

**Légzésmechanika és tüdőstruktúra az emphysema rágcsáló
modelljeiben
(Respiratory mechanics and lung structure in rodent models
of emphysema)**

Dr. Szabari Margit Veronika
Szegedi Tudományegyetem
Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet

PhD Tézis
Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola
Témavezető: Prof. Hantos Zoltán

Szeged, 2015

A tézisek alapjául szolgáló közlemények jegyzéke

- I. Z. Hantos, Á. Adamicza, T. Jánosi, **M.V. Szabari**, J. Tolnai and B. Suki: **Lung volumes and respiratory mechanics in elastase-induced emphysema in mice.** *Journal of Applied Physiology*, 105: 1864–1872 (2008), impakt faktor: 3,658
- II. J. Tolnai, **M.V. Szabari**, G. Albu, B.A. Maár, H. Parameswaran, E. Bartolák-Suki, B. Suki and Z. Hantos: **Functional and morphological assessment of early impairment of airway function in a rat model of emphysema.** *Journal of Applied Physiology*, 112: 1932–1939 (2012), impakt faktor: 3,484
- III. **M.V. Szabari**, J. Tolnai, B.A. Maár, H. Parameswaran, E. Bartolák-Suki, B. Suki and Z. Hantos: **Lung structure and function relation in elastase-treated rats: a long-term follow up study.** *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 215: 13–19 (2015), impakt faktor: 1,971
- IV. **M.V. Szabari**, H. Parameswaran, S. Sato, Z. Hantos, E. Bartolák-Suki and B. Suki: **Acute mechanical forces cause deterioration in lung structure and function in elastase-induced emphysema.** *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 303: L567–L574 (2012), impakt faktor: 3,523

A tézisekhez kapcsolódó közlemény:

- V. B. Suki, S. Sato, H. Parameswaran, **M.V. Szabari**, A. Takahashi and E. Bartolák-Suki: **Emphysema and mechanical stress-induced lung remodeling.** *Physiology*, 28: 404–413 (2013), impakt faktor: 5,645

BEVEZETÉS

A krónikus obstruktív légzőszervi megbetegedés (chronic obstructive pulmonary disease (COPD)) a harmadik vezető halálok a világban. Nehézlégzéssel, köhögéssel, légúti szűkülettel és váladéktermeléssel járó megbetegedés, mely két betegséget is magában foglal: a krónikus bronchitist és az emphysemát.

Az emphysema egy lassan progrediáló betegség, melyben a légterek falai károsodnak. Ennek következtében a tüdő jelentős mértékben kitágul és a tüdőszövet retrakciós ereje lecsökken. Kialakulásában feltételezhetően több folyamat is közrejátszik, úgy mint a protease–antiprotease egyensúly felbomlása, gyulladás, valamint az extracelluláris mátrix abnormális újrastrukturálódása. A szöveti károsodás miatti retrakciós kapacitás csökkenése megváltoztatja a mellkasfal és a tüdő közötti rugalmas egyensúlyt, ami megemeli a kilégzésvégi tüdőtérfogatot, még anélkül is, hogy dinamikus hiperinfláció lépne fel. Ráadásul, a szöveti destrukció gyengíti a légutakat kifeszítő és nyitva tartó erőket. Valószínűsíthető, hogy a rugalmas erők gyengülése önmagában elegendő ahhoz, hogy csökkentse a transzbronchiális nyomást és következményesen a légutak átmérőit is, de ez a hipotézis ez idáig még nem bizonyított. A COPD korai tünetmentes szakaszáról - amikor még nincs légúti érintettség, és a tüdő funkciója (FEV₁ érték) még nem csökkent - nem sokat tudunk, így a betegség ezen szakaszának megértése rendkívül nehéz. Éppen ezért fontos, hogy megfelelő állatkísérletes modelleken, részletes légzésmechanikai mérésekkel próbájuk megérteni a betegség ezen szakaszának pathomechanizmusát.

Míg a tüdőtérfogatok változásai az emphysema alapvető és standard módszerekkel mérhető jellegzetességei, addig a légutak funkcionális vizsgálata szinte kizárólagosan spirometriás méréseken alapul. A légzőrendszeri mechanika legrészletesebb mérésének módja az alacsonyfrekvenciás kényszerített oszcilláció módszere (low-frequency forced oscillation technique (LFOT)), mely lehetővé teszi a légutak és a tüdőszövet mechanikájának elkülönítését légzésszünetben, mely utóbbi miatt csak kevés humán vizsgálat alkalmazta ezt a technikát. Állatkísérletekben ezzel szemben nem az apnoés állapot elérése, hanem a tüdőtérfogat precíz mérése jelenti a problémát.

Az elasztázzal létrehozott emphysema rágszáló modelljeit széleskörben alkalmazzák, mivel rövid időn belül, egy hónap múlva kialakul az emphysema az állatokban. Ám ezzel ellentétben a humán betegség lassan progrediál, és középkorú emberekben okozza az első

tüneteket. Ahhoz, hogy megértsük a megbetegedés kialakulását és krónikus progrediálását követéses vizsgálatok szükségesek, melyek a szöveti destrukció légzésfunkcióra gyakorolt hatását tanulmányozzák. Mivel azonban az ismételt intubációs technika altatót rágcsálóknak speciális felkészültséget kíván, a legtöbb tanulmány keresztmetszeti vizsgálatokban tanulmányozza az emphysema előrehaladását. Mindemellett kevés figyelem fordult eddig arra a kérdésre, hogy a csökkenő kifeszítő erők hogyan befolyasolják a légutak funkcióját.

A COPD-s betegekre jellemző, hogy tüdőterefogatuk és kilégzési légúti ellenállásuk megemelkedett, így nagyobb erők feszítik és nyújtják meg a szöveteket. Ezen betegeknél időről-időre akut fellángolás történik, ami nehézlégzéssel, súlyos köhögéssel és váladékképződéssel jár. Ezen akut exacerbációk (acute exacerbation of COPD (AECOPD)) megemelik a feszítő és nyújtó erőket a mellkasban, melyek tovább károsíthatják a tüdőszöveteket. Az AECOPD egyre gyakorrabba válik, ahogy a betegség előrehalad, ám pontosan még nem értjük, hogyan vezet ez a folyamat a tüdőfunkció irreverzibilis romlásához. Feltételezzük, hogy a mechanikai erők a kémiai meggyengített szöveten döntő szerepet játszanak a szövet destrukciójában és a funkció irreverzibilis romlásában, így együttes alkalmazásukkal klinikailag relevánsabb modell hozható létre az AECOPD vizsgálatára.

CÉLOK

Az értekezés elsődleges célja az volt, hogy megvizsgáljuk a tüdő struktúrális és funkcionális változásait az elasztáz-indukált emphysema kialakulása és progrediálása során. Ebben a tanulmányban LFOT technikát alkalmaztunk a légzőrendszer mechanikájának vizsgálatára, testpletizmográfiásan tüdőterefogatokat mértünk és különböző technikákkal vizualizáltuk a tüdő struktúráját. További célunk volt egy részleges AECOPD modell felállítása is. A specifikus célok a következők voltak:

I. tanulmány: Célunk az volt, hogy a légutak és a tüdőszövet mechanikáját a tüdőterefogatok függvényében kövessük, ehhez lassú be- és kilégzési manővereket vizsgáltunk.

II. tanulmány: Kíváncsiak voltunk arra, hogy az elasztáz-kiváltotta emphysemában a szöveti destrukció okoz-e változást a légutak funkciójában.

III. tanulmány: Mivel az emphyséma egy krónikus megbetegedés, elasztázkezelés állatmodellben vizsgáltuk a tüdő szöveti és strukturális változásait egy követéses, longitudinális tanulmányban egészen 105 napig.

IV. tanulmány: Célunk az volt, hogy felállítsunk egy exacerbációs modellt, melyben a kémiai meggyengített emphysémás szöveten mechanikai erőket alkalmazunk. Feltételeztük, hogy bár fertőzés az AECOPD kiváltója, mechanikai erők is hozzájárulnak a tüdőfunkció irreverzibilis romlásához. Modellünkben mély belégzési (deep inspiration (DI)) manővereket alkalmaztunk az emphyséma modell különböző fázisaiban.

MÓDSZEREK

LFOT-tal mértük a légzőrendszer impedanciáját, majd az impedanciára a konstans-fázisú modellt illesztettük és kiszámítottuk a légúti ellenállást (R_N), a szöveti rugalmasságot (H) és csillapítást (G). Testpletizmográfiásan tüdőterfogatok (funkcionális reziduális kapacitást: FRC) mértünk a Boyle-Mariott törvény szerint az állat spontán légzési manőverei, valamint bizonyos esetekben elektromosan stimulált légzőizmok mellett. Inspirációs kapacitást (IC) és expirációs rezerv térfogatot (ERV) mértünk, miközben a pletizmográfban a nyomás -35 és 20 H_2Ocm között változott. A teljes tüdőkapacitást (total lung capacity: TLC) és a reziduális volument (RV) az alábbiak szerint számoltuk: $TLC = FRC + IC$ és $RV = FRC - ERV$. Az I. tanulmány alatt lassú ki- és belégzési manőverek során követtük a légzőrendszer mechanikáját LFOT-tal. Epifluoreszcens mikroszkópiával (I. tanulmány), hagyományos hisztológiával (II-IV. tanulmány) vizsgáltuk az alveoláris struktúrát, kiszámítottuk a légterek átmérőjét (D_{alv}), súlyozott átlagát (D_2), a légutak (T_w) és alveolusok falvastagságát (W_t). A III. tanulmányban pedig orthogonális polarizációs spektrális (OPS) technikával *ex vivo* vizualizáltuk a subpleurális alveolusokat.

EREDMÉNYEK

I. tanulmány: Jelentős D_{alv} és D_2 emelkedést tapasztaltunk az elasztázal kezelte egerekben. A D_{alv} eloszlása az emphysémás csoportban eltolódott a nagyobb méretű légterek felé. A tüdőterfogatok szignifikáns emelkedése is alátámasztotta a betegség kialakulását. A kezelte állatokban a H 57% és 27%-kal nőtt meg 0 ill. 20 H_2Ocm -es transzrespiratórikus nyomáson (P_{rs}). Hszterezivitás (η), mely a G és a H hányadosa, 0 H_2Ocm -en 55%-kal, míg

20 H₂Ocm nyomáson 12%-kal emelkedett a beteg egerekben. Az R_N nem különbözött a két csoportban egyik P_{rs} értéken sem.

II. tanulmány: Az elasztázzal kezelt csoportban az FRC és az RV szignifikánsan (38 ill. 53%-kal) megemelkedett a kontrollokhöz képest. A G és H 76% ill. 62%-kal volt alacsonyabb a kezelt csoportban. Mivel a H jobban csökkent mint a G, az η magasabb volt az emphysemás állatokban (129%-kal). Az R_N ismét nem volt különböző a két csoportban. A D_{alv} eloszlása a nagyobb alveoláris méretek felé tolódott az elasztázzal kezelt patkányokban. T_w magasabb volt az emphysemás csoportban a kontrollokhöz képest (12,4 ill. 10,8 μ m).

III. tanulmány: A 105 napos követési periódus alatt FRC, TLC és RV fokozatosan emelkedett. A kontroll állatokban 75%-kal nőtt az FRC és 56%-kal az RV a kísérlet elejétől, addig a kezelt csoportban mindez 194 és 244%-os emelkedést jelentett. A két csoport között a különbség már a kísérlet 3. napjától kezdve megmutatkozott az FRC és RV értékeiben, míg a TLC-beli különbség csak a 21. naptól vált szignifikánssá. Az R_N nem különbözött a két csoportban a 105 napos kísérleti periódus alatt, míg a H és a η már a 3. naptól eltért. A D_{alv} a kísérlet 21. napjától mutatott különbséget a két csoport között, míg D₂ már a 3. naptól. Az emphysemás állatokban emelkedett W_t mutatkozott, valamint az OPS képződés képes volt a megnagyobbodott alveoláris méreteket a tüdő felszínén is detektálni 105 nappal az elasztáz kezelés után. Erős negatív kapcsolatot találtunk a H és a D_{alv} között a kontroll és a beteg patkányokban.

IV. tanulmány: A DI-ok által közvetített akut, enyhe mechanikai erők a következő elváltozásokat eredményezték: az FRC és a compliance (1/H) növekedett a DI-ok hatására, irreverzibilis struktúrális változásokat voltunk képesek detektálni a szövettani metszeteken 21 nappal az elasztáz kezelés után, bizonyítva ezzel, hogy egy kémiaiilag meggyengített extracelluláris mátrix szükséges ahhoz, hogy a mechanikai erők irreverzibilis hatást tudjanak kifejteni.

ÖSSZEFOGLALÁS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

1. Demonstráltuk, hogy (*I-III tanulmány*) az elasztázzal kezelt állatokban a tüdőszövet károsodott, a tüdőterfogatok és a compliance megemelkedett, modellezve a humán megbetegedést. Ennek ellenére a lecsökkent légutakat kifeszítő erők mégsem eredményeztek különbséget az R_N-ben a kontroll és az emphysemás csoportok között. Így ez a modell az

emphyséma korai, tünetmentes szakaszának felel meg, és arra is felhívja a figyelmet, hogy légúti obstrukcióhoz nem elégséges a mellkasfal és a tüdőszövet közötti rugalmas egyensúly megbomlása.

2. Kísérletünk során követtük az emphyséma progresszióját egyszeri elasztáz kezelés után (*III. tanulmány*). A 105 nap alatt emelkedett térfogatokat és tüdő compliance-t, de változatlan R_N -t találtunk. Ez az első stúdium, mely az OPS technikát a subpleurális alveolusok *ex vivo* vizualizációjára használta (mely így mentes az *in vitro* technika melléktemékeitől) és összehasonlította a hagyományos szövettani metszetek eredményeivel. Ráadásul erős struktúrális-funkcionális korrelációt fedeztünk fel az alveoláris méretek és a compliance között.

3. Bebizonyítottuk, hogy exacerbáció-szerű változást eredményeztek az akut mechanikai erők a meggyengült extracelluláris mátrixon, bakteriális vagy virális fertőzés nélkül (*IV. tanulmány*). Így feltételezhetjük, hogy a megemelkedett mechanikai erők köhögés és hyperinfláció alatt fontos tényezők lehetnek az emphysémás szövet irreverzibilis változásában AECOPD során. Köztudott, hogy a fertőzés a folyamat elindítója, mely megnöveli a mechanikai stresszt, de tanulmányunk felhívja a figyelmet arra, hogy a terápia során döntő lehet a mechanikai erőket minimalizálni, például köhögéscsillapítók vagy a légzéstámogatás során figyelmesen megválasztott lélegeztetési paraméterek alkalmazásával.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőmnek, Hantos Zoltán professzornak a medikus és PhD hallgatói éveim alatt nyújtott támogatását. Nagyon hálás vagyok Neki a sok segítségért és időért, amit a tanítással és képzéssel töltött.

Nagy hálával tartozom az én tiszteletbeli témavezetőimnek is a Bostoni Egyetemen, Suki Béla professzornak és Bartolák-Suki Erzsébetnek, akik az utóbbi években oly sokat támogattak és segítettek engem. Köszönöm minden kedves kollégámnak, különösképpen Tolnai Józsefnek és Harikrishnan Parameswarannak a kitartó barátságukat és hogy állandóan segítségemre siettek, ha szükségem volt rájuk. Hatalmas hálával tartozom Adamicza Ágnesnek és Varga Gabriellának, akik bevezettek engem a kisállat sebészet rejtelmeibe.

Mindig nagy szeretettel gondolok az Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet, valamint a Sebészeti Műtéttani Intézet minden kedves dolgozójára is, akik a hosszú diákévek

alatt segítettek a kísérletekben és támogattak a munkámban. Szeretném még köszönetemet kifejezni jelenlegi főnökömnek, Dr. Guido Muschnak és a kollégáimnak a Massachusetts General Hospital/Harvard Medical School-ban, Bostonban, akik végigkísérték a tézisem megírását és a sorsomat az utóbbi 3 évben. Külön szeretném kiemelni Tilo Winkler professzor urat, aki mentorom volt az utóbbi években. Sok tanáccsal és iránymutatással segített engem az elmúlt 3 évben.

És végül, de a legfontosabb helyen, szeretném újra és újra megköszönni az én kis Csaladomnak, hogy mindig mellettem álltak és támogattak engem, hogy feltétel nélkül szerettek és szeretnek függetlenül attól, hogy hol vagyok éppen vagy milyen kalandokon megyek keresztül.

A jelen tézis alapját adó kutatási munkát a magyar Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA 66700, 105403, T42971, T37810 és HURO/0901/137/2.2.2), az ausztrál National Health and Medical Research Council (139024) és az amerikai National Science Foundation (BES-0402530), és a National Heart, Lung, and Blood Institute (HL-059215, HL-090757, HL-098976) valamint a Rosztóczy Alapítvány támogatta.

Társszerzői nyilatkozat

A Szabari Margit Veronika *Respiratory mechanics and lung structure in rodent models of emphysema* című PhD disszertációja alapját képező közlemények

Z. Hantos, Á. Adamicza, T. Jánosi, M.V. Szabari, J. Tolnai and B. Suki: Lung volumes and respiratory mechanics in elastase-induced emphysema in mice. *Journal of Applied Physiology*, 105: 1864–1872 (2008)

J. Tolnai, M.V. Szabari, G. Albu, B.A. Maár, H. Parameswaran, E. Bartolák-Suki, B. Suki and Z. Hantos: Functional and morphological assessment of early impairment of airway function in a rat model of emphysema. *Journal of Applied Physiology*, 112: 1932–1939 (2012)

M.V. Szabari, J. Tolnai, B.A. Maár, H. Parameswaran, E. Bartolák-Suki, B. Suki and Z. Hantos: Lung structure and function relation in elastase-treated rats: a long-term follow up study. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 215: 13–19 (2015)

M.V. Szabari, H. Parameswaran, S. Sato, Z. Hantos, E. Bartolák-Suki and B. Suki: Acute mechanical forces cause deterioration in lung structure and function in elastase-induced emphysema. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 303: L567–L574 (2012)

felelős szerzőiként kijelentjük, hogy az e közlemények anyagából a disszertációban közölt eredmények a jelölt saját munkájának tekinthetők.

2015. október 21.



Prof. Dr. Suki Béla
Boston University



Prof. Dr. Hantos Zoltán
Szegedi Tudományegyetem