

# Kunstig lungemodel kan sikkerhedsteste spraymidler

*Udarbejdet af Aiko Sho Nielsen (freelancejournalist og gymnasielærer i biologi) for Danmarks 3R-Center (copyright)*

**På Det Nationale Forskningscenter for Arbejdsmiljø har forskere udviklet en dyrefri in vitro-metode som kan vise, om forskellige stoffer i sprayform skader lungernes surfaktant-lag. Dermed kan antallet af forsøgsdyr, som bruges til disse sikkerhedstests, reduceres. Projektet støttes af Danmarks 3R-Center.**

Selvom vi trækker vejret mange gange i minuttet, tænker de færreste af os over det. Når man tager en indånding, suser atmosfærisk luft ned gennem luftrøret, bronkierne og bronkiolerne for at ende i alveolerne, som er de yderste forgreninger af lungerne. Her sker udvekslingen af gasser mellem blodet og luften, sådan at kroppens celler hele tiden får tilført ny ilt til respirationen og gennem udåndingen skiller sig af med kuldioxid. Uden denne proces kan cellerne – og dermed vi selv – ikke overleve. Derfor er det ikke så mærkeligt, at vi gennem evolutionen har udviklet mekanismer, som gør, at det føles ubehageligt, hvis vi prøver at holde vejret for længe, eller hvis vi indånder noget skadeligt.

For at vi kan passe på vores lunger, er det vigtigt at kende til de stoffer, som kan irritere og skade luftvejene. De fleste af os kender imprægneringsmidler fra dagligdagen. Det kan være produkter, som man bruger på sine sko, tøj, møbler eller gulve, for at gøre dem vand- og smudsafvisende. Mange af disse produkter sælges som sprayflasker, der indeholder væske under tryk og indeholder en opløsning med meget små dråber (mindre end  $1\mu\text{m}$  i diameter). Denne type imprægneringsmidler er man særligt interesseret i at sikkerhedsteste, fordi man har set eksempler på, at nogle af dem kan være giftige, hvis de indåndes i for høj koncentration.

Når man skal undersøge, om stoffer skader lungerne ved indånding, bruger man ofte dyreforsøg, hvor fx mus fungerer som model for mennesket. Men på Det Nationale Forskningscenter for Arbejdsmiljø har forskere udviklet en dyrefri in vitro-metode, som kan vise, om et stof i sprayform skader en vigtig del af lungerne, nemlig det såkaldte surfaktantlag i alveolerne. Med den nye metode håber man at kunne reducere brugen af forsøgsdyr til sikkerhedstests.

## **Partiklernes størrelse er vigtig**

Når man skal undersøge eller forudsige, om et stof, som indåndes, kan skade luftvejene, spiller størrelsen af partiklerne en stor rolle. Groft sagt er det de små partikler, som kan give os de største problemer.

Hvis der svæver partikler i luften omkring os, indånder vi dem, og jo mindre partiklerne er, jo længere kan de nå ned i luftvejene. Heldigvis er vores luftveje opbygget sådan, at de beskytter vores lunger. Når luften passerer gennem næsen/munden, og derefter gennem luftrøret, bronkier og bronkioler, opvarmes og fugtes luften, mens den passerer de mange sving og forgreninger. Dette effektive filter betyder, at partikler, som er større end ca.  $10\mu\text{m}$  (mikrometer), opfanges på deres rejse enten i næsen eller af bronkierne og

bronkiolernes mange små fimrehår, cilierne. Fimrehårene i bronkierne transporterer partiklerne op i svælget, hvorefter de synkes.

En del af de partikler, som er mindre end  $10\ \mu\text{m}$ , vil nå helt ud i alveolerne, som er de yderste forgreninger af lungerne. Man ved også, at såkaldte nanopartikler, som er mindre end ca.  $100\ \text{nm}$  ( $< 0,1$  mikrometer), som udgangspunkt altid kan nå ned til alveolerne, hvis de indåndes. Der er ingen fimrehår i alveolerne, så nanopartiklerne fjernes af makrofager (ædeceller), der fungerer som en slags skraldemænd. Makrofager optager partikler og bakterier, som derefter nedbrydes eller transporteres bort fra lungerne gennem lymfævæsken eller via bronkiolerne. En makrofag fjerner kun en eller få partikler af gangen, så hvis der er mange små partikler, går det meget langsommere, end hvis der er få større partikler. Alveolerne er derfor sårbare overfor skadelige partikler.

Imprægneringsprodukter på aerosolform laver dråber, som er mindre end  $1\ \mu\text{m}$ . De er luftbårne i længere tid end partikler fra produkter på almindelig pumpeflaske. Det betyder, at flere dråber indåndes fra den sky, som udløses, når man bruger aerosolproduktet. Derfor er man også særlig opmærksom på at sikkerhedsteste aerosolprodukter.

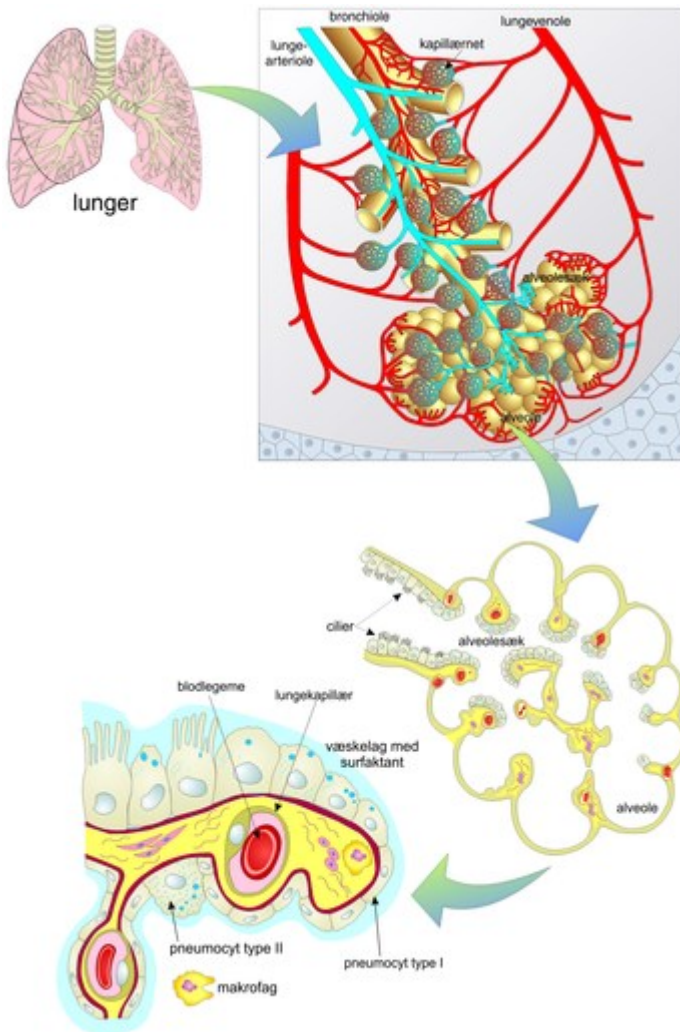
### Surfaktantlaget

I hver lunge har vi omkring 300 millioner alveoler, som hver især kun er cirka  $200\ \mu\text{m}$  i diameter. Alveolernes indre overflade er dækket af et væskelag, som indeholder lungesurfaktant. Voksne mennesker har kun ca.  $10\text{-}20\ \text{mL}$  lungesurfaktant, så væskefilmen i alveolerne er meget tynd ( $0,2\ \mu\text{m}$ ). Hvis man foldede alle dele af luftvejene ud, ville man få en overflade på omtrent  $100\ \text{m}^2$ , og langt det meste af arealet ville udgøres af alveoler. Den store overflade sikrer, at diffusionen af ilt og kuldioxid ind og ud af alveolerne foregår effektivt og hurtigt. Her spiller surfaktant en afgørende rolle for, at vores lunger fungerer.

I 1990'erne opdagede man, at den væsentligste årsag til at børn der var født tidligere end uge 34 døde, var, at de blev overbelastede, når de forsøgte at trække vejret, fordi deres lunger havde for lidt eller næsten ingen lungesurfaktant. Man ved i dag, at mange personer har nedsat lungesurfaktantfunktion, som følge af lungesygdom. Dette sker blandt andet ved ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome), som kan opstå, når man udsættes for fx traumer, sepsis (infektion) eller hvis man inhalerer giftige kemikalier m.fl. Lungesurfaktantens funktion spiller også en rolle i sygdomme som astma, KOL og lungebetændelse.

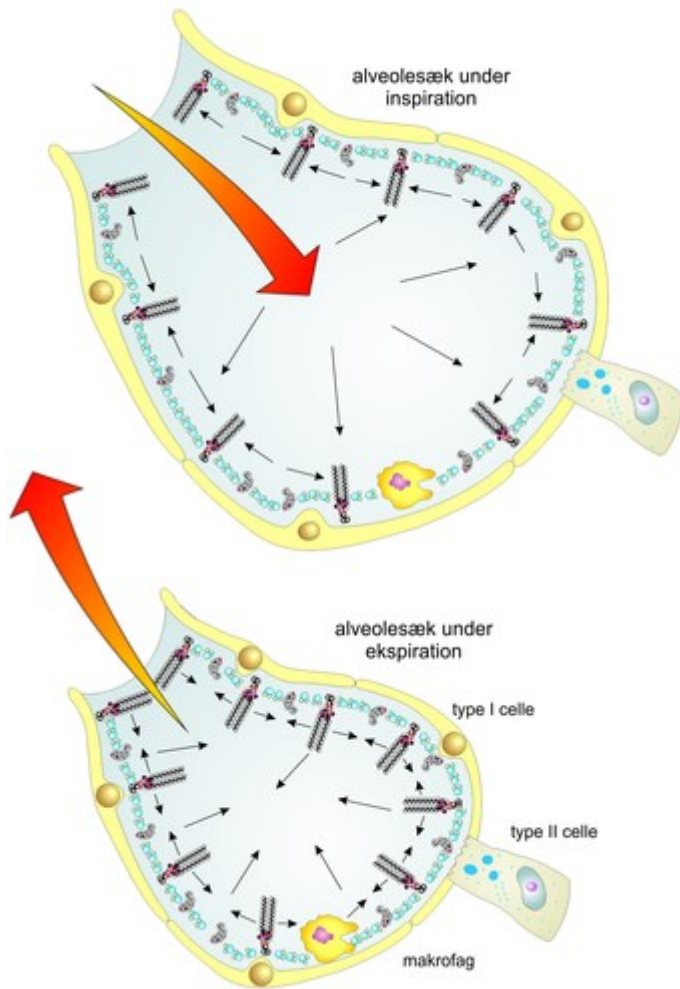
Surfaktantlaget er en kompleks blanding af lipider og proteiner, som reducerer overfladespændingen på væskefilmen (se figur 2). Overfladespænding opstår, fordi molekylerne i en væske tiltrækkes af hinanden. Det er overfladespændingen, der holder sammen på en dråbe. I rent vand er overfladespændingen  $70\ \text{mN/m}$  (millinewton per meter), men i alveolerne er den væsentligt lavere. Det skyldes, at væskelaget indeholder surfaktant. Alveolens størrelse ændrer sig desuden i takt med, at man ånder ind eller ud. Når man ånder ud, bringes væggene i alveolerne tættere på hinanden. Hvis overfladespændingen var lige så høj, som i rent vand, ville de klappe sammen. Lungesurfaktanten sænker overfladespændingen til nær  $0\ \text{mN/m}$  under en udånding, så selv meget små alveoler kan holdes åbne (se figur 3).

Det betyder, at vi skal bruge meget få kræfter på at trække vejret. Hvis lungesurfaktanten derimod er beskadiget, fx på grund af indånding af noget giftigt, sænkes overfladespændingen ikke til disse meget lave værdier, og de mindste alveoler vil kollapse rundt omkring i lungerne. Det vil medføre, at nogle af de yderste bronkioler fyldes med væske. Det kræver mange kræfter at åbne alveolerne og fjerne væsken fra bronkiolerne, og man vil trække vejret tungt og med besvær. I værste fald kan skader på surfaktanten føre til, at lungerne klapper sammen (såkaldt atelaktase), hvilket er en livsfarlig tilstand.

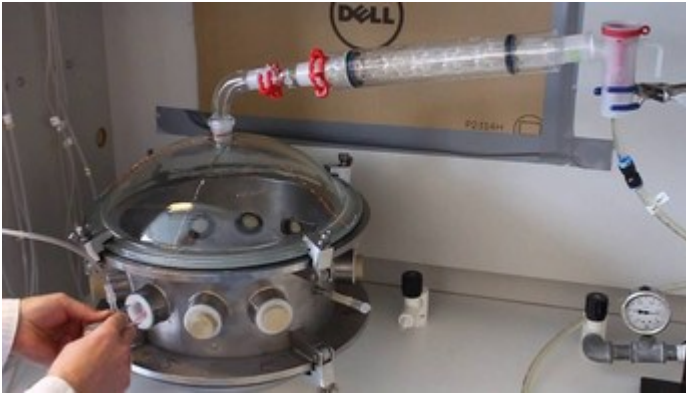


**Fig. 1: Lungernes opbygning:** I alveolerne sker den livsvigtige udveksling af ilt og kuldioxid mellem blodkarrene og alveolernes luftrum. Alveolernes indre overflade består af et enkelt celleglag med to typer celler: Type I- og II-pneumocytter. Det er type II-pneumocytterne, som producerer og udskiller den såkaldte surfaktant til væskelaget, som dækker indersiden af alveolerne. Surfaktanten hjælper med at holde alveolerne åbne under udånding, sådan at man kan trække vejret uden at bruge for mange kræfter (Copyright Jens Bøgeskov).





**Fig. 3: Overfladespænding:** Trykket, som holder sammen på en dråbe vand, er større i en mindre dråbe end i en større dråbe. Så hvis væsken i alveolerne bestod af rent vand, ville væskelaget i en tørt/'lille' alveole (efter en udånding) have større tendens til at samle sig, og dermed sammentrække alveolens indre vægge, end væskelaget i en udvidet alveole. Surfaktantens evne til at nedsætte overfladespændingen stiger, når alveolens størrelse falder. På den måde modvirker et fungerende lag af surfaktant at alveolen klapper sammen (Copyright Jens Bøgeskov).

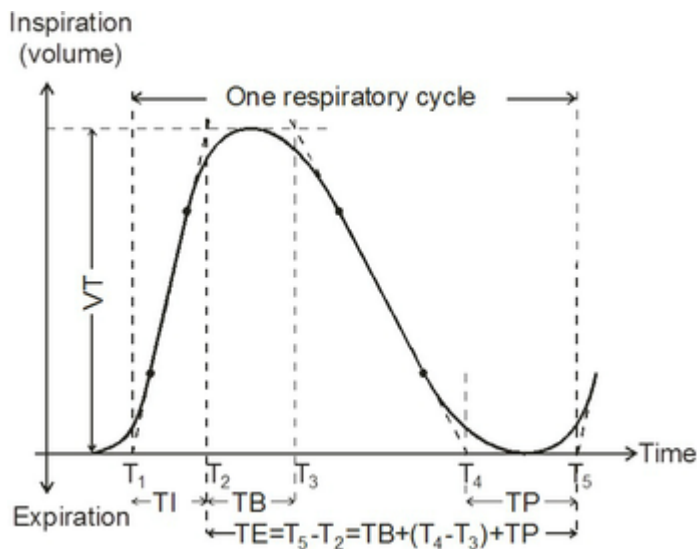


**Fig. 4: Test af imprægneringsmidler:** Aerosolkammer til mus. Musene sidder i hvert deres rør, med hovedet pegende ind mod kammerets midte. Den aerosol, som man ønsker at teste, sprøjtes herefter ind i kammeret. Musenes vejrtrækningsmønster registreres af et spirometer, som aflæser trykændringer i luften rundt om musens krop, som opstår ved ind- og udånding. De nuværende guidelines fra OECD foreskriver, at man tester med ret høje koncentrationer (op til 5g/m<sup>3</sup>) i op til fire timer (Copyright Danmarks 3R-Center).

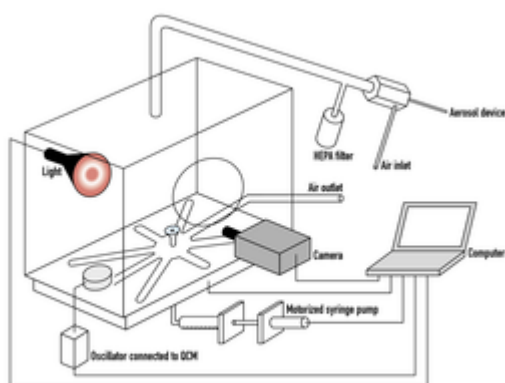
### Viden fra vejrtrækningen

Målinger af vejrtrækningens faser, fx fra dyreforsøg, kan ikke blot bruges til at afsløre, om et stof skader luftvejene, men kan også sige noget om typen og placeringen af skaden:

- Irritation i øvre luftveje: Stimulation af smertereceptorer i næse og øvre svælg medfører en forlænget TB-fase, dvs. perioden efter en indånding, før musen ånder ud igen – i praksis kan man se, at musen 'holder vejret'.
- Irritation af nedre luftveje: Når smertereceptorer i de nedre luftveje (luftrør og bronkier) aktiveres, ser man en forlænget TP-fase. Musen holder længere pause mellem åndedragene, næsten som om den forsøger at udskyde at trække vejret. Nogle gange vil musen vise et andet refleksmønster, hvor den trækker vejret hurtigt og overfladisk. Dette skyldes, at dens Tidal Volumen (VT) er nedsat, hvilket gør, at vejrtrækningsfrekvensen øges, så cellerne kan få deres behov for ilt dækket.
- Ødelagt surfaktant: Hvis surfaktantlaget i alveolerne mangler eller er ødelagt, vil musen få et nedsat Tidal Volumen og et nedsat udåndingsflow (Expiratory Flow Rate; udåndingsvolumen per tidsenhed). Dette skyldes, at de mindste alveoler vil klappe sammen og de mindste bronkioler gradvist fyldes med væske, når musen ånder ud. Vejrtrækningen bliver derfor overfladisk, og det føles som 'tungt arbejde' at trække vejret.



**Fig. 5: Vejtrækningens faser:** Når man tager en indånding stiger Tidal Volumen (VT). Når man herefter laver en udånding falder VT igen. Når man undersøger om stoffer er giftige ved indånding, kigger man typisk på Tidal Volumen samt vejtrækningsfrekvensen og udåndingsflowet (Expiratory Flow Rate) hos mus. Resultaterne fra mus bruges til at forudsige, om menneskers luftveje også vil reagere på de undersøgte stoffer. Figuren vises med tilladelse fra: Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 2005, 96, 420–428: Mechanisms of Acute Inhalation Effects of ( $\pi$ ) and (a)-a-Pinene in BALB/c Mice.



**Fig. 6: Den kunstige lungemodel:** Den kunstige lungemodel, CDS (Constrained Drop Surfactometer) er et lufttæt kammer, hvori der kan sprøjtes kontrollerede mængder aerosol ind. En motoriseret pumpe kan ændre størrelsen på en dråbe, som hviler på piedestalen i bundpladen. Dråbens form optages på film af kameraet, som er koblet til en computer. Figuren vises med tilladelse fra: The American Thoracic Society: American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology Volume 54 Number 3 | March 2016: A Proposed In Vitro Method to Assess Effects of Inhaled Particles on Lung Surfactant Function, Jorid B. Sørli, Emilie Da Silva, Per Bäckman, Marcus Levin, Birthe L. Thomsen, Ismo K. Koponen and Søren T. Larsen.