

원 저

흰쥐에서 급성 일산화탄소 중독 후 뇌 흥분성 변화를 규명하기 위한 탈륨 Autometallography의 적용

원광대학교 의과대학 응급의학교실¹, 원광보건대학교 의무부사관과²

이민수¹ · 양승범² · 허준호¹

Application of Thallium Autometallography for Observation of Changes in Excitability of Rodent Brain following Acute Carbon Monoxide Intoxication

Min Soo Lee, M.D.¹, Seung Bum Yang², Jun Ho Heo, M.D.¹

*Department of Emergency Medicine, Wonkwang University School of Medicine, Iksan¹,
Department of Medical Non-commissioned Officer, Wonkwang Health Science University, Iksan², Korea*

Purpose: Thallium (TI+) autometallography is often used for the imaging of neuronal metabolic activity in the rodent brain under various pathophysiologic conditions. The purpose of this study was to apply a thallium autometallographic technique to observe changes in neuronal activity in the forebrain of rats following acute carbon monoxide (CO) intoxication.

Methods: In order to induce acute CO intoxication, adult Sprague-Dawley rats were exposed to 1100 ppm of CO for 40 minutes, followed by 3000 ppm of CO for 20 minutes. Animals were sacrificed at 30 minutes and 5 days after induction of acute CO intoxication for thallium autometallography. Immunohistochemical staining and toluidine blue staining were performed to observe cellular damage in the forebrain following intoxication.

Results: Acute CO intoxication resulted in significant reduction of TI+ uptake in major forebrain structures, including the cortex, hippocampus, thalamus, and striatum. In the cortex and hippocampal CA1 area, marked reduction of TI+ uptake was observed in the cell bodies and dendrites of pyramidal neurons at 30 minutes following acute CO intoxication. There was also strong uptake of TI+ in astrocytes in the hippocampal CA3 area following acute CO intoxication. However, there were no significant histological findings of cell death and no reduction of NeuN (+) neuronal populations in the cortex and hippocampus at 5 days after acute CO intoxication.

Conclusion: The results of this study suggest that thallium autometallography can be a new and useful technique for imaging functional changes in neural activity of the forebrain structure following mild to moderate CO intoxication.

Key Words: CO intoxication, Thallium, Autometallography, Cortex

서 론

일산화탄소(carbon monoxide, CO)는 무취, 무색의 기체로 탄소의 불완전 연소로 발생하고 헤모글로빈의 포르피린링과의 결합능이 산소보다 250배 이상 높아 적혈구의 산소 운반 능력을 감소시켜 저산소증을 유발한다. 이러한 CO의 화학적 결합 특성 때문에 비록 소량의 CO를 흡입하더라도 우리 신체의 중추 신경, 심폐, 골격근계에

책임저자: 허 준 호

전라북도 익산시 무왕로 895

원광대학교병원 응급의학과

Tel: 063) 859-1150 Fax: 063) 859-2129,

E-mail: tesaza22@hanmail.net

투고일: 2019년 9월 11일

1차 심사일: 2019년 9월 12일

게재 승인일: 2019년 9월 17일

심각한 기능 장애 또는 사망을 초래하는 급성 CO 중독을 일으킨다¹⁾. 급성 CO 중독은 전세계적으로 치명적인 중독 환자에서의 원인으로 절반 이상을 차지하며 미국의 경우 CO 중독으로 매년 약 5만 명이 응급실에 내원하고, 2014년까지도 일 년 동안 약 1300명의 사망자가 발생한 것으로 알려져 있다^{2,3)}. 우리나라에서는 난방도구의 현대화로 과거보다 급성 CO 중독 사례는 전반적으로 줄어들었으나 자살 방식으로 급성 CO 중독 사례가 꾸준히 증가하는 추세로 3번째로 높은 자살 수단으로 보고되었다^{4,5)}. 이와 함께 최근 캠핑 인구가 증가하면서 텐트 내에서의 연소기구 불완전 연소 및 환기장애로 급성 CO 중독 환자가 증가하고 있는 추세이다⁶⁾. 따라서 CO 중독 환자에 대한 적절한 초기 평가와 치료 및 예후 예측의 중요성이 증가하고 있다.

급성 CO 중독에 의한 저산소증에 의해 에너지 대사가 높은 뇌에서 세포 손상이 흔히 발생하는데 CO 가스의 농도 및 노출시간에 따라서 두통, 무기력, 피로, 경련, 의식 소실 등 다양한 신경계 증상들을 보인다. 한편 급성기에 발생한 신경학적 부작용이 적절히 개선되지 못해 경도 또는 중등도의 인지 장애를 동반한 파킨슨 증후군, 치매, 보행장애, 운동 및 감각장애 등의 후유증을 유발하는 지연성 신경-정신 후유 장애(delayed neuropsychiatric sequelae, DNS)가 초래된다^{1,7)}.

임상적으로 급성 CO 중독에 의한 뇌 손상 진단을 위해 자기공명영상(magnetic resonance imaging, MRI) 기법이 많이 사용되는 데, CO 중독 1시간이 지난 후부터 MRI 영상에서 담창구의 괴사, 뇌기저핵, 시상, 해마 및 대뇌피질의 해면성 변화가 관찰되어, MRI 영상이 급성 CO 중독을 진단하는데 민감하다^{8,9)}.

최근 실험동물을 대상으로 급성 CO 중독 모델에서 중추신경계 손상기전 규명 및 치료방법 개발을 위한 많은 연구들이 진행되고 있다^{10,11)}. 대부분의 실험적 연구들에서 중추신경계의 손상을 평가하기 위한 연구기법으로 뇌 절편을 이용하여 hematoxylin-eosin 염색, cresyl violet 염색 등과 같은 고전적 염색기법을 적용 후 현미경하에서 신경세포의 형태학적 변화를 관찰한다. 또한 최근 연구들에서 세포사멸과 관련된 분자생물학적 표지자를 이용한 면역조직검사 및 분자영상기법 등이 사용되고 있다¹²⁾.

Thallium autometallography 기법은 탈륨 이온(thallium, Tl⁺)이 중추신경계 세포들에 흡수된 것을 조직화학염색을 통하여 Tl⁺을 영상화하는 기법이다. Tl⁺은 1가 양이온으로써 세포외에서 세포내로 이동할 수 있는데, 이 때 K⁺와 유사한 이동방식을 취한다. 즉, Na⁺-K⁺ ATPase (pump)의 작동을 통하여 Tl⁺은 K⁺와 경쟁적으로 세포 밖에서 세포 안으로 이동할 수 있다^{13,14)}. 따라서 신경세포의

전기적 활동성 증가로 인한 Na⁺-K⁺ ATPase 활성이 증가하면 Tl⁺의 세포 내 유입이 증가하여 세포 내에 농도가 증가된다. 따라서 세포 내 Tl⁺ 농도는 Na⁺-K⁺ ATPase 활성과 밀접한 관계가 있으며 전기적 흥분도 및 에너지 대사 정도와도 밀접한 관련이 있다. Goldschmidt 등¹⁵⁾은 금속이온을 조직화학적으로 염색하는 실험기법인 autometallography 원리를 응용하여 설치류의 뇌에서 Tl⁺을 염색하는 실험절차를 개발하고 thallium autometallography로 명명하였다. 이후 다수의 실험연구에서 thallium autometallography 기법을 이용하여 생리적 변화에 대한 중추신경계 뉴런들의 흥분성 변화를 관찰하여 뇌의 특정 영역 활성화를 매핑하였다. 또한 본 연구기법을 이용하여 허혈 및 저체온과 같은 병리적 상태에서 뉴런들의 흥분성 변화를 관찰하였다¹⁴⁾. 특히 현미경 수준 하에서 단일 신경세포들의 흥분성 변화를 관찰할 수 있는 장점을 가지고 있다¹³⁾.

그러나 실험동물 수준에서 급성 CO 중독 모델을 대상으로 thallium autometallography 기법을 이용하여 대뇌의 흥분성 변화를 관찰한 연구는 진행되지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 흰쥐를 대상으로 급성 CO 중독을 유발하고 30분 후, 5일 후에 동물을 희생하여 thallium autometallography를 실시하여 대뇌피질 및 해마 영역의 신경세포들에서 Tl⁺ 흡수정도를 확인하였다.

대상과 방법

1. 실험동물

실험동물로 성숙한 Sprague-Dawley계 수컷 쥐(250-300 g, Samtako, Osan, Korea)를 사용하였다(n=18). 이 때 동물실험에 관련된 모든 절차는 원광대학교 실험동물 관리위원회 규정에 의거하여 시행하였다. 실험 7일전에 동물을 구입하여 실험실 환경에 적응시켰으며, 사육실 평균온도는 22±1°C, 습도는 55%로 유지하였으며 12시간 간격으로 명암을 조절하여 07:00부터 19:00까지 조명을 제공하였고 필터한 물 섭취는 제한하지 않았다.

실험동물군은 다음과 같이 3개로 구분하였다. ① 정상 공기를 호흡한 대조군(control, n=5), ② 일산화탄소중독 후 30분 이내 군(CO-30 min), n=5), ③ 일산화탄소중독 후 5일 군(CO-5 days, n=5)으로 구분하였다.

2. 급성 일산화탄소 중독 유발

본 연구에서 흰쥐를 대상으로 급성 CO 중독은 Li 등¹⁸⁾이 제시한 방법을 근거로 하였으며 다만 CO 농도 및 노출

시간을 일부 변경하였다. 일반공기에 CO를 혼합한 CO 혼합기체(0.3%, 3000 ppm)를 구입(Hanshin Gas, Korea) 하였다. 투명한 아크릴로 제작한 밀폐챔버(7 L, LifeTech Korea, Korea)를 이용하였는데, 밀봉이 잘 될 수 있도록 실리콘으로 개구부를 밀봉하였으며 아크릴 박스 3면에 스프링 잠금장치를 설치하였다. 밀폐챔버의 양측에 개폐가 가능한 가스 주입용 밸브 및 토출용 밸브를 장착하였다. 각 실험동물을 밀폐챔버를 위치시키고 밀폐챔버를 잠금 장치로 밀폐 후 흡입구 개폐밸브를 개방하여 0.3% CO 혼합가스를 분당 5 L로 주입하였는데 이때 토출용 밸브를 개방하고 일산화탄소 측정기(TPI 707A, TPI Inc, Korean)를 연결하여 CO 농도의 변화를 측정하였다. 토출되는 공기에서 CO 농도가 1100 ppm에 도달했을 때 CO 혼합가스 주입을 중단하였다. 이 상태에서 체온을 일정하게 유지하기 위하여 밀폐챔버를 항온챔버(28°C)에 위치시키고 40분간 실험동물을 방치하였다. 이후 0.3% CO 혼합가스를 추가적으로 주입하고 일산화탄소 측정기를 이용하여 챔버 내 공기 중 CO 농도를 3000 ppm에 도달하도록 하였다. CO 3000 ppm 농도에서 실험동물을 추가적으로 20분 이상 방치하였다. 이후 실험동물을 챔버 밖으로 위치시켜 정상 공기호흡을 유지하였다.

한편 CO 중독 유발 후 실험동물을 과량 마취 후 심장관류 뇌 고정을 실시하기 전에 좌심실에서 0.5 ml의 혈액을 채취하여 동맥혈 가스분석기(Cobasb 221 system, Roche Diagnostics GmbH, Germany)를 이용하여 carboxyhemoglobin (COHb) 농도를 측정하였다. 대조군의 모든 실험절차는 일산화탄소 중독 절차와 같은 조건하에서 진행되었으나 CO 혼합가스 대신 정상 공기를 주입하고 1시간 10분을 챔버에 방치하였다.

3. Thallium autometallography

본 연구의 thallium autometallography 염색은 Goldschmidt 등¹³⁾이 제시한 방법에 따라 진행되었다. CO 중독 30분 후와 CO 중독 5일 후 각 실험동물을 urethane으로 전신 마취 후 0.05% TIDDC (thallium diethyldithiocarbamate) 용액(0.7 mL)을 수술 현미경하에서 한쪽 넙다리정맥으로 주입하였다. 이후 0.325% Na₂S가 포함된 생리식염수 10 mL를 peristaltic pump를 이용하여 좌심실로 주입하고 우심실을 절개하여 혈액을 제거하면서 세포 내 존재하는 TI⁺을 고정하였다. 다시 0.16% Na₂S+3% glutaraldehyde 혼합액으로 심장을 관류하여 뇌를 고정한다 다음 두개골로부터 뇌를 분리하였다. 분리된 뇌를 30% sucrose 용액에 2일간 방치하여 동결과

정에서 뇌조직 내 얼음조각이 발생하지 않도록 하였다. 뇌를 반으로 절단하여 일측 뇌는 시상면(sagittal plane)으로 다른 일측뇌는 관상면(coronal plane)으로 고정하고 동결조직절단기(HM525 NX Cryostat, ThermoFisher Sci, USA)를 사용하여 뇌조직을 25 μm 두께로 절단하여 뇌절편을 제작하였다. 한편 각 실험군의 뇌절편을 같은 날 제작하고 하나의 슬라이드글라스에 대조군, CO-30 min 군, CO-5 days군의 뇌절편을 부착하여 각 실험군의 뇌조직이 같은 조건에서 염색이 진행되도록 하였다.

뇌절편을 0.1 N HCl로 30분간 반응하고 증류수로 세척 후 건조하였다. 50% Gum arabic+0.1 M citric buffer+hydroquinone (0.03 g/ml)+sliver latate (0.005 g/ml)으로 구성된 발색액을 뇌절편에 처리하여 암실에서 2시간 반응시켰다. 이후 증류수로 발색액을 세척하고 슬라이드를 충분히 건조시켰다. 슬라이드글라스에 부착된 뇌절편을 단계적 ethanol 처리와 xylene 처리 후 Canada balsam을 이용하여 커버글라스로 뇌절편을 덮고 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 TI⁺ 염색 정도를 관찰하고 디지털 카메라를 사용하여 그 영상을 컴퓨터에 저장하였다.

4. 면역조직 화학검사

면역조직화학검사는 관상면으로 절단한 뇌절편을 사용하였으며, 뇌절편들을 10 mM PBS (phosphate-buffered saline)로 세척 후 peroxidase의 활성을 억제하기 위하여 3% H₂O₂ 용액에서 30분 동안 진탕하고, PBS 용액으로 3회 이상 세척하고 0.3% Triton-X 100으로 30분간 진탕한 후 PBS로 3회 이상 세척하였다. 그 후 1% 정상염소혈청 용액을 실온에서 30분간 처리한 일차항체(NeuN, Abcam, USA, 1:2000)를 4°C에서 하룻밤 동안 반응시킨 후 2시간 동안 실온에서 진탕시키고 PBS로 세척하였다. 그 후 이차항체인 biotinylated anti-rabbit & anti-mouse immunoglobulin (Dako, Denmark)을 실온에서 40분간 처리하여 PBS로 세척하고, streptavidin peroxidase (Vector ABC kit)를 20분간 처리하여 PBS로 세척한 뒤 chromogen인 0.05% diaminobenzidine+0.1% nickle 용액으로 발색하였다. PBS로 1시간 동안 세척한 후 조직을 슬라이드글라스에 부착하여 건조하고 탈수과정을 거쳐 커버글라스를 덮어 광학현미경하에서 암갈색의 NeuN 양성 뉴론을 관찰하고 디지털 카메라로 그 영상을 컴퓨터에 저장하였다.

한편 해마영역에서 정상세포 분포를 확인하기 위하여 대조군과 CO-5 day군의 뇌절편을 대상으로 1차 항체 처리 전단계 과정은 상기 서술과 같은 방법으로 진행하였다. 형광이 표지된 1차 항체(Alexa Fluor 488 conjugated

GFAP Monoclonal Antibody, Invitrogen, USA 1:1000)에 뇌절편을 실온에서 24시간동안 반응시켰다. 이후 PBS로 세척 후 뇌절편을 슬라이드글라스에 부착하고 공기 건조 후 도포용액(ProLong Antifade Mountants, ThermoFischer Sci., USA)으로 도포 후 커버글라스로 밀봉하였다. Confocal microscopy (FV1000, Olympus, Japan)를 이용하여 GFAP에 표지된 정상세포를 확인하고 영상화 하였다.

5. Toluidine blue 염색

뇌절편들을 10 mM PBS로 10분간 3회 세척 후 0.1% toluidine blue (0.1 g/100 mL 증류수) 용액에 넣어 교반기에 10분간 반응하였다. 이후 0.1% acetic acid 용액에 5분간 방치하여 뇌 절편으로부터 염색약을 제거하고, 뇌절편을 슬라이드글라스에 부착하여 3일 이상 방치하여 건조하였다. 뇌절편이 부착된 슬라이드글라스를 95% 에탄올 용액에 2분간 방치하여 탈수하고 다시 100% 에탄올용액에 10분 이상 방치하여 추가적 탈수를 진행하였다. 다시 슬라이드 글라스를 xylene용액에 10분간 처리 후 퍼마운트(Permount ; Fisher Scientific, USA)로 봉입하고 커버글라스를 덮고 현미경에 장착한 카메라를 사용하여 디지털 영상화하였다.

6. 영상분석

뇌의 특정영역 및 세포수준에서 TI^+ 흡수정도를 정량적 분석 및 정상세포에서 GFAP 단백 발현을 분석하기 위하여 자동영상분석프로그램(Image J, USA)을 사용하였다. 디지털 영상 간에 TI^+ 흡수정도를 비교 분석하기 위하여 각 실험군의 디지털 영상을 1개 파일에 동시에 저장하였다. Image J 프로그램을 사용하여 모든 디지털 칼라영상들은 8-bit 흑백영상(gray scale image)으로 전환하였다. 8-bit 흑백영상은 pixel의 밝기를 0-256 수준으로 분류할 수 있으며 이때 pixel 밝기가 어두울수록 256 값에, 밝을수록 0 값에 근접할 수 있도록 셋팅하였다. 프로그램의 threshold 기능을 이용하여 일정 gray scale 값 이상을 갖는 pixel 영상만 분석되도록 하였다. 저배율에서 관찰한 전뇌 영상에서 피질, 해마, 시상 등 주요 구조물의 TI^+ 흡수정도를 분석하기 위하여 선택적으로 특정영역으로 설정한 다음 분석 프로그램의 Measurement 기능을 이용하여 이들 영역의 평균 gray scale 값을 산출하였다. 또한 고배율에서 세포수준의 TI^+ 흡수정도를 분석하기 위하여 다음 분석 프로그램의 Analyze Particles 기능을 이용하여 일정 gray scale 값 이상을 갖는 세포체의 수를 분석하였다.

해마 CA3 영역에서 GFAP 면역형광영상은 정상세포의 형태학적 특징에 때문에 GFAP 양성 정상세포의 세포체의 수를 측정하기 불가능하여 CA3 영역을 프로그램의 Measurement 기능을 이용하여 이들 영역의 평균 gray scale 값을 산출하였다. 한편, 대뇌피질 및 해마 CA1 영역에서 세포사멸 및 손상을 확인하기 위해 NeuN 면역조직화학 검사 및 Toluidine blue 염색으로부터 획득된 영상은 실험군 간에 차이가 보이지 않아 영상분석에서 제외하였다.

7. 통계의 분석

각 실험군의 값은 평균과 표준편차로 표현하였으며 각 실험군 간의 통계처리는 Kruskal-Wallis test와 Mann-Whitney U test를 이용하여 p 값이 0.05 이하인 경우에 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 급성 CO 중독 후 행동학적 변화 및 COHb 농도변화

각 실험동물을 밀폐챔버에 넣고 CO 농도가 1100 ppm에 40분, 이후 3000 ppm에 20분 동안 CO 중독을 유도하였다. CO 중독 후 30분 후군인 실험동물 5례의 좌심실에서 채취한 혈액에서 COHb 농도는 $42.7 \pm 3.5\%$ 을 보였다. 한편 정상 공기를 호흡한 대조군(5례)의 좌심실에서 채취한 혈액에서 COHb 농도는 $0.2 \pm 0.3\%$ 이었다.

CO 중독을 유발하는 동안 1100 ppm CO 노출 20분 이후부터 운동능력이 감소하였고 40분 이후부터 움직임이 현저하게 감소하였으며 60분 이후부터는 외부 소음자극에 전혀 움직이지 않는 상태를 보여 이를 의식소실로 간주하였다. 한편 대부분의 실험동물들에서 의식소실을 초래하였으며 노출된 실험동물 13예에서 3예가 24시간 이내에 사망하였다.

2. 급성 CO 중독 후 뇌에서 TI^+ 흡수 변화

각 실험동물에 TIDDC를 주입 후 5-7분 이내에 실험동물들을 희생하여 심장관류법을 통하여 뇌를 고정한 다음 시상축(saggital axis)으로 뇌절편을 제작하여 전뇌를 대상으로 thallium autometallography를 실시하였다. Thallium autometallography 상 대조군의 전뇌영역에서 세포 내 TI^+ 흡수정도에 따라 암갈색의 발현 정도가 차이가 있었다. 즉, 전뇌(forebrain) 주요 영역들 중 전두엽, 선조체, 해마 및 시상핵에서 TI^+ 의 세포 내 흡수가 증가되

어 보다 진한 암갈색을 보였으며 특히 전두엽부분에서 가장 진한 암갈색을 보였다(Fig. 1).

급성 CO 중독 유발 30분 후 thallium autometallography를 실시하여 대조군의 thallium 염색 정도와 비교하

였을 때, 전뇌의 대부분 영역에서 Tl^+ 염색 정도가 전반적으로 현저하게 감소하였다. 대조군의 전뇌 영역들의 Tl^+ 염색 정도와 비교하였을 때 대뇌피질의 전두엽에서 33% ($p < 0.01$), 해마에서 26% ($p < 0.01$), 시상핵에서 17%

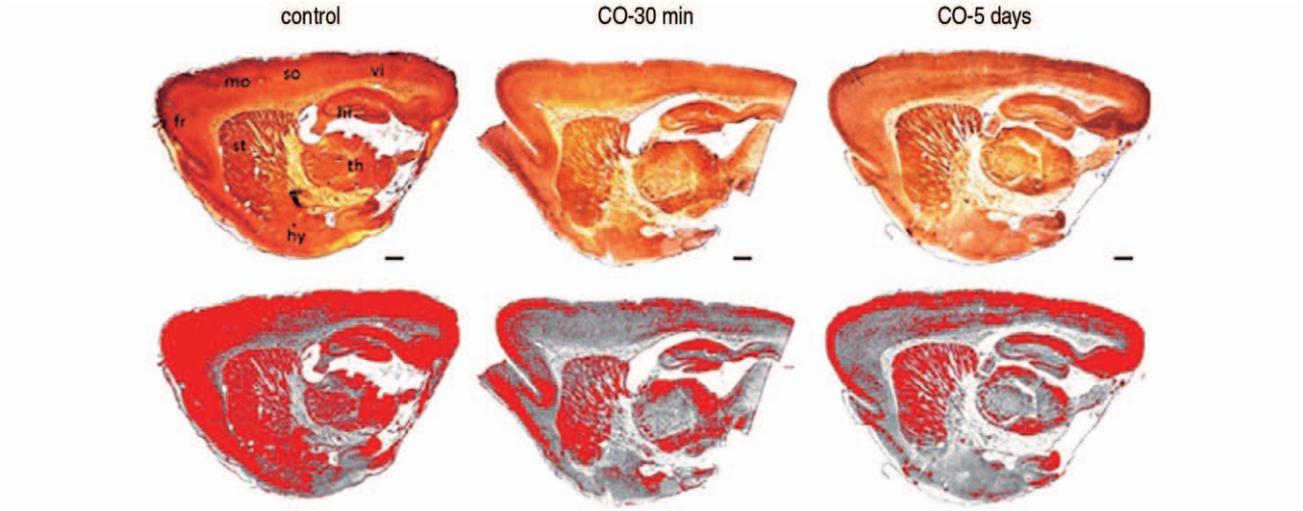


Fig. 1. Regional changes in thallium ion (Tl^+) uptake in rat forebrains following acute carbon monoxide (CO) intoxication. Upper three photographs show the uptake of Tl^+ ion that is histochemically stained with brown color by autometallographic technique in sagittal hemi-brain section of control, CO-30 min, and CO-5 days groups. Animals of control group were exposed at normal room air for 60 minutes. Animals of CO-30 min group and CO-5 days group were sacrificed at 30 minutes and 5 days after 40 minutes exposure of 1100 ppm CO followed by 3000 ppm CO for 20 minutes, respectively. The more dark-brown color intensity represents the higher uptake of Tl^+ ion in the cells in the brain area. Lower three photographs show pseudo-colored images of Tl^+ ion uptake that were generated by transformation of original images into 8-bit grayscale images. Pixels on the gray image were thresholded, converted into pseudo-red colored image by using Image J software. Fr, frontal cortex; mo, motor cortex; so, somatosensory cortex; vi, visual cortex; st, striatum; hi, hippocampus; th, thalamus; hy, hypothalamus. Scale bar. 1 mm.

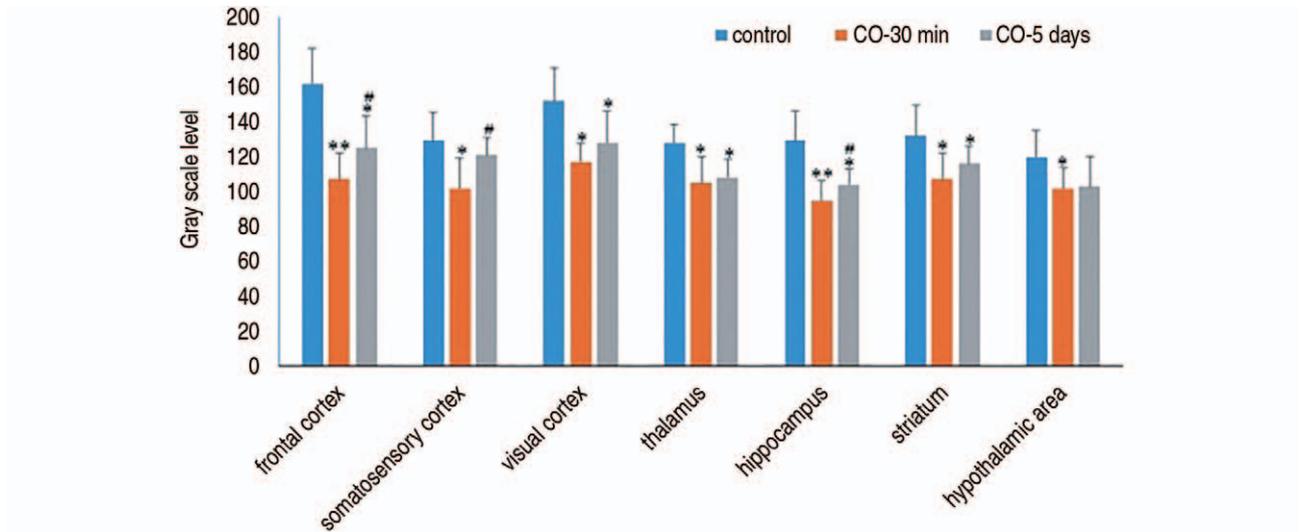


Fig. 2. Statistical analysis of gray scale value of relative Tl^+ ion uptake in major forebrain structures of three experimental groups. For quantification of gray scale value of the Tl^+ ion uptake, pixels were thresholded via the Image J and gray values of pixels above threshold in a specific area of the brain were analyzed with 8-bit gray scale level (0-256) using the built-in function 'Measurement'. Values are mean \pm S.D. of 5 rats of each experimental group. * Denotes significant difference between control and CO-30 min or CO-5 days ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$). # Denotes significant difference between CO-30 min and CO-5 days ($#p < 0.05$).

($p < 0.05$), 선조체에서 18% ($p < 0.05$) 이상 유의한 감소를 보였다(Fig. 1, 2).

한편 고배율 하에서 대뇌피질과 해마에서 세포수준에서 Tl^+ 흡수에 대한 급성 CO 중독의 효과를 관찰하였다. 정상 공기에 노출한 대조군의 대뇌피질에서 Tl^+ 흡수가 증가한 세포는 두 가지 유형을 보였다. 즉 세포체와 긴 수상돌기에서 Tl^+ 염색이 동시에 관찰되는 피라미드뉴론(pyramidal neuron)과 작은 세포체에서 Tl^+ 염색이 되나 수상돌기에서 염색되지 않는 억제성 중간뉴론(interneuron)이 관찰되었다. 특히 대뇌피질의 4-5층에 있는 피라미드뉴론 및 중간뉴론에서 강한 Tl^+ 염색이 잘 관찰되었다(Fig. 3).

한편 급성 CO 중독 30분 후 대뇌피질에서 피라미드 뉴론 및 중간뉴론에서 Tl^+ 흡수가 감소하였으며, 특히 피라미드 뉴론의 세포체에서 Tl^+ 염색이 감소할 뿐만 아니라 수상돌기에서도 감소하여 수상돌기의 길이가 감소하거나 수상돌기가 없이 세포체만 관찰되는 사례가 증가되었다.

급성 CO 중독 5일 후 대뇌피질의 피라미드 뉴론 및 중간뉴론에서 급성 CO 중독 30분 후와 비교하여 대뇌피질의 피라미드 뉴론에서 Tl^+ 흡수가 증가하였으나 정상 대조군과 비교하여 감소하였다(Fig. 1, 2).

한편 자동 영상분석프로그램을 이용하여 급성 CO 중독에 의한 대뇌피질의 4-5층에서 피라미드 뉴론의 Tl^+ 흡수

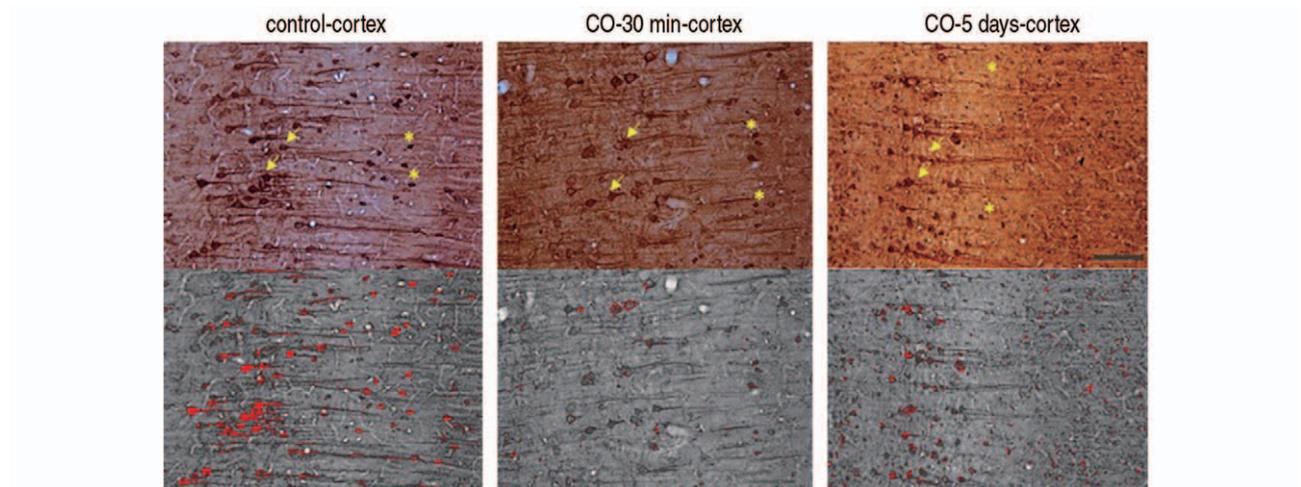


Fig. 3. Changes in Tl^+ ion uptake in the layer 4-5 of the somatosensory cortex rat brains following acute CO intoxication. Upper photographs, autometallographic images for Tl^+ ion uptake; Lower photographs, pseudo-colored image of Tl^+ ion uptake. Arrows indicate Tl^+ ion uptake in the pyramidal neurons and asterisks (*) represent interneurons. There was a marked reduction of Tl^+ ion uptake at 30 min after acute CO intoxication. Scale bar, 100 μm .

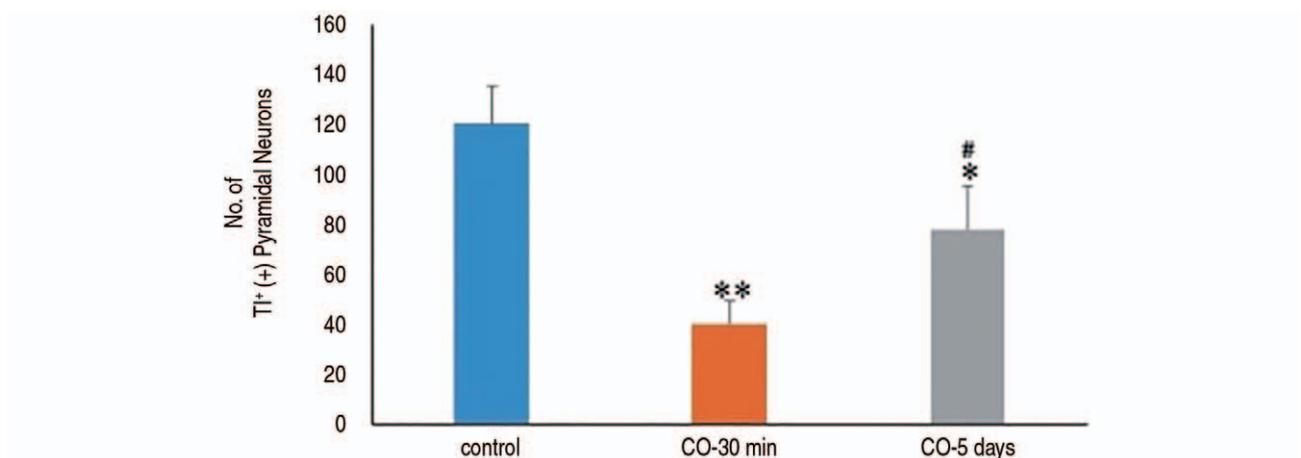


Fig. 4. Statistical analysis of changes in Tl^+ ion uptake in the pyramidal neurons at the 4-5 layers of the somatosensory cortex following acute CO intoxication. For quantification of gray scale value of the Tl^+ ion uptake, pixels were thresholded via the Image J and cells with gray values above threshold were counted using the built-in function 'Analyze Particles'. Other notations are the same as in previous figures.

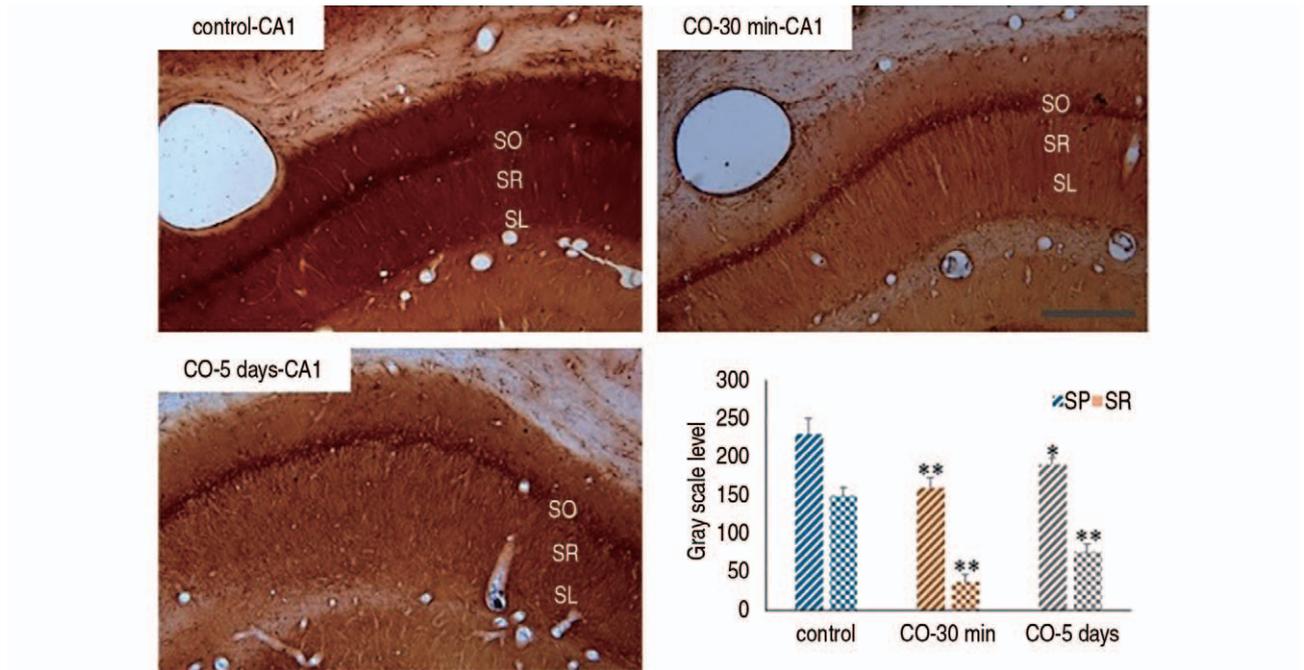


Fig. 5. Changes in Tl^+ ion uptake in the hippocampal CA1 area following CO intoxication. Three photographs shows autometallographic images for Tl^+ ion uptake in the stratum pyramidalis (SP) and stratum radiatum (SR) layers of pyramidal neurons of the CA1 area of 3 experimental groups. Bar histogram represents statistical analysis of changes in Tl^+ ion uptake in the SP and SR of pyramidal neurons of CA1 area of 3 experimental groups. SL, stratum lacunosum. Other notations are the same as in previous figures. Scale bar, 200 μ m.

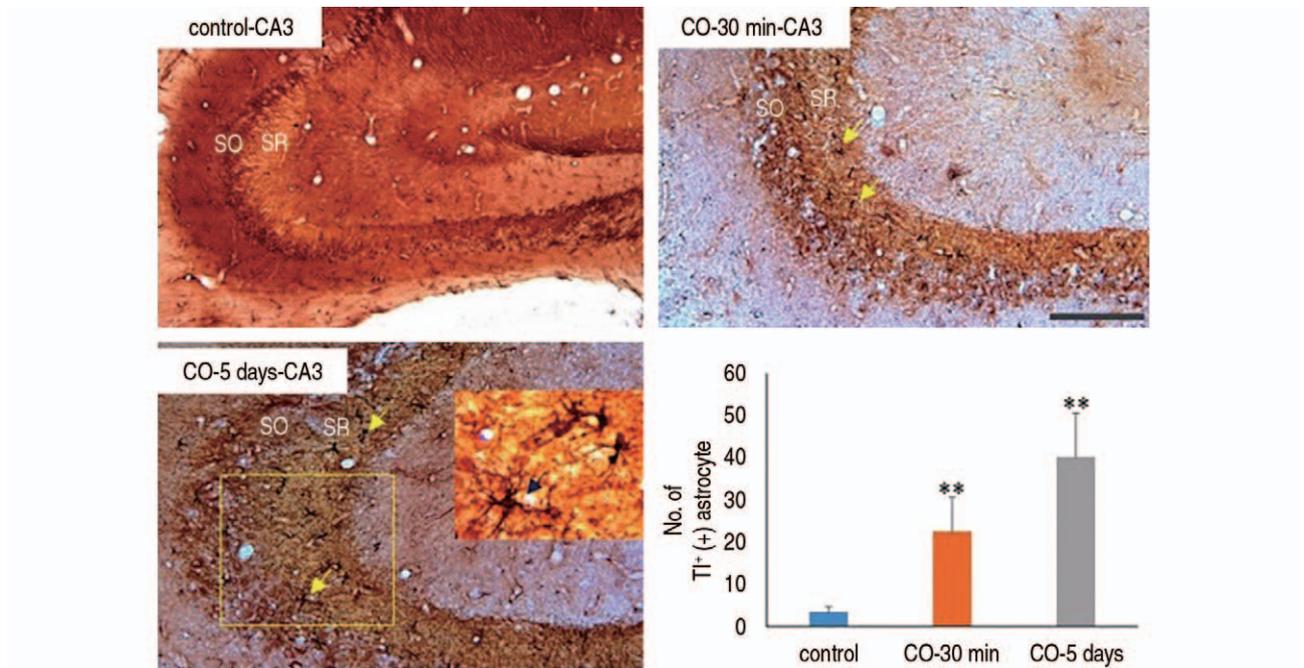


Fig. 6. Changes in Tl^+ ion uptake in the hippocampal CA3 area following acute carbon monoxide (CO) intoxication. Three photographs shows autometallographic images for Tl^+ ion uptake in the CA3 area of 3 experimental groups. Arrows indicate astrocytes with a marked cellular uptake of Tl^+ ion. In the photograph of CO-5days-CA3, high magnification image show typical morphology of astrocyte from yellow square area of low magnification image. Bar histogram represents statistical analysis for the number of high Tl^+ ion uptake- positive astrocytes in the SP and SR layers of pyramidal neurons of CA3 area of 3 experimental groups. Other notations are the same as in previous figures. Scale bar, 200 μ m.

정도를 정량적으로 분석하였을 때 대조군에서 120.4 ± 15.4 개, CO-30 min 군에서 40.5 ± 9.3 개, CO-5 days 군에서 78.4 ± 17.3 개로 대조군과 비교하여 CO-30 min 군과 CO-5 days 군이 각각 유의한 차이가 있었으며 ($p < 0.01$), CO-30 min 군과 CO-5 days 군 사이에서도 유의한 차이가 보였다($p < 0.05$) (Fig. 4).

대조군의 해마에서 CA (Cornu Ammonis) 1 영역의 피라미드 뉴런에서 TI^+ 의 흡수가 저명하게 관찰되었는데, 이때 세포체가 밀집한 피라미드층(stratum pyramidalis, SP)에서 가장 강하게 흡수가 관찰되었고 수상돌기들이 밀집한 방사층(stratum radiatum, SR)와 소강층(stratum lacunosum, SL)에서는 수상돌기에 TI^+ 이 흡수되어 암갈색의 가는 선으로 관찰되었다(Fig. 5).

영상분석프로그램을 이용하여 CO-30 min 군과 CO-5 days 군에서 급성 CO 중독에 의한 CA 1영역 피라미드세포의 SR층에서 thallium 흡수 정도를 8-bit gray 값으로 정량하였을 때 대조군에서 225.4 ± 10.4 값, CO-30 min 군에서 $55. \pm 2.2$ 값, CO-5 days 군에서 144.5 ± 5.5 값으로 대조군과 비교하여 CO-30 min 군($p < 0.01$)과 CO-5 days 군($p < 0.05$)이 각각 유의한 차이가 있었다(Fig. 5).

한편 CA 3 영역의 SR층과 SO층에서 CO 중독에 의해

선택적으로 정상세포와 형태학적으로 유사한 세포들에서 강한 TI^+ 흡수가 관찰되었으며 이러한 현상은 CO-30 min 군과 CO-5 days 군에서 모두 관찰되었으며 CO-5 days 군에서 유의하게 더욱 증가되었다($p < 0.01$) (Fig. 6). 그러나 다른 뇌 영역에서는 이러한 현상이 관찰되지 않았다.

3. 급성 CO 중독 후 해마 CA3 영역에서 정상세포의 변화

급성 CO 중독에 의한 해마 CA3 영역에서 정상세포의 수적변화를 확인하기 위하여 대조군과 CO-5 days 군의 3 예에서 뇌절편을 대상으로 정상세포의 단백질 표지자인 GFAP에 대한 형광면역조직화학검사를 실시하였다. 대조군에 비하여 급성 CO 중독 5일 후 해마 CA3 영역에서 정상세포의 표지자인 GFAP 단백질 발현은 유의하게 감소되었다($p < 0.01$) (Fig. 7).

4. 급성 CO 중독 후 대뇌피질 및 해마에서 NeuN 양성 신경세포의 변화 및 조직학적 변화

정상 대조군과 CO-5 days 군에서 뇌절편을 대상으로 신경세포의 단백질 표지자인 NeuN에 대한 면역조직화학

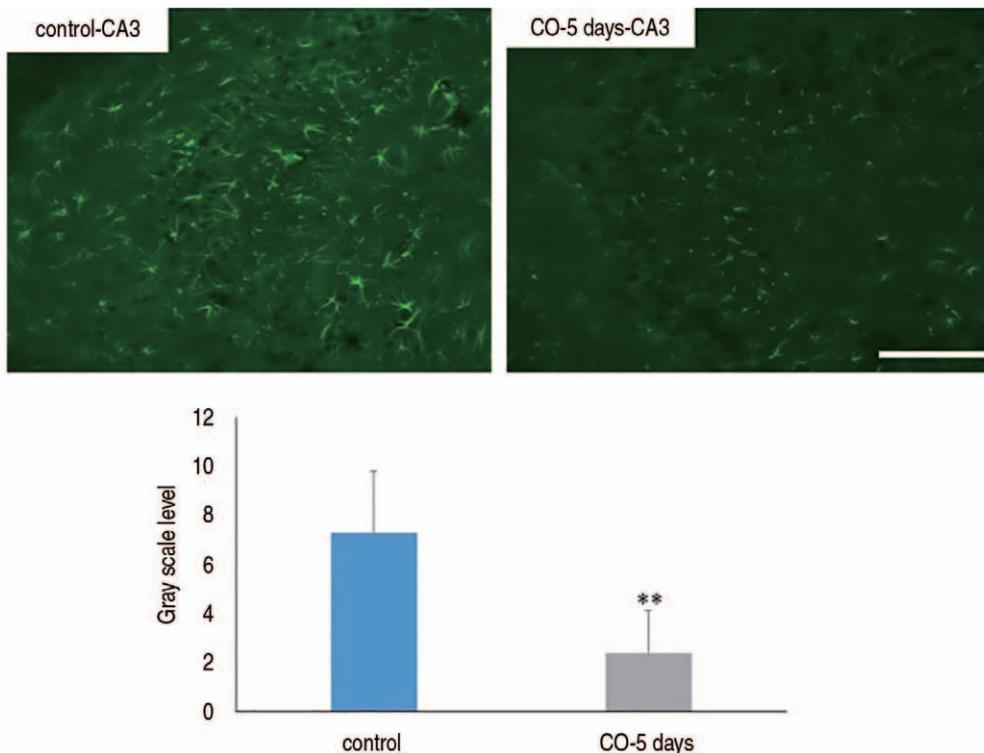


Fig. 7. Distribution of GFAP (+) astrocytes in the hippocampal CA3 area of control and CO-5 days groups. Two photographs show confocal microscopic images for immunofluorescent GFAP (+) astrocytes in the CA3 area. Bar histogram represents statistical analysis of GFAP immunoreactivity levels in the hippocampal CA3 area of control and CO-5 days groups. Other notations are the same as in previous figures. Scale bar, 200 μ m.

검사를 실시 후 대뇌피질 및 해마에서 신경세포의 수적 변화를 관찰하였다. CO-5 days 군의 대뇌피질 및 해마에서

NeuN 양성 뉴런 수가 대조군과 유사하여 신경세포의 유의한 사멸이 관찰되지 않았다(Fig. 8).

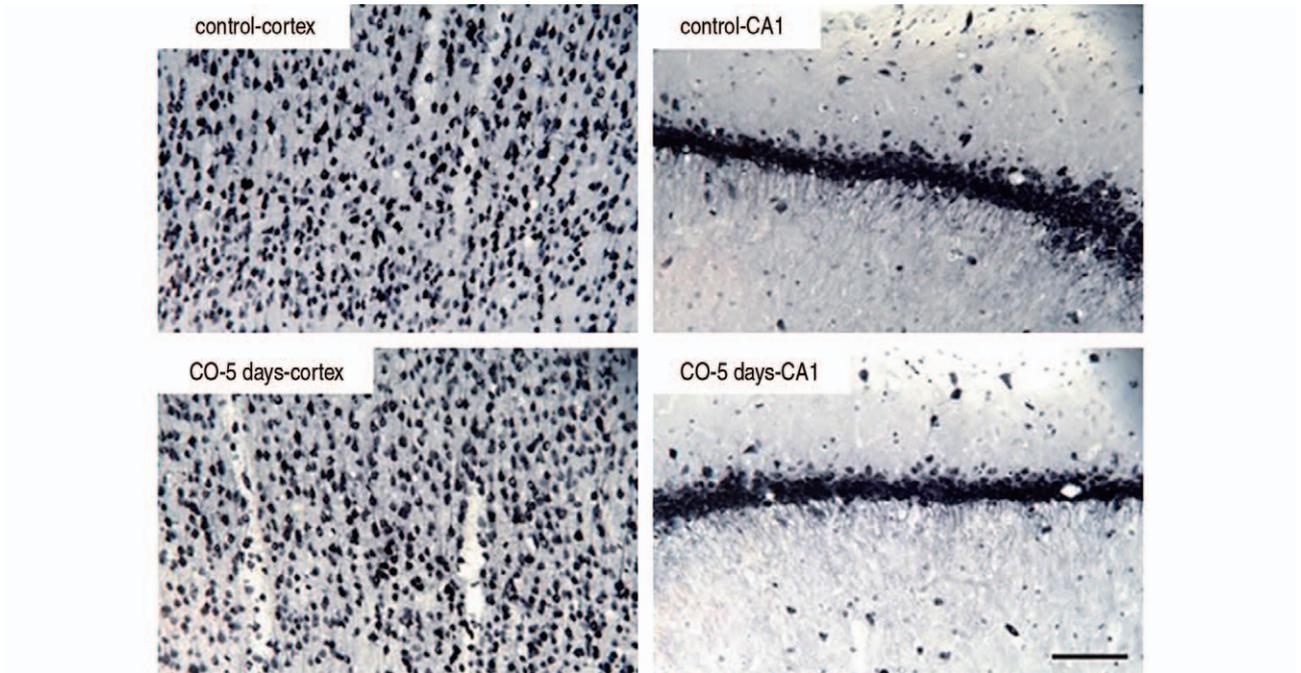


Fig. 8. Representative photographs showing high magnification images of NeuN immunoreactive neurons in the 4-5 layers of somatosensory cortex and hippocampal CA1 area of control and CO-5 days groups. Protocol of acute CO intoxication used in this study results in a minimal changes in the number of NeuN immunoreactive neurons in the cortex and hippocampus. Scale bar, 100 μ m.

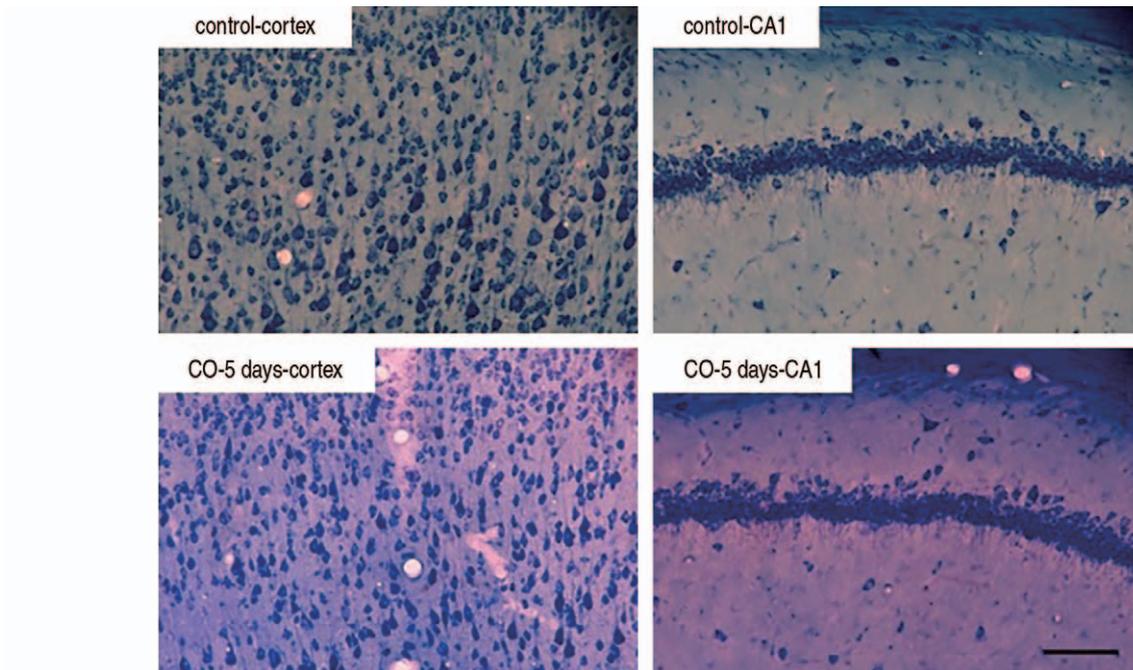


Fig. 9. Representative photographs showing high magnification images of toluidine blue stained cells in the 4-5 layers of somatosensory cortex and hippocampal CA1 area of control and CO-5 days groups. There are no significant histological markers for cell death such as a cavitation around nucleus and the presence of pyknotic homogenous nuclei in these structures 5 days after acute CO intoxication (CO-5 days groups). Scale bar, 100 μ m.

또한 toluidine blue 염색 검사에서 CO-5 days 군의 대뇌피질 및 해마에서 신경세포의 손상을 의미하는 니슬소체, 세포의 위축, 핵의 응축, 색소용해 같은 조직학적 소견은 관찰되지 않았다(Fig. 9).

고찰

본 연구는 흰쥐를 대상으로 1100 ppm CO 농도에 40분, 이후 3000 ppm CO 농도에 20분 간 노출하여 급성 CO 중독을 초래하고, 중독 30분과 5일 후에 thallium autometallography를 실시하여 전뇌 주요부위에서 Tl^+ 흡수의 변화를 영상화하고 정량적으로 분석하였다. CO 중독 30분 후 대조군과 비교하여 대뇌피질, 해마, 시상, 및 선조체 등의 주요 전뇌 영역들에서 Tl^+ 염색정도가 유의하게 감소하였다. 이때 세포수준 관찰에서 급성 CO 중독 30분 후 대뇌피질에서 피라미드 뉴런의 세포체 및 수상돌기, 중간뉴런의 세포체에서 Tl^+ 이온의 흡수가 유의하게 감소하였다. 또한 해마 CA1 영역의 피라미드 뉴런의 세포체 집단인 피라미드층과 수상돌기 영역인 방사층에서 Tl^+ 이온의 흡수가 70% 이상 감소하였다. 한편, 급성 CO 중독에 의한 신경세포의 Tl^+ 흡수 변화에 대한 사전연구가 거의 없어 본 연구가 전뇌 주요 구조물들의 신경세포들에서 급성 CO 중독이 Tl^+ 흡수를 억제함을 제시하는 첫 번째 실험으로 사료된다.

Tl^+ 는 1가 양이온으로 K^+ 이온의 유사체로 세포 내외에서 Na^+-K^+ ATPase의 작용으로 K^+ 이온의 유사한 형태로 세포 내로 이동을 한다. 따라서 Tl^+ 의 세포 내 이동은 ATP 생성을 하는 미토콘드리아의 기능, 포도당대사, 신경세포의 전기적 흥분성과 밀접한 관계가 있다¹⁾. 한편 급성 CO 중독이 신경세포들에서 Tl^+ 흡수가 어떻게 감소하는 지에 대한 정확한 기전을 아직은 알 수 없는 실정이다. 다만 생쥐에서 일측 중대뇌동맥을 15분간 폐쇄 후 선조체 신경세포들에서 선택적으로 Tl^+ 흡수가 감소되었으며 허혈 기간이 늘어남에 따라서 선조체 이외 대뇌피질에서도 Tl^+ 흡수가 감소되었다. 이때 Nissl 조직 염색상 세포피사의 조직학적 소견을 보이는 곳에서 Tl^+ 흡수가 완전히 소실됨으로써 에너지 대사가 완전히 차단되어 Na^+-K^+ ATPase 기능이 완전 소실되면 Tl^+ 흡수가 일어나지 않음을 보였다¹⁴⁾. 또한 개의 심장에 일시적 허혈 손상 후 세포의 에너지 대사가 감소한 심장근육에서 Tl^+ 흡수가 감소하였고, 이때 허혈 시간과 Tl^+ 흡수율이 반비례 관계를 보였다. 또한 임상적으로도 ²⁰¹Tl-SPECT 검사가 심장의 허혈 손상 정도를 평가하는 좋은 영상기법 중의 하나로 사용되고 있다¹⁵⁾. 따라서 본 연구결과와 상기 연구결과들을 고려했을 때 다

양한 원인들에 의한 저산소 및 허혈 상태에서 에너지 대사 장애로 인해 뇌 및 심장 세포들의 Tl^+ 흡수가 감소될 수 있음을 보여 준다.

지금까지 CO 중독에 의한 세포손상 기전은 아직까지 정확히 알려져 있지 않으나 기본적으로 저산소 및 재순환 과정에 의한 다양한 병태생리학적 현상들이 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 병태생리학적 현상들 중에 반응성 산소종(reactive oxygen species)의 증가에 의한 산화성 스트레스(oxidative stress)가 급성 CO 중독 후 신경세포 손상의 발생기전들 중에 하나로 인식되고 있다(Akyol et al., 2014). 특히 뇌 신경세포들은 높은 에너지 대사율, 낮은 항산화효소 농도, 세포질용적대비 높은 세포막 표면적 등의 이유로 산화성 스트레스에 의한 세포손상이 쉽게 초래됨이 알려져 있다¹⁶⁾. 산화성 스트레스는 미토콘드리아 장애, 지방 과산화 현상 등을 초래하며 이들 현상들이 악순환 되면서 세포손상을 더욱 가속시킨다. CO 중독이 뇌에서 산화성 스트레스를 초래한다는 많은 실험적 증거들이 보고되었으며¹⁶⁾, 특히 1000 ppm CO 농도에서 60분 간 노출시킨 후 30분 이내 희생한 흰쥐의 뇌에서 질소산화물 및 nitrotyrosine 단백질 발현이 증가됨으로 산화성 스트레스가 관찰되었다^{17,18)}. 이러한 낮은 농도의 CO 노출에서도 산화성 스트레스가 관찰된다는 상기 연구결과를 고려해 볼 때, 본 연구의 급성 CO 모델의 뇌에서 산화성 스트레스가 초래될 가능성이 높음을 암시할 수 있다.

CO 중독이 Na^+-K^+ ATPase 활성화에 영향을 미친다는 직접적인 연구는 거의 없으나 저산소 및 산화성 스트레스가 Na^+-K^+ ATPase 활성화 및 단백질에 영향을 준다는 실험적 증거들이 보고되었다. 즉, 흰쥐에서 만성 스트레스를 유발하면 전두엽에서 Na^+-K^+ ATPase 활성이 감소되는데 이때 항산화제를 투여하면 이러한 Na^+-K^+ ATPase활성 감소가 적게 나타났다¹⁹⁾. 흰쥐의 뇌에서 Carbofuran 약물로 유도되는 산화성 스트레스에 의한 Na^+-K^+ ATPase활성 감소를 항산화제인 비타민E의 전처치로 활성을 증가시켰다²⁰⁾. 흰쥐 심장근에서도 허혈-재순환 손상에 의한 산화성 스트레스가 Na^+-K^+ ATPase 단백질 및 mRNA 발현량을 감소시켰다^{21,22)}. 따라서 본 연구에서 CO 중독 30분 후 대뇌피질 및 해마의 신경세포들에서 Tl^+ 이온의 흡수는 CO 중독 초기에 발생하는 산화성 스트레스에 의한 Na^+-K^+ ATPase 활성화 감소가 주된 원인으로 추측된다. 추가적 연구를 통하여 급성 CO 중독 모델의 뇌에서 산화성 스트레스와 Tl^+ 감소의 연관성을 규명해야 할 것으로 사료된다.

본 연구에서 CO-5 days 군에서 toluidine blue 염색 검사에서 대뇌피질 및 해마에서 신경세포의 손상에 대한 조직학적 소견이 관찰되지 않았으며 NeuN 면역조직화학

검사에서 이들 영역들에서 대조군과 CO-5 days 군 간에 신경세포의 수적 차이는 거의 보이지 않았다. 이는 본 연구에서 제작한 급성 CO 중독 모델에서 신경세포의 사멸이 현저하게 관찰되지 않음을 의미한다. 본 연구와 유사한 조건에 급성 CO 중독을 유발한 선행 연구들에서도 대뇌 및 해마에서 신경세포의 사멸에 대한 상반된 연구들이 보고되었다. 즉, Watanabe 등(2010)은 급성 CO 중독 7일 후 흰쥐의 피질 및 해마에서 신경세포의 사멸 및 손상에 대한 조직학적 변화가 관찰되지 않았음을 보고하여²³⁾, 본 연구결과와 유사하였다. 그러나 다수의 실험연구들에서는 7일 이내 대뇌 및 해마에서 10-20% 신경세포의 사멸이 관찰되었다^{12,24)}. 또한 본 연구보다 높은 0.5-0.8% CO 농도에서 흰쥐를 60분간 노출 시킨 후 7일째에 관찰한 해마 및 대뇌피질에서 신경세포의 손상이 발견되지 않았으나 일측 경동맥을 차단하는 경우에는 세포사멸이 관찰되었다²⁵⁾. 한편 같은 CO 농도에 노출되더라도 연구자에 따라서 CoHb 농도가 차이가 있었는데 예를 들어 3000 ppm에서 노출시간과 무관하게 혈액에서 CoHb의 농도가 55-80%의 변동성을 보였다¹⁰⁾. 따라서 같은 실험동물을 대상으로 유사한 환경에서 급성 CO 중독을 유발한다고 하더라도 실험조건 즉, 챔버 내 온도, 이산화탄소 농도, 챔버 크기 등에 많은 영향을 받는 것으로 사료된다. 이와 함께 설치류의 헤모글로빈은 사람과 비교하여 CO에 대한 결합력이 낮고²⁶⁾, CO 중독 초기 순간적인 뇌 혈류의 증가로 사람과 비교하여 CO 중독에 의한 뇌 손상이 심하지 않는 것으로 알려져 있다²⁷⁾. 따라서 설치류를 대상으로 급성 CO 중독에 의한 뇌 신경세포 사멸에 대한 연구는 다양한 실험 환경들을 충분히 통제해야 하고, 실험동물 중에 따른 신경세포의 사멸 민감도 등도 고려해야 될 것으로 사료된다.

한편 본 연구에서 급성 CO 중독 5일 후 대뇌 주요 부위 및 해마에서 대조군과 비교하여 TI^+ 흡수가 유의한 감소를 보임으로써 신경세포의 사멸은 관찰되지 않았으나 Na^+-K^+ ATPase 활성변화는 지속적으로 진행되고 있음을 의미할 수 있다. 흰쥐를 1000 ppm CO 농도에서 60분간 노출한 다음 5일 후에 뇌에서 지질과산화(lipid peroxidation)가 증가되었는데 이 때 항산화 효과를 위한 resveratrol 전처리로 이러한 현상들이 감소되었다²⁸⁾. 이러한 결과는 급성 CO 중독 7일 후까지도 산화성 스트레스 손상이 지속되어 Na^+-K^+ ATPase 활성 감소가 유지되고 신경세포들에서 TI^+ 흡수 감소가 진행될 수 있음을 의미한다. 흰쥐의 청각피질영역에 선택적으로 저온 자극을 하면 신경세포들의 전기적 흥분성이 감소함과 동시에 신경세포에서 TI^+ 흡수 감소가 나타나서, TI^+ 흡수와 전기적 흥분성 간에 상관성을 보였다. 이러한 선행결과는 본 연구에서 관찰한 신경

세포의 TI^+ 흡수의 지속적 감소가 신경세포의 전기적 흥분성의 변화에 기인할 수 있음을 가정할 수 있다. 그러나 이러한 현상을 증명하기 위하여 전기생리학적 방법을 사용하여 본 실험모델에서 대뇌 및 해마의 전기적 흥분성의 변화를 확인할 추가적 연구들이 요구된다.

한편 해마 CA3 영역에서 급성 CO 중독 30분 후 일부 정상세포에서 강한 TI^+ 흡수가 관찰되었으며, CO 중독 5일째에서 유의한 수적 증가를 보였다. 그러나 급성 CO 중독 5일 후 해마 CA3 영역에서 정상세포의 표지자인 GFAP 단백질의 발현은 유의하게 감소되었다. 급성 CO 중독 모델에서 정상세포의 변화에 대한 선행연구들이 거의 없어 이러한 현상들의 발생기전을 정확히 설명하기 어려운 실정이다. 다만 배양된 아교세포종에서 TI^+ 흡수 정도는 세포막 전위와 관련이 있고 K^+ 이온의 투과도에 비례함으로써 신경세포, 심장세포와 유사한 TI^+ 흡수 기전을 보였다²⁹⁾. 임상적으로 ²⁰¹Tl-SPECT 검사에서 아교세포종에서 악성 정도가 클수록 암세포들에서 TI^+ 흡수가 비례적으로 증가되었다³⁰⁾. 따라서 이러한 연구결과를 고려해 볼 때 본 연구에서 해마 CA3 영역에서 TI^+ 흡수가 증가된 정상세포는 CO 중독 동안 정상세포의 흥분성 증가 또는 에너지 대사 증가에 기인한 것으로 추측할 수 있다. 그러나 이들 정상세포들에서 TI^+ 흡수 증가 기전과 이들 세포들의 기능을 규명하기 위한 추후 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

결론

본 연구는 흰쥐를 대상으로 1100 ppm CO 농도에 40분, 이후 3000 ppm CO 농도에 20분간 노출하여 급성 CO 중독을 초래하고, 중독 30분과 5일 후에 thallium autometallography을 실시하였다. 정상 대조군과 비교하여 급성 CO 중독 후 대뇌피질, 해마, 시상, 및 선조체에서 TI^+ 흡수가 유의하게 감소하였다. 급성 CO 중독에 의한 TI^+ 흡수 감소가 피질 및 해마의 피라미드 뉴론의 세포체 및 수상돌기에서도 관찰되었다. 또한 해마 CA3 영역에서 정상세포에서 TI^+ 흡수가 선택적으로 강하게 관찰되었다. 그러나 toluidine blue 염색 검사 및 NeuN 면역조직화학 검사에서 급성 CO 중독으로 대뇌피질 및 해마에서 신경세포의 손상 및 사멸은 초래되지 않았다. 따라서 본 연구를 통하여 신경세포의 심한 손상이 경미한 급성 CO 중독 모델에서 thallium autometallography가 뇌의 기능성 변화를 조직학적 수준에서 관찰할 수 있는 새로운 실험적 기법으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

ORCID

Min Soo Lee (<https://orcid.org/0000-0001-7285-7036>)

Jun Ho Heo (<https://orcid.org/0000-0001-7011-0713>)

참고문헌

- Rose JJ, Wang L. Carbon Monoxide Poisoning: Pathogenesis, Management, and Future Directions of Therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2017; 195:596-606.
- Gorman D, Drewry A, Huang YL, et al. The clinical toxicology of carbon monoxide. *Toxicology* 2003; 187:25-38.
- Raub JA, Mathieu-Nolf M, Hampson NB, et al. Carbon monoxide poisoning--a public health perspective. *Toxicology* 2000; 145:1-14.
- Lee JS, Song JH, Lim BS. Characteristics of suicide by carbon monoxide poisoning in Korea. *J Korean Official Stat* 2016; 21:57-83.
- Choi YR, Cha ES, Chang SS, et al. Suicide from carbon monoxide poisoning in South Korea: 2006-2012. *J Affect Disord* 2014; 167:322-5.
- Cho Y, Effects of acute carbon monoxide poisoning on venous thromboembolism: a population-based study, in Department of Emergency Medicine. 2019, Hanyang University, Seoul. p. 1-2.
- Oh S, Choi SC. Acute carbon monoxide poisoning and delayed neurological sequelae: a potential neuroprotection bundle therapy. *Neural Regen Res* 2015; 10:36-8.
- Kim DM, Lee IH, Park JY, et al. Acute carbon monoxide poisoning: MR imaging findings with clinical correlation. *Diagn Interv Imaging* 2017; 98:299-306.
- Prockop LD. Carbon monoxide brain toxicity: clinical, magnetic resonance imaging, magnetic resonance spectroscopy, and neuropsychological effects in 9 people. *J Neuroimaging* 2005; 15:144-9.
- Penney DG. Acute carbon monoxide poisoning: animal models: a review. *Toxicology* 1990; 62:123-60.
- Prockop LD, Chichkova RI. Carbon monoxide intoxication: an updated review. *J Neurol Sci* 2007; 262:122-30.
- Bi M, Li Q, Guo D, et al. Sulphoraphane Improves Neuronal Mitochondrial Function in Brain Tissue in Acute Carbon Monoxide Poisoning Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2017; 120:541-49.
- Goldschmidt J, Zuschratter W, Scheich H. High-resolution mapping of neuronal activity by thallium autometallography. *Neuroimage* 2004; 23:638-47.
- Stober F, Baldauf K, Ziabreva I, et al. Single-cell resolution mapping of neuronal damage in acute focal cerebral ischemia using thallium autometallography. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014; 34:144-52.
- Patel RA, Beller GA. Prognostic role of single-photon emission computed tomography (SPECT) imaging in myocardial viability. *Curr Opin Cardiol* 2006; 21:457-63.
- Evans PH. Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br Med Bull* 1993; 49:577-87.
- Ischiropoulos H, Beers MF, Ohnishi ST, et al. Nitric oxide production and perivascular nitration in brain after carbon monoxide poisoning in the rat. *J Clin Invest* 1996; 97:2260-7.
- Meilin S, Rogatsky GG, Thom SR, et al. Effects of carbon monoxide on the brain may be mediated by nitric oxide. *J Appl Physiol* (1985) 1996; 81:1078-83.
- Novaes LS, Dos Santos NB, Dragunas G, et al. Repeated Restraint Stress Decreases Na,K-ATPase Activity via Oxidative and Nitrosative Damage in the Frontal Cortex of Rats. *Neuroscience* 2018; 393:273-83.
- Jaiswal SK, Siddiqi NJ, Sharma B. Carbofuran induced oxidative stress mediated alterations in Na(+)-K(+)-ATPase activity in rat brain: amelioration by vitamin E. *J Biochem Mol Toxicol* 2014; 28:320-7.
- Ostadal P, Elmoselhi AB, Zdobnicka I, et al. Role of oxidative stress in ischemia-reperfusion-induced changes in Na+,K(+)-ATPase isoform expression in rat heart. *Antioxid Redox Signal* 2004; 6:914-23.
- Ostadal P, Elmoselhi AB, Zdobnicka I, et al. Ischemia-reperfusion alters gene expression of Na+-K+ ATPase isoforms in rat heart. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 306:457-62.
- Watanabe S, Matsuo H, Kobayashi Y, et al. Transient degradation of myelin basic protein in the rat hippocampus following acute carbon monoxide poisoning. *Neurosci Res* 2010; 68:232-40.
- Zhao N, Liang P, Zhuo X, et al. After Treatment with Methylene Blue is Effective against Delayed Encephalopathy after Acute Carbon Monoxide Poisoning. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2018; 122:470-80.
- Koroleva VI, Korolev OS, Mares V, et al. Hippocampal damage induced by carbon monoxide poisoning and spreading depression is alleviated by chronic treatment with brain derived polypeptides. *Brain Res* 1999; 816:618-27.
- Watson ES, Jones AB, Ashfaq MK, et al. Spectrophotometric evaluation of carboxyhemoglobin in blood of mice after exposure to marijuana or tobacco smoke in a modified Walton horizontal smoke exposure machine. *J Anal Toxicol* 1987; 11:19-23.
- Laas R, Igloffstein J, Meyerhoff S. Cerebral infarction due to carotid occlusion and carbon monoxide exposure. I. Pathophysiological and neuropathological investigations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1983; 46:756-67.
- Tabrizian K, Shahraki J, Bazzi M, et al. Neuro-Protective

- Effects of Resveratrol on Carbon Monoxide-Induced Toxicity in Male Rats. *Phytother Res* 2017; 31:1310-15.
29. Brismar T, Collins VP, Kesselberg M. Thallium-201 uptake relates to membrane potential and potassium permeability in human glioma cells. *Brain Res* 1989; 500:30-6.
30. Igase K, Oka Y, Ohta S, et al. Usefulness of thallium-201 single photon emission computed tomography to quantify the malignancy grade of brain tumors. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 1996; 36:434-9.