

STRESZCZENIE

Wstęp

Dysplazja oskrzelowo-płucna (ang. bronchopulmonary dysplasia, BPD) to najczęstsza przewlekła choroba płuc występująca u skrajnych wcześniaków, która ma poważne i długoterminowe konsekwencje. Patogeneza BPD jest wieloczynnikowa i wynika z nakładających się na siebie czynników takich jak infekcje przed i poporodowe, toksyczność tlenu oraz mechaniczna wentylacja. Tak zwana „nowa” BPD ery surfaktantu charakteryzuje się nieprawidłowym rozwojem płuc, obejmującym zmniejszoną septację pęcherzyków płucnych, zaburzoną waskularyzację płucnego łożyska naczyniowego oraz zmiany patologiczne oskrzeli, co prowadzi do zmniejszenia możliwości oddechowych małych pacjentów. Obecnie przebudowę dróg oddechowych oraz miąższu płucnego ocenia się głównie na podstawie barwienia, jednakże uzyskane dane nie dostarczają informacji na poziomie molekularnym. Z kolei mikrospektroskopia w podczerwieni charakteryzuje się wysoką czułością molekularną, a w połączeniu z wielowymiarową analizą danych dostarcza informacji ilościowych i jakościowych o molekułach budujących tkankę, stanowiąc swoisty „odcisk palca” badanej struktury. Stąd też w niniejszej pracy postanowiono wykorzystać możliwości tej metody do badań tkanek płuc w modelu zwierzęcym dysplazji oskrzelowo-płucnej.

Cel pracy

Analiza zmian tkanek płuc w modelu zwierzęcym dysplazji oskrzelowo-płucnej oraz porównanie uzyskanych wyników ze zdrową kontrolą.

Material i metody

Wszystkie eksperymenty wykonano w Hudson Institute of Medical Research oraz Australian Synchrotron w Australii. Do badań wykorzystano myszy model BPD, zaindukowanej poprzez wywołanie u ciężarnych myszy okołoporodowego stanu zapalnego oraz umieszczenie mysich osesków w hiperoksji (65% tlenu, grupa badana), oraz w normoksji (21% tlenu, grupa kontrolna). W 28. dniu życia myszy zostały humanitarnie uśmiercone, a ich płuca wycięto i po utrwaleniu zatopiono w bloczki parafinowe. Do badań mikroskopowych oraz spektroskopowych wykorzystano różnej grubości skrawki płuc pochodzące od dziesięciu myszy z grupy kontrolnej oraz jedenastu myszy z grupy badanej. Skrawki do badania morfometrycznego pęcherzyków płuc wybarwiono hematoksyliną i eozyną. Pozostałe skrawki poddano obrazowaniu mikrospektroskopowemu FPA-FTIR w celu zbadania zmian w oskrzelach oraz S-FTIR dla oceny zmian w pęcherzykach płucnych. Widma transmisyjne zostały zebrane w zakresie $4000-900\text{ cm}^{-1}$ dla oskrzeli oraz $3800-700\text{ cm}^{-1}$

dla pęcherzyków, z rozdzielczością spektralną 4 cm^{-1} . Każdą próbkę poddano obrazowaniu przynajmniej trzykrotnie w różnych obszarach, odpowiadających ścianom oskrzeli lub pęcherzyków płucnych, wyznaczonych uprzednio na kompatybilnych skrawkach wybarwionych. Po wstępnym przetwarzaniu map chemicznych, uzyskane widma zostały opisane pod kątem występujących w nich charakterystycznych pasm. W kolejnym etapie procesu badawczego obliczono współczynniki absorpcji i poddano widma analizie PCA.

Wyniki

Wyniki wszystkich wykonanych analiz wykazały wyraźne różnice pomiędzy tkanką płuc osobników chorych i zdrowych. Analiza morfometryczna wykazała 60% redukcję ilości pęcherzyków płucnych, 80% spadek powierzchni wymiany gazowej oraz dwukrotne powiększenie rozmiaru pęcherzyków płucnych w grupie badanej. Zmiany molekularne w ścianach oskrzeli dotyczą głównie wzrostu ilości konformacji α -helisy amidu I-rzędowego, wzrostu ilości kolagenu oraz tyrozyny. Z kolei zmiany molekularne w pęcherzykach płucnych dotyczą zarówno zmian ilościowych amidów I i II rzędu, kolagenu, tyrozyny, DNA czy RNA, jak również zmian konformacyjnych tych związków. Zgromadzone dane potwierdzają obraz patologiczny „nowej” BPD, w której obserwuje się mniejsze zmiany w oskrzelach, a znacznie większe w pęcherzykach płucnych.

Wnioski

1. Mikrospektroskopia w podczerwieni FTIR jest odpowiednio czułym narzędziem do charakteryzowania zmian w płucach w przebiegu dysplazji oskrzelowo-płucnej w populacji zwierzęcej (myszy).
2. Stwierdza się wysoką zgodność otrzymanych wyników z wynikami innych metod badania zmian patologicznych w dysplazji oskrzelowo-płucnej.
3. Z uwagi na fakt, że analizy spektralne i chemometryczne ścian oskrzeli wykazały znaczną zgodność pomiędzy zestawami danych z różnych przedziałów czasowych, istnieje możliwość wykonania modelu klasyfikacyjnego bazującego na uzyskanych wynikach, jednak wykracza to poza ramy niniejszej pracy.
4. Istnieje konieczność przeprowadzenia kolejnych badań z wykorzystaniem dodatkowych metod komplementarnych takich jak spektroskopia Ramana, spektroskopia światła widzialnego i ultrafioletu, czy spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego.
5. Celowym jest przeprowadzenie badań na większej populacji osobników, co pozwoli na podwyższenie statystycznej wiarygodności wyników przeprowadzonych badań.

Słowa kluczowe: dysplazja oskrzelowo-płucna, spektroskopia FTIR, oskrzela, pęcherzyki płucne