

# Kísérleti eszközök és módszerek fejlesztése a hipoxia és annak sportra gyakorolt hatásának vizsgálatára

Doktori értekezés

**Bagó Marcell**

Testnevelési Egyetem  
Sporttudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Lacza Zsombor tudományos főmunkatárs, DSc

Hivatalos bírálók: Dr. Pavlik Gábor professor emeritus, DSc  
Dr. Holnapy Gergely egyetemi adjunktus, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Pavlik Gábor professor emeritus, DSc  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Sós Csaba egyetemi tanár, PhD  
Dr. Sántha Hunor egyetemi docens, PhD

Budapest  
2021

## Bevezetés

A vérellátási zavarból eredő halálozási okokat gyakoriságuk miatt sejt, szövet és állatmodellek széles körében vizsgálják. Az Európai Unióban 2016-ban több mint 1,8 millió ember hunyt el szívroham vagy az agyat érintő iszkémiás elváltozás miatt.

Iszkémiáról akkor beszélünk, ha valamilyen oknál fogva csökken, vagy teljesen megszűnik a szövetek vérellátása. Erősen aerob szövetek esetén, mint például az agy vagy a szív, akár néhány perc elteltével végleges károsodást okozhat. A reperfüzió tovább növelheti a sérülés mértékét az iszkémiás állapot megszűnése után. A károsodás sebessége csökkenthető, ha a sejtek testhőmérséklet alá hűlnek, mivel ekkor a metabolikus folyamatok jelentősen lelassulnak.

Az oxigén-glükóz depriváció (OGD) széleskörben alkalmazott *in vitro* eljárás, amely többek közt alkalmas sejtszintű iszkémia és hipoxia vizsgálatokra. Testhőmérsékleten széles körben vizsgált folyamat. Ezzel szemben az alacsony hőmérséklet iszkémiás szövetekre gyakorolt hatása kevésbé vizsgált tudományterület.

A sejt és szövetszintű *in vitro* modelleken kívül *in vivo* állatkísérletek is vizsgálják az iszkémia, illetve a hipoxiás környezet szervezetre gyakorolt hatását. Az egyik leggyakrabban használt eljárás az artéria cerebri média okklúzió (MCAO) patkányokban és egerekben.

Léteznek azonban olyan noninvazív vizsgálatok is, amelyek szintén alkalmasak az agyi expozíció tanulmányozására. Egyes beszámolók szerint az alvási apnoe a kardiovaszkuláris betegségek, vagy a stroke egyik fő, független kockázati tényezője. Az alvási apnoe (OSA – Obstructive Sleep Apnoea) egy krónikus, széles körben alul diagnosztizált állapot, amelyet az alvási fázisok megzavarása és a légzés rövid leállása miatti időszakos (szakaszos) hipoxia jellemez. Az alvási apnoe és a különféle klinikai rendellenességek közötti kapcsolat megértéséhez olyan állatkísérletes modellre van szükség, amely a lehető legpontosabban szimulálja az alvási apnoe állapotát, hogy tisztázza mind a következményeket, mind a lehetséges terápiás stratégiákat.

A bemutatott humán kísérletekkel főleg az anaerob sporttevékenység közben bekövetkező hipoxiás állapotot vizsgáltuk. Sok megoldás létezik az edzések ilyen fajta kiegészítésére, valamint továbbra is nyitott kérdés, hogy hogyan kell optimálisan megválasztani a hipoxiás edzések jellemzőit (a felkészülés mely szakaszában alkalmazzuk, mennyi ideig, milyen formában stb.). Ezen kérdések már inkább az

edzésmethodika területéhez tartoznak. A dolgozatban bemutatott kutatómunka során inkább arra voltunk kíváncsiak, hogy mely élettani paraméterek határozzák meg a hipoxia tűrőképességet.

## Célkitűzés

1. Olyan OGD kísérletre alkalmas kamra fejlesztése, amely a következő tulajdonságokkal rendelkezik:
  - a. 0 és 37 °C között szabályozható hőmérséklet tartomány
  - b. 0,5% alatti O<sub>2</sub>-koncentráció biztosítása a kísérlet teljes ideje alatt
  - c. szabályozható átáramlás a gázfogyasztás optimalizálása érdekében
  - d. 90% feletti páratartalom a minták kiszáradása ellen
  - e. moduláris felépítés, legalább két minta befogadására alkalmas, amelyek szükség esetén egymástól független hőmérsékleten és időben indíthatók
  - f. a kísérleti eszköz és protokoll validálása *in vitro* sejt és szövetminták felhasználásával
  
2. Olyan szakaszos hipoxiás kamra létrehozása, amely alkalmas az obstruktív alvási apnoe egereken történő modellezésére. Az eszközzel szemben támasztott követelmények a következők:
  - a. az állatok eredeti tároló ketrecének módosításával legyen kialakítva a modell, hogy elkerüljük az új környezet okozta stresszhatást
  - b. alkalmas legyen a gyors O<sub>2</sub>-koncentráció változtatásra a következő protokoll szerint: 90s 21% O<sub>2</sub> / 90s 5.7% O<sub>2</sub> folyamatosan váltakozva 8 órán keresztül
  - c. igény szerint módosítható legyen az időzítés és az O<sub>2</sub>-koncentráció értéke
  - d. az átáramló gáz páratartalma legyen 50±10% tartományban
  - e. az átáramló gáz homogén módon keringjen a zárt dobozban
  - f. a modell biológiai hatásának kimutatása
  
3. Edzett szabadtüdő bűvárok és edzetlen kontroll személyek közti különbségek vizsgálata hipoxia alatt. Olyan élettani paraméterek kutatása, amelyek befolyásolják a hipoxia tűrőképességet. A mérések során a következő értékek monitorozását végeztük: véroxigén szaturáció; lépméret, volumetria és elasztográfiai változások; FVC (Forced Vital Capacity – Erőltetett kilégzési vitálkapacitás). A következő kérdésekre kerestük a választ:
  - a. Kimutatható-e szignifikáns különbség a két csoport apneateljesítménye között?

- b. Mérhető-e szignifikáns különbség a csoportoknál a fent említett élettani paraméterekben?

Összefoglalva a jelen munka egyik célja, hogy olyan fejlesztéseket mutasson be, amelyek felhasználhatók az *in vitro* iszkémia különböző hőmérsékleteken történő tanulmányozására, valamint az alvási apnoe állatkísérletes modellezésére.

Másfelől a további kísérletek a hipoxiás edzés humán vonatkozásait vizsgálják, amely során az adaptációs folyamatok tanulmányozása kerül előtérbe.

## Módszerek

A szövetkultúrák vizsgálatokat patkányból izolált calvaria csont graftokon végeztük. A minták begyűjtése 3-4 hónapos, ~350g tömegű hím Wistar patkányokból történt. A mintákat 37 °C-os összejtmediumban (DMEM, 10% FBS, 5% L-glutamin, 1% penicillin-streptomycin, Lonza) 3 napig inkubáltuk. Ezt követően párhuzamosan végeztünk hideg (4 °C) és meleg (37 °C) OGD vizsgálatot csoportonként n=12 mintán, glükózmentes tenyésztő oldatban. Az OGD-t követően a minták friss tenyésztő oldatba kerültek és 3 napos inkubációval (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) modelleztük a reperfüziós időszakot. A sejtek életképességének mérését kolorimetriás XTT (sárga tetrazolium) vizsgálattal végeztük a gyártó utasításai szerint. A sejtek metabolikus aktivitását abszorbanciaként, száraz tömegre normálva fejeztük ki. A vizsgálatokhoz egyedi fejlesztésű modellt használtunk fel, amely a célkitűzésekben megfogalmazott követelményeket igazoltan teljesíteni tudta.

Az *in vivo* állatkísérletben TLR2-luc-GFP transzgenikus egereket használtunk a hipoxia hatására bekövetkező TLR2 aktiváció vizualizációjára (Szakaszos hipoxiás csoport n=7; Kontroll csoport n=7). A nappali és éjszakai ciklusok 12-12 órák voltak. Az itatás és etetés ad libitum módon zajlott (a kísérlet közben is). A tároló helyiségek hőmérséklete és páratartalma szabályozott volt. Hím, 85±20 napos egerek közül véletlenszerűen válogatva alakítottunk ki két csoportot (IH n=7, CTRL n=7). A hipoxiás csoportban lévő állatokat napi 8 órában 21 napig kezeltük. A kísérlethez sajátfejlesztésű kamrát használtunk egyedi vezérlési rendszerrel. A kísérlet közben 90s periódusonként változtattuk az oxigénkoncentrációt (5,7% / 21%). A megfelelő gyorsaság érdekében a nitrogén áramlási sebességét 50 l/perc értékre állítottuk.

A vizsgálat során biolumineszcens molekuláris képalkotó kamerával (Xenogen IVIS-200, Caliper LifeSciences) jelenítettük meg az élő állatok agyában stressz hatására létrejövő TLR2 transzkripciós aktivitást. 25 perccel a felvétel előtt az egereknek intraperitoneális úton D-luciferint fecskendeztük be (150 mg/kg, 20 mg/ml D-luciferin 0,9%-os sóoldatban). Ezt követően az állatokat 2% izoflurán és 100% oxigén keverékével altattuk 1,5 l/perc áramlás mellett.

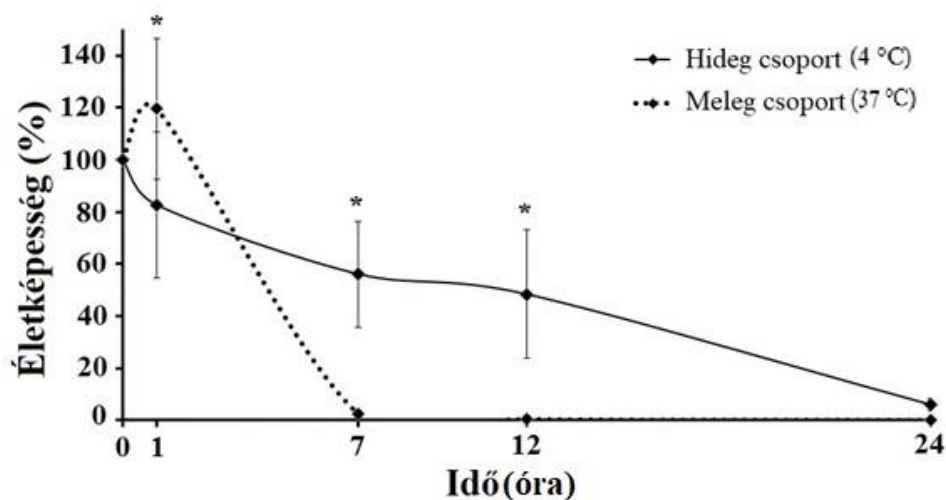
A sejt- és szövettani kísérleteken túl kíváncsiak voltunk a hipoxiás állapot adaptációs folyamataira is. Ehhez humán vizsgálatokat folytattunk, ahol az egyes szervrendszerek reakcióját mértük levegő megvonás közben. A mérésbe olyan

szabadtüdős bűvárokat vontunk be, akik rendszeresen végeznek hipoxiás edzéseket. A kontrol csoportba szabadtüdős bűvármúlittal nem rendelkező egyének kerültek.

Ezt követően olyan módszert kerestünk, amely alkalmas lehet a hipoxia tűrőképességet bizonyos élettani paraméterek közti különbség formájában kimutatni a kontroll és a bűvár csoportok között. A mért jellemzők: véroxigénszint, vitálkapacitás. Ezen felül különböző képalkotó eljárásokkal (UH, MR) a hipoxia hatására bekövetkező lépreakciókat is vizsgáltuk.

## Eredmények

Az OGD kamra műszaki jellemzéséhez négy mérést végeztünk. A minimális nitrogén átfolyást 1 liter/perc/kamra értékben határoztuk meg, hogy a szükséges 0,5%-os oxigénkoncentrációt stabil módon (~150s beállási időt követően) fenn tudjuk tartani. A hűtési idő körülbelül 20 perc, mire a kamra eléri a 4 °C-os hőmérsékletet. A Peltier-modul eltérő fűtési és hűtési teljesítménye miatt a meleg kamra hamarabb melegszik a kívánt 37 °C-os értékre. A páratartalom 92-98% között mozgott a meleg kamra esetében. A hideg kísérletnél 10-15%-ot mértünk. Egyik esetben sem tapasztaltunk jelentős mértékű folyadékvesztést.



**1. ábra** A csontszövet iszkémia tűrőképessége 37 és 4 °C hőmérsékleten. A kísérletet 1, 7, 12 és 24 órás iszkémia időkkel végeztük. A meleg csoport életképessége váratlan kiugrást mutatott az 1 órás expozíciónál. Ezt követően hirtelen csökkenés figyelhető meg a hideg csoport értékeihez képest. 7 órás kezelést követően a meleg csoport nem mutatott aktivitást. Az eredmények az adott méréshez tartozó kontroll csoporthoz (100%) viszonyított arányt mutatják (n=12) (Bago és mtsai 2018).

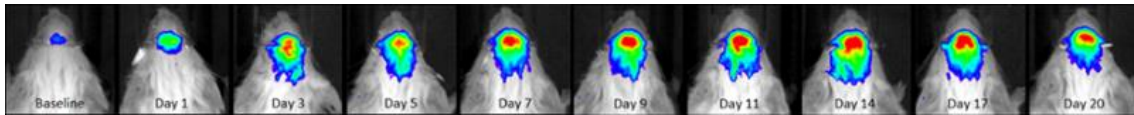
Eltérő hosszúságú (1, 7, 12, illetve 24 óra) hideg és meleg OGD kísérleteket végeztünk, hogy megfigyeljük a csontszövet iszkémiás állapottal szembeni tűrőképességét. Az 1. ábrán a csoportok közti arányok láthatók az adott méréshez tartozó kontroll csoport függvényében

A saját fejlesztésű OSA kamra tesztelése során a következő paramétereket vizsgáltuk: O<sub>2</sub>-szintek közti csere ideje, a szabályozó pontossága, a gázfogyasztás mértéke, a kamra páratartalma. Az eredmények alapján az oxigénkoncentráció, a rendszer késleltetése miatt  $\pm 0,5\%$ -os hibahatárral körülbelül 22s elteltével stabilizálódik



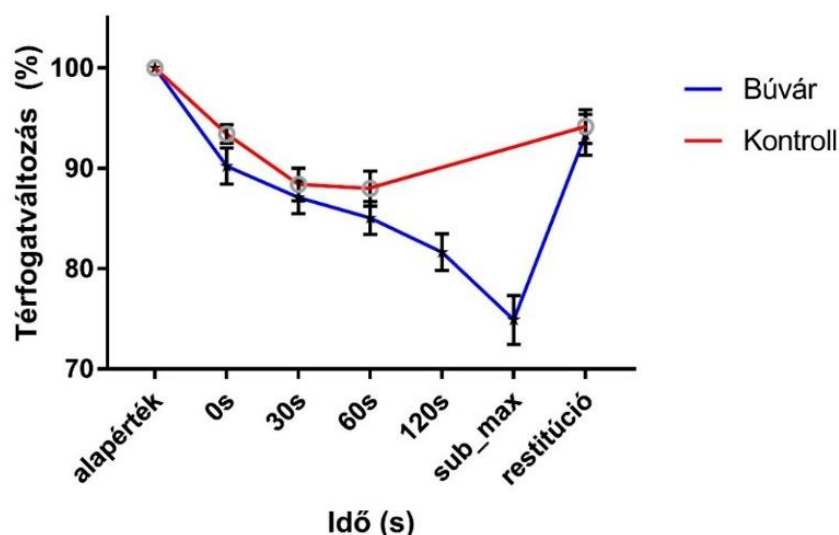
az egyes fázisokban. A 8 órás kísérlet során ~3200L nitrogént használtunk (80bar, 40L palack). A páratartalom a kísérlet teljes ideje alatt 60-70%-os tartományban mozgott.

A modell fiziológiai hatását biolumineszcens felvételekkel vizsgáltuk. A 2. ábrán látható, hogy hogyan változik az agyi stressz mértéke a kísérlet előre haladtával. Megfigyelhető, hogy az első héten erősen fokozódik az aktivitás, majd a kísérlet további részében lelassul a változás.



**2. ábra** Az obstruktív alvási apnoe kísérlet biolumineszcens kiértékelése. A kísérlet előtt, majd az 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17, 20. napokon készültek a felvételek. A színek jelölik a hipoxia okozta agyi stressz helyét és mértékét (IH, n=8; CTRL, n=7) (Polsek és mtsai 2017).

A humán vizsgálati eredmények alapján szignifikáns különbség mutatkozik a statikus és dinamikus apneateljesítményben a két vizsgált csoport (búvár, kontroll) között, azonban ez a különbség nem jelenik meg egyértelmű módon a vizsgált élettani paraméterekben. Megfelelő felkészítéssel a kontrol alanyoknál is tapasztaltunk mérhető szaturációs változást, így önmagában ez az érték nem mutatott szignifikáns eltérést. A spirometriai mérések sem mutattak jelentős különbséget a csoportok között, azonban azoknál a búvároknál, akik képesek voltak speciális „packing” technikával levegőt venni, szignifikánsan magasabb értéket mértünk ( $+1\pm 0,3L$ ).



**3. ábra** A búvár és a kontroll csoportnál mért térfogatváltozási adatok. Az ANOVA-vizsgálat szerint az eltérés nem szignifikáns a 0, 30 és 60 s időpontokban, de a tendencia alapján a búvárok nagyobb mértékű térfogatváltozást értek el a magasabb apnea teljesítménynek köszönhetően. Továbbá a 2 perces pihenő alatt a búvároknál nagyobb mértékű változást mutattunk ki. (n=10 búvár, n=13 kontroll)

A lép térfogat értékek egyik esetben sem estek a normális tartományon kívül. Az apnea hatására bekövetkező lép térfogatváltozás nyomon követésére az MR felvételek bizonyultak a legalkalmasabbnak.

A 3. ábrán látható mérési eredmények ugyan nem mutatnak szignifikáns eltérést 0-60 s mérési pontok között, de látható, hogy a bűvárok jelentősen hosszabb ideig bírták a levegő nélküli vizsgálatot és ezzel nagyobb térfogatváltozást értek el.

## Következtetések

Az eredmények alapján a dolgozatban bemutatott egyedi fejlesztések alkalmasak az iszkémia *in vitro*, illetve hipoxia *in vivo* modellezésére. A kidolgozott protokollok ismételhető és megbízható eredményt szolgáltatnak.

Az OGD modell fejlesztése során a validációs tesztek igazolták, hogy a készülék megfelel a kívánt követelményeknek. Stabil módon képes az általunk végzett kísérletekhez szükséges 4, illetve 37 °C-os hőmérséklet fenntartására, megfelelő szigeteléssel rendelkezik, amely biztosítja, hogy az oxigénkoncentráció folyamatosan 0,5% alatt maradjon. Pneumatikai elemek segítségével a rendszer nitrogén fogyasztását is sikerült optimalizálni. A tesztek alatt a páratartalom végig a szövetkultúráknak kedvező szinten maradt. A validációs eredmények megerősítették, hogy a kamra alkalmas az irodalomban és a piacon található más hipoxiás kamrákhoz hasonló funkciókra, így megalapozottá vált a kamra szövet kísérleti alkalmazása. Az OGD kísérletek során a szövetek túlélőképességét két paraméter befolyásolja: a hőmérséklet és az iszkémiás állapot időtartama. A két kamrás felépítés lehetővé tette az eltérő hőmérsékleten zajló, párhuzamos vizsgálatokat. Az ismételt kísérletek eredményei alapján a modell képes biológiai hatást kiváltani, ismételhető módon. Az eredmények pedig igazolják a felvetésünket, miszerint a hőmérséklet és az iszkémiás idő jelentősen befolyásolják a túlélési arányt. A rendszer továbbá alkalmazható iszkémia tűrőképesség fokozó vizsgálatokra, amely során optimalizált eljárás dolgozható ki az egyes szövet típusok konzervációjára. A transzplantációs területen kívül számos betegség és akut sérülés közben lezajló folyamatok jobb megértését is lehetővé teszi.

Az alvási apnoe modell technikai validációját empirikus úton valósítottuk meg. A tesztek során olyan beállításokat alkalmaztunk, amelyek biztosították a kívánt sebesség és oxigénkoncentrációk elérését. A menürendszer lehetővé tette a szabad paraméterválasztást, így a rendszer alkalmassá vált más protokollok vizsgálatára is. A technikai mérések során kapott adatok egybevágóak más tanulmányokban használt értékekkel, ezzel igazolva, hogy a kamra műszakilag alkalmas a modellezésre. A vizsgálatok alatt nem tapasztaltunk rendellenes viselkedést a kísérleti állatokon, amely megerősítette, hogy a kamra és az alkalmazott áramlássebesség, páratartalom megfelelő számukra. A biológiai validáció során a sorozatos hipoxiás expozíció gyulladással indított el az állatok agyában. A folyamat jól nyomon követhető volt

biolumineszcens képalkotó technológiával, illetve az elváltozások hisztológiai vizsgálattal igazolhatók a kísérletet követően. Az eredmények alapján az alvási apnoe állatkísérlettel modellezhető szakaszos hipoxia kamrában. A készülék ezen felül alkalmas lehet a hipoxia során kiváltott adaptációs mechanizmusok megfigyelésére is. Ezzel lehetőséget biztosít, hogy részletesebb információt kapjunk az egyes szervek hipoxia, illetve anoxia közben betöltött szerepéről.

Az eszközfelállítás mindkét esetben sikeresnek bizonyult, amelyek során olyan alpmódszereket hoztunk létre, amelyre más kutatásokat is fel lehet építeni. Ezt támasztja alá az azóta elindult kísérletek eredményei, amelyek alapján a jelen munkától függetlenül egy diplomamunka, egy doktori értekezés, illetve két tudományos publikáció megvalósulását is biztosították. Továbbá, a fejlesztőmunka sikerét tovább erősíti az obstruktív alvási apnoe kamra idén elfogadásra került szabadalmi bejelentése.

A humán vizsgálatoknál a teljesítmény adatok alapján egyértelműen látszott a különbség a kontroll és a búvár csoportok között. A búvároknál mért értékek alapján levonható a következtetés, hogy az apnea tűrőképesség edzéssel javítható, azonban az élettani mérések során nem találtunk olyan különbséget, amely egyértelműen azonosíthatná az adaptációt. Ennek ellenére a tüdőkapacitás és lépméret indikátora lehet az apneateljesítménynek.

A lépreakciók képalkotó eljárással nyomon követhetők, amely során megállapítottuk, hogy az ultrahang alkalmas arra, hogy a lépkontrakció tényét búvár esetében regisztráljuk, azonban arra nem alkalmas, hogy a méretváltozás pontos mértékét meghatározzuk. A megfigyeléseink szerint az MR bizonyult a legpontosabbnak, emiatt ennek alkalmazása lenne szükséges a későbbi vizsgálatokban.

A hipoxia tanulmányozására bemutatott három különböző megközelítés, együttesen egy olyan eszközparkot és lehetőséget kínál, amely a sejtszintű kísérletektől egészen a humán vizsgálatokig lehetővé teszi a kutatást. A megfigyelések és az irodalmi adatok alapján a kísérletek jó kiegészítői egymásnak. Az obstruktív alvási apnoe kamra kiváló kapcsolódási pont az OGD és apnea kutatások között. A két kamrát együtt használva az *in vivo* módon kiváltott elváltozásokat *in vitro* OGD kísérlettel igazolni tudjuk. Ezen felül hasonlóság mutatkozik az apnea és az alvási apnoe közben zajló folyamatoknál. Az OSA kamra ez alapján alkalmas apnea kísérletekre is, amelyek eredménye felhasználható a humán vizsgálatok során is.

## **Saját publikációk jegyzéke**

### **A dolgozathoz kapcsolódó saját publikációk:**

Bago M, Horvathy D, Simon M, Marschall B, Pinto A, Kuten O, Polšek D, Hornyak I, Nehrer S, Lacza Zs. (2018) Temperature controlled dual hypoxic chamber design for in vitro ischemia experiments. *Biocybern Biomed Eng*, 38(3):498-503.

Polšek D, Bago M, Živaljić M, Rosenzweig I, Lacza Zs, Gajović S. (2017) A novel adjustable automated system for inducing chronic intermittent hypoxia in mice. *PLoS ONE* 12(3): e0174896.

### **A dolgozattól független saját publikációk:**

Horvathy D, Szanto P, Marschall B, Bago M, Csery M, Hornyak I, Doros A, Lacza Zs. (2020) Ketamine decreases cell viability of bone explants and impairs bone healing in rats. *J Orthop Surg Res*, 15(46):1-5.

Simon M, Major B, Vacz G, Kuten O, Hornyak I, Hinsenkamp A, Kardos D, Bago M, Cseh D, Sarkozi A, Horvathy D, Nehrer S, Lacza Zs. (2018) The Effects of Hyperacute Serum on the Elements of the Human Subchondral Bone Marrow Niche. *Stem Cells Int*, 2018(4854619):1-12.

Lacza Zs, Marschall B, Bagó M, Gyevnár Zs, Béres Gy, Szabó B, Kovács P. (2018) A dinamikus Q-szög futókban és balett táncosokban: térsérülésre hajlamosító tényező, amely edzéssel elkerülhető? *Sportorvosi Szemle*, 59(2):65.