

A LÉGZŐRENDSZERI MECHANIKA ÉS GÁZCSERE ELTÉRÉSEI KEZELT ÉS KEZELETLEN KETTES TÍPUSÚ DIABÉTESZ ÁLLATMODELLJEIBEN

Dr. Schranc Álmos István

PhD értekezés tézisei

Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet
Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézet

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők:

Prof. Dr. Peták Ferenc PhD DSc

Prof. Dr. Babik Barna PhD

Szeged, 2023

I. BEVEZETÉS

A kettes típusú cukorbetegségben (T2DM) fennálló krónikus hiperglikémia számos sejtszintű illetve molekuláris útvonal aktivációjához vezet, melynek következményei a késői glikációs végtermékek (AGEs) felhalmozódása, az oxidatív stressz, a nitrogén-oxid – endothelin-1 rendszer egyensúlyának felborulása, vérzsír eltérések, citokin vihar, a nukleáris faktor- κ B aktivációja, illetve proinflammatorikus gének expressziója.

A kóros molekuláris jelutak aktiválódása T2DM-ben endoteliális és simaizom-diszfunkcióhoz, valamint az extracelluláris mátrix átépüléséhez (ECM) vezet. Mivel a kisvérkör révén a tüdő gazdagon vaszkularizált, így nagy mennyiségben van jelen endotélium és simaizom sejt, ennek következtében a cukorbetegség számos szervrendszer között a tüdőt is érinti.

1.1. Vázizomfunkció kettes típusú diabéteszben

A vázizomnak fontos szerepe van a cukorháztartásban, továbbá a vázizomsejtek inzulin rezisztenciája a T2DM kialakulásának egyik legfontosabb faktora. A cukorbetegség számos strukturális és funkcionális változást okozhat a vázizomban. A magas plazma dikarbonil-metabolit szintnek köszönhetően az ECM átalakul, illetve a AGEs receptorok hosszútávú aktivációját a vázizom elsovadásához vezet. A hosszútávú hiperglikémia következtében megfigyelt légzésfunkciós eltérések elsődleges oka még tisztázatlan, és kevés ismeret áll rendelkezésre arról, hogy a tüdő és a mellkasfal milyen mértékben járul hozzá a légzőrendszeri elváltozásokhoz.

1.2. Metformin terápia

A metformin elsővonalbeli terápiás gyógyszer a T2DM fent említett szövődményeinek visszaszorításában. A vércukor csökkentő hatás fő háttere a máj glükóz előállításának csökkentése, szemben az inzulinszekréció fokozásával vagy a glükózeloszlás befolyásolásával. Másodlagos hatásként a metformin növeli az inzulin stimulálta glükózfelvételt és megváltoztatja az enterális glükózfelszívódást a bél mikrobiom összetételének és a hormonszekréciónak befolyásolásával. Korábbi tanulmányok már beszámoltak a metformin szisztémás, preventív hatásáról T2DM-ben. Továbbá a diabéteszben szenvedőknél kontrollált hiperglikémiát fenntartó metformin növelte a légúti fertőzéseket követő túlélést és csökkentette a tüdőfibrózis progresszióját. Ugyanakkor a metformin kezelés cukorbetegség légzőrendszeri szövődményeire gyakorolt hatása tisztázatlan.

1.3. Lélegeztetőgép-indukálta tüdőkárosodás

A lélegeztetőgép-indukálta tüdőkárosodás hátterében általában négy fő mechanizmus áll. Ezek közül hármat fizikai erőbehatás okoz, úgy, mint a baro-, a volu- és atelektotraumát. A negyedik

a következményes biotrauma. A lélegeztetőgép indukálta alveoláris gyulladás különböző strukturális és funkcionális elváltozásokat idéz elő, mint például epitheliális-mesenhimális átalakulás, surfactant diszfunkció, fibroproliferáció, fokozott alveolo-kapilláris permeabilitás, tüdőödéma, hialinmembrán-túltermelődés és a hörgőhám leválása. Mindezek megnövekedett élettani holtteret, csökkent tüdő tágulékonyságot és romló gázcserét eredményeznek.

II. CÉLKITŰZÉS ÉS HIPOTÉZISEK

II.1. A légzőrendszeri mechanika PEEP-függő változásai T2DM-ben

Célul tűztük ki az emelkedett vércukorszint hatásainak vizsgálatát szeparáltan a mellkasfali izmok és a tüdő mechanikájára különböző pozitív végkilégzési nyomások (PEEP) mellett. Vizsgáltuk továbbá a következményes gázcsere eltéréseket és végül a légzőrendszeri mechanikai eltérések igazolására szövettani vizsgálatokat végeztünk.

- I. A diabétesz által indukált strukturális változások miatt a T2DM csoportban várhatóan csökkenő végkilégzési tüdőtérfogat jelenhet meg.
- II. Mivel a vázizmok is érintettek T2DM-ben, azok viszkoelasztikus és mechanikus tulajdonságai eltérőek lehetnek a kontroll állatokban tapasztaltakéhoz.
- III. A metformin terápia protektív hatással lehet a T2DM által indukált strukturális és funkcionális elváltozásokkal szemben, ennél fogva a légzésmechanikai és gázcsere-paraméterek hasonlóak lehetnek a kontroll állatokban mértékhez.
- IV. A diabétesz következtében kialakuló légzőrendszeri strukturális és funkcionális elváltozások a kollagén felhalmozódásával igazolhatóak a tüdő szövettani mintáin.

II.2. Kezelt és kezeletlen T2DM hatása a VILI-re

Célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy a T2DM hatással van-e a VILI légzőrendszeri szövődményeinek kialakulására. Ennek tanulmányozására gázcsere és légzésmechanikai paramétereket határoztunk meg. Továbbá, mivel a metformin a T2DM elsővonalbeli terápiája, vizsgáltuk a gyógyszeres terápia által indukált kontrollált hiperglikémia hatását a VILI szövődményeire.

- I. Feltételeztük, hogy a 4 óra hosszú tüdőkárosodást indukáló lélegeztetést követően a kezeletlen T2DM csoportot rosszabb gázcsere és légzésmechanika jellemzi.
- II. A metformin terápia protektív hatással lehet a VILI kialakulására T2DM-ben.
- III. Feltételeztük, hogy a hosszútávú lélegeztetés okozta tüdőkárosodás súlyosabb lesz a kezeletlen T2DM csoportban mint a metforminnal kezelt illetve CTRL csoportban.

III. ANYAG ÉS MÓDSZER

III.1. Etikai szempontok

Mindkét kísérleti protokoll része volt egy, a Csongrád Megyei Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság által 2020. március 18-án jóváhagyott kutatási projektnek (no. XXXII./150/2020).

III.2. Előkezelés

A tézisben szereplő mindkét kísérleti protokollban 4 hetes, hím Wistar patkányokat véletlenszerűen három csoportba soroltunk: kezeletlen T2DM modell (T2DM), metformin-kezelt T2DM modell (MET) és kontrol csoport (CTRL). A cukorbetegség kialakításához a MET és T2DM csoportban egy a szakirodalomban ismert, validált, és a kutatócsoportunk által használt T2DM modellt alkalmaztunk, mely szerint az állatok 5 hetes koruktól magas zsírtartalmú diétában részesültek. A kontrol csoport állatai a protokoll teljes időtartama alatt normál tápot kaptak. A hasnyálmirigy inzulin termelésének csökkentése céljából, a MET és T2DM csoport állatai 7 hetes korukban, egyszeri alacsony dózisú intraperitonális streptozotocin (STZ, 30 mg/kg) kezelésben részesültek, míg a CTRL csoport állatai csak az oldószert kapták. A MET csoport állatai számára, négy hét elteltével később 300 mg/kg/nap dózisú metformin terápiát kezdtünk, melyhez a metformint az állatok ivóvizébe oldottuk. Az előkezelési periódus 15 héten át tartott.

III.3. Csoport allokáció

A légzőrendszer mechanika PEEP-függő változásait vizsgáltuk T2DM-ben, melyhez az állatokat véletlenszerűen osztottuk be a vizsgálati csoportokba az alábbiak szerint az előkezelést megelőzően: T2DM csoport (n=7), MET csoport (n=6) és CTRL csoport (n=7).

A kezelt és kezeletlen T2DM VILI-re gyakorolt hatásának vizsgálatához 24 állatot (CTRL, n=8; MET, n=8; T2DM, n=8) vontunk be a végső elemzésbe.

III.4. Végáz mérések és az intrapulmonális söntfrakció

Mindkét kísérletben egyszerre történt az artériás és centrális vénás vérminták vétele a végázparaméterek meghatározása céljából. Egy point-of-care eszköz segítségével meghatároztuk az oxigén parciális nyomását az artériás vérben (PaO₂) és az artériás oxigén szaturációt (SaO₂). A kapilláris (CcO₂), artériás (CaO₂) és vénás (CvO₂) oxigén tartalmat a végáz paramétereiből kalkuláltuk, majd ezeket felhasználva a módosult Berggren egyenlet segítségével kiszámítottuk az intrapulmonális söntfrakció (Q_s/Q_t) mértékét:

$$\frac{Q_s}{Q_t} = \frac{C_cO_2 - C_aO_2}{C_cO_2 - C_vO_2}$$

III. 5. Lézésmechanikai mérések

A teljes légzőrendszer bemeneti impedanciájának (Z_{rs}) meghatározásához a kényszerített oszcillációs technika egy már korábban leírt hullámcső modelljét alkalmaztuk. Röviden, a tracheális tubus hozzá van kapcsolva egy nyitott rendszerű hangszóróhoz, mely egy pszeudorandom alacsony amplitúdójú jelet generál. A méréshez a lélegeztetést felfüggesztjük kilégzés végén egy rövid időszakra (8 s), és az oszcillációs jelet keresztülengedjük a hullámcsövön. Egyidejűleg mérjük a nyomást a hullámcső hangszóró és légcső felöli végén miniatűr differenciális nyomásmérőkkel. A Z_{rs} -t a hullámcső terhelő impedanciájaként számítottuk.

III.5.1. A mellkasfali és tüdő mechanika szétválasztása

A tüdő és a mellkasfali mechanika szétválasztására egy a nyelvcső alsó harmadába lehelyezett nyomásmérő szondát alkalmaztunk mellyel az intrapleurális nyomást mértük. A katéter pozícióját módosított okklúziós teszttel ellenőriztük neuro-muszkuláris blokád alatt. A mellkasfal mechanikai impedanciáját (Z_{cw}) a P_{tr} és P_{es} transzfer-függvények kiszámításával határoztuk meg, úgy mint $Z_{cw} = Z_{rs}(P_{es}/P_{tr})$. Az érzékelők eltérő frekvenciaválaszai miatt, a P_{es}/P_{tr} nyomásátviteli függvényt frekvenciatartományban kompenzáltuk. A tüdő bemenő impedanciája (Z_L) számítása az alábbiak szerint történt: $Z_L = Z_{rs} - Z_{cw}$.

A tüdő és a mellkasfal mechanikai tulajdonságainak meghatározásához egy validált konstans fázisú modellt illesztettünk az átlagolt Z_L és Z_{cw} spektrumokra, a mért és a modellezett impedanciaadatok közötti relatív különbség minimalizálásával az alábbiak szerint:

$$Z = R_N + j\omega I + (G - jH)/\omega^\alpha ,$$

ahol $\alpha = (2/\pi)\arctan(H/G)$, j a képzetes egység és ω a szögfrekvencia. R_N reprezentálja a frekvencia-független légúti ellenállást, ha a modellt Z_L -re illesztettük, ugyanakkor, ha Z_{cw} -re, akkor a newtoni, frekvencia-független ellenállást. I az intrapulmonális gáz (Z_L esetén) illetve a mellkasfal (Z_{cw} esetén) tehetetlenségét jellemzi, azonban ez a paraméter elhanyagolható volt a vizsgálat frekvencia tartományban. A viszkoelasztikus konstans-fázisú szöveti komponens jellemzői a tüdő és mellkasfal szöveti sűrűdési (G), illetve elasztikus (H) tényezői. A szöveti hiszterezivitás (η) jellemzi a tüdőben és mellkasfalban a disszipatív és rugalmas erők közötti kapcsolatot, melyet a következőképp számítottunk: $\eta = G/H$.

III.5.2. Modell illesztés a teljes légzőrendszeri impedanciaspektrumra

A magas lélegeztetési térfogatoknak köszönhetően a tüdőkárosodást indukáló lélegeztetés esetén az intrapleurális nyomás becslése nem volt lehetséges. Ebben a protokollban ezért a teljes légzőrendszer mechanikai paraméterei voltak jellemezve egy validált konstans fázisú modell

illesztésével az átlagolt Z_{rs} spektrumra. A model tartalmaz frekvencia-független légúti ellenállást (R_{aw}) és légúti tehetetlenséget, illetve egy viszkoelasztikus konstans fázisú szöveti komponenst mely magába foglalja a szöveti rugalmasságot (G) és elaszticitást (H) jellemző paramétereket. Ebben az esetben G_{rs} és H_{rs} képviselik a teljes légzőrendszer (beleértve a tüdőt és mellkasfalat) rugalmas és elasztikus tényezőit.

III. 6. A tüdő szövettani metszeteinek készítése és elemzése

A kísérleti protokoll befejezését követően a tüdőket 4%-os para-formaldehidben fixáltuk, majd a hilus alatti régió preparátumából 7- μ m vastag metszeteket készítettünk mikrotóm segítségével.

III.6.1. A légzőrendszeri mechanika PEEP-függő változásai T2DM-ben

A kollagén felhalmozódásának kimutatására, Masson's trichrome festést alkalmaztunk. A kollagént az ImageJ szoftver Trainable Weka Segmentation pluginjének segítségével szegmentáltuk és kvantifikáltuk.

III.6.2. Kezelt és kezeletlen T2DM hatása a VILI-re

A tüdőkárosodást a hematoxilinnal és eozinnal festett metszetek fénymikroszkópos vizsgálatával állapították meg. A tüdő-károsodási pontszámot (LIS) az alábbiak szerint kalkuláltuk: $LIS = [(alveoláris\ vérzés\ pontjai) + 2 \times (alveoláris\ infiltrátum\ pontjai) + 3 \times (fibrinlerakódás\ pontjai) + (alveoláris\ szeptális\ beszűrődés\ pontjai)] / \text{értékelt alveolusok száma a látótérben}$. Az oxidatív DNS károsodás mértékének megállapítására a kiválasztott metszetek 8-hidroxi-2'-deoxiguanozin (8-OHDG) immunhisztokémiai festésen estek át. A sejteket az ImageJ szoftver manual cell counting funkciójával számoltuk meg.

III. 7. További mérések

III.7.1. Kilégzésvégi légtérfogat

Az állatokat egy teljestest-pletizmográfba helyeztük. A méréseket különböző PEEP mellett végeztük: 0, 3, and 6 cmH₂O. A kilégzésvégi légtérfogatot (TGV) szimultán mért nyomásjelekből határoztuk meg a Boyle-Mariotte törvény alkalmazásával. Az individuális testtömeg különbségek kompenzálására a TGV értékeket normalizáltuk testtömegre (nTGV = TGV/testtömeg).

III.8. Vizsgálati protokollok

III.8.1. A légzőrendszeri mechanika PEEP-függő változásai T2DM-ben

Az előkezelési időszakot követően az állatokat elaltattuk és tracheosztomizáltuk majd lélegeztetni kezdtük. Meghatároztuk a TGV értékeket 0, 3, and 6 cmH₂O PEEP mellett egy teljestest-pletizmográf segítségével. Ezt követően a nyelőcsőbe helyeztük a nyomásmérő katéter és ellenőriztük helyes pozícióját módosított okklúziós teszt segítségével. Az állatokat 3

cmH₂O-es PEEP-et alkalmazva lélegeztettük és a lélegeztetőgép kilégzőszárának 1 kilégzési időre történő lefogásával hiperinflációs manővert végeztünk a lélegeztetési térfogatok standardizálása céljából. Három perccel később szimultán artériás és vénás vérgázmintát vettünk és kényszerített oszcilláció segítségével légzésmechanikai paramétereket mértünk. Öt perces adaptációs periódust követően a méréseket elvégeztük 0 és 6 cmH₂O-es PEEP mellett is. Trendszerűen regisztráltuk az állatok elektrokardiogramját és a szisztémás vérnyomás értékeit. A mérések végeztével az állatokat feláldoztuk nátrium-pentobarbitál (200 mg/kg) intravénás adminisztrációjával és eltávolítottuk a tüdőt szövettani elemzés céljából.

III.8.2. Kezelt és kezeletlen T2DM hatása a VILI-re

Az előkezelési periódust követően az állatokat elaltattuk és volumen kontrollált módban lélegeztettük (VT: 7 ml/kg, PEEP: 3 cmH₂O és 55–60/perc közötti lélegeztetési frekvencia) 20 percen át. Légúti bementi nyomást monitorizáltuk a belégzési csúcsnyomás (PIP) meghatározására és trendszerűen regisztráltuk az állatok elektrokardiogramját és szisztémás vérnyomását. Alapvonal állapotban kényszerített oszcillációs méréseket végeztünk és elemeztük az artériás és vénás vérgázmintákat. Ezt követően egy validált tüdőkárosító stratégiát alkalmaztunk a VILI kialakítására, mely egyidejűleg okoz barotraumát a magas lélegeztetési térfogat (23 ml/kg) és atelektraumát az alacsony PEEP miatt (0 cmH₂O). Az állatokat 4 órán keresztül lélegeztettük tüdőkárosító lélegeztetési móddal. A súlyos hipokapnia elkerülése céljából a lélegeztetési frekvenciát 25-30/percre csökkentettük, hogy a kilégzésvégi szén-dioxid szintet 25-30 Hgmm között tartjuk. Kényszerített oszcillációs méréseket és vérgáz analízist végeztünk 15 perccel az említett stratégia megkezdése után, stabil kardiopulmonális állapotban majd 2 és 4 órát követően. A protokoll végén az állatokat feláldoztuk nátrium-pentobarbitál (200 mg/kg) intravénás adminisztrációjával és eltávolítottuk a tüdőt szövettani elemzés céljából.

IV. EREDMÉNYEK

IV.1. A légzőrendszeri mechanika PEEP-függő változásai T2DM-ben

IV.1.1. Kilégzésvégi légtérfogat.

Míg az nTGV értékei szignifikánsan nőttek a PEEP növelésével ($p < 0,001$), a vizsgált csoportok között nem volt szignifikáns különbség a különböző PEEP szinteken.

IV.1.2. Tüdő és mellkasfali mechanikai paraméterek

A PEEP emelése az R_N, G és H pulmonális komponenseinek szignifikáns csökkenését eredményezte (mind $p < 0,05$), míg a mellkasfali mechanikát prezentáló mechanikai paraméterekre a PEEP változásnak kevésbé volt hatása. A T2DM állatokban, PEEP 0 mellett a

tüdőre vonatkozó R_N , G és H szignifikánsan magasabb, a η pedig szignifikánsan alacsonyabb volt a másik két csoportban mértekhez képest (mind, $p < 0,05$). Ezek az eltérések azonban nem álltak fent a csoportok között magasabb PEEP esetén. A mellkasfalra vonatkozó R_N , G és H nem mutattak szignifikáns különbséget a csoportok között. Ezzel szemben, PEEP 0 mellett a mellkasfali η szignifikánsan alacsonyabb volt a T2DM csoportban, mint a CTRL állatokban ($p < 0,05$).

IV.1.3. Gázcsere paraméterek

Szignifikánsan magasabb Q_s/Q_t és alacsonyabb SaO_2 volt megfigyelhető a T2DM csoportban a MET és CTRL csoportokhoz képest PEEP 0 és 6 mellett (mind $p < 0,001$). A T2DM csoport szignifikánsan alacsonyabb PaO_2 -t mutatott a CTRL ($p < 0,001$) és MET ($p < 0,05$) csoportokhoz képest PEEP 0 mellett, azonban ezek a különbségek nem voltak jelen magasabb PEEP szint mellett.

IV.1.4. Hemodinamika

Míg a CTRL csoportban a PEEP 0-ról 6-ra emelésével az artériás középnyomás (MAP) jelentős csökkenése volt megfigyelhető ($-124 \pm 155\%$), addig a T2DM ($-2,8 \pm 10,6\%$) és MET ($-26 \pm 32\%$) csoportokban nem történt szignifikáns MAP változás.

IV.1.5. Szöveti eredmények

Míg az alveolusok átlagos lineáris keresztmetszete nem mutatott különbséget az egyes csoportok között, a tüdő-parenchimában a kollagénfelhalmozódás relatív területe szignifikánsan nagyon volt a MET és T2DM csoportokban a CTRL csoporthoz képest ($p < 0,001$). Továbbá, szignifikáns kollagén-többlet volt megfigyelhető a T2DM csoportban a MET csoporthoz képest ($p < 0,001$).

IV.2. Kezelt és kezeletlen T2DM hatása a VILI-re

VI.2.1. Gázcsere paraméterek

Bár a PaO_2 csökkent a CTRL állatokban a 4 óra tüdőkárosító lélegeztetés után ($p < 0,05$), ez a csökkenés szignifikánsabban jelentkezett a T2DM csoportban ($p < 0,001$). Ugyanezen méréspontban, a CTRL és MET csoport állatai csak tendenciát mutattak SaO_2 és Q_s/Q_t csökkenésére, azonban a T2DM állatok szignifikánsan romlott gázcserét mutattak a tüdőkárosító lélegeztetésnek köszönhetően ($p < 0,05$). A T2DM állatok relatív gázcsere romlása a PaO_2 -t és SaO_2 -t tekintve szignifikánsan nagyobb volt a másik két csoporthoz képest ($p < 0,05$).

IV.2.2. Légzőrendszeri mechanika

A T2DM csoportban szignifikánsan magasabb PIP értékeket tapasztaltunk, mint a másik két vizsgálati csoportban a teljes protokoll alatt (mind $p < 0,05$), illetve a T2DM állatok PIP értéke

szignifikánsan megnőtt 4 óra tüdőkárosító lélegeztetést követően ($p < 0,05$). Szintén magasabb Raw-t mutattak a T2DM állatok, már a tüdőkárosító lélegeztetés elején a CTRL csoporthoz képest (0 h, $p = 0,013$). Ez a szignifikáns különbség fennállt 4 óra tüdőkárosító lélegeztetést követően is ($p = 0,012$), illetve ebben a mérési pontban a T2DM csoport értékei már szignifikánsan különböztek a MET csoportétól ($p < 0,05$). A légzőrendszer szöveti mechanikai paraméterek a mérés egyik időpontjában sem mutattak szignifikáns különbséget a vizsgált csoportok között.

IV.2.3. Tüdőkárosodási pontszám

A T2DM csoportban szignifikánsan magasabb volt a LIS, mint a CTRL és a MET csoportban ($p < 0,001$). Az intra-alveoláris fibrin-felhalmozódás mértéke szignifikánsan nagyobb volt a T2DM állatokban a CTRL csoporthoz képest ($p = 0,018$), és a T2DM állatokban szignifikánsan több intra-alveoláris infiltrátum volt megfigyelhető, mint a MET csoport állataiban ($p = 0,009$). Az alveoláris szeptális beszűrődés és az alveoláris vérzés szignifikánsan gyakrabban jelent meg a T2DM csoportban, mint a másik két vizsgálati csoportban (mind $p < 0,001$).

IV.2.4. 8-OHDG pozitív sejtek száma

A MET csoportba tartozó állatokban szignifikánsan magasabb volt a pozitívan festődő sejtmagok száma, mint a CTRL csoportban ($p = 0,037$), míg a T2DM-patkányok tüdejében a pozitívan 8-OHDG pozitív sejtmagok száma szignifikánsan nagyobb volt, mint a CTRL- és MET-patkányoké ($p < 0,001$).

V. MEGBESZÉLÉS

A T2DM-ben fennálló krónikus hiperglikémia, molekuláris mechanizmusok, sejti- és szöveti funkciók változása miatt számos szervrendszer és biológiai folyamatot érint. A T2DM kialakulásáért felelős környezeti és genetikai tényezők gyakran növelik az olyan társbetegségek kockázatát, mint az elhízás, a magas vérnyomás, az érlemeszesedés *stb.* Az említett etiopatológiák szisztémás gyulladáshoz is vezetnek, amelynek egyik potenciális célszerve a légzőrendszer. Bár több tanulmány is kísérletet tett a T2DM légzőszervi következményeinek vizsgálatára, a pontos mechanizmusok és a diabéteszes tüdő a különböző lélegeztetési beállításokra adott válasza nem tisztázott. Továbbá a T2DM-et vizsgáló tanulmányok gyakran olyan modelleket használnak melyek csak a diabéteszt vizsgálják és egyéb faktoroktól, mint például a metformin terápia, eltekintenek. Ezzel szemben a a diabéteszben szenvedőka gyógyszeres kezelésnek köszönhetően jellemzően kontrollált hiperglikémiával élnek. A diabétesz légzőrendszeri hatásainak pontosabb tanulmányozására kezelt és kezeletlen T2DM légzőrendszeri eltéréseit vizsgáltuk különböző lélegeztetési stratégiák során. Különböző PEEP-ek és tüdőkárosító lélegeztetési protokoll alkalmazásával vizsgáltuk a légzésmechanika és gázcsere változásait kezelt és kezeletlen T2DM validált állatmodeljeiben.

V.1. A légzőrendszeri mechanika PEEP-függő változásai T2DM-ben

A tüdő és a mellkasfal mechanikai tulajdonságainak szeparált vizsgálata a T2DM kísérleti modelljében rávilágított, hogy mindkét kompartment részt vesz a globális légzésmechanika kóros eltéréseiben. Alacsony PEEP mellett a cukorbetegség hozzájárult azon mechanikai paraméterek növekedéséhez, melyek tükrözik a légáramlást, a tüdőszöveti ellenállást, valamint a tüdőparenchima merevségét. A kilégzésvégi tüdőterefogat növelése mérsékelte a légzőrendszeri mechanikai eltéréseket. Ami a tartós hiperglikémia mellkasfalra gyakorolt hatását illeti, csak a mellkasi szövetek disszipatív vagy rugalmas tulajdonságainak változására utaló tendenciák voltak megfigyelhetők. Alacsony PEEP mellett azonban az említett két tulajdonság kapcsolatát jellemző η eltérése, a rugalmas tulajdonságok változására utaló tendenciát mutat. Bár a metforminnal kezelt cukorbeteg állatok nem mutattak eltérést a tüdő, illetve mellkasfali mechanikában, a gázcsere paraméterek eltérése, illetve az extracelluláris rosthálózat átépülése a szövettani mintákon ebben a csoportban is megfigyelhető volt.

A T2DM kialakításához egy jól ismert modellt alkalmaztunk egyszeri alacsony dózisú STZ, illetve magas zsírtartalmú táp kombinációjával. Az STZ a béta-sejtek elhalását majd a Langerhans-szigetek sorvadását idézi elő. A diagnosztikai kritériumok alapján a patkányok mind a T2DM, mind a MET csoportban a metformin terápia megkezdése előtt végzett első

intraperitonális glükóz tolerancia teszt (IPGTT) során a cukorbetegségekre jellemző vércukorparamétereket mutattak. A metformin beadásának módját és napi adagját úgy adaptáltuk, hogy az tükrözze a cukorbetegek gyógyszeradagolásának klinikai körülményeit. Ezen terápiás megközelítés alapján a MET csoportban a második IPGTT során kontrollált hiperglikémia volt megfigyelhető, míg a T2DM állatokban a kitartóan magas vércukorszint. A MET csoportban az állatok súlya a klinikai tapasztalatoknak megfelelően alacsonyabb volt, mint a másik két csoportban. A metforminnal összefüggő súlycsökkenés a hipotalamusz étvágy szabályozó központok modulációjának és a bélmikrobiom változásának tulajdonítható, ami tovább erősíti a gyógyszer klinikailag releváns koncentrációban történő hatékony adagolását. A CTRL és T2DM állatok testsúlya közötti különbség hiánya valószínűleg az STZ által okozott inzulinszekréció kimerülésével és a cukorbeteg állatokban eltolódott izom/zsír aránnyal magyarázható.

V.1.1. Légzőrendszeri mechanika eltérései

A nyelőcsőnyomás mérése lehetővé teszi a tüdő és a mellkasfal mechanikai tulajdonságainak szeparált vizsgálatát. Mivel a cukorbetegség és a metformin-terápia a PEEP-től függetlenül kisebb hatással van a mellkasfal mechanikára, következésképpen a tüdőmechanika változása járul hozzá elsődlegesen tartós hiperglikémiát követő patológiás légzőrendszeri elváltozásokhoz. Ezen eredmények megerősítették a korábbi hipotéziseket melyek a légutak obstrukciójára, illetve tüdőszövet viszkoelasztikus tulajdonságainak romlására utalnak alacsony PEEP mellett, míg a PEEP növelése megelőzheti a tüdőben bekövetkező káros változásokat, és ezáltal leküzdheti a cukorbetegség káros tüdőmechanikai következményeit. A T2DM csoportban észlelt magasabb nTGV értékek hátterében a kis légutak elzáródása és az ebből következő gáztömeg tüdőben maradása állhat. Ugyanakkor az nTGV-ben a protokollcsoportok közötti szignifikáns különbségek hiánya azt jelzi, hogy a cukorbetegségben a megváltozott tüdőszöveti mechanika belső eredetű, nem pedig a statikus tüdőtérfogatok eltolódásának következménye. A cukorbetegség következtében kialakuló belső tüdőszöveti átépülést a szövettani vizsgálatokban kimutatott kollagén felhalmozódás is alátámasztja. A tüdőszövet viszkoelaszticitását elsősorban a glikáció következtében kialakuló elasztin-kollagén rostok kóros elrendeződése és kereszthídképződése határozza meg, nem pedig azok mennyisége. Azonban a T2DM nemcsak a kollagén és elasztin mennyiségét, hanem a kollagén-elasztin hálózat strukturális átrendeződését is befolyásolhatja, ami magyarázatot adhat a PEEP-függő mechanikai és szövettani leletek közötti látszólagos ellentmondásra.

Ami a mellkasfal tulajdonságainak változását illeti cukorbetegségben, a jelentősen csökkent η alacsony PEEP mellett, a mellkasfalat alkotó szövetek mechanikai tulajdonságának

egyensúlyzavarára utal, ahol rugalmasság dominál az energiaeloszlás rovására. Ezen eredmények patofiziológiai háttere nem teljesen világos. A G és H változásainak tendenciái azonban cukorbetegségben az ECM rosthálózatának némileg merevebbé válására utalnak, ami a mellkasfal szöveteiben a belső súrlódás csökkenésével jár együtt. A növekedő tendenciát mutató mellkasfali elasztancia összhangban van a korábbi eredményekkel, amelyek a T2DM-ben szenvedő idős betegek egyes vázizomrostjainak megnövekedett passzív merevségét mutatják. Annak hátterében, hogy méréseink során nem sikerült a mellkasfali mechanika további eltéréseit detektálni, szerepe lehet a mellkasfalat határoló csontos és porcos váz jelenlétének, in vivo modellünkben. Mivel nem állt rendelkezésünkre olyan in vivo módszer, amellyel ezen anatómiai struktúrák mechanikai tulajdonságaiban bekövetkezett változásokat meg tudtuk volna határozni, a vázizom mechanikájának cukorbetegséggel összefüggő változásai nem teljesen tisztázottak.

V.1.2. Metformin terápia hatása

Jelen tanulmány egy másik fő megállapítása, hogy a metformin képes csökkenteni a T2DM légzőszervi szövödményeit a diabétesz kisírletes modelljében. A metformin monoterápia csökkenti a vércukorszintet azáltal, hogy fokozza a glükoneogenezis inzulin által közvetített szuppresszióját és növeli az inzulin által közvetített glükózfelvételt a vázizomzatban. Továbbá a metformin pleiotróp hatásai képesek csökkenteni a gyulladást, az oxidatív stresszt, az endothelialis átépülést és a tüdő ereiben a simaizomsejtek proliferációját. Az AMP-aktivált protein kináz foszforilációja a lipid- és glükózanyagcserén keresztül befolyásolja az intracelluláris energiaegyensúlyt, és gátolja a transzformáló növekedési faktor- β által indukált kollagéntermelést a fibroblasztokban. Mindezek a mechanizmusok hozzájárulhattak a tüdőszövetben a kollagén felhalmozódásának csökkenéséhez, valamint a MET csoport állataiban tüdő- és mellkasfal-mechanika normalizálódásához. Korábbi eredményekkel összhangban a T2DM növelte az intrapulmonális sőtöt és csökkentette a tüdő oxigenizációját alacsony és magas PEEP mellett. Az Q_s/Q_t emelkedése és PaO_2 csökkenése PEEP 0 mellett, a kis légutak obstrukciójávalval és a megnövekedett atelektázissal magyarázható, mely mérséklődik a PEEP 3 cmH₂O-re történő emelésével. A PEEP további emelése a hemodinamikai válasz hiánya mellett az emelkedett intrathoracalis nyomás miatt a pulmonális kapillárisok további kompresszióját okozta a jól szellőző alveoláris régiókban, ezáltal a perfúziót a kissé rosszabb légcseréjű tüdőrégiókba irányította át. A MET csoport gázcsere-eredményei nem különböztek a CTRL csoportban tapasztaltaktól. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a metformin légzésmechanikára gyakorolt kedvező hatásai abban is megnyilvánultak, hogy a metformin elősegíti a fiziológiás gázcsere fenntartását.

V.2. Kezelt és kezeletlen T2DM hatása a VILI-re

Vizsgálatunk rávilágít, hogy a gázcsere eltérések alapján a T2DM ronthatja a légzésfunkciót és a tüdőkárosodást a hosszan tartó mechanikus lélegeztetés okozta biotraumát követően. A tüdő szövettani és immunhisztokémiai paraméterei arra utalnak, hogy a cukorbetegség fokozta a VILI-t és az oxidatív DNS-károsodást. A metforminkezelés megelőzte a hosszú távú mechanikus lélegeztetés káros légzőrendszeri következményeit cukorbetegség jelenlétében.

Ebben a tanulmányban szintén a jól ismert alacsony dózisu STZ terápia és magas zsírtartalmú tápon alapuló T2DM modellt adaptáltuk. Az STZ a hasnyálmirigy sejtek diffúz degenerációját idézzék elő, és ezzel a béta-sejtek elégtelenségét imitálják. Az STZ-vel kezelt patkányok éhomi glükózszintje a 7,0 mmol/l-es küszöbérték felett volt, és vércukorszintjük szignifikánsan magasabb volt a kontroll állatokhoz képest. Továbbá a 120 perces vércukorértékek minden STZ-vel kezelt állatnál a 11,1 mmol/l-es küszöbérték felett voltak, míg a kontroll állatok közül egyiknek sem volt kóros vércukorértéke. Következésképpen a diagnosztikai kritériumok szerint a patkányok mindkét STZ-kezelt csoportban (T2DM és MET-csoport) az STZ-kezelés után egy héttel, a metformin-terápia megkezdése előtt, a cukorbetegségre jellemző vércukorszint-eltéréseket mutattak. Az előkezelési időszak végén, a második toleranciaeszt során a T2DM csoport éhomi és 120 perces vércukorértékei mindkét küszöbértéket meghaladták. A MET csoport a második teszt során kontrollált hiperglikémiát mutatott, míg a CTRL állatok vércukor görbéi megegyezett az első tolerancia teszt során mértekkel.

V.2.1. VILI és T2DM

A jelen vizsgálatban használt transzlációs állatmodell célja az enyhe-közepes VILI kialakulásának modellezése volt, előzetesen fennálló tüdőbetegségek nélkül. Ennek megfelelően a hosszan tartó tüdőkárosító mechanikus lélegeztetés megkezdése előtt nem alkalmaztunk beavatkozást a surfactant-hiány vagy proinflammatorikus válaszok kiváltására. Az alveoláris túlfeszülést és a tüdőparenchima fokozott nyírófeszültségét, mint a VILI fő jellemzőit magas VT és alacsony PEEP együttes alkalmazásával hoztuk létre, hogy elősegítsük a barotrauma, volutrauma és atelektrauma kialakulását. Függetlenül a T2DM jelenlététől, a mechanikai stressz a gázcsere romlásában, valamint tüdőkárosodásban és oxidatív DNS-károsodásban nyilvánultak meg. Bár a T2DM csoportban a légzőrendszer mechanikai tulajdonságainak a tüdőkárosodást előidéző lélegeztetés miatti romlását a PIP szignifikáns emelkedése jelezte, az kényszerített oszcillációs paraméterek változásai nem mutattak szignifikáns eltérést. Ez az eredmény azzal magyarázható, hogy a tüdőkárosodást indukáló lélegeztetés során magas lélegeztetési térfogatok maximális alveolustoborzást biztosítottak. Ezen túlmenően a diabéteszben kevésbé érintett mellkasfali komponens befolyásolhatta a

szöveti paraméterek eltéréseinek detektálást, ezáltal az enyhe-közepes tüdőkárosodás, mechanikai paraméterekkel történő kimutatását. Ezzel szemben a CTRL állatokban jelentősen nagyobb LIS-t és a 8-OHGD-pozitív sejt festődést figyeltünk meg a tüdőszövetben, mint a korábbi, hosszú távú lélegeztetésen át nem esett patkányokban ($0,15 \pm 0,12$ vs. $0,49 \pm 0,18$ és $3,0 \pm 1,0$ vs. $7,0 \pm 2,9$, $p < 0,05$ mindkét esetben). Ezek az eredmények megerősítik a VILI-re jellemző strukturális és funkcionális elváltozások kialakulását még a kontroll állatokban is.

Vizsgálatunk legjelentősebb eredménye a VILI progressziója a kezeletlen T2DM állatokban. Mindezt alátámasztja a súlyosabb gázcsere eltérés a T2DM csoportban. Mivel a légzésmechanikai paraméterek nem mutattak túlzott mértékű változást a cukorbeteg patkányokban, az atelektikus tüdőtérfogat-vesztés valószínűleg nem játszott jelentős szerepet a leromlott gázcserében. Ezzel szemben a gázcsere eltérésekért a tüdőszövet belső átépülése és a gyulladás lehet felelős, melyhez társul a sérült alveolo-kapilláris barrier így lassul a gázmolekulák diffúziója az alveoláris membránon keresztül. Ezen mechanizmust támasztják alá a szövettani képek, melyek az alveoláris szeptális beszűrődés, illetve az alveoláris vérzés fokozódását mutatták, továbbá megnőtt az alveoláris infiltráció és fibrin jelenléte is. Eredményeinkkel összhangban korábbi tanulmányok a VILI kísérleti modelljeiben közvetlen szövetkárosodást mutattak ki, mely gyulladás és az oxidatív sejtkárosodás következménye. Ezek közé tartozik a szöveti lipid- és fehérjeösszetevők oxidációja, az IL-1 β , IL-6, IL-8 és TNF- α megnövekedett szintje. Ezen molekuláris folyamatok fokozzák a tartós hiperglikémia proinflammatorikus hatásait, ami súlyosabb tüdőkárosodást eredményez.

V.2.2. Metformin terápia hatásai

Vizsgálatunk további eredménye, hogy a metformin képes megelőzni a VILI súlyosbodását T2DM jelenlétében. A metforminkezelést követően végzett 2. IPGTT eredményei bizonyították, hogy a gyógyszeres terápia a következő jól ismert mechanizmusok révén hatékonyan vezet kontrollált hiperglikémiához a MET csoportban: a máj glükoneogenezisének gátlása és a máj glükózkibocsátásának csökkentése; a perifériás szövetek (izom és zsír) glükózfelvételének és -hasznosításának növelése; valamint az AMP-aktivált protein-kináz aktiválásán keresztül az izom, a zsír és a máj energiaanyagcseréjének javítása. Ismert, hogy az AMP-aktivált protein-kináz csökkenti bizonyos proinflammatorikus útvonalak (NF- κ B) aktivációját, ami hozzájárulhat a metformin kedvező légzőszervi hatásaihoz is. Korábbi eredményekkel összhangban a metformin-terápia nem volt jelentős hatással a tüdő funkcionális vagy strukturális alapparamétereire. A metformin terápiának a tüdőre gyakorolt hatása azonban egyértelműen abban nyilvánult meg, hogy képes volt megelőzni a T2DM által kiváltott súlyos gázcsere-romlást, a tüdőkárosodás súlyosbodását és az oxidatív DNS-károsodást. Ezek az

eredmények arra utalnak, hogy a metformin terápia nemcsak a hiperglikémia és a csökkent glükóztolerancia csökkentésére képes, hanem a T2DM káros tüdőkövetkezményeinek enyhítésére is. Eredményeink megfelelnek a korábbi kísérletes és klinikai vizsgálatok megállapításainak, melyek szerint a megfelelő diabéteszterápia megelőzi a mechanikus lélegeztetés szövődményeként fellépő tüdőkárosodás kialakulását, míg a túl magas vércukorszint a szisztémás gyulladást indukál, ami elősegíti a légzőrendszeri szövődmények kialakulását.

VI. ÖSSZEFOGLALÁS

A jelen dolgozatban részletezett vizsgálatok a T2DM légzőszervi következményeinek új aspektusait tárják fel, különös tekintettel a tüdő és a mellkasfali mechanika PEEP-függő változásaira, valamint arra, hogy a T2DM súlyosbíthatja a hosszan tartó gépi lélegeztetést követő tüdőkárosodást.

Annak összegzése, hogy a T2DM miként befolyásolta a légzőrendszeri mechanika PEEP-függő változásait az alábbi következtetésekhez vezettek:

- I. A tüdő és a mellkasfali mechanika tulajdonságainak szeparált vizsgálata kimutatta a tüdő dominanciáját a teljes légzőrendszer mechanikájának globális romlásában a cukorbetegség kialakulását követően.
- II. A tartós hiperglikémia csökkentette a légutak átjárhatóságát, növelte a tüdőparenchima merevségét és energiaveszteséget, valamint alacsony PEEP mellett fokozta az atelektázis kialakulását.
- III. Az említett elváltozások hátterében az extracelluláris kollagénrostok túlzott felhalmozódása állhat.
- IV. Leromlott gázcsere volt megfigyelhető a fokozott atelektázishajlam miatt alacsony PEEP mellett, és az alveolo-kapilláris barrier átépülése, illetve intraalveoláris kapillárisok túlzott kompresszibilitása miatt magas PEEP mellett
- V. A krónikus hiperglikémiának a mellkasfali szövetek viszkoelasztikus tulajdonságaira gyakorolt enyhe mechanikai következménye csak alacsony PEEP szintnél mutatkozott a szöveti csillapítás csökkenésében, ami a belső súrlódási erőkkel szemben a rugalmas feszültségek dominanciája felé történő mechanikai elmozdulást mutatja.

A második tanulmány, mely a kezelt és kezeletlen T2DM hatásait vizsgálta a VILI-re, a következő főbb eredményeket mutatta:

- VI. A diabéteszes tüdő hosszan tartó mechanikus lélegeztetése súlyosbítja az enyhe-közepes VILI-ben jelentkező légzőrendszeri funkcionális és strukturális eltéréseket.

- VII. A T2DM modellben a súlyos tüdőkárosodás az alveolo-kapilláris barrier kifejezettebb átalakulását eredményezi, melynek elsődleges következménye a leromlott gázcsere.
- VIII. Bár a gázcsere és a légzésmechanika jelentős extrém romlása nem volt megfigyelhető a tüdőkárosodást indukáló lélegeztetést követően, a T2DM modellben a fokozott gyulladás és a szövetkárosodás figyelmeztető jelek lehetnek a légzőrendszerben jelentkező súlyosabb hosszú távú következményekre.

Végül, a T2DM elsővonalbeli terápiás szereként ismert metformin hatásait vizsgáltuk a diabétesz légzőrendszeri szövődményeiben melyek az alábbi következtetésekhez vezettek:

- IX. A korai és megfelelő metformin terápia hatékonyan kezeli a cukorbetegség káros légzőszervi következményeit, jól ismert kedvező szisztémás hatásai mellett.
- X. Bár a metformin terápia nincs közvetlen hatással a tüdőfunkcióra vagy a gázcsere-re, a kontrollált hiperglikémia vagy euglikémia csökkenti az akut tüdőkárosodás kialakulásának kockázatát, és súlyos esetekben a hosszú távú mechanikus lélegeztetést követően az ARDS kialakulásának kockázatát is.
- XI. Ezen eredmények együttesen tovább hangsúlyozzák a cukorbetegség korai diagnózisának és terápiájának fontosságát.

Összefoglalva, ezek az eredmények különös jelentőséggel bírnak mind a cukorbetegségben jelentkező légzőrendszeri eltérések jobb megértése, mind az anesztézia, illetve az intenzív ellátás során szükséges gépi lélegeztetést igénylő betegek ellátásának optimalizálása szempontjából, ebben a légzőszervi szövődményekre hajlamos betegpopulációban.

VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném köszönetemet és hálámat kifejezni témavezetőimnek. Több mint hat évvel ezelőtt csatlakoztam a Peták Ferenc és Babik Barna professzor urak által vezetett kardiopulmonális kutatócsoporthoz. Hatalmas tudásukkal és elhivatottságukkal segítettek az egyetemi éveim alatt, majd a PhD tanulmányaim során. Segítségük és útmutatásuk nélkül nem tudtam volna ezt az utat végig járni. Nagy hatással voltak rám.

Őszinte hálával tartozom Südy Robertának. A kezdetektől fogva ő volt a legsegítőkésebb személy és a mai napig nagyon közeli barátom. Mindent, amit a kísérletek elvégzéséről tudok, tőle tanultam. Szeretnék köszönetet mondani Fodor Gergelynek a kísérletek elvégzésében és az adatelemzésben nyújtott segítségéért. Ő egy kiváló laborpartner és jó barát. Hálás vagyok Walid Habre professzor úrnak a lehetőségért, hogy csatlakozhattam a kutatólaboratóriumához. Az ő munkája volt a legnagyobb hatással a karrieremre.

Köszönöm Tolnai Józsefnek, hogy segített az adatelemzésben és Ivánkovitsné Kiss Orsolyának, hogy minden kísérletben hatalmas technikai segítséget nyújtott. Szeretném megköszönni Balogh Ádámnak a tanácsait a kutatói pályafutásom során, illetve Varga Viktóriának, aki hatalmas segítséget nyújtott a szövettani elemzésben. Hálás vagyok Ballók Bencének és Kulcsár Richárdnak a kísérletek elvégzésében nyújtott segítségükért. Köszönöm Schwartz Noéminek, hogy az orvosi egyetem kezdete óta a legjobb barátom volt. Végül pedig a legnagyobb elismerésem a családomnak a támogatásukért.

A TÉZISBE FOGLALT TUDOMÁNYOK PUBLIKÁCIÓK:

I. Lung and chest wall mechanical properties in metformin-treated and untreated models of type 2 diabetes

Álmos Schranc, Gergely H. Fodor, Roberta Südy, Bence Ballók, Richard Kulcsár, József Tolnai, Barna Babik, Ferenc Peták
Journal of Applied Physiology, 2022; 132(5):1115-1124

II. Exaggerated ventilator-induced lung injury in an animal model of type 2 diabetes mellitus: a randomized experimental study

Álmos Schranc, Gergely H. Fodor, Roberta Südy, József Tolnai, Barna Babik, Ferenc Peták
Frontiers in Physiology, 2022; 13:889032

A TÉZIS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ MEGJELENT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK:

III. Lung volume dependence of respiratory function in rodent models of diabetes mellitus

Roberta Südy, Álmos Schranc, Gergely H. Fodor, József Tolnai, Barna Babik, Ferenc Peták
Respiratory Research, 2020; 21(1):82