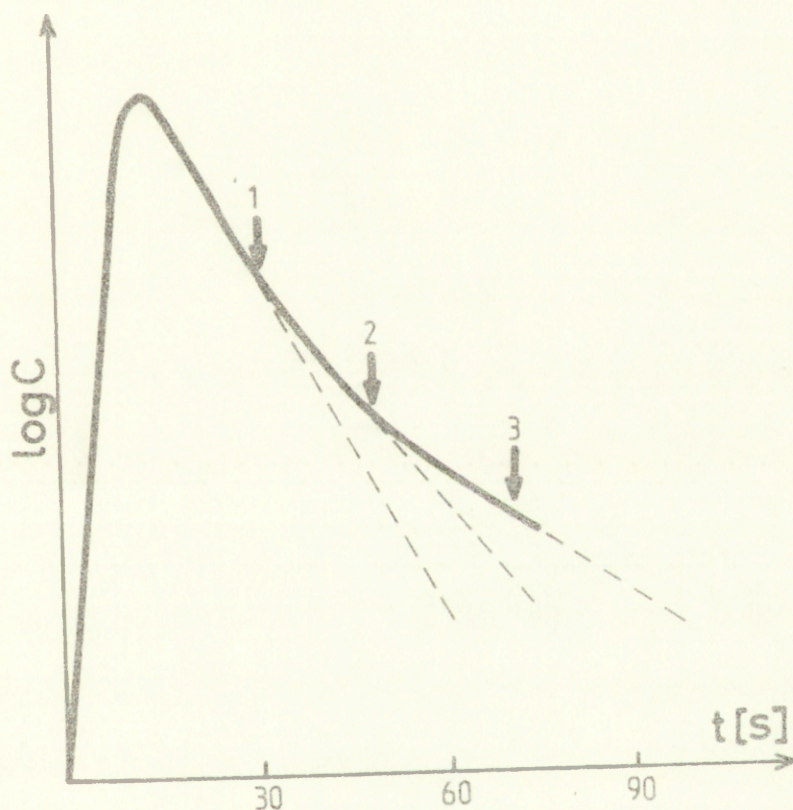
Po trzecie, założenie istnienia bariery dyfuzyjnej również nie znajduje potwierdzenia w wynikach. Zagadnienie kształtów krzywych ekstrakcji w przypadku istnienia bariery dyfuzyjnej zostało omówione poprzednio /p. str. 44/. W takim przypadku krzywa ekstrakcji powinna rozpoczynać się od plateau. Obecność plateau obserwowano tylko wtedy, gdy tętniczo-żylna różnica  $[O_2]$  była na tyle duża, że dyskwalifikowała badany preparat /p. dośw. nr 33/.

Poszukując wyjaśnienia obserwowanej dyskrepancji pomiędzy wynikami związanymi z analizą krzywych ekstrakcji a wynikami związanymi z integracją i ekstrapolacją krzywych rozcieńczenia zaczęliśmy poszukiwać ewentualnej przyczyny /błędu systematycznego/, która powodowałaby nieporównywalność jednych i drugich wyników. Warunkiem poprawności analizy krzywych ekstrakcji jest poprawna normalizacja krzywych, a ta procedura nie wzbudzała istotnych wątpliwości. Natomiast obliczenia średnich czasów tranzytu i pól pod krzywymi rozcieńczenia nie zależą od dokładności normalizacji krzywych, lecz jedynie od poprawności ekstrapolacji ich przebiegu do czasu nieskończoności. Istotnym krokiem w kierunku wyjaśnienia problemu było krytyczne rozpatrzenie stosowanej metody ekstrapolacji krzywych. Doprowadziło to najpierw do wyjaśnienia korelacji obserwowanej pomiędzy średnimi czasami tranzytu a czasami próbkowania. Zagadnienie to wyjaśnia ryc. 5.10. Zstępujące ramiona krzywych rozcieńczenia wskaźników nie mają charakteru monoeksponencjalnego, lecz najwidoczniej multieksponecjonalny. Ponieważ ekstrapolowano ostatni odcinek krzywej, to im dłuższe były czasy próbkowania, a co za tym idzie, czas rejestracji



krzywej, tym wyższe wartości przyjmowały obliczone średnie czasy tranzytu.

Obserwacja ta wyjaśnia jednocześnie powtarzalną różnicę pomiędzy estymatorem perfuzji uzyskanym przy pomocy metody Henriquesa-Hamiltona, a rzeczywistym tempem perfuzji badanego preparatu.



Ryc. 5.10. Zależność nachylenia ekstrapolowanego odcinka krzywej od czasu próbkowania. Przy czasach próbkowania  $< 1$  s,  $\sim 1,5$  s i  $> 2$  s rejestracja krzywej kończy się po  $\sim 35$  s /punkt 1/,  $\sim 52$  s /punkt 2/ i po  $\sim 70$  s /punkt 3/.



Ponieważ ciśnienie perfuzyjne było zawsze nieco wyższe, niż ciśnienie obwodowe zwierzęcia, estymat "perfuzyjny" możemy uznać za odzwierciedlenie rzeczywistego tempa perfuzji /krew nie mogła dopływać do badanego preparatu innymi wejściami tętnicznymi "pod prąd" gradientu ciśnienia/. Natomiast estymat uzyskany metodą integracji krzywej rozcieńczenia chromowanych erytrocytów jest wyższy, bowiem wartość liczbowa całki mianownika wzoru [2.2.] jest niższy od całkowitego pola pod krzywą /zastosowana metoda integracji całego pola pod krzywą nie podaje/.

Multieksponencjalny charakter krzywych rozcieńczenia wskaźnika wewnątrznaczyniowego świadczyć może o heterogenności włósniczkowych czasów tranzytu krwi, i to o heterogenności o charakterze nieciągłym. Wskazywałby on na istnienie w tkankach co najmniej dwóch populacji włósniczek, z których jedna ma krótkie, a druga bardzo długie czasy tranzytu. W sumie tworzyłyby one bimodalny /lub multimodalny/ rozkład czasów tranzytu.

Dostrzeżenie tego faktu nasuwa dwa pytania: po pierwsze, czy tkankowa heterogenność włósniczkowa jest do pogodzenia z obserwowanymi kształtami krzywych ekstrakcji; po drugie, czy zjawiska świadczące o takiej heterogenności były obserwowane przez innych autorów, czy mają więc charakter powtarzalny i fizjologiczny.

Zagadnienie wpływu heterogenności włósniczkowych czasów tranzytu na kształt krzywych rozcieńczenia wskaźników dyfundujących dyskutowane było poprzednio przy okazji interpretacji mózgowych krzywych ekstrakcji tlenu-18. W teorii



rozcieńczania wskaźników przyjmuje się, że heterogene o  
właściwościach czasów tranzytu pociąga za sobą wzrost war-  
tości ekstrakcji w początkowym przebiegu krzywych rozcień-  
czenia /p. str. / . Dzieje się tak jednak tylko wtedy, gdy  
eterogenność czasów tranzytu występuje jednocześnie z barierą  
dyfuzyjną. Jak wyglądają krzywe ekstrakcji wówczas, gdy hete-  
rogenność w ośmi zkowych czasów tranzytu współistnieje z  
brakiem bariery dyfuzyjnej?

mózgu bez wątpienia występuje heterogenność właściwko-  
wych czasów tranzytu, a jednocześnie krzywe ekstrakcji  
tlenu-18 rozpoczynają się od wysokich wartości i spadają mono-  
tonicznie w czasie. Tak więc eterogenność tkankowa jest  
możliwa do pogodzenia z wysokimi początkowymi wartościami  
ekstrakcji .

Drugie zagadnienie, fizjologicznego występowania hetero-  
genności właściwościach czasów tranzytu w krążeniu ko czyn i  
jej specyficznego charakteru, może być rozpatrywane poprzez  
analizę krzywych rozcieńczania wskaźników, uzyskanych przez  
innych autorów. Rysujący się obraz nie jest tu jednoznaczny.  
Z jednej strony przyjmuje się, za Hamiltonem i wsp. /1928/, że  
zstępujące ramiona krzywych rozcieńczenia wskaźników wewnątrz-  
naczyniowych mają generalnie charakter wykładniczy. Stwierdze-  
nie to jest uogólnieniem obserwacji doświadczalnych, które  
niekoniecznie mogą być uznane za niepodważalne, z następują-  
cych przyczyn. Po pierwsze, dowolna suma krzywych wykładni-  
czych przypomina na początku swojego przebiegu krzywą wykład-  
niczą, chociaż nią nie jest. Po drugie, dewiacja od wykładni-  
czego charakteru krzywej rozcieńczenia w przypadku wskaźnika

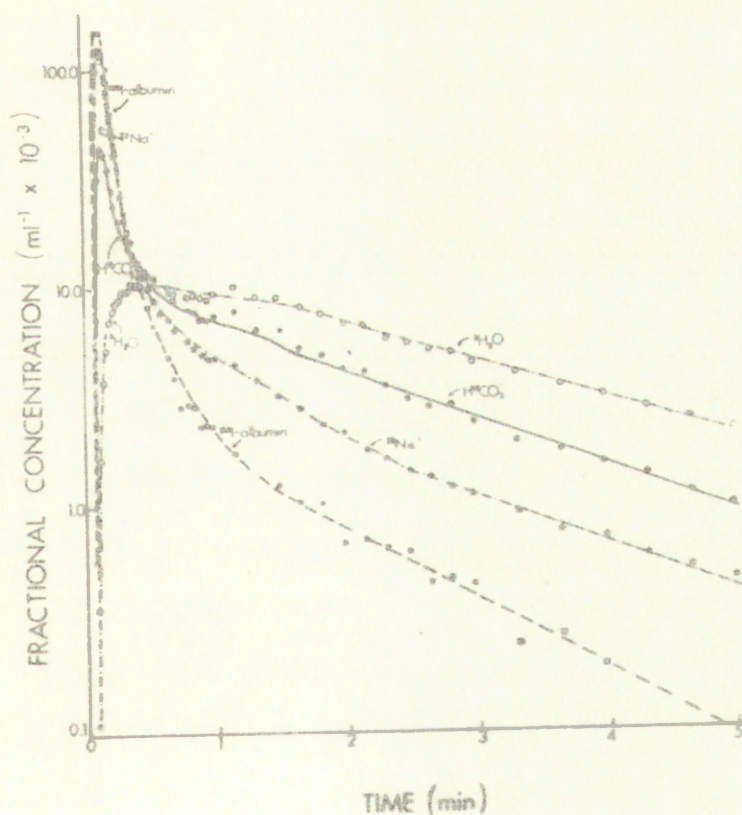


wewnątrznaczyniowego byłaby albo zniekształcona, albo wręcz interpretowana jako artefakt recyrkulacji wskaźnika. Po trzecie, nie ma teoretycznego uzasadnienia, że rozkład czasów tranzytu krwi przez włosniczki ma być właśnie taki, aby krzywe rozcieńczenia wskaźników wewnątrznaczyniowych musiały mieć monoeksponencjalne ramiona zstępujące. Rozkład taki byłby tylko pewnym szczególnym, możliwym, ale nie koniecznym przypadkiem. Zapewne taki właśnie szczególny przypadek rozkładu czasów tranzytu zachodzi w krążeniu mózgowym. Obecne wyniki nasuwały podejrzenie, że rozkład ten w krążeniu preparatu kończyny może mieć zupełnie odmienny charakter.

W istocie trudno było znaleźć w literaturze dane świadczące przeciwko "regule" Hamiltona o monoeksponencjalnym charakterze zstępujących ramion krzywych rozcieńczenia wskaźników wewnątrznaczyniowych. Wyjątkową w tym zakresie okazała się praca Effrosa i Weissmana /1979/. Autorzy ci opublikowali wynik doświadczenia przeprowadzonego techniką "pojedyncze wstrzyknięcie - detekcja wskaźników w odpływie" na preparacie perfundowanej krystaloidami kończyny tylnej kota. Użyty przez nich model doświadczalny umożliwił bardzo długi czas rejestracji krzywej z uniknięciem artefaktu recyrkulacji. Wynik jest dość zaskakujący /ryc. 5.11./. Po pierwsze wyraźnie zaznacza się bieksponencjalny charakter zstępujących gałęzi krzywych. Po drugie, szybka i wolna składowa krzywych występuje niewątpliwie w przypadku trzech różnych wskaźników: jodowanej albuminy /RISA/,  $\text{Na}^+$  i  $\text{HCO}_3^-$ . W badanym układzie przestrzeń dystrybucji każdego z tych wskaźników jest niewielka. Po trzecie, różnica nachyleń szybkiej i wolnej



składowej omawianych krzywych jest bardzo znaczna. Wartości  $t_{1/2}$  dla RISA wynoszą, odpowiednio,  $\frac{1}{4}$  s i prawie 1 min. Różnica jest więc prawie piętnastokrotna. Wolny składnik krzywej staje się widoczny przy stężeniu wskaźnika poniżej 5% stężenia maksymalnego na szczycie krzywej. Niemniej w wyniku wielokrotnej różnicy w nachyleniu pole pod wolną składową krzywej, ekstrapolowane do czasu nieskończoności, wynosi około 30% całkowitego pola pod krzywą. /Przypomnieć można, że pole pod krzywą rozcieńczenia jest proporcjonalne do masy wskaźnika opuszczającego tkankę/.



Ryc. 5.11. Krzywe rozcieńczenia wskaźników w kończynie tylnej psa /reprodukowane z pracy Effros i Weissman, 1979/.



Kolejną zaskakującą cechą wyników Buffrosa i Weissmana /1979/ jest charakter rejestrowanej przez nich jednocześnie krzywej rozcieńczenia THO. Krzywa ta nie wykazuje co prawda charakteru bieksponencjalnego, ale jej  $t_{1/2}$  wynosi tylko 3 min, a więc jedynie trzykrotnie więcej, niż  $t_{1/2}$  wolnej składowej krzywej RISA, wskaźnika wewnątrznaczyniowego. Biorąc pod uwagę, że  $\lambda$  dla wody wynosi około 1, dochodzimy do wniosku, że znakowana woda pozostaje w równowadze dyfuzyjnej z bardzo małym fragmentem przestrzeni tkankowej. Alternatywą jest, że rejestrowany fragment krzywej rozcieńczenia THO odpowiada szybkiej składowej krzywej RISA, a w dalszym przebiegu krzywa THO nabrałaby również bieksponencjalnego charakteru.

Dane innych autorów potwierdzają takie właśnie przypuszczenie. Rejestrowane w dłuższych odcinkach czasu mięśniowe krzywe kliransu inertnych dobrze dyfundujących wskaźników, w tym wody, mają charakter multieksponencjalny, wykazując dwa lub trzy składniki o różnych nachyleniach /Auckland i Leraand, 1960; Piiper i Meyer, w druku; Sparks i Mohrman, 1977; Tonnesen i Sejrnsen, 1967/. Zjawisko to interpretowane było jako wynik przecieku dyfuzyjnego /Auckland i Leraand, 1960/, żylna-tętnicznej dyfuzji przeciwprądowej /Piiper i Meyer, w druku/, lub heterogenności przepływu.

Występowanie w tkankach mięśniowych bardzo dużej heterogenności tkankowej potwierdzone zostało również innymi metodami. Między innymi Renkin i wsp. /1981/ wykonali doświadczenia, w których wstrzykiwali do wejścia tętniczego kończyny tylnej królików /czyli do tętnicy udowej/ impulsy tuszu o różnym czasie trwania. Tusz jest zawiesiną cząstek, które



nie przechodzą przez ściany włóściwek, i z tego względu jest stosowany jako histologiczny marker przestrzeni wewnątrz-naczyniowej w tkankach. Autorzy ci stwierdzili, że frakcja sieci włóściwek kończyny, która wypełniała się tuszem, wzrastała wraz z czasem trwania infuzji wskaźnika. Gdy infuzja trwała 3,5 s, jedynie 12 do 19% włóściwek wypełniało się tuszem, podczas gdy po infuzji trwającej 60 do 90 s stopień wypełnienia sieci włóściwek wskaźnikiem wzrastał do 58-80%. Wyniki te mogą być interpretowane jako konsekwencja zróżnicowanych włóściwych czasów tranzytu, sięgających od mniej niż 3 s do ponad 30 s. Analiza wykonana przez Renkina i wsp. /1981/ wykazuje ponadto, że tak duże zróżnicowanie czasów tranzytu nie może być wyjaśnione samym tylko rozkładem długości włóściwek; musi ono więc wynikać również ze zróżnicowanej szybkości przepływu krwi przez włóściwki.

Podobne dane uzyskali Honig i Gayeski /1982/. Obliczyli oni, że w mięśniu smukłym /m. gracilis/ psa średnia szybkość przepływu erytrocytów przez sieć włóściwą wynosi jedynie około  $0,05 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ , co koresponduje ze średnim czasem tranzytu 30 s. Ponieważ rozkład włóściwych czasów tranzytu jest asymetryczny, z maksimum przesuniętym w kierunku krótszych czasów /Honig i wsp., 1977; Honig i Odoroff, 1981/, uzyskany wynik oznaczałby, że czasy tranzytu krwi przez niektóre fragmenty mięśniowej sieci włóściwej mogą być zaskakująco długie, rzędu kilku minut. Tak długie czasy tranzytu musiałyby zapewne doprowadzać do 100% ekstrakcji tlenu w niektórych włóściwkach. Wynik ten Honig i Gayeski /1982/ uznali za nieprawdopodobny, a przeto błędny.



Istotnie, zjawisko takie jest trudne do wyjaśnienia, jeśli posługujemy się klasycznym paradygmatem fizjologii, każącym nam myśleć, że "erytrocyty nie parkują we włosniczkach".

Weźmy jednak pod uwagę inne właściwości mięśniowej sieci włosniczkowej. Wiadomo, że mięśnie są zdolne zwiększać spoczynkowe zużycie tlenu około stukrotnie. Z tego względu mięśniowa sieć włosniczkowa musi być zdolna do dostarczania, zależnie od potrzeb, zarówno niewielkich, jak i bardzo dużych ilości tlenu. Jest możliwe, że podczas intensywnego wysiłku wszystkie włosniczki są perfundowane krwią w sposób ciągły. W spoczynku jednakże niewielka jedynie część sieci włosniczkowej może być otwarta. Doświadczalnie stwierdzono, że procent ten może nie przekraczać 20 /LaLone i Johnson, 1979/, a nawet 10 /Honig i wsp., 1970; Mc Donagh i wsp., 1982/.

Obserwacja, że w danym momencie w mięśniach otwarte dla przepływu krwi jest 10-20% sieci włosniczkowej, ma charakter statyczny, "migawkowy". W istocie nie mamy żadnego powodu, aby założyć, że przez cały czas ten sam fragment sieci włosniczkowej jest otwarty, podczas gdy reszta sieci jest ciągle zamknięta. Przeciwnie, znacznie bardziej prawdopodobne jest, że w badanym preparacie następuje "gra naczyniowa", polegająca na cyklicznym kurczeniu się i rozkurczaniu mięśni zwieraczy prekapilar /naczyń oporowych/. Jeżeli równocześnie otwarte jest 10% włosniczek, a średni czas otwarcia wynosi np. 5 s, to średni czas, w którym pozostają one zamknięte, może wynosić ponad minutę. Zjawisko takie, pociągające za sobą sekwencyjne włączanie i wyłączenie perfuzji w poszczególnych segmentach sieci określane jest terminem "capillary



intermittency".

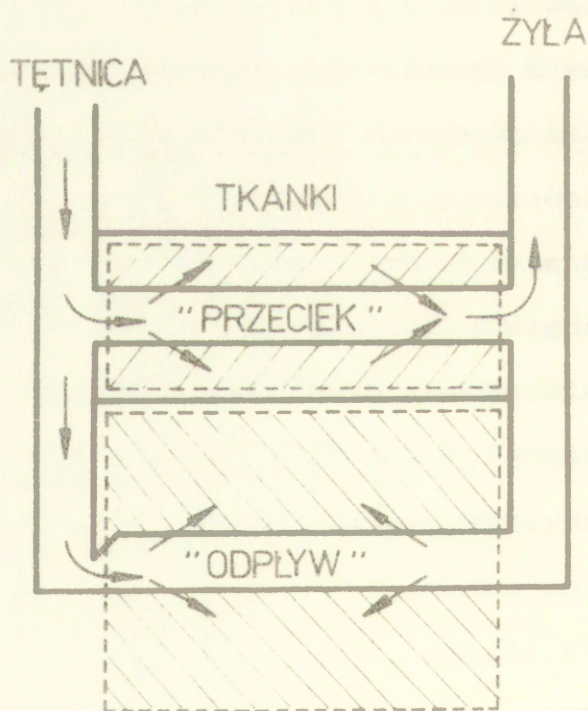
Założenie istnienia "capillary intermittency" o opisanym powyżej charakterze nasuwa hipotezę wyjaśniającą w sposób kompleksowy /i na obecnym etapie - jakościowy/ wyniki uzyskane metodą rozcieńczania tlenu-18. Hipoteza ta jest w pewnym stopniu podobna do hipotezy wysuniętej przez Renkina /1971/ w celu wyjaśnienia multieksponencjalnego charakteru procesów równoważenia się substancji wskaźnikowych o różnej zdolności przechodzenia przez ściany włośniczek pomiędzy krwią a tkankami w preparatach kończyn podobnych do tych, które stanowiły obiekt obecnych badań.

Hipoteza Renkina znana jest jako "Nutritional-Shunt-Flow". Zgodnie z tą koncepcją w preparacie kończyny z usuniętymi powłokami skórnymi funkcjonują równolegle dwa szlaki krążeniowe, oba zlokalizowane w tkankach mięśniowych. Szlaki te są złożone z włośniczek o podobnych przepuszczalnościach, lecz różniących się wyraźnie stosunkiem tempa przepływu krwi do masy odżywianych przez nie tkanek. Ze względu na podobieństwo do hipotezy Renkina, proponowana obecnie hipoteza nazwana została "Nutritional Shunt-Sink" /Grieb i wsp., w druku/, co w przekładzie na język polski brzmi "Odżywczy Przeciek-Odpływ".



5.3.4. Model "Przeciek-Odplyw" środowiska tlenowego tkanek mięśniowych w spoczynku. Interpretacja krzywych rozcieńczenia znakowanego tlenu.

Założmy, że w badanym preparacie kończyny w danym czasie otwarte jest dla przepływu 10-20% sieci włośniczkowej, oraz że następuje w nim gra naczyniowa polegająca na cyklicznym kurczeniu się i rozkurczaniu mięśni zwieraczy przedwłośniczkowych. Podany dotętnniczo impuls wskaźników wchodząc do tkanek rozdziela się pomiędzy dwa szlaki /ryc. 5.12/.



Ryc. 5.12. Model "Przeciek-Odplyw" krążenia mięśniowego. Objaśnienie w tekście.



Jeden z nich, szybki - "przeciek" /shunt/ wie dzie tą częścią sieci, która pozostaje otwarta co najmniej tak długo, ile wynosi czas tranzytu krwi. Drugi z nich, wolny - "odpływ" /sink/ wie dzie tą częścią sieci, w której przepływ krwi zatrzymuje się w wyniku następującego w trakcie tranzytu impulsu skurczu zwieraczy przedwłośniczkowych. Oba szlaki, "przeciek" i "odpływ", wiodą przez włóściczki, które mogą wymieniać substancje, w tym tlen, z tkankami, przy czym przepuszczalność włóściczek obu szlaków jest identyczna. Dzieje się tak dlatego, że w momencie podawania impulsu wskaźników rozdział sieci włóściczkowej na dwa szlaki krążeniowe ma charakter przypadkowy.

Różnica pomiędzy "szybkim" i wolnym" szlakiem krążeniowym polega na tym, że - w związku z ograniczonym tempem dyfuzji w tkankach - substancje /w szczególności swobodnie dyfundujące i gazowe/ zawarte w krwi płynącej szlakiem "szybkim" równoważą się z niewielką jedynie masą tkanki w otoczeniu włóściczek. Natomiast substancje zawarte w krwi wchodzącej do wolnego szlaku krążeniowego, który jest czymś w rodzaju "pułapki" tkankowej, dyfundują do większej masy tkankowej. Tak więc oba szlaki różnią się jedynie /podobnie jak w hipotezie Renkina/ stosunkiem perfuzji do masy tkanki, z którą równoważą się wskaźniki.

Na poziomie całego narządu procesy przepływu krwi przez włóściczki wolnego i szybkiego szlaku mają charakter stochastyczny. W dowolnie wybranym momencie, np. w chwili podawania impulsu wskaźników, włóściczki tkankowe lub poszczególne segmenty sieci włóściczkowej znajdują się w różnych fazach



cyklu "otwarcie-zamknięcie", jak również cykle te mają zapewne różne czasy trwania. Niemniej, statystycznie rzecz biorąc, frakcja  $f$  masy podanych wskaźników wchodzi do tych segmentów sieci, które pozostają otwarte dla przepływu przez czas nie krótszy, niż czas tranzytu impulsu wskaźników. Pozostała frakcja  $/1-f/$  wchodzi do tych segmentów sieci, w których przepływ krwi przez włósczki zatrzymuje się w trakcie tranzytu impulsów. Konsekwencje tego są następujące:

1. Żylny profil wskaźnika wewnątrznaczyniowego /w obecnych doświadczeniach  $^{51}\text{Cr-rbc}/$  jest kombinacją dwóch rozkładów. Jeden z nich, kształtowany przez czasy tranzytu szybkiego kanału krążeniowego /"przeciek"/, skupiony jest dookoła wartości krótkich /kilku-kilkunastosekundowych/. Drugi rozkład jest wynikiem przebywania krwi w tkance przez znacznie dłuższe /minutowe/ czasy.
2. Żylne stężenie tlenu,  $[O_2]_v$ , jest średnią ważoną stężenia tlenu w krwi opuszczającej "szybki" i "wolny" szlak krążeniowy:

$$[O_2]_v = f \cdot [O_2]_f + (1-f) \cdot [O_2]_s \quad [5.9.]$$

/gdzie indeksy  $f$  i  $s$  oznaczają, odpowiednio, "przeciek" i "odpływ"/. W krańcowym przypadku  $[O_2]_f \cong [O_2]_a$ , natomiast  $[O_2]_s \rightarrow 0$ . W rzeczywistości "przeciek" ani "odpływ" nie są "zupełne". Krew opuszczająca szybki szlak krążeniowy posiada  $[O_2]$  nieco niższe od tętniczego, gdyż odżywiane przez nią tkanki zużywają tlen, oraz uzupełniają zapas tlenu w postaci  $\text{MbO}_2$ . Podobnie krew opuszczająca wolny szlak krążeniowy posiada zapewne  $[O_2]$  nieco wyższy od zera.



3. Natomiast zylny profil znakowanego tlenu, będący iloczynem stężenia tlenu nieznakowanego i chwilowej wartości frakcji  $^{18}\text{O}_2$  w krwi,  $\alpha(t)$ , można wyrazić również jako:

$$\begin{aligned} [^{18}\text{O}_2]_v(t) &= [\text{O}_2]_v \cdot \alpha_v(t) = \\ &= f \cdot [\text{O}_2]_f \cdot \alpha_f(t) + (1-f) \cdot [\text{O}_2]_s \cdot \alpha_s(t) \end{aligned} \quad [5.10.]$$

W początkowym odcinku krzywych możemy założyć, że  $\alpha_s(t) = 0$ , bowiem impuls znakowanej krwi nie zdążył jeszcze przejść przez najkrótsze segmenty wolnego szlaku. Wówczas:

$$[^{18}\text{O}_2]_v(t) = f \cdot [\text{O}_2]_f \cdot \alpha_f(t) \quad [5.11.]$$

Przyjmijmy dla uproszczenia, że  $[\text{O}_2]_f \rightarrow [\text{O}_2]_a$  i  $[\text{O}_2]_s \rightarrow 0$ .

Wtedy:

$$[\text{O}_2]_v \cdot \alpha_v(t) = f \cdot [\text{O}_2]_a \cdot \alpha_f(t) \quad [5.12.]$$

$$f = \frac{[\text{O}_2]_v}{[\text{O}_2]_a} \quad [5.13.]$$

$$[^{18}\text{O}_2]_v(t) = [\text{O}_2]_v \cdot \alpha_f(t) \quad [5.14.]$$

Jak już wspomniano powyżej, w rzeczywistości  $[\text{O}_2]_f < [\text{O}_2]_a$  i  $[\text{O}_2]_s > 0$ . Jednakże powyższy przykład wykazuje istotę procesu rozcieńczania profilu znakowanego tlenu opuszczającego szybki szlak krążeniowy przez krew o niskiej zawartości  $\text{O}_2$  dochodzący z wolnego szlaku krążeniowego. Proces ten zachodzi bez zmiany kształtu profilu  $^{18}\text{O}_2$ , natomiast obniża jego wysokość proporcjonalnie do stosunku  $[\text{O}_2]_v / [\text{O}_2]_a$ . Jednocześnie kształt profilu  $^{18}\text{O}_2$  warunkowany jest przez przebieg  $\alpha_f(t)$ . Przebieg ten nie jest zmieniany przez



metabolizm, natomiast duża nieznacznemu przesunięciu w wyniku rozcieńczenia znakowanego tlenu w puli tlenowej tej niewielkiej frakcji tkanek, które są odżywiane przez, i osiągają równowagę dyfuzyjną z krwią płynącą szybkim szlakiem krążeniowym.

Tak więc rejestrowane krzywe rozcieńczenia tlenu powstają w wyniku podwójnego rozcieńczenia tego wskaźnika. Wyjaśnia to, dlaczego mamy do czynienia z pozornie paradoksalną sytuacją: krzywe rozcieńczenia tlenu są w bardzo niewielkim stopniu przesunięte wobec krzywych odniesienia, ale biegną równoległe, oraz początkowa ekstrakcja  $^{18}\text{O}_2$  jest wysoka.

#### 5.3.5. Porównanie trzech modeli środowiska tlenowego tkanek mięśniowych

W chwili obecnej mamy więc trzy modele środowiska tlenowego tkanek mięśniowych. Zapewne ten z nich jest najbliższy prawdzie, który wyjaśnia najszerszy zakres obserwowanych doświadczalnie zjawisk.

Najstarszym i najsłynniejszym jest model Krogha /1919/, który został niedawno omówiony krytycznie przez Kreuzera /1982/. W celu analitycznego opisu transportu tlenu w tkance Krogh dokonał idealizacji realnej sytuacji, przyjmując następujące założenia:

1. Dyfuzja tlenu zachodzi jedynie radialnie, od włośniczki w głąb tkanki;
2. Stężenie tlenu w przekroju poprzecznym włośniczki jest homogenne, a deoksygenacja hemoglobiny jest natychmiastowa;



3. Kużycie tlenu w tkance jest procesem przebiegającym zgodnie z kinetyką zerowego rzędu /"wszystko albo nie"/;
4. Konsumpcja tlenu w tkance jest jednorodna;
5. Włośniczki tkankowe są proste, rozmieszczone homogenicznie, równoległe i perfundowane izotropowo;
6. Czasy tranzytu krwi przez włośniczki są jednakowe;
7. Ściany włośniczek nie stanowią bariery dla dyfuzji tlenu;
8. Perfuzja włośniczek jest jednakowa; ze względu na założenia 4, 5 i 6 oznacza to, że po stronie żyłnej  $[O_2]$  we wszystkich włośniczkach powinno być jednakowe;
9. Przepływ tlenu z tkanki do krwi jest cylindrycznie symetryczny;
10. Wymiana tlenu z tkanką zachodzi tylko poprzez ściany włośniczek, nie zaś przez ściany naczyń przed- i za-włośniczkowych /co wyklucza wymianę przeciwprądową/;
11. Tlen nie dyfunduje poza granicę rozpatrywanej cylindrycznej jednostki włośniczkowo-tkankowej;
12. Współczynnik dyfuzji tlenu jest homogeniczny w całej tkance;
13. Nie ma ułatwionej dyfuzji tlenu /np. przez mioglobinę/;
14. Środowisko tlenowe tkanki jest w stanie ustalonym;
15. W rozpatrywanym układzie nie występują zjawiska konwekcyjnego przenoszenia tlenu w tkance /tzn. poza włośniczkami/.

"Jest to imponująca lista założeń, zmuszająca do postawienia pytania, do jakiego stopnia obliczenia oparte na modelu Krogha mogą być uznane za znaczące i realistyczne" - pisze Kreuzer /1982/.

Wielu autorów analizowało wpływ poszczególnych założeń modelu Krogha na jego właściwości. Jest to ważne, gdyż



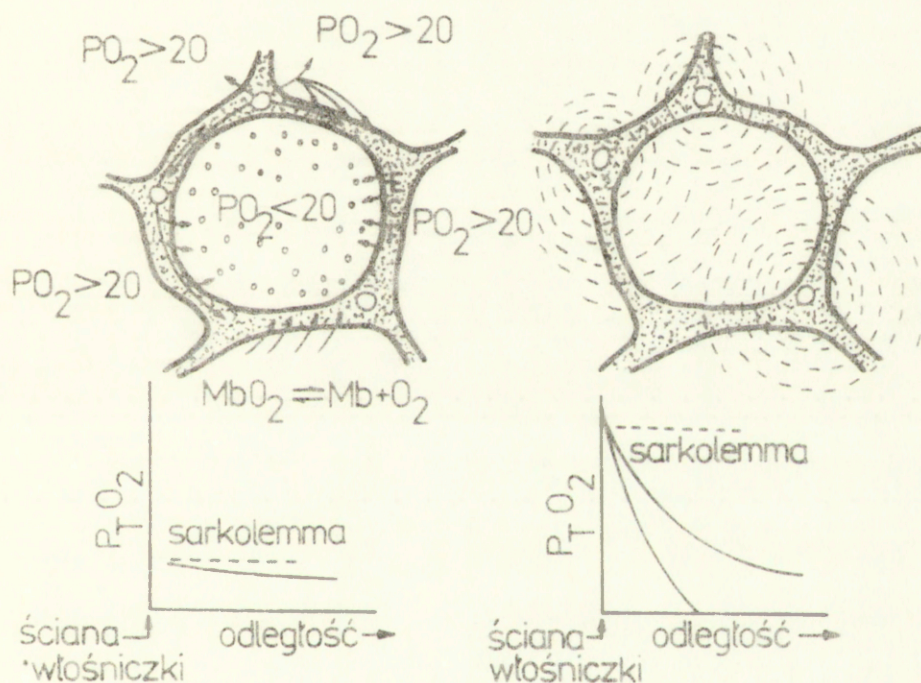
prawdziwość żadnego z nich nie jest bez wątpliwości dowiedziona, a wiele z nich /m.in. 1, 4, 5, 6, 8, 11, 12/ jest z całą pewnością niespełniane. Przegląd danych na ten temat prowadzi do wniosku, że efekty odstępstw od założeń Kroghowskich, badane z osobna i w ramach granic uznanych za "fizjologiczne", są zwykle bez większego znaczenia. Fletcher /1978/ stwierdził, że model Krogha może ciągle być najbardziej efektywnym podejściem do opisu właściwości środowiska tlenowego tkanek, ponieważ wpływy różnych czynników komplikujących go równoważą się wzajemnie.

Porównanie badań doświadczalnych i modelowych dotyczących krzywych rozcieńczenia tlenu-18 w krążeniu mózgowym potwierdza tę tezę. W badanym modelu uwzględniono wszystkie założenia Krogha, z wyjątkiem założenia 1. Mimo przyjęcia tak daleko idących idealizacji, własności modelu /w badanym zakresie/ były bardzo zbliżone do własności badanego naturalnego obiektu /p. rozdz. 4.3.4./.

Jest paradoksem, że model Krogha, opracowany dla tkanki mięśniowej, w tym właśnie zakresie wydaje się szczególnie mało realistyczny. Wśród mogących się rozbieżności pomiędzy przewidywaniami modelu Krogha a obserwacjami doświadczalnymi wymienić należy mikroskaningowe badania utlenowania mioglobiny w mrożonych in situ skrawkach mięśniowych /Gayeski i Honig, 1983/. Badania te wykazały, że wewnątrz miocytów pobranych z mięśnia podczas wysiłku utlenowanie mioglobiny jest homogenne, nie wykazując gradientu przewidywanego na podstawie modelu Krogha. Obserwacja ta koresponduje z bardzo niskim  $P_{O_2}$  rejestrowanym wewnątrz miocytów mikroelektrodami tlenowymi /Whalen, 1971/.



Obserwacje te stały się podstawą do sformułowania przez Honiga /manuskrypt autora/ modelu środowiska tlenowego mięśni fundamentalnie różniącego się od modelu Krogha. Skrótowo rzecz ujmując, koncepcja Honiga polega na "odwróceniu pojęć" /ryc. 5.13/.



Ryc. 5.13. Porównanie modelu Krogha i modelu Honiga.  
/Reprodukowane wg pracy Honiga i wsp.,  
manuskrypt autorów/.



O ile model Krogha można określić jako obraz przekroju poprzecznego tkanki zawierający "punktowe źródła i jednorodny odpływ" tlenu /point sources, uniform sink/, to zgodnie z modelem Honiga obraz taki zawiera "rozproszone źródło i punktowe odpływy" /distributed source, point sinks/. Wynika to z przyjęcia założeń odmiennych od Kroghowskich założeń 1, 2, 7 i 9. Zamiast nich Honig zakłada, że:

1. Głównym oporem dla dyfuzji tlenu z krwi do mitochondriów są "funkcjonalne" bariery dyfuzyjne pomiędzy włosniczką a komórkami;
2. Tempo uwalniania tlenu z erytrocytów jest czynnikiem ograniczającym dostawę tlenu do tkanki;
3. Konsumpcja tlenu w tkance ma charakter dyskretny /punktowy/;
4. Przepływ tlenu do tkanek jest cylindrycznie symetryczny, ale nie na zewnątrz włosniczek, lecz do wnętrza komórek.

Dodatkowo zakłada on, że rolą mioglobiny jest "buforowanie" wewnątrzkomórkowego  $P_{O_2}$  do wartości znacznie niższych niż włosniczkowe  $P_{O_2}$ , dzięki czemu generowany jest ostry gradient  $P_{O_2}$  na granicy włosniczki - tkanka i tlen jest niejako "wsysany" z otoczenia komórek do ich wnętrza; koncepcja ta jest w istocie podobna do przedstawionej poprzednio koncepcji mitochondriów jako "doskonałych odpływów" dla tlenu z tym, że w modelu Honiga "doskonałymi odpływami" są całe komórki.

Nie trudno zauważyć, że wyniki doświadczeń z tlenem-18 nie mogą być wyjaśnione w oparciu o model Honiga, z dwóch względów: wysokie wartości ekstrakcji początkowej wskaźnika tlenowego świadczą przeciwko obecności bariery dyfuzyjnej, oraz zachowanie się tlenu nie jest w istocie odmienne od

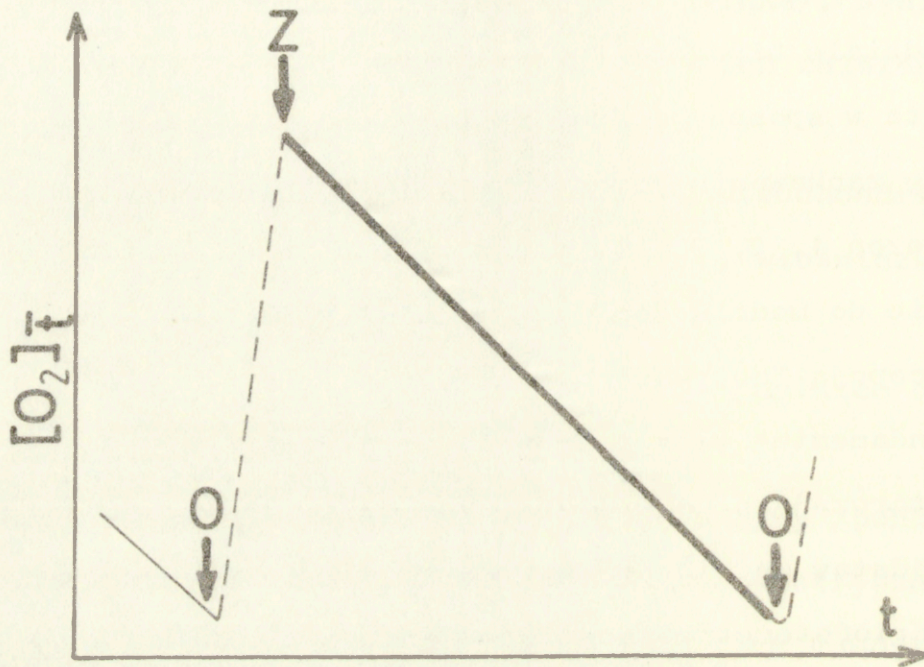


zachowania się innych substancji dobrze dyfundujących, a więc brak zgodności pomiędzy oczekiwanymi i uzyskanymi rezultatami nie wynika ze swoistej dla tlenu "buforującej" roli mioglobiny wewnątrz komórek.

W kategoriach założeń Krogha przedstawiona w poprzednim rozdziale hipoteza "przeciek-odpływ" polega na niespełnieniu /i to w sposób bardzo dobitny/ założeń 6 i 8 /oraz także 14/, przy zachowaniu pozostałych, w tym negowanych przez Honiga założeń 1, 2, 7 i 9. Można więc przyjąć, że - w przeciwieństwie do modelu Honiga - model "Przeciek-Odpływ" nie jest koncepcją "anty-kroghowską", nie wymaga bowiem modyfikacji "fundamentu" teorii Krogha. Hipoteza ta wydaje się również wystarczająca do wyjaśnienia niektórych obserwacji leżących u podstaw modelu Honiga.

Kriofotometryczne mikroskaningowe badania skrawków mięśni pobranych w spoczynku /Gayeski i Honig, 1978/ wykazały, że stopień utlenowania mioglobiny wynosi średnio 77-91%, ale rozkład tych wartości jest bimodalny, wykazując szeroki pik odpowiadający  $P_{O_2}$  między 14 a 35 mmHg, i drugi, wąski pik odpowiadający wartościom  $P_{O_2}$  powyżej 34 mmHg. Na pierwszy rzut oka nie jest oczywiste, że taki wynik jest dokładnie zgodny z przewidywaniami hipotezy "Przeciek-Odpływ". Aby sobie to uświadomić, rozpatrzmy przewidywane zmiany wokół włóściczki podczas cyklu "otwarcie-zamknięcie". Ryc. 5.14. ilustruje zmiany średniego stężenia tlenu w tkance w otoczeniu włóściczki, przy założeniu zużycia  $O_2$  zgodnie z kinetyką zerowego rzędu.





Ryc. 5.14. Przewidywane zmiany średniego  $[O_2]$  w tkance w otoczeniu włosniczki w cyklu "otwarcie" (o) - "zamknięcie" (z) .

W chwili otwierania się włosniczki tkankowe  $P_{O_2}$  i  $[O_2]$  jest niskie /prawie cały tlen został metabolicznie zużyty w czasie, gdy włosniczka była zamknięta/. Kiedy rozpoczyna się perfuzja,  $P_{O_2}$  w tkance szybko rośnie. Mioglobina w komórkach zostaje "naładowana" tlenem. Tkankowe  $P_{O_2}$  uzyskuje maksymalną wartość chwilę przed ponownym zamknięciem włosniczki. Jest to faza

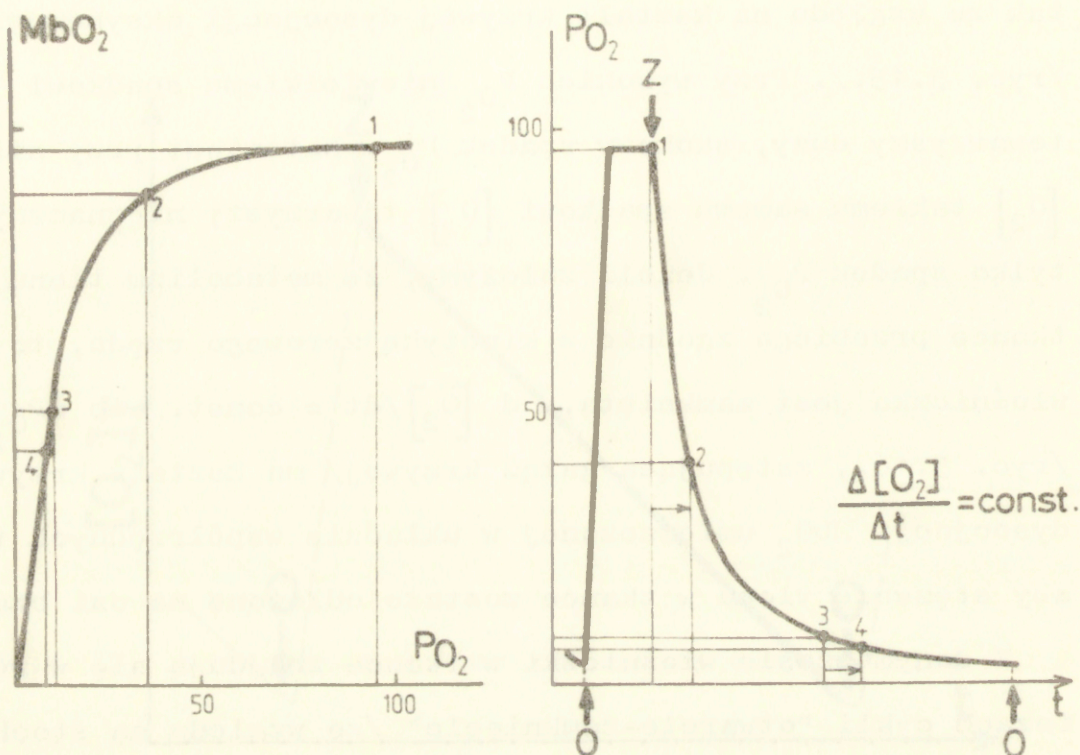


cyklu, w której występuje chwilowa równowaga dyfuzyjna pomiędzy tlenem w krwi i w tkance. Po zamknięciu się włóścizki następuje bardzo szybki spadek tkankowego  $P_{O_2}$ . Dzieje się tak ze względu na kształt krzywej dysocjacji oksyhemoglobiny /ryc. 5.15./. Przy wysokich  $P_{O_2}$  niewielkiemu spadkowi  $[O_2]$  towarzyszy duży, skokowy spadek  $P_{O_2}$ . Natomiast przy niskich  $[O_2]$  takiemu samemu spadkowi  $[O_2]$  towarzyszy nieznaczny tylko spadek  $P_{O_2}$ . Jeżeli założymy, że metabolizm tlenu w tkance przebiega zgodnie z kinetyką zerowego rzędu, to gdy włóścizka jest zamknięta,  $d[O_2]/dt = \text{const.}$  ale  $dP_{O_2}/dt$  /ryc. 5.16., zstępująca gałąź krzywej/ ma kształt krzywej dysocjacji  $HbO_2$  umieszczonej w układzie współrzędnych tak, aby stężenie tlenu w tkance zostało odłożone na osi czasu.

W danym czasie włóścizki w tkance znajdują się w różnych fazach cykli "otwarcie-zamknięcie" /ze względu na stochastyczny charakter tych procesów/. Jest więc oczywiste, że najmniej często występować będą w tkance wartości  $P_{O_2}$ , które w cyklu "zamknięcie-otwarcie" występują najkrócej - a więc wartości "średnie", np. między 35 a 84 mmHg. Obserwowany przez Gayeskiego i Honiga /1978/ szeroki pik niskich  $P_{O_2}$  odpowiadałby wartościom przeważającym w otoczeniu zamkniętych włóścizek, a wąski drugi pik wysokich wartości  $P_{O_2}$  - wartościom przeważającym w otoczeniu włóścizek perfundowanych, których w danej chwili jest 10-20%.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy przy pomocy metody rozcieńczenia tlenu-18 dotyczą preparatów badanych w stanie spoczynku. Nie potwierdzają one hipotezy Honiga, ale jednocześnie nie oznaczają jej obalenia. Dotyczy ona bowiem mięśni





Ryc. 5.15. Strona lewa: krzywa dysocjacji mioglobiny.

Strona prawa: przewidywane zmiany średniego  $P_{O_2}$  w tkance w otoczeniu włosniczki w cyklu "otwarcie" - "zamknięcie". Krzywa  $P_{O_2}(t)$  jest odwróconą o  $90^\circ$  w lewo krzywą dysocjacji mioglobiny, pomnożoną przez tempo metabolizmu tlenu w tkance,  $[O_2] \cdot dt$ . Udział tlenu rozpuszczonego fizycznie w tkance został pominięty dla uproszczenia.

Zmiana stężenia tlenu przy wysokim  $P_{O_2}$  ( $1 \rightarrow 2$ ) pociąga za sobą znacznie większą zmianę  $P_{O_2}$ , niż taka sama zmiana  $[O_2]$  przy niskim  $P_{O_2}$  ( $3 \rightarrow 4$ ).



w wysiłku, kiedy perfuzja włóśnierek jest znacznie większa, a czasy tranzytu przez włóśniarki znacznie krótsze. Być może bariera dyfuzyjna dla tlenu, niedostrzegalna w spoczynku, nabiera wówczas istotnego znaczenia. Użycie metody rozcieńczenia tlenu-18 mogłoby wniesć tu wiele istotnych informacji. Wykonanie takich doświadczeń jest - niestety - mało prawdopodobne, ze względu na techniczne trudności detekcji znakowanego  $O_2$  przy niskich wartościach zylnego  $[O_2]$ , jakie występują podczas wysiłku mięśniowego.



PIŚMIENICTWO

- Acker, H., D.W. Lubbers /1971/ Eine Sauerstoffdurchlässige Zone in der Wand der Arteria. *Experientia* 27:394-395.
- Acker, H., D.W. Lubbers, H. Weigelt, D. Dingmans, D. Schafer, B. Seidl /1973/ The oxygen barrier in the carotid body of cat and rabbit. *Adv. Exp. Med. Biol.* 37A:609-615.
- Ackerman, J.J.H., T.H. Grove, G.G. Wong, D.G. Gadian, G.H. Radda /1980/ Mapping of metabolites in whole animals by <sup>31</sup>P-NMR using surface coils. *Nature* 283:167-170.
- Astrand, I., P. Astrand, B.H. Christensen, R. Hedman /1960/ Myohemoglobin as an oxygen store in man. *Acta Physiol. Scand.* 43:454-460.
- Aukland, K., S. Akre, S. Leraand /1960/ Arteriovenous counter-current exchange of hydrogen gas in skeletal muscle. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 19, Suppl. 99:72-75.
- Baines, A.D., C.W. Gottschalk, W.E. Lasitter /1968/ Microinjection study of p-aminohippurate excretion by rat kidney. *Am. J. Physiol.* 214: 703-709.
- Barcroft, J. /1934/ Features in the Architecture of Physiological Function; Cambridge University Press.
- Bassingthwaighte, J.B. /1966/ Plasma indicator dispersion in arteries of the human leg. *Circ. Res.* 19:332-346.
- Bassingthwaighte, J.B. /1974/ A concurrent model for extraction during transcapillary passage. *Circ. Res.* 35:483-503.
- Bassingthwaighte, J.B., T.J. Knopp, J.B. Hazelrig /1970/ A concurrent flow model of capillary-tissue exchange. /w:/ Capillary Permeability, ed. C. Crone, N.A. Lassen, str. 60-81; Munksgaard, Copenhagen.
- Bassingthwaighte, J.B., T. Yipintsoi /1974/ Organ blood flow, wash-in, washout, and clearance of nutrients and metabolites. *Mayo Clin. Proc.* 49:248-255.



- Bergner, P.A. /1965/ Exchangeable mass: determination without assumption of isotopic equilibrium. *Science* 150: 1048-1050.
- Björck, G. /1949/ On myoglobin and its occurrence in man. *Acta Med. Scand.* 133, Suppl. 226:1-216.
- Dolwig, T.G., N.A. Lassen /1975/ The diffusion permeability to water of the rat blood-brain barrier. *Acta Physiol. Scand.* 93:415-422.
- Bourgain, R.H., P. Colin, H. Vermarion, L. Maes, J. Manil /1981/ Control mechanisms involved in the regulation of cerebral tissue pressure in oxygen. *Adv. Physiol. Sci.* 25:207-231.
- Brigham, K.L., L.H. Ramsey, J.D. Snell, M. Cullen /1971/ On defining the pulmonary extravascular water volume. *Circ. Res.* 29:385-397.
- Brodersen, P., P. Sejrnsen, N.A. Lassen /1973/ Diffusion bypass of Xenon in brain circulation. *Circ. Res.* 32:363-369.
- Burns, B., G.H. Gurtner /1973/ A specific carrier for oxygen and carbon monoxide in the lung and placenta. *Drug Metab. Dispos.* 1:374-379.
- Chance, B. /1951/ Rapid and sensitive spectrophotometry. III. A double beam apparatus. *Rev. Sci. Instr.* 22:634-638.
- Chance, B. /1954/ Spectrophotometry of intracellular respiratory pigments. *Science* 120:767-775.
- Chance, B., S. Elcff, J.S. Leigh, Jr. /1980/ Non-invasive, non-destructive approaches to cell bioenergetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:7430-7434.
- Chance, B., J. Hasselgrove, C. Barlow /1981/ Redox gradients in oxygen delivery to tissue. *Adv. Physiol. Sci.* 25:13-37.
- Chance, B., N. Oshino, T. Sugano, A. Mayovsky /1973/ Basic principles of tissue oxygen determination from mitochondrial signals. *Adv. Exp. Med. Biol.* 37A:277-292.
- Chance, B., G.R. Williams /1955/ Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 217:383-427.



- Chance, B., J.R. Williamson, D. Jamieson, E. Schoener /1965/ Properties and kinetics of reduced pyridine nucleotide fluorescence of the isolated and in vivo rat heart. *Biochem. Z.* 341:357-377.
- Chinard, F.P. /1970/ Intrarenal volumes of distribution of some extracellular tracers. Theoretical considerations and possible practical applications /w:/ *Capillary Permeability*, ed. C. Crone, N.A. Lassen; str. 32-44; Munksgaard, Copenhagen.
- Chinard, F.P., R. Effros, W. Perl, M. Silverman /1967/ Organ vascular and extravascular compartments in vivo /w:/ *Compartments, Pools and Spaces*, ed. P.E. Bergner, C.C. Lushbaugh, str. 381-422; U.S. Atomic Energy Comision, Oak Ridge, Tennessee.
- Chinard, F.P., T. Ems, M.F. Nolan /1962/ Pulmonary extravascular water volumes from transit time and slope data. *J. Appl. Physiol.* 17:179-183.
- Clark, B.J., R.F. Coburn /1975/ Mean myoglobin oxygen tension during exercise at maximal oxygen uptake. *J. Appl. Physiol.* 39:135-144.
- Coburn, R.F., L.B. Mayers /1971/ Myoglobin  $O_2$  tension determined from measurements of carboxymyoglobin in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 220:66-74.
- Cohen, P.J., S.C. Alexander, F.C. Smith, M. Reivich, H. Wollman /1967/ Effects of hypoxia and normocarbica on cerebral blood flow and metabolism in conscious man. *J. Appl. Physiol.* 23:183-189.
- Cole, R.P. /1982/ Myoglobin function in exercising skeletal muscle. *Science* 216:523-525.
- Cole, R.P., B.A. Wittenberg, P.R.B. Caldwell /1978/ Myoglobin function in the isolated fluorocarbon-perfused dog heart. *Am. J. Physiol.* 234:H567-H572.
- Cotev, S., J. Lee, J.W. Severinghaus /1968/ The effect of acetazolamide on cerebral blood flow and cerebral tissue  $P_{O_2}$ . *Anesthesiology* 29:471-477.



- Crank, K. /1957/ Diffusion with rapid irreversible immobilisation. *Trans. Faraday Soc.* 53:1083-1091.
- Cremer, J.E., M.P. Seville /1983/ Regional brain blood flow, blood volume, and hematocrit values in the adult rat. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* 3:254-256.
- Crone, C. /1963/ The permeability of capillaries in various organs as determined by use of the "indicator-diffusion" method. *Acta Physiol. Scand.* 58:292-305.
- Crone, C. /1965/ Facilitated transfer of glucose from blood into brain tissues. *J. Physiol. /Lond./* 18:103-113.
- Crone, C., A.M. Thompson /1973/ Comparative studies of capillary permeability in brain and muscle. *Acta Physiol. Scand.* 87:252-260.
- D'Alcey, L.G., C.J. Rose, S.A. Sellers, J.P. Manfredi /1980/ Cerebral sodium extraction in the dog: a test for extracerebral contamination. *Am. J. Physiol.* 238:H868-H875.
- Davies, P.W., F. Bronk /1951/ Microelectrodes for measuring local oxygen tension in animal tissues. *Rev. Sci. Instr.* 13:524-533.
- Davson, H. /1968/ *Physiology of Cerebrospinal Fluid.* Lippincott, London.
- Dejours, P. /1966/ *Respiration;* Oxford University Press.
- De Monig, J., L.J.C. Hofd, F. Kreuzer /1981/ Oxygen transport and the function of myoglobin. Theoretical model and experiments in chicken gizzard smooth muscle. *Pflugers Arch.* 389:211-217.
- Effros, R.M., M.L. Weissman /1979/ Carbonic anhydrase activity of the cat hind leg. *J. Appl. Physiol.* 47:1090-1098.
- Erdmann, W., S. Kunke, W. Kroll /1973/ Tissue  $P_{O_2}$ , an experimental study with multimicroelectrodes in the rat brain /w:/ Oxygen Supply, red. M. Kessler i in., s. 169, Urban and Schwarzenberg, Munchen-Wien.



- Fabel, H. /1963/ Normal and critical oxygen supply of the heart /w:/ Oxygen Transport in Blood and Tissue, red. D.W. Lubbers i in., str. 159-171; Thieme, Stuttgart.
- Fabel, H., D.W. Lubbers /1965/ Measurements of reflection spectra of the beating rabbit heart in situ. Biochem. Z. 341:351-356.
- Finkelstein, S., N.M. Alpert, R.H. Ackerman, F.S. Buonanno, J.A. Correia, J. Chang, S. Kulas, G.L. Brownell, J.M. Taveras /1981/ Positron imaging of the normal brain: regional patterns of cerebral blood flow and metabolism. Trans. Am. Neurol. Assoc. 105:8-10.
- Fletcher, J.E. /1978/ Mathematical modelling of the micro-circulation. Math. Biosci. 38:159-202.
- Forster, R.E., C.W. Goodwin, N. Itada /1976/ A new approach to the experimental measurement of mean tissue  $P_{O_2}$ . Adv. Exp. Med. Biol. 75:41-46.
- Fox, M.A., H.D. Landahl /1965/ Theory of hemoglobin facilitated oxygen transport. Bull. Math. Biophys. 27:183-190.
- Frackowiak, R.S.J., G.-L. Lenzi, T. Jones, J.D. Heather /1980/ Quantitative measurement of regional cerebral blood flow and oxygen metabolism in man using  $^{15}O_2$  and positron emission tomography: theory, procedure, and normal values. J. Comp. Assist. Tomogr. 4:727-736.
- Friis, M.L., O.B. Paulson, M.M. Hertz /1970/ Carbon dioxide permeability of the blood-brain barrier in man. The effect of acetazolamide. Microvasc. Res. 20:71-80.
- Gayeski, T.E.J., C.R. Honig /1978/ Myoglobin saturation and calculated  $P_{O_2}$  in single cells of resting gracilis muscles. Adv. Exp. Med. Biol. 94:77-84.
- Gayeski, T.E.J., C.R. Honig /1983/ Direct measurement of intracellular  $O_2$  gradients; role of convection and myoglobin. Adv. Exp. Med. Biol. 159:613-622.
- Goldfisher, S. /1967/ The cytochemical localization of myoglobin in striated muscle of man and walrus. J. Cell Biol. 34:398-402.



- Goresky, C.A., G.G. Bach, B.E. Nadeau /1975/ Red cell carriage of label. Its limiting effect on the exchange of materials in the liver. *Circ. Res.* 36:328-351.
- Goresky, C.A., R.F.P. Cronin, B.E. Wangel /1969/ Indicator dilution measurements of extravascular water in the lungs. *J. Clin. Invest.* 48:487-501.
- Goresky, C.A., M. Silverman /1964/ Effect of correction of catheter distortion on calculated liver sinusoidal volumes. *Am. J. Physiol.* 207:883-892.
- Goresky, C.A., W.H. Ziegler, G.G. Bach /1970/ Capillary exchange modelling: barrier-limited and flow-limited distribution. *Circ. Res.* 27:739-764.
- Grieb, P., R.E. Forster /1981/ The effect of acetazolamide on brain O<sub>2</sub> metabolism. *Adv. Physiol. Sci.* 25:271-272.
- Grieb, P. R.E. Forster, P.C. Pape. Oxygen exchanges between blood and resting skeletal muscle: a Shunt-Sink hypothesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* /w druku/.
- Grunewald, W.A., W. Sowa /1977/ Capillary structures and O<sub>2</sub> supply to tissue. An analysis with a digital diffusion model as applied to the skeletal muscle. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 77:149-209.
- Hamilton, W.F., J.W. Moore, J.M. Kinsman, R.G. Spurling /1928/ Simultaneous determination of the greater and lesser circulation time, of the mean velocity of blood flow through the heart and lungs, of the cardiac output, and an approximation of the amount of blood actively circulating in the heart and lungs. *Am. J. Physiol.* 85:337-365.
- Hellums, J.D. /1970/ The resistance to oxygen transport in the capillaries relative to that in the surrounding tissue. *Microvasc. Res.* 13:131-136.
- Hemmingsen, E. /1965/ Accelerated transfer of oxygen through solutions of heme pigments. *Acta Physiol. Scand.* 64, Suppl. 246:1-53.



- Hemmingsen, E., P.F. Schollander /1960/ Specific transport of oxygen through hemoglobin solutions. Science 132: 1379-1381.
- Hempel, F.G., F.F. Jobsis, J.L. La Manna, M.R. Rosenthal, H.A. Saltzman /1977/ Oxidation of cerebral cytochrome aa<sub>3</sub> by oxygen plus carbon dioxide at hyperbaric pressures. J. Appl. Physiol. 43:873-879.
- Henriques, V. /1943/ Biochem. Zeitschr. 56:230 /cf. Lassen i Perl, 1979/.
- Hertz, M.M., T.G. Bolwig /1976/ Blood-brain barrier studies in the rat: an indicator dilution technique with tracer sodium as an internal standard for estimation of extra-cerebral contamination. Brain Res. 107:333-343.
- Hertz, M.M., C.B. Paulson /1980/ Heterogeneity of cerebral capillary flow in man and its consequences for estimation of blood-brain barrier permeability. J. Clin. Invest. 65: 1114-1151.
- Honig, C.R., M.L. Feldstein, J.L. Frierson /1977/ Capillary lengths, anastomoses, and estimated capillary transit times in skeletal muscle. Am. J. Physiol. 233:H112-H129.
- Honig, C.R., J.L. Frierson, J.L. Patterson /1970/ Comparison of neural controls of resistance and capillary density in resting muscle. Am. J. Physiol. 218:937-942.
- Honig, C.R., T.E.J. Gayeski /1982/ Correlation of O<sub>2</sub> transport in the micro and macroscale. Int. J. Microcirc. Clin. Exp. 1:367-380.
- Honig, C.R., T.E.J. Gayeski, W. Federspiel, A. Clark, Jr., P. Clark. Muscle O<sub>2</sub> gradients from hemoglobin to cytochrome: new concepts, new complexities /manuskrypt autorów/.
- Honig, C.R., C.L. Odoroff /1981/ Calculated dispersion of capillary transit times: Significance for oxygen exchange. Am. J. Physiol. 240:H199.
- Itada, N., R.E. Forster /1977/ Carbonic anhydrase activity in intact red blood cells measured with <sup>18</sup>O<sub>2</sub> exchange. J. Biol. Chem. 252:3881-3890.



- James, N.T. /1968/ Histochemical demonstration of myoglobin in skeletal muscle fibres and muscle spindles. *Nature* 219:1174-1175.
- Jankowska, L., P. Grieb /1981/ Relationship between arterial and cisternal CSF oxygen tension in rabbits. *Am. J. Physiol.* 236:F220-225.
- Jobsis, F.F., J. Keizer, J. La Manna, M. Rosenthal /1977/ Reflectance spectrophotometry of cytochrome aa<sub>3</sub> in vivo. *J. Appl. Physiol.* 43:858-872.
- Jobsis, F.F., M.H. Mitnick, T.R. Snow /1976/ Pyrene butyric acid: a non-invasive probe for in situ intracellular oxygen concentration. *Adv. Exp. Biol. Med.* 75:47-54.
- Johnson, P.C. /1971/ Red cell separation in the capillary network. *Am. J. Physiol.* 221:91-104.
- Jones, D.P., F.G. Kennedy /1982/ Intracellular O<sub>2</sub> gradients in cardiac myocytes. Lack of a role for myoglobin in facilitation of intracellular O<sub>2</sub> diffusion. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 105:419-424.
- Kagen, L.J., R. Gurevich /1966/ Localization of myoglobin in human skeletal muscle using fluorescent antibody technique. *J. Histochem. Cytochem.* 15:436-441.
- Kessler, H., J. Hopper, D.W. Lubbers, S. Ji /1981/ Local factors affecting regulation of microflow, O<sub>2</sub> uptake and energy metabolism. *Adv. Physiol. Sci.* 25:155-161.
- Kety, S.S. /1957/ Determinants of tissue oxygen tension. *Fed. Proc.* 16:666-670.
- Kety, S.S., C.F. Schmidt /1945/ Determination of cerebral blood flow in man by the use of nitrous oxide in low concentrations. *Am. J. Physiol.* 143:53-62.
- Kety, S.S., C.F. Schmidt /1948/ The nitrous oxide method for the quantitative determination of cerebral blood flow in man: theory, procedure, and normal values. *J. Clin. Invest.* 27:476-483.



- Kreuzer, F. /1982/ Oxygen supply to tissues: The Krogh model and its assumptions. *Experientia* 38:1415-1426.
- Kreuzer, F., L.J.C. Hofd /1970/ Facilitated diffusion of oxygen in the presence of hemoglobin. *Resp. Physiol.* 10: 542-558.
- Krogh, A. /1919/ The number and distribution of capillaries in muscle with calculations of the oxygen pressure head necessary for supplying the tissue. *J. Physiol. /Lond./* 52:409-415.
- La Lone, B.J., P.C. Johnson /1979/ Arteriolar-capillary network analysis in resting cat sartorius muscle. *Microvasc. Res.* 17:519 /Abstract/.
- La Manna, J.C., S.J. Peretsman, A.T. Light, M. Rosenthal /1981/ Oxygen sufficiency in the "working" brain. *Adv. Physiol. Sci.* 25:95-96.
- Lassen, N.A., H.W. Fritts, Jr., P.R.B. Caldwell, C. Giuntini, W. Dansgaard, A. Courmand /1965/ Intrapulmonary exchange of the stable isotope  $^{18}\text{O}_2$  injected intravenously in man. *J. Appl. Physiol.* 20:809-815.
- Lassen, N.A., K. Hoedt-Rasmussen /1966/ Human cerebral blood flow measured by inert gas techniques. Comparison of the Kety-Schmidt method and intra-arterial injection method. *Circ. Res.* 19:681-688.
- Lassen, N.A., W. Perl /1979/ *Tracer Kinetic Methods in Medical Physiology*, Raven Press, New York.
- Lassen, N.A., J. Trap-Jensen, S.C. Alexander, J. Olesen, O.B. Paulson /1971/ Blood-brain barrier studies in man using the double-indicator method. *Am. J. Physiol.* 220: 1627-1633.
- Laux, B.E., M.E. Raichle /1978/ The effect of acetazolamide on cerebral blood flow and oxygen utilization in the Rhesus monkey. *J. Clin. Invest.* 62:585-592.
- Lawrie, R.A. /1950/ Some observations on factors affecting myoglobin concentrations in muscle. *J. Agr. Sci.* 40:356-366.



- Leonard, E.F., S.B. Jorgensen /1974/ The analysis of convection and diffusion in capillary beds. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 3:293-339.
- Longmuir, I.S. /1976/ Measurement of the fraction of oxygen carried by facilitated diffusion. *Adv. Exp. Med. Biol.* 75:217-224.
- Longmuir, I.S. /1977/ Search for alternative oxygen carriers /w:/ *Oxygen and Physiological Function*, red. F.F. Jobsis i in., str. 247-254.
- Longmuir, I.S. /1981/ Channels of oxygen transport from blood to mitochondria. *Adv. Physiol. Sci.* 25:19-22.
- Longmuir, I.S., J.A. Knopp /1976/ Measurement of tissue oxygen with a fluorescent probe. *J. Appl. Physiol.* 41:598-602.
- Longmuir, I.S., J.A. Knopp, D. Benson, H. Gregson /1981/ Intracellular heterogeneity of oxygen concentrations. *Adv. Physiol. Sci.* 25:43-44.
- Longmuir, I.S., M.G.P. Mc Cabe /1964/ Evidence for an oxygen carrier in tissue. *J. Pol. Soc.* 10:45-48.
- Lubbers, D.W. /1968/ Oxygen pressure field in the brain and its significance for the normal and critical oxygen supply in the brain /w:/ *Oxygen Transport to Blood and Tissue*, red. D.W. Lubbers i in., str. 124-139; Thieme, Stuttgart.
- Lubbers, D.W., H. Fabel /1964/ *Verhandl. Deut. Ges. Kreislaufforsch.* 30:198-201 /cf. Wittenberg, 1970/.
- Mitnick, M., F.F. Jobsis /1976/ Pyrenebutyric acid as an optical oxygen probe in the intact cerebral cortex. *J. Appl. Physiol.* 41:593-596.
- Mc Donagh, P.F., R.W. Gore, S.D. Gray /1982/ Perfused capillary surface area in postural and locomotor skeletal muscle. *Microvasc. Res.* 24:142-157.
- Meldon, J.H., R.P. Northey, Jr. /1981/ Hemoglobin-myoglobin teamwork. *Adv. Physiol. Sci.* 25:327-328.



- Meyer, R.A., M.J. Kushmerick, T.R. Brown /1982/ Application of  $^{31}\text{P}$ -NMR spectroscopy to the study of striated muscle metabolism. *Am. J. Physiol.* 242:C1-C11.
- Nichenfelder, J.D., J.M. Messick, Jr., R.A. Theye /1968/ Simultaneous cerebral blood flow measurement by direct and indirect methods. *J. Surg. Res.* 8:475-481.
- Millikan, G.A. /1937/ The kinetics of muscle haemoglobin. *Proc. Roy. Soc., London, Ser. B.* 123:218-241.
- Mochizuki, M., R.E. Forster /1962/ Diffusion of carbon monoxide through thin layers of hemoglobin solution. *Science* 138:897-898.
- Moll, W. /1968/ The diffusion coefficient of myoglobin in muscle homogenate. *Arch. Ges. Physiol.* 299:247-251.
- Morita, S., R.G. Cassens, E.J. Briskey /1969/ Localization of myoglobin in striated muscle of domestic pig; benzidine and  $\text{NADH}_2$ -TR reactions. *Stain Technol.* 44:283-286.
- Murray, J.D. /1974/ On the role of myoglobin in muscle respiration. *J. Theor. Biol.* 47:115-126.
- Ohta, Y., A. Ar, L.E. Farhi /1979/ Solubility and partition coefficients for gases in rabbit brain and blood. *J. Appl. Physiol.* 46:1169-1170.
- Oshino, N., T. Sugano, R. Oshino, B. Chance /1974/ Mitochondrial function under hypoxic conditions: The steady states of cytochrome  $a+a_3$  and their relation to mitochondrial energy states. *Biochim. Biophys. Acta* 368:298-310.
- Pape, P.C., R.E. Forster, P. Grieb, C.W. Goodwin, S. Nioka, L. Labatte /1983/ Distribution of  $^{18}\text{O}_2$ ,  $\text{C}_2\text{H}_2$  and tritiated water /TNO/ in dog skeletal muscle studied by indicator-dilution. *Fed. Proc.* 42:487 /Abstrakt/.
- Perl, W., F.P. Chinard /1968/ A convection-diffusion model of indicator transport through an organ. *Circ. Res.* 22:273-298.
- Piiper, J., M. Meyer. Diffusion-perfusion relationships in skeletal muscle: models and experimental evidence from inert gas washout. *Adv. Exp. Med. Biol.* /w druku/.



- Purves, M.J. /1972/ Physiology of the Cerebral Circulation, Cambridge University Press.
- Raichle, M.E., J.O. Eichling, M.G. Straatmann, M.J. Welch, K.B. Larson, M.M. Ter-Pogossian /1976/ Blood-brain barrier permeability of  $^{14}\text{C}$ -labelled alcohols and  $^{15}\text{O}$ -labelled water. Am. J. Physiol. 230:543-552.
- Ramirez, J. /1959/ Oxidation-reduction changes of cytochromes following stimulation of amphibian cardiac muscle. J. Physiol. /Lond./ 147:14-32.
- Rasio, E.A., C.A. Goresky /1979/ Capillary limitation of oxygen distribution in the isolated rete mirabile of the eel /*Anguilla anguilla*/. Circ. Res. 44:498-503.
- Renkin, B.M. /1971/ The Nutritional-Shunt-Flow hypothesis in skeletal muscle circulation. Circ. Res. 28/29, Suppl.: I21-I25.
- Renkin, B.M., S.D. Gray, L.R. Dodd /1981/ Filling microcirculation in skeletal muscles during timed India ink perfusion. Am. J. Physiol. 241:H174-H186.
- Riveros-Moreno, V., J.B. Wittenberg /1972/ The self-diffusion coefficients of myoglobin and hemoglobin in concentrated solutions. J. Biol. Chem. 247:895-901.
- Reneau, D.D., M.H. Knisley /1971/ A mathematical stimulation of oxygen transport in the human brain under condition of countercurrent capillary blood flow. Chem. Eng. Progress 67:18-27.
- Roberts, M., G. Owens /1972/ Direct mass spectrographic measurement of regional intracerebral oxygen, carbon dioxide, and argon. J. Neurosurg. 37:706-710.
- Rose, C.P., C.A. Goresky /1976/ Vasomotor control of capillary transit time heterogeneity in the canine coronary circulation. Circ. Res. 39:541-544.
- Rose, C.P., C.A. Goresky /1982/ Barrier-limited transport of oxygen in the coronary circulation. Fed. Proc. 41:1252.



- Rose, C.F., C.A. Goresky, G.G. Bach /1977/ The capillary and sarcolemmal barriers in the heart. An exploration of labelled water permeability. *Circ. Res.* 41:515-533.
- Rosenthal, H., J.C. La Manna, F.F. Jobsis, J.B. Levasseur, H.A. Kontos, J.L. Patterson /1976/ Effects of respiratory gases on cytochrome a in intact cerebral cortex: is there a critical  $P_{O_2}$ ? *Brain Res.* 108:143-154.
- Rossing, R.G., S.M. Cain /1966/ A nomogram relating  $P_{O_2}$ , pH, temperature, and hemoglobin saturation in the dog. *J. Appl. Physiol.* 21:195-201.
- Roughton, F.J.W. /1960/ Diffusion through membranes followed by diffusion with rapid irreversible immobilization in another medium. *Trans. Faraday Soc.* 56:1085-1094.
- Rubinow, S.I., H. Dembo /1977/ The facilitated diffusion of oxygen by hemoglobin and myoglobin. *Biophys. J.* 18:29-42.
- Schollander, P.F. /1960/ Oxygen transport through hemoglobin solutions. *Science* 131:585-590.
- Sejrsen, P., K.H. Tonnesen /1972/ Shunting by diffusion of inert gas in skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 86:82-91.
- Seylaz, J., D. Pinard /1978/ Continuous measurement of gas partial pressures in intracerebral tissue. *J. Appl. Physiol.* 44:528-533.
- Siesjo, B.K. /1978/ *Brain Energy Metabolism*; Willey, New York.
- Silver, I.A. /1973/ The oxygen microelectrode. *Adv. Exp. Biol. Med.* 37A:7-16.
- Skalak, R., P.I. Branemark /1969/ Deformation of red blood cells in capillaries. *Science* 196:717.
- Sklar, F.H., D.F. Burke, Jr., T. Langfitt /1968/ Cerebral blood volume: values obtained with  $^{51}Cr$ -labelled red blood cells and RISA. *J. Appl. Physiol.* 24:79-82.
- Smith, R.H., E.J. Gilbeau, D.D. Reneau /1977/ The oxygen tension field within a discrete volume of cerebral cortex. *Microvasc. Res.* 13:233-240.



- Snell, F.M. /1965/ Facilitated transport of oxygen through solutions of hemoglobin. *J. Theor. Biol.* 6:469-479.
- Sparks, H.V., D.E. Mohrman /1977/ Heterogeneity of flow as an explanation for the multiexponential washout of inert gas from skeletal muscle. *Microvasc. Res.* 13:161-164.
- Stainsby, W.N., A.B. Otis /1964/ Blood flow, blood oxygen tension, oxygen uptake, and oxygen transport in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 206:858-866.
- Starlinger, H., D.W. Lubbers /1973/ Polarographic measurements of the oxygen pressure performed simultaneously with optical measurements of the redox state of the respiratory chain in suspensions of mitochondria under steady-state conditions at low oxygen tensions. *Pfluegers Arch.* 341: 15-22.
- Stewart, G.N. /1897/ *J. Physiol. /Lond./* 22:159 /cf. Lassen i Perl, 1979/.
- Storey, B. /w:/ Silver, I.A. /1981/ Discussion and summary Session II Heterogeneities and  $O_2$  transport, model and experimental. *Adv. Physiol. Sci.* 25:123.
- Subramanyam, R., N.M. Alpert, B. Hoop, G.L. Brownell, J.M. Traveras /1978/ A model for regional cerebral oxygen distribution during the continuous inhalation of  $^{15}O_2$ ,  $C^{15}O$ , and  $C^{15}O_2$ . *J. Nucl. Med.* 19:48-53.
- Taylor, G.I. /1953/ The dispersion of soluble matter in solvent flowing through a tube. *Proc. Roy. Soc., London, Ser. A.* 219:186-203.
- Temney, S.M. /1974/ A theoretical analysis of the relationship between venous blood and mean tissue oxygen pressures. *Resp. Physiol.* 20:283-296.
- Ter-Pogossian, M.M., J.O. Eichling, D.O. Davies, M.J. Welch /1970/ The measure in vivo of regional cerebral oxygen utilization by means of oxyhemoglobin labelled with radioactive oxygen-15. *J. Clin. Invest.* 49:381-391.



- Thews, G. /1960/ Die Sauerstoffdiffusion im Gehirn. Pfluegers Arch. 271:197-226.
- Tonnosen, K.H., P. Sejrnsen /1967/ Inert gas diffusion method for measurement of blood flow. Circ. Res. 20:552-564.
- Vaughn, W.M., G. Weber /1970/ Oxygen quenching of pyrene-butyric acid in water. A dynamic probe of the microenvironment. Biochemistry 9:465-473.
- Wagner, P.D., R.F. Nauman, R.B. Laravnsø /1974/ Simultaneous measurement of eight foreign gases in blood by gas chromatography. J. Appl. Physiol. 36:600-605.
- Watkins, G.M., T.D. Johnson /1978/ The effect of acute alkalosis on intrahepatic oxygen tension as measured in bile /w:/ Recent Developments in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine, red. A. Frigeiro, str. 577-586; Plenum Press, New York.
- Weil, A., F.R. Zeiss, D.A. Cleveland /1931/ The determination of the amount of blood in the central nervous system after injection of hypertonic solutions. Am. J. Physiol. 98: 363-367.
- Whalen, W.J. /1971/ Intracellular  $P_{O_2}$  in heart and skeletal muscle. Physiologist 14:69-82.
- Wilford, C.W., D.F. Bruley, R.S. Artigue /1981/ Probabilistic modeling of oxygen transport in brain tissue. Adv. Physiol. Sci. 25:77-86.
- Wittenberg, J.B. /1959/ Oxygen transport: a new function proposed for myoglobin. Biol. Bull. 117:402.
- Wittenberg, J.B. /1966/ The molecular mechanism of hemoglobin-facilitated oxygen diffusion. J. Biol. Chem. 241:104-114.
- Wittenberg, J.B. /1970/ Myoglobin-facilitated oxygen diffusion: Role of myoglobin in oxygen entry into muscle. Physiol. Rev. 50:559-636.
- Wittenberg, B.A., J.B. Wittenberg, P.R.B. Caldwell /1975/ Role of myoglobin in the oxygen supply to red skeletal muscle. J. Biol. Chem. 250:9038-9043.



Wyman, J. /1966/ Facilitated diffusion and the possible role of myoglobin as a transport mechanism. J. Biol. Chem. 24:115-121.

Yudilievich, D.L., N. DeRose /1971/ Blood-brain transfer of glucose and other molecules measured by rapid indicator dilution. Am. J. Physiol. 221:841-846.

Zander, R. /1976/ Cellular oxygen concentration. Adv. Exp. Biol. Med. 75:463-463.

Zierler, K.L. /1963/ Theory of the use of indicators to measure blood flow and extracellular volume and calculations of transcapillary movement of traces. Circ. Res. 12:464-471.