

## OTKA 67700: Az emfizéma strukturális és funkcionális összefüggései kísérletes modellekben

### ZÁRÓJELENTÉS

Kutatási pályázatunk eredetileg így összegezte a feladatokat:

*A kutatások célja az emfizéma kialakulásának és progressziójának állatkísérletes modellekben való tanulmányozása a légzésfunkció érzékeny, kis állatok (egér és patkány) mérésére kifejlesztett módszereivel: a tüdőtérfogatok pletizmográfias meghatározásával, a légúti és szöveti mechanikai tulajdonságok kényszerített oszcillációs mérésével, a légutak kollapszushajlamának akusztikus vizsgálatával (reinflációs crackle hangok). A strukturális változások kimutatására a szokásos post-mortem technikák mellett - az előzetes vizsgálatok alapján - a szubpleurális alveolusok in vivo megjelenítésére képes ortogonális polarizációs spektrális képalkotást alkalmazunk. Az elasztáz-kezelés okozta szöveti destrukció kialakulása mellett követni kívánjuk a légúti obstrukció mechanikai eredetű vagy gyulladós folyamatok miatti bekövetkezését, valamint e kórfolyamatokban megelőző ill. terápiás hatást ígérő kezelések hatását.*

A ténylegesen elvégzett kutatómunka a tervezetthez képest elsősorban a követéses vizsgálatokra helyezett nagyobb súlyt és több protokoll kipróbálása után a jobbnak talált patkánymodellben a rövidtávú (a kezelés utáni 3. napi) és a hosszútávú (105. napi) strukturális és funkcionális változásokra koncentrált. A hagyományos morfometriai módszereken túllépve az egész tüdő beágyazásával és hematoxilin-eozin festésű teljes metszeti képek elemzésével jutottunk átfogóbb strukturális információkhoz; az alveoláris morfometria mellett a hörgőátmérők és -falvastagságok, valamint az alveoláris attachmentek sűrűsége is a vizsgálat tárgyai voltak. Más festési eljárásokat is bevezettünk a hörgőfal kollagén- és elasztinsűrűségének és homogenitásának kimutatására. A tüdőfelszíni alveolusok megjelenítésére alkalmazott ortogonális polarizációs spektrális (OPS) képalkotásnál áttértünk az ex vivo vizsgálatokra, mely a képminőség javulása révén lehetővé tette az alveoláris szeptumok gépi felismerését. Ígéretes új kísérleti koncepcióként jelent meg az elasztázkezelés és a gyakori mély belégzések alkalmazása, mely a tüdőszöveti destrukció kémiai és mechanikai folyamatainak szinergizmusa révén tekinthető a COPD akut exacerbációja első állatkísérletes modelljének. A pathomechanizmusok és a struktúra-funkció kapcsolat további finomabb tisztázását viszont fontosabbnak éreztük a kórfolyamatba történő beavatkozásnál, ezért a foszfátidilkolin (PC) előkezelés hatásának vizsgálatára még nem került sor.

## MÓDSZERTANI EREDMÉNYEK:

*A követéses vizsgálatok módszertanának kialakítása.* Az elasztáz-kezelés optimális dózisának eltalálása (elfogadhatóan magas túlélési arány markáns elasztolitikus hatással) számos előkísérletet igényelt. Ismeretlen tényező volt a követéses mérések időzítése is, mind a korai hatások, mind a késői, remodelling jellegű változások kimutatását illetően. Csak röviden felsorolva az ide vonatkozó előkísérleteket és lezárt tanulmányokat:

(a) Sikerült biztonságos és jól időzíthető altatási eljárást (klorálhidrát) beállítanunk, azaz az FRC mérésekhez szükséges spontán légzőizomkontrakciók megmaradása, majd az altatás mélyülésével kellően hosszú (6 s) apnoés szakaszok a Zrs alacsonyfrekvenciás oszcillációs méréseihez és végül a spontán aktivitás visszatérése a lélegeztetésről történő leszoktatás és az extubálás idejére.

(b) CBA/Ca egereken rövid altatás alatt, orotracheális intubálást követően mértünk tüdőterefogatokat és alacsonyfrekvenciás légzőrendszeri impedanciát (Zrs), majd mindezt megismételtük másnap majd 1, 2, 3 és 5 hét elteltével;

(c) 5 hetes korú CFLP egereken 2, 7, 14 és 21 nap múlva sikerrel megismételtük az FRC és Zrs méréseit, kimutatva a fiatal egerek légzőrendszeri paramétereinek fejlődéses változásait (Am J Respir Crit Care Med. 177: A224, 2008);

(d) e sikeres módszerfejlesztés után kontroll és 0.3 IU elasztázzal kezelt felnőtt Balb/C egereket mértünk 3 és 6 hét után újra. Megállapítottuk, hogy a 3. hétre kialakult FRC és TLC emelkedés, valamint az elastance csökkenése a 6. héten nem módosult [Eur Respir J 32 (Suppl. 52): 533s, 2008], jelezve a követési időtartam szélesítésének igényét;

(e) a patkánymodellekre (Sprague-Dawley) áttérve is több kísérletsorozatot végeztük el. Az első sorozatban (N=8-8) 5 IU elasztáz instillálásával enyhe fokú emfizémás elváltozásokat hoztunk létre [Eur Respir J 34(Suppl. 53): 835S, 2009];

(f) A második sorozatban (N=10-10) nagyobb, 50 IU dózist alkalmaztunk; ezt a kezelést tartottuk meg két kiterjedt funkcionális-strukturális stúdiumban, a kezelést követő 6. héten végzett vizsgálatokban [Functional and morphological assessment of early impairment of airway function in a rat model of emphysema, J Appl Physiol (in press), 2012], valamint egy hosszabb követéses tanulmányban, melynél a kezelés utáni 3., 10., 21. és 105. napokon végeztünk méréseket (kézirat előkészületben az Am J Resp Cell Mol Biol számára).

*Új morfometriai megközelítések.* A funkcionális vizsgálatok eszköztára – jórészt korábbi OTKA pályázataink eredményeképpen a nemzetközi élvonalat képviselik. Az ehhez méltó strukturális elemzési módszertan elérése ezért pályázatunk komoly feladata volt.

(a) A standard eljárásokon messze túlmutató, átfogó in vitro morfometriás eljárást dolgoztunk ki. A teljes tüdő 25 hPa nyomáson való fixálását és három szintű transzverzális metszetek készítését és digitalizálását követően állatonként 18 tüdőrégió automatizált alveoláris morfometriáját végeztük el, valamint (félautomatikus módszerrel) kiértékeljük a légutak

kerületének, falvastagságának és a szeptális kapcsolódásainak adatait. Ezt az átfogó megközelítést alátámasztották a kapott eredmények: az elasztázkezelés a humán kórképekhez hasonló nagyfokú heterogenitást eredményezett a parenchymális struktúrában, melynek mértéke ad hoc mintavétellel rejtve is maradhatott volna.

(b) Az *in vivo* és metszeti morfometria összehasonlítása csak 20 vagy 25 hPa *in vivo* transzplumonális nyomásszinten történt meg, főleg az OPS képalkotás minőségének romlása és képregisztrációs nehézségek miatt az alacsonyabb tüdőterefogatszinteken. Az OPS képek kontrasztviszonyai kezdetben még így sem tették lehetővé az alveolusok automatizált (számítógépi) méretmeghatározását; itt jelentős képfeldolgozási eszközfejlesztés vált szükségessé az időigényes manuális elemzés kiváltására. Mindezek ellenére tisztáztuk, hogy (i) lényeges eltérés az átlagos alveolusméretekben nem várható az *in vivo* és *in vitro* meghatározások között, és hogy (ii) a szubpleurális (*in vivo* is megfigyelhető) populáció nem különbözik méreteiben a szomszédos, centrálisabb sávokétól. A fixálásos technika zsugorodási artefaktumainak általában élénken vitatott szerepe is még további vizsgálatokat tesz szükségessé.

(c) A 20 hPa nyomásról induló lassú kilégzési manőverek során OPS képalkotással mértük a szubpleurális alveolusméretek és a tüdőterefogat változását. Bár a képi kiértékelés 3-7 hPa nyomásig volt lehetséges, az alveolusok gömbmodell-közelítéssel kapott térfogata és a globális térfogat változása között szoros lineáris kapcsolatot találtunk. Itt a technika javítása szükséges a fiziológiás nyomástartomány méretadatainak kiértékeléséhez.

(d) A thoracotomiát követően végzett OPS mikroszkópia a vizsgálható tüdőfelület kis hányada miatt egérben célszerűtlen volt, de patkányban is erős korlát volt a frontális felület kicsinyége az átfogó *in vitro* morfometria fényében. A patkánykísérletek végén ezért izoláltuk a teljes tüdőt, és a felfüggesztett, 20 hPa nyomáson tartott tüdő felületén 10 standardizált régiót jelöltünk ki. A régióként rögzített, 12-15 független kép elemzése már reprezentatívabb adatokat eredményezett a tüdőfelszíni alveoláris populációról. A videón rögzített nagy képanyagot most nem korlátozta a thoracotomia mérete és nem terhelte az *in vivo* zajszint.

## FŐBB ÉLETTANI EREDMÉNYEK:

(i) Egérkísérleteinkben a tervezett protokollhoz képest változtattunk az OPS mikroszkópia elhagyásával és az *in vivo* gáztalanított tüdők újrafelfújását kísérő légúti kinyílási (crackle) hangok rögzítésével. Endotracheális intubálással és testpletizmográfiasan mértünk tüdőterefogatokat (FRC, RV és TLC), a mechanikai paramétereket lassú inflációs manőver közepette a kényszerített oszcilláció tracking módszerével határoztuk meg. Az eredmények (J Appl Physiol 105: 1864-1872, 2008) jelentős emelkedést mutattak az FRC és TLC értékében (változatlan RV mellett!) az elasztázal kezelt csoportban, mely a tüdőszöveti elastance megfelelő csökkenésével, de a légúti funkció (légúti ellenállás, annak nyomásfüggése és a bronchiális kollapszushajlam) változatlanságával társult. Az *in vitro* strukturális adatok összhangban voltak a szöveti destrukció funkcionális mutatóival. Hasonló eredményeket kaptunk egy másik (Balb/C) törzsből végzett követéses vizsgálatok során is [Eur Respir J 32 (Suppl. 52): 533s, 2008]. Összefoglalóan megállapíthattuk, hogy ebben az

egérmodellben a humán betegség legfeljebb kezdeti (és ezért nem detektált ill. dokumentált) olyan szakaszát értük el, melyben a szöveti változások még nem érintik a légúti funkciót.

(ii) Az emfizéma patkánymodelljében orotracheális intubálással, testpletizmográfiásan mértünk tüdőterfogatókat (FRC, RV és TLC) és FRC-szintű mechanikai paramétereket (légúti ellenállás, szöveti csillapítás és elaszticitás) az 50 IU elasztáz intratracheális instillálását megelőzően. A 6. héten tracheostomia után megismételtük az előző légzésfunkciós méréseket, majd oxigénlelegeztetés és okklúzió segítségével in vivo gáztalanított tüdő lassú reinflálása során mértük az intratracheális crackle hangokat. Thoracotomiát követően alacsonyfrekvenciás pulmonális impedanciát (ZL) mértünk 2 hPa transzpulmonális nyomáson (csak a második sorozatban), ezt követte a tüdőfelszíni alveolusok pásztázása 20 hPa nyomáson az ortogonális polarizációs spektrális mikroszkópiával (OPS), majd a tüdő izolálása és fixálása 20 hPa nyomáson a metszeti morfometria céljából. A funkcionális mérések főbb eredményei: (a) az elasztáz 38%-os ill. 53 %-os emelkedést okozott az FRC és az RV értékében (míg a TLC alig emelkedett), (b) a teljes légzőrendszeri elaszticitás 62% -ára esett, (c) nem volt változás a légúti ellenállás értékében, bár (d) mindezek értelmezésénél figyelembe kell venni, hogy e változásokat tompítja a mellkasfali ellenállás és elaszticitás nagyfokú (>50%-os) hozzájárulása a Zrs adataihoz. E megfigyelés gyökeres különbségeket jelez az egértanulmányok adataihoz képest. A kezelt és a kontroll állatok között lényeges különbséget találtunk az alveolusok méretének eloszlásában, míg a légúti morfometria csak enyhe különbségeket mutatott, összhangban a funkcionális adatokkal. Az in vivo gáztalanított tüdők újranyílását jelző crackle hangok statisztikájában ugyancsak enyhe eltérés volt a két csoport között, ismét a légúti funkció intaktságát bizonyítva (J Appl Physiol, nyomdában, Doi:10.1152/jappphysiol.00587.2011).

(iii) Az előző stúdium fontos üzenete volt az, hogy a kórfolyamat kialakulásának kezdeti fázisát valamint egy, a remodelling szempontjából informatív, késői időpontot is szükséges vizsgálni – lehetőség szerint követéses módszerrel. Ismételt altatással és orotracheális intubálással követéses vizsgálatokat végeztünk összesen 18 kontroll és 20 elasztázzal (50 U) kezelt Sprague-Dawley patkányban a kezelés előtt, az azt követő 3., 10., 21. és 105. napon. A mérések végén izolált, a tracheán felfüggesztett tüdőket azonnal OPS mikroszkópiának vetettük alá, 20 hPa transzpulmonális nyomáson, 10 előre definiált standard régióban. A képek szerény kontrasztszintje ellenére a szegmentálási algoritmus jól működött, mindazonáltal gyors vizuális ellenőrzésre és esetenként manuális korrekcióra volt szükség. Az in vitro morfometria most is a nagytömbös beágyazással és a 3 szintes teljes keresztmetszet festéseivel (hematoxylin-eozin, elasztin és kollagén festések) készült metszeteken alapult. A 105 napos csoportok mellett metszeteink készültek részpopulációkban, azaz a 3. ill. 21 napnál befejezett kísérletekből. A kezelt és kontroll csoportokban azonos súlynövekedés következett be, de az FRC és az RV értékeiben már a 3. napon szignifikáns különbség lépett fel, mely a 21. napra 80 ill. 120 %-os különbséggé nőtt; a TLC esetén ez kisebb mértékű volt és csak a 21. naptól vált statisztikailag szignifikánssá. A légúti ellenállásban a két csoport nem

különbözött. A kezelés az alveoláris átmérők nagyobb növekedésében és az elasztintartalom csökkenésében is megnyilvánult, a 105. napra a bronchiális falvastagság növekedése is megfigyelhető volt. Az *in vitro* és *in vivo* morfometria eredményei hasonló változásokat tártak fel az alveoláris méretekben. Az átlagos alveoláris átmérők és a légzőrendszeri compliance között erős lineáris kapcsolatot ( $r^2=0,695$ ;  $p<0,001$ ) találtunk, melyet a strukturális és funkcionális változások korreláltságának szép és új példájának tekintünk.

(iv) Az elmúlt év kutatásaiban tovább erősödött az együttműködés a Boston University kutatóival. A saját fejlesztésű testpletizmográfias térfogatmérés és alacsonyfrekvenciás impedanciamérés segítségével követtük elasztázzal kezelt Balb/c egerek légzésfunkciójának károsodását nagy térfogatkitéréseket (deep inspiration: DI) is tartalmazó lélegeztetés hatására. E kísérletsorozat célja a biokémiai (elasztolitikus) károsodás és a mechanikai stressz együttes hatásának kimutatása volt, elsőként megkísérelve a COPD akut exacerbációjának modellezését. A kezelt és kontroll egereket 2, 7 vagy 21 nappal a kezelés után 1 órán keresztül lélegeztettük egyenletesen ill. 2 DI/min közbeiktatásával. Az eredmények azt mutatták, hogy a funkcionális reziduális kapacitás és a légzőrendszeri compliance az idővel – de főleg a DI alkalmazásával – nőtt, a hematoxylin-eozin festésű metszetek az ekvivalens alveoláris átmérő, a szeptumvastagság és a szeptumszakadások számának növekedését bizonyították. A 21. napra a DI-k megváltoztatták az alveoláris átmérők eloszlástípusát is. Az akut mechanikai erőhatások így irreverzibilis változásokhoz vezettek a struktúrában és a funkcióban egyaránt, mielőtt a parenchymális extracelluláris mátrixban a remodelling a kritikus szintjét eléri. Az ismételt és akut DI hatások és az elasztolitikus előkezelés együttesen tehát adekvát modellnek bizonyul a COPD akut exacerbációjának tanulmányozásában. Az e vizsgálatokat összefoglaló közleményünk (M. V. Szabari, H. Parameswaran, S. Sato, Z. Hantos, E. Bartolák-Suki, and B. Suki: Acute mechanical forces in elastase-induced emphysema: a novel animal model of exacerbation) az *Am J Resp Crit Care Med* folyóiratnál bírálat alatt áll.

(v) Összes eddigi kísérletünk egérben és patkányban azt mutatták, hogy az elasztázkezelésnek a tüdőterefogatokra és a szöveti mechanikára gyakorolt markáns hatása nem társul a légúti ellenállás változásával. Elasztázzal kezelt és kontroll patkányokban methacholin provokációt (64  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  i.v. infúzió) is végeztünk. A tüdőterefogatok és az oszcillációs mechanika paramétereit illetően nem volt eltérés a csoportok között, az *in vivo* gáztalanítás utáni kollabált állapotból történő recruitment és az azt jelző crackle hangok dinamikájában azonban jelentős különbség mutatkozott, jelezve a szöveti konstrikció fokozódását a meggyengült parenchymában [*Eur Respir J* 38 (Suppl. 55): #4873, 2011]. Az eredmények további elemzése még szükséges a teljes terjedelmű közlés előtt.

(vi) A követéses vizsgálatok lezáró mérésekor a teljes légzőrendszeri impedanciák meghatározását követően thoracotomia mellett is végeztünk méréseket: ezek a

mellkasfal viszkoelasztikus paramétereinek jelentőségén (>50 %-os hozzájárulás) túl arra is intenek, hogy a newtoni ellenállás jelentős (~30 %-os) komponense nem légúti eredetű. A mellkasfalnak az egérkísérletekben szokásos elhanyagolása tehát patkányban nem tehető meg [Eur Respir J 36 (Suppl. 54): 48s, 2010]. Néhány kiegészítő kísérlet szükséges még ezen megfigyelések publikációjához.

#### TOVÁBBI EREDMÉNYEK:

A légzőrendszer (kvázi)statikus és dinamikus működésének tanulmányozására kidolgozott módszereinket kamatoztattuk az ausztrál kutatópartnerekkel végzett közös kutatás során is. Az alacsonyfrekvenciás Zrs adatok és – a testpletizmográfia szolgáltatotta – abszolút tüdőtérfogatok együttes ismerete a légzésmechanika legérzékenyebb mutatóihoz juttat, és ez tette lehetővé azt, hogy kimutassuk a kolinerg bronchiális tónus hiányát Balb/c egerekben (Respir Physiol Neurobiol 161: 223-229, 2008). Demonstráltuk az Influenza A vírus okozta bronchiális hiperreaktivitás kialakulását, melyet az in vitro érzékenységvizsgálat rejtve hagyott (Respir Physiol Neurobiol 162: 190-196, 2008). A mesterséges lélegeztetéssel társuló tüdőkárosodások kezdeteinek funkcionális tanulmányozásában ugyancsak nélkülözhetetlenek bizonyult vizsgálati módszereink érzékenysége (Respir Physiol Neurobiol 165: 61-66, 2009). A légzéskutatásban leggyakrabban használt egér tüdejének sajátos, instabil nyomástérfogat karakterisztikája (J Appl Physiol 105: 685-692, 2008) nem csupán a mérések standardizálásának szükségességét veti fel, hanem egy rejtélyes struktúra-funkció összefüggésre is fényt vet.

A légúti és a szöveti mechanika szeparált vizsgálatában a jelen pályázatot is érintő eredményeink születtek, elsősorban a mesterséges lélegeztetés hatásai (Respir Physiol Neurobiol 169: 243-251, 2009), az oxigénadagolás (Respir Physiol Neurobiol 165: 61-66, 2009) és az akut tüdőszűrés vonatkozásában (Respir Physiol Neurobiol 171: 101-109, 2009).

Munkacsoportunk részt vett egy kooperációs állatkísérletes struktúra-funkció vizsgálatban a Grenoble szinkrotron centrum képalkotási lehetőségeit kihasználva (Am J Respir Crit Care Med 180: 296-303, 2009). E közös munka következő fázisa is támaszkodik a jelen OTKA kutatási pályázat eredményeire, egyrészt a mi funkcionális vizsgálati metodikánk alkalmazása, másrészt pedig az elasztáz-kezeléses patkánymodellünk átvétele révén.

Méréstechnikai fejlesztéseinket eredményesen alkalmaztuk az alveoláris hipokapniának és a keringési hiperkapniának a légúti ellenállásra gyakorolt hatása vizsgálatokor a kardiopulmonális bypass kísérletes modelljében (Respir Physiol Neurobiol 175: 140-145, 2011).

Ausztrál munkatársakkal együttműködésben a mechanikai lélegeztetésnek a légzésfunkcióra és a gyulladási folyamatokra gyakorolt együttes hatását vizsgáltuk patkányban (Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 300: L112-L120, 2011).

Egy mini-review (Emergent behavior of regional heterogeneity in the lung and its effects on respiratory impedance. J Appl Physiol 110: 1473-1481, 2011) és egy nagyobb monográfia (Oscillation Mechanics of the Respiratory System. Compr Physiol 1: 1233-1272, 2011) közvetve kapcsolódik a kutatási témához, és a társszerzői munka erre az időszakra esik, az OTKA támogatása az előzőnél van feltüntetve. Az utóbbi a Handbook of Physiology utódkiadása, itt kutatási források feltüntetése nem megengedett.

#### KUTATÓKÉPZÉSI VONATKOZÁSOK:

A tényleges kutatási eredmények mellett jelentős és örömteli a fiatal kutatói kollektíva kialakulása. Miközben az eredeti pályázat szenior kutatói közül többen nyugdíjba mentek, illetőleg más okokból váltak inaktívvá e kutatásokban, orvostanhallgatók csatlakoztak (és csatlakoznak) az állatkísérletes és értékelő tevékenységhez. Nyolc TDK előadást tartottak e pályázat témaköréből (I-III helyezések), a két OTDK részvétel egy első helyezést és Pro Scientia Aranyérem kitüntetést (Szabari M.) eredményezett. Nagyrészt e pályázat témaköréből készült el Tolnai J. PhD értekezése (Crackle sounds and lung recruitment) és készülnek Szabari M. PhD tézisei.