

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY PALACKÉHO V OLOMOUCI

KATEDRA OPTIKY



# **VLIV INHALACE VODÍKU NA SLZNÝ FILM**

Diplomová práce

VYPRACOVALA:

Bc. Nikol Valentová

Obor 5345T008 OPTOMETRIE

Školní rok 2023/2024

VEDOUCÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE:

Mgr. Lenka Musilová, DiS., Ph.D.

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci napsala samostatně a pod vedením Mgr. Lenky Musilové, DiS., Ph.D. za použití literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne 15. 4. 2024

.....

Bc. Nikol Valentová

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Mgr. Lence Musilové, DiS., Ph.D., vedoucí diplomové práce, za vstřícnost, konzultace a připomínky, které mi při psaní práce poskytla. Dále bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Františku Pluháčkovi, Ph.D., za rady a doporučení týkající se experimentální části mé práce. Dále děkuji mé rodině a přátelům, kteří mě podporovali nejen při psaní této diplomové práce, ale i po celou dobu mého studia.

Tato práce byla vytvořena za podpory projektů IGA PřF UP v Olomouci s názvem "Optometrie a její aplikace", č. IGA\_PrF\_2023\_004 a IGA\_PrF\_2024\_019.

# OBSAH

ÚVOD.....	6
1 VODÍK .....	7
1.1 Chemický prvek H.....	7
1.2 Funkce molekulárního vodíku v lidském organismu.....	8
1.2.1 Volné radikály .....	8
1.2.2 Oxidační stres .....	10
1.2.3 Antioxidanty .....	10
2 VYUŽITÍ MOLEKULÁRNÍHO VODÍKU .....	13
2.1 Možnosti aplikace H <sub>2</sub> .....	13
2.1.1 Inhalace .....	13
2.1.2 Hydrogenová voda.....	14
2.1.3 Injekce.....	14
2.2 Terapeutické účinky molekulárního vodíku.....	14
2.2.1 Vliv H <sub>2</sub> na celkový organismus .....	15
2.2.2 Vliv H <sub>2</sub> na zrakový aparát .....	16
3 SLZNÝ FILM .....	19
3.1 Funkce slzného filmu.....	19
3.2 Funkční jednotka slzného aparátu .....	19
3.3 Struktura slzného filmu.....	21
3.3.1 Lipidová vrstva .....	21
3.3.2 Mukovodná gelová vrstva .....	22
3.4 Stabilita a dynamika slzného filmu .....	25
3.5 Vznik oxidačního stresu.....	26
3.5.1 Syndrom suchého oka .....	27
4 EXPERIMENTÁLNÍ OVĚŘENÍ Vlivu INHALACE H <sub>2</sub> NA SLZNÝ FILM	29
4.1 Metodika a subjekty.....	29
4.1.1 Subjekty.....	29
4.1.2 Popis experimentu.....	30



4.1.3 Použitá zařízení a metody měření .....	32
4.1.4 Analýza dat .....	34
4.2 Výsledky .....	35
4.2.1 Inhalace do plic.....	36
4.2.2 Inhalace pomocí brýlí.....	39
4.3 Diskuze .....	42
ZÁVĚR.....	45
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	46

# ÚVOD

Molekulární vodík je nejmenší molekula plynu, která je díky své struktuře nejjednodušším prvkem v přírodě. Dnešní doba nám umožňuje tuto molekulu zkoumat detailněji. Dosud nebyly prokázány žádné negativní vlivy  $H_2$  na lidský organismus, ba naopak. Molekulární vodík je označován jako účinný antioxidant zabraňující vzniku oxidačního stresu. Několik studií potvrdilo jeho protizánětlivé, protialergické a antiapoptotické účinky téměř ve všech orgánech, včetně zrakového aparátu.

Slzný film působí jako bariéra mezi okem a vnějším prostředím, jež je zodpovědná za zdraví, pohodlí, mechanickou, environmentální a imunitní ochranu. Pokud je narušena lipidová vrstva slzného filmu, do oka je propuštěno větší množství kyslíku. Důsledkem zvýšené hladiny  $O_2$  je nadprodukce volných radikálů, což vede k oxidačnímu stresu v buňkách, a tím k několika zánětlivým onemocněním povrchu oka. Proto se tato diplomová práce zaměřila na souvislost mezi slzným filmem a molekulárním vodíkem jakožto antioxidantem zabraňujícím rozvoji oxidačního stresu v této vrstvě.

Práce je rozdělena na část teoretickou, která se skládá ze tří hlavních kapitol, a část experimentální. První kapitola teoretické části charakterizuje chemický prvek vodík a jeho funkce v lidském organismu, včetně volných radikálů, oxidačního stresu a antioxidantů. Závěr této kapitoly diskutuje o molekulárním vodíku jakožto účinném a bezpečném antioxidantu. Druhá kapitola teoretické části pojednává o terapeutických účincích molekulárního vodíku a možnostech samotné aplikace tohoto plynného prvku do našeho těla. Následně jsou uvedeny vlivy molekulárního vodíku nejen na celkový organismus, ale i na zrakový aparát. Třetí kapitola teoretické části je věnována charakteristice slzného filmu, konkrétně jeho funkci, struktuře a funkční jednotce slzného aparátu. V závěru této kapitoly je popsán vznik oxidačního stresu v slzném filmu a jeho možný vliv na přední segment oka. Experimentální část popisuje ověření vlivu inhalace  $H_2$  na slzný film, při kterém je hodnocena doba rozpadu slzného filmu, výška a objemová složka slzného menisku.

# 1 VODÍK

V úvodu této kapitoly budou popsány vlastnosti, výskyt a využití chemického prvku vodíku. Poté budou rozebrány funkce molekulárního vodíku v lidském organismu, včetně volných radikálů, oxidačního stresu a antioxidantů. První kapitolu uzavírá pojednání o molekulárním vodíku jakožto účinném a bezpečném antioxidantu.

## 1.1 Chemický prvek H

Vodík je chemický prvek, který se nachází na prvním místě v periodické tabulce prvků a je označován symbolem „H“. Jeho atom se skládá z jednoho protonu, tvořící jádro, a jednoho elektronu. Právě díky této struktuře je nejjednodušším prvkem v přírodě a zároveň nejmenším atomem ve vesmíru, v němž tvoří téměř 75 % hmoty. Vodík má tři přírodní izotopy nazývané protium, deuterium a tritium, avšak existují také uměle syntetizované formy. Jejich fyzikální a chemické vlastnosti se liší mnohem více než izotopy kteréhokoli jiného prvku. Za objevitele vodíku se, podle definice vědeckých objevů, považuje Henry Cavendish, protože byl prvním vědcem, který tento prvek pečlivě studoval a určil některé kritické vlastnosti. (Sun a kol. 2015, Housecroft & Sharpe 2012, Ohta 2012)

Molekulární vodík  $H_2$  je nejmenší molekula plynu složená ze dvou protonů a dvou elektronů. Na Zemi se vyskytuje především ve formě vody nebo v organických/anorganických sloučeninách (uhlovodících, živočišných a rostlinných tělech). Tato dvouatomová molekula se při pokojové teplotě chová jako bezbarvý, netoxický, nekovový plyn bez chuti a zápachu. Zemská atmosféra obsahuje méně než 1 ppm plynného vodíku, zatímco v atmosférách Jupiteru, Neptunu, Saturnu a Uranu je zastoupen v daleko větším množství. Hlavním důvodem malého výskytu  $H_2$  v atmosféře je jeho vypařování do vesmíru. V pevném stavu struktura vodíku odpovídá nejtěsnějšímu hexagonálnímu uspořádání. Protože mezi molekulami  $H_2$  působí pouze slabé van der Waalsovy síly, je jeho teplota tání a teplota varu velmi nízká. (Ohta 2015, Ohta 2012, Sun a kol. 2015, Ohno a kol. 2012, Nicolson a kol. 2016, Housecroft & Sharpe 2012)

Molekulární vodík má nejmenší molekulovou hmotnost v přírodě a jeho hustota je menší než hustota vzduchu. Za standardních podmínek, tedy při teplotě 0 °C a tlaku 101,325 kPa, odpovídá hmotnost 1 l plynného vodíku 0,089 g. Hmotnost vodíku odpovídá přibližně 1/14 hmotnosti vzduchu. Díky této vlastnosti se dříve používal

vodíkový balón jako dopravní prostředek. Vodík je výbušný při 4–75 % koncentraci. Při koncentraci větší jak 75 % hoří a jeho teplota samovznícení na vzduchu je přibližně 500 °C. V každodenním životě je H<sub>2</sub> chemicky stabilní, což je dáno především silnou kovalentní vazbou mezi atomy. Při zapálení čistého plynného vodíku může tento plyn vytvářet modrý plamen či vydávat teplo. Pokud bychom přikryli kádinku, ve které provádíme tento pokus, na jejích stěnách by se začaly objevovat kapičky vody. (Ohta 2015, Ohta 2012, Sun a kol. 2015, Ohno a kol. 2012, Nicolson a kol. 2016)

Jedním z primárních zdrojů endogenního vodíku jsou střevní bakterie. K největšímu procentu produkce H<sub>2</sub> přispívá kmen rodu *Clostridium*, členové čeledi *Enterobacteriaceae* a anaerobní koky. Molekulární vodík vzniká jako vedlejší produkt fermentačních reakcí, a to zejména oxidací pyruvátu, mravenčanu a redukovaných dinukleotidů. Náš organismus v průměru vyprodukuje 1 l plynného vodíku denně. Maximálně je však schopen vyrobit až 12 l. Tento vyprodukovaný H<sub>2</sub> spotřebovávají tři hlavní skupiny mikrobů jako součást svého metabolismu. Produkci H<sub>2</sub> lze změřit dechovým testem, jenž se může použít k diagnostice bakteriálního přerůstání nebo dysbiózy. Na závěr lze tedy říct, že ačkoli je množství exogenně přijímaného molekulárního vodíku mnohem menší než množství produkované střevními bakteriemi, H<sub>2</sub> vykazuje výrazný účinek, jak bude popsáno v kapitole 2.2. (Ostojic 2018, Ohno a kol. 2012)

## 1.2 Funkce molekulárního vodíku v lidském organismu

V posledních letech se studium biologie více věnuje tématu volných radikálů, a to díky jejich stěžejní roli ve fyziologických stavech a účasti při různých onemocněních. Na náš organismus mohou v malém množství volné radikály působit prospěšně, při vyšších koncentracích naopak škodlivě. Jsou spojovány se zdravotními riziky a s pojmem oxidační stres, proti kterému náš organismus bojuje pomocí antioxidantů. (Pláteník 2009, Phaniendra a kol. 2015)

### 1.2.1 Volné radikály

Obecně se prooxidanty dělí na reaktivní formy kyslíku (ROS) a reaktivní formy dusíku (RNS). Tyto formy lze dále rozdělit do dvou skupin sloučenin, a to na volné radikály a další neradikálové reaktivní druhy (viz tab. 1, str. 9). Při nízkých hladinách mají ROS i RNS příznivé účinky a podílejí se na různých fyziologických funkcích, např. při imunitních reakcích, na řadě buněčných signálních drah, na mitogenní odpovědi

a na redoxní regulaci. Hladinu pod kontrolou udržují endogenní antioxidační systémy, mezi něž patří superoxiddismutáza, kataláza, glutathionperoxidáza a různé vitamíny. (Valko a kol. 2007, Nordberg & Arnér 2001, Nicolson a kol. 2016) Ve vyšších koncentracích však ROS i RNS mohou nepříznivě ovlivňovat důležité třídy biologických molekul, jako jsou nukleové kyseliny, lipidy a proteiny a DNA. Tímto dochází ke změně redoxního stavu, což vede ke zvýšenému oxidačnímu stresu a potenciálnímu poškození molekuly. (Phaniendra a kol. 2015)

Tab. 1: Rozdělení vybraných prooxidantů. (vytvořeno dle Phaniendra a kol. 2015)

Prooxidanty	Symbol
<b>Reaktivní formy kyslíku (ROS)</b>	
Volné radikály	
<i>Superoxid</i>	•O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
<i>Hydroxyl</i>	•OH
Neradikálové reaktivní druhy	
<i>Peroxid vodíku</i>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>Reaktivní formy dusíku (RNS)</b>	
Volné radikály	
<i>Oxid dusnatý</i>	NO•
Neradikálové reaktivní druhy	
<i>Peroxynitrit</i>	ONOO <sup>-</sup>

Volné radikály pocházejí jak z endogenních zdrojů (mitochondrie, peroxizomy, endoplazmatické retikulum, fagocytární buňky atd.) jako vedlejší produkty oxidačního metabolismu, tak z exogenních zdrojů (znečištění, alkohol, tabákový kouř, těžké kovy, přechodné kovy, průmyslová rozpouštědla, pesticidy, některé léky a záření). Radikál lze definovat jako atom nebo molekulu, která obsahuje jeden nebo více nepárových elektronů ve své valenční vrstvě. Tento lichý počet elektronů jej činí nestabilním a vysoce reaktivním. Vzhledem ke své vysoké reaktivitě mohou volné radikály odevzdat nebo získat elektrony z jiných sloučenin a tím dosáhnout stability. Napadená molekula se tak sama stává volným radikálem, čímž začíná kaskáda řetězových reakcí, které vedou k poškození živé buňky. (Phaniendra a kol. 2015) Neradikálové reaktivní formy mohou taktéž snadno vést k reakcím v živých organismech. (Genestra 2007)

### 1.2.2 Oxidační stres

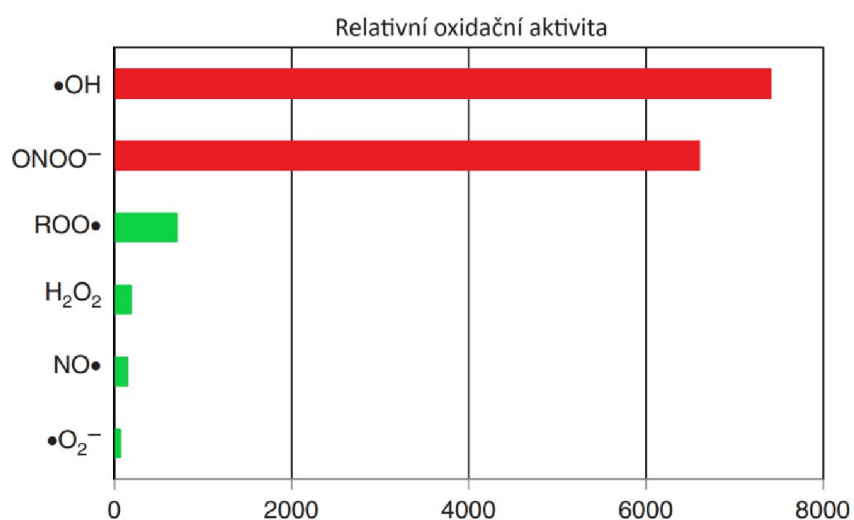
Oxidační stres je definován jako stav nerovnováhy mezi nadměrným množstvím volných radikálů a jejich nedostatečným odbouráváním antioxidantními systémy v rámci obranného mechanismu. (Daenen a kol. 2019) Jelikož jsou mitochondrie hlavním intracelulárním zdrojem volných radikálů, jsou také počátečním cílem oxidačního poškození. Nadbytek ROS i RNS způsobuje progresivní oxidační poškození mitochondriálních membrán, proteinů a mitochondriálního DNA a případně dalších buněčných složek. Tato mitochondriální dysfunkce se vyskytuje v podstatě u všech chronických onemocnění. (Nicolson a kol. 2016) Akutní oxidační stres může být způsoben několika faktory, včetně zánětu, intenzivního cvičení, srdečního infarktu, zastavení průtoku krve a transplantace orgánů. (Ohsawa a kol. 2007)

Oxidační stres vede k poškození tkání u různých chorobných stavů, jako je metabolické onemocnění (diabetes mellitus), neurodegenerativní onemocnění (Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba a roztroušená skleróza), kardiovaskulární onemocnění (ateroskleróza a hypertenze), revmatické onemocnění (revmatoidní artritida), gastrointestinální onemocnění, neoplastické onemocnění, oční onemocnění (katarakta, syndrom suchého oka, glaukom) atd., a tím výrazně urychluje progresi onemocnění. (Phaniendra a kol. 2015, Oharazawa a kol. 2010) Oxidační stres se rovněž podílí na procesu stárnutí, a to jak již zmíněným poškozením mitochondriálního DNA, tak i dalšími mechanismy. (Nordberg & Arnér 2001)

### 1.2.3 Antioxidanty

Lidské tělo má zabudovaný obranný mechanismus proti oxidačnímu stresu, jsou jím antioxidanty. Doktoři Halliwell a Gutteridge (1998) navrhli definici antioxidantu jako „*jakoukoli látku, která zpomaluje, zabraňuje nebo odstraňuje oxidační poškození cílové molekuly*“. Jak z definice vyplývá, antioxidanty inhibují několik destruktivních oxidačních reakcí tím, že se samy oxidují. Tento obranný systém funguje prostřednictvím kaskády blokování počáteční produkce volných radikálů a vylučování oxidantů, při níž se oxidanty přeměňují na méně toxické sloučeniny a tím zabraňují sekundární produkci toxických metabolitů. Následně se obranný systém zaměřuje na opravu molekulárního poškození či posílení endogenního antioxidantního obranného systému, který se skládá z enzymatických a neenzymatických antioxidantů. (Daenen a kol. 2019, Procházková a kol. 2011)

Od ideálního antioxidantu se očekává, že zmírní nadměrný oxidační stres, ale zároveň nenaruší redoxní homeostázu. Jinými slovy, ideální molekula by neměla redukovat signální molekuly, jako je peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ale měla by účinně redukovat silné oxidanty, jako je hydroxylový radikál ( $\bullet\text{OH}$ ). (Ohta 2015) Reaktivní oxidační aktivitu jednotlivých prooxidantů znázorňuje obr. 1. Z experimentů pana Christensena a jeho kolegy Sehesteda (1983) vyplynulo, že molekulární vodík neutralizuje  $\bullet\text{OH}$  ve vodných roztocích při 20 °C. Ve studii (Ohsawa a kol. 2007) na základě fluorescenčních signálů barviva MitoSOX a dichlorfluoresceinu bylo zjištěno, že  $\text{H}_2$  rozpuštěný v kultivačním médiu nemění buněčnou hladinu superoxidu ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), peroxidu vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a oxidu dusnatému ( $\text{NO}\bullet$ ), které mají důležitou fyziologickou úlohu. Významně snížená hladina byla naopak zaznamenána u  $\bullet\text{OH}$ . (Setsukinai a kol. 2003) Ohsawa a jeho kolegové (2007) prokázali, že molekulární vodík zachycuje také peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), avšak v menší míře. Pan doktor Ohta (2015) došel k závěru, že ideálním antioxidantem by mohl být právě  $\text{H}_2$ , protože působí terapeuticky a preventivně tím, že selektivně redukuje vysoce reaktivní oxidanty, jako je  $\bullet\text{OH}$  a  $\text{ONOO}^-$ .

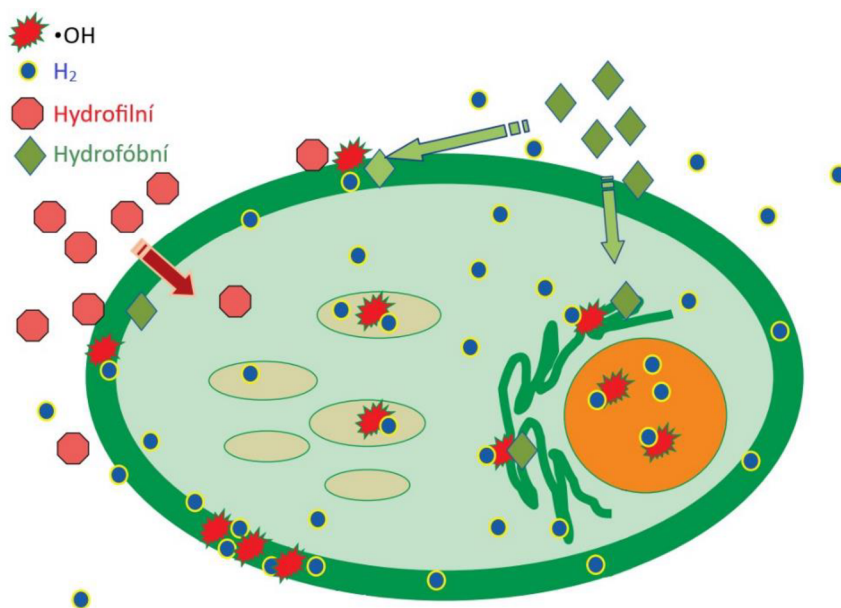


Obr. 1: Relativní oxidační aktivity jednotlivých reaktivních forem kyslíku a dusíku. Červená – vysoce reaktivní oxidanty  $\bullet\text{OH}$  a  $\text{ONOO}^-$ . Zelená – signální molekuly  $\bullet\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{NO}\bullet$  (upraveno). (Ohta 2015)

### Molekulární vodík jako antioxidant

Díky svým vlastnostem, které byly zmíněny v kap. 1.1, má  $\text{H}_2$  příznivé distribuční schopnosti. Molekulární vodík dokáže snadno pronikat biomembránami a difundovat do cytosolu, mitochondrií a jádra, jak znázorňuje obr. 2, str. 12. Navíc zvládne prostupovat přes hematoencefalickou bariéru, ačkoli to většina antioxidačních sloučenin

neumí. (Ohta 2015, Zhang a kol. 2022) Experimenty (Oharazawa a kol. 2010) naznačují, že  $H_2$  může rychle difundovat do tkání i v případě, že jsou avaskulární.



Obr. 2: Plyná difúze molekulárního vodíku v buňce. Většina hydrofilních sloučenin se zadržuje na membránách a nemůže se dostat do cytosolu, zatímco většina hydrofobních sloučenin nemůže proniknout biomembránami bez specifických přenašečů. Naproti tomu  $H_2$  se může rychle distribuovat jak do cytosolu, tak i do jednotlivých organel (upraveno). (Ohta 2015)

Molekulární vodík je bezpečný a účinný antioxidant s minimálními vedlejšími účinky ve srovnání s účinky jiných antioxidantů. Jelikož  $H_2$  účinně zasahuje jádro a mitochondrie, má preventivní účinky proti nemocem souvisejícím s životním stylem, rakovině a procesu stárnutí. (Ohsawa a kol. 2007) Ohta (2015) uvádí cytoprotektivní účinky proti oxidačnímu stresu a netoxicitu ani při vysokých koncentracích.  $H_2$  vykazuje také antialergické účinky. (Ohta 2012) Studie (Ohta 2015, Zhang a kol. 2022) odhalily, že kromě přímé neutralizace vysoce reaktivních oxidantů, molekulární vodík nepřímo snižuje oxidační stres regulací exprese různých genů. Díky ní  $H_2$  působí jako protizánětlivá, protialergická a antiapoptická molekula, jež stimuluje energetický metabolismus. Je nepravděpodobné, že by molekulární vodík neměl žádné nepříznivé účinky, ačkoli nebyly dosud žádné nalezeny. Jsou tedy zapotřebí další výzkumy, aby se potvrdilo, zda má  $H_2$  nezjištěné potenciální nepříznivé účinky. (Zhang a kol. 2022)



## 2 VYUŽITÍ MOLEKULÁRNÍHO VODÍKU

V rámci druhé kapitoly bude uvedeno nejen dnešní využití molekulárního vodíku proti oxidačnímu stresu, ale i první studie zkoumající účinky tohoto prvku. Nejprve budou popsány jednotlivé možnosti aplikace molekulárního vodíku do těla. Následně budou uvedeny vlivy molekulárního vodíku na celkový organismus a se zaměřením na zrakový aparát.

### 2.1 Možnosti aplikace H<sub>2</sub>

Vzhledem k tomu, že se jedná o plyný prvek, lze ho podávat různými metodami. Může být inhalován, aplikován intravenózně či intraperitoneálně, nebo přijímán jako hydrogenová voda. Mezi další způsoby aplikace H<sub>2</sub> lze zařadit oční kapky, vodní lázeň a inhalační vodíkové brýle (viz. kap. 4.1.3). Prostřednictvím inhalačních brýlí lze snadno transportovat molekulu vodíku k povrchu rohovky stejně jako molekulu kyslíku. (Yazdani 2023) Molekulární vodík může snadno pronikat kůží a prostřednictvím krevního oběhu je distribuován do celého těla za pouhých 10 minut. Teplá vodní lázeň s rozpuštěným H<sub>2</sub> je tedy metodou, jež lze pohodlně aplikovat v každodenním životě. V Japonsku je dostupná možnost volně zakoupit tablety s H<sub>2</sub>, které lze použít k přípravě těchto koupelí. (Ohta 2015, Zhang a kol. 2022)

#### 2.1.1 Inhalace

Inhalace plyného vodíku je jednou z nejčastěji používaných metod při jeho podávání. Molekulární vodík lze inhalovat prostřednictvím nosní kanyly, lékařského ventilátoru či obličejové masky. Vdechovaný plyný H<sub>2</sub> vstupuje do plic, difunduje do alveol a následně se přes cévní systém přenáší do celého těla. (Wu a kol. 2023, Nicolson a kol. 2016, Zhang a kol. 2022)

Ono a kol. (2012) při sledování inhalace 3-4 % plyného H<sub>2</sub> prokázali, že nemá vliv na žádné fyziologické parametry, což nenaznačuje žádné nežádoucí účinky. Vzhledem k tomu, že se inhalovaný molekulární vodík rychle vstřebává, může být vhodný pro obranu proti akutnímu oxidačnímu stresu. (Ohsawa a kol. 2007) Inhalace H<sub>2</sub> má využití i při transplantaci orgánů ke snížení poranění střev a plic a taktéž k prevenci zánětu orgánů. (Nicolson a kol. 2016)

### 2.1.2 Hydrogenová voda

Po diskuzi o různých způsobech podávání vodíku do našeho organismu Shen a kol. (2014) došli k závěru, že pití vody obohacené o  $H_2$  může být nejpraktičtějším a nejjednodušším způsobem v každodenním životě. Oproti inhalaci  $H_2$  se jedná o přenosný, snadno podávaný a bezpečný způsob příjmu. (Wu a kol. 2023, Ohta 2015)

Vodíkovou vodu lze vyrobit několika způsoby, a to infuzí plynu  $H_2$  do vody za vysokého tlaku, pomocí fyzikálně-chemického jevu – elektrolýzou nebo reakcí kovového hořčíku či jeho hydridu s vodou. (Asada a kol. 2020) Rozpustnost molekulárního vodíku ve vodě je až 1,6 ppm při normálním atmosférickém tlaku a pokojové teplotě, aniž by došlo ke změně pH, chuti nebo barvy. Takto vyrobená hydrogenová voda by se měla skladovat spíše v hliníkové nádobě. Ze skleněných či plastových nádob vodík rychle uniká skrz stěny a za 8 hodin téměř vymizí. (Wu a kol. 2023, Ohta 2015) Studie (Shimouchi a kol. 2012) na základě výpočtů uvádí, že přibližně 40 %  $H_2$  z celkového množství vypité vodíkové vody je využito našim tělem, a přesto je tento způsob podání molekulárního vodíku účinný při zlepšování buněčných a metabolických procesů.

### 2.1.3 Injekce

Přestože je podávání vodíku inhalací a pitím vodíkové vody bezpečné a snadno použitelné, příjem dávky do konkrétní cílové oblasti je omezený. Vodík je možné aplikovat intravenózně nebo intraperitoneálně ve formě fyziologického roztoku obohaceného o  $H_2$ , díky čemuž lze dosáhnout přesnější dávky do postižené oblasti. (Wu a kol. 2023, Zhang a kol. 2022)

Publikace (Jiang a kol. 2021, Chu a kol. 2019) prokázaly touto metodou aplikace molekulárního vodíku neuroprotektivní potenciál u četných mozkových poruch. Protože je injekce fyziologického roztoku obohaceného o  $H_2$  invazivní, je obtížné ji přijmout jako způsob každodenního ošetření vodíkem. Kromě toho hrozí u časté injekce riziko infekce. (Tian a kol. 2021)

## 2.2 Terapeutické účinky molekulárního vodíku

První studie zkoumající vodík využívaly řasy a bakterie, které tento prvek produkují. Bylo zjištěno, že vodík podporuje růst rostlin a reguluje rostlinné hormony a cytokiny. (Gaffron 1939) V roce 1888 byla provedena první aplikace vodíku jako zdravotnického prostředku. Vodík byl využit ve formě plynu k identifikaci kolorektální

perforace a vyhodnocení nutnosti operace. (Pilcher 1888) Další aplikace H<sub>2</sub> byla uskutečněna v roce 1995 při hlubokomořském potápění. Molekulární vodík byl použit ke snížení toxicity dusíku a dýchacího odporu v hlubinách moře, tedy k překonání vysokotlakého nervového syndromu. (Lafay a kol. 1995) V roce 2001 studie (Gharib a kol. 2001) prokázala, že vysokotlaký plynný H<sub>2</sub> má protizánětlivé vlastnosti, jež mohou vyléčit zánět jater vyvolaný parazity u zvířat. K zásadnímu průlomů ve studiích na toto téma došlo v červnu 2007, kdy pan doktor Ohsawa a kol. (2007) zaznamenali výrazný účinek H<sub>2</sub> u mozkového infarktu. Potkani byli podrobeni okluzi levé střední cerebrální arterie. Krysy umístěné v plynové komoře s 2–4 % vodíkem vykazovaly výrazně menší objemy infarktu ve srovnání s kontrolní skupinou.

Od té doby bylo provedeno velké množství studií, které zkoumaly terapeutické a preventivní účinky H<sub>2</sub>. V současné době bylo publikováno více než 15 000 článků. Tyto publikace zahrnují mnoho účinků molekulárního vodíku proti oxidačnímu stresu téměř ve všech orgánech. Kromě rozsáhlých studií na zvířatech s více než 170 druhy modelů zvířecích chorob bylo provedeno více než 70 klinických studií zkoumajících účinnost H<sub>2</sub>. (Ohta 2021) Molekulární vodík je snadno použitelný, protože vykazuje pozoruhodnou účinnost na téměř všechny patogenní stavy, které se účastní zánětu a oxidačního stresu. Následné studie i klinické experimenty prokázaly preventivní a terapeutické účinky H<sub>2</sub> v podstatě ve všech tkáních, včetně mozku, míchy, očí, uší, plic, srdce, jater, ledvin, slinivky břišní, střeva, krevních cév, svalů a chrupavek. (Zhang a kol. 2022)

### 2.2.1 Vliv H<sub>2</sub> na celkový organismus

Klinické studie (Chen a kol. 2019, Niu a kol. 2020, Wang a kol. 2020) ukázaly, že H<sub>2</sub> může zmírnit zánět a oxidační stres v dýchacích cestách u infekčních plicních onemocnění. Randomizovaná klinická studie (Zheng a kol. 2021) uvedla, že podávání směsi molekulárního vodíku a kyslíku je lepší než podávání samotného kyslíku ke zlepšení symptomů u pacientů s akutní exacerbací chronické obstrukční plicní nemoci. Doktor Ohno a jeho kolegové (2012) pozorovali výrazné účinky u ischemických a zánětlivých poruch. Rozsáhlá práce (Wu a kol. 2023) uvádí vynikající antioxidační a protizánětlivé účinky H<sub>2</sub> u různých mozkových poruch. Studie (Fu a kol. 2009) se zaměřila na podávání vodíkové vody u pacientů s Parkinsonovou chorobou. Aplikace H<sub>2</sub> potlačila ztrátu dopaminergních buněk a pravděpodobně zpomalila vývoj a progresi tohoto onemocnění.

Vdechování molekulárního vodíku ve 2 % koncentraci významně snížilo poškození myokardu vyvolané oxidačním stresem a velikost infarktu bez ovlivnění hemodynamických parametrů, a tím zabránilo škodlivé remodelaci levé komory. (Hayashida a kol. 2008) Pilotní studie (Katsumata a kol. 2017) u pacientů s infarktem myokardu prokázala, že inhalace plynného H<sub>2</sub> během perkutánní koronární intervence je proveditelná a bezpečná. Samotný vodík se zde podílí na podpoře reverzní remodelace levé komory po 6 měsících od samotného infarktu myokardu. Molekulární vodík má potenciál předcházet arterioskleróze, neboť ve studii (Kolovou a kol. 2008) konzumace vodíkové vody snížila hladinu oxidačního stresu v aortě a zabránila arterioskleróze u myši.

Dlouhodobá aplikace hydrogenové vody významně kontrolovala tuky a tělesnou hmotnost subjektů zařazených do výzkumu. Při výzkumu nedošlo ke zvýšení spotřeby jídla ani vody a byly zaznamenány nižší hladiny plazmatické glukózy, inzulinu a triglyceridů, jejichž účinek na hyperglykémii byl podobný jako dietní omezení. Tyto výsledky naznačují potenciální přínos H<sub>2</sub> při zlepšování obezity, diabetes mellitus a metabolického syndromu. (Kamimura a kol. 2011) Stejně výsledky u pacientů s diabetes mellitus ukazuje studie (Kajiyama a kol. 2009) a s metabolickým syndromem studie (Nakao a kol. 2010).

Studie (Nakashima-Kamimura a kol. 2009) uvádí, že molekulární vodík má potenciál zlepšit kvalitu života pacientů během chemoterapie. Molekulární vodík má mimo jiné příznivé účinky na tkáň při transplantaci orgánů, při léčbě rakoviny a kožních onemocnění. (Nicolson a kol. 2016) Publikace (Kato a kol. 2012) zkoumala produkci kolagenu v kožních fibroblastech a keratinocytech vystavených UVA záření. Zjistili, že syntéza kolagenu byla zvýšena více než 2x při aplikaci H<sub>2</sub> ve srovnání s kontrolní skupinou.

### 2.2.2 Vliv H<sub>2</sub> na zrakový aparát

Účinky byly pozorovány také v případě zrakového aparátu. Studie (Oharazawa a kol. 2010, Wei a kol. 2012) se ve svých výzkumech zaměřily na akutní glaukom. Účinek molekulárního vodíku se projevil i ve vrstvách sítnice (Tian a kol. 2013, Feng a kol. 2012, Yokota a kol. 2015) a měl pozitivní vliv na funkci optického nervu (Sun a kol. 2014). V případě předního segmentu byly zaznamenány změny na rohovce (Kubota a kol. 2011, Igarashi a kol. 2016) a zlepšená stabilita slz (Kubota a kol. 2021).

## Zadní segment oka

U akutního glaukomu dochází k přechodnému zvýšení nitroočního tlaku, jež významně snižuje tloušťku sítnice v důsledku ischemicko-reperfuzního poškození zprostředkovaného tvorbou ROS. Při kontinuální aplikaci očních kapek s H<sub>2</sub> se snížila hladina •OH, počet apoptotických buněk a ztenčení sítnice s doprovodnou aktivací Müllerových buněk. Obnova tloušťky vnitřní vrstvy sítnice se zlepšila na 70 %. (Oharazawa a kol. 2010) Studie (Wei a kol. 2012) prokázala sníženou ztrátu gangliových buněk a taktéž zmírněné ztenčení sítnice při léčbě pomocí molekulárního vodíku. Nejlepší výsledky byly pozorovány u subjektů, kterým byl H<sub>2</sub> aplikován jak do sklivce, tak do peritoneální dutiny.

Tian a kol. (2013) zkoumali účinky H<sub>2</sub> na poškození fotoreceptorů sítnice způsobené intenzivním světlem. Histologie ukázala, že významné ztráty byly zaznamenány v retinálním pigmentovém epitelu. Skupina, které byl podáván fyziologický roztok obohacený o H<sub>2</sub>, měla významně menší poškození, což bylo posouzeno podle elektroretinografie. Výsledky publikace Feng a kol. (2012) rovněž ukázaly, že intraperitoneální aplikace H<sub>2</sub> roztoku chrání sítnici před poškozením způsobeným světlem, a to zmírněním oxidačního stresu. Molekulární vodík byl také použit k ochraně zrakového nervu před účinky mechanického traumatu a poškozením způsobeným světlem. Sun a kol. (2014) zkoumali účinky H<sub>2</sub> při jeho každodenní aplikaci na funkci zrakového nervu. Funkce byla měřena pomocí zrakových evokovaných potenciálů a pupilárních světelných reflexů. Skupina, jež přijímala fyziologický roztok obohacený o H<sub>2</sub>, vykazovala významné zlepšení funkce optického nervu ve srovnání s kontrolami.

Molekulární vodík se osvědčil jako terapeutický antioxidant ke zpomalení degeneraci fotoreceptorů u pacientů s *retinitis pigmentosa*. Účinně neutralizuje cytotoxické ROS, usměrňuje abnormality v apoptotických kaskádách a zmírňuje související zánětlivé reakce. (Tao a kol. 2016) Publikace (Huang a kol. 2012) zkoumala terapeutický účinek H<sub>2</sub> u retinopatie vyvolané hyperoxií. Výsledky ukázaly, že byla snížena neovaskularizace sítnice, exprese vaskulárního endoteliálního růstového faktoru a byl potlačen oxidační stres. Yokota a kol. (2015) ve své studii dospěli k závěru, že H<sub>2</sub> má neuroprotektivní účinek proti oxidačnímu poškození buněk sítnice, pravděpodobně díky vychytávání peroxynitritu.

## **Přední segment oka**

Molekulární vodík se ukázal jako účinný v prevenci oxidačního a nitrosativního stresu u rohovek ozářených UVB, což by mohlo představovat nový profylaktický přístup při fotopoškození. V publikaci (Kubota a kol. 2011) studovali účinky aplikace H<sub>2</sub> roztoku jako přípravku pro podporu hojení rohovky při popálení zásadami. Výsledky ukázaly, že okamžitý výplach rohovky významně snížil angiogenezi. Tyto účinky popisují i Cejka a jeho kolegové (2017), kteří ve své práci uvádějí, že po okamžitém výplachu zasaženého oka byla během následujících pěti dnů obnovena rohovková transparentnost a během deseti dnů snížena zvýšená hydratace rohovky na fyziologickou úroveň. Z těchto studií vyplývá, že při akutním očním poranění nebo onemocnění, jako je popálení rohovky zásadami či ozáření rohovky UVB paprsky, je roztok H<sub>2</sub> nejučinnější, je-li aplikován na povrch oka okamžitě nebo alespoň velmi brzy po úrazu. V tomto případě molekulární vodík umožňuje hojení rohovky bez tvorby jizev, popř. neovaskularizace.

Při fakoemulzifikaci je ultrazvukem indukována tvorba hydroxylových radikálů, které poškozují endotel rohovky. Proto ve svém experimentu Igarashi a kol. (2016) při tomto chirurgickém zákroku použili roztok obohacený o H<sub>2</sub>. Výsledkem bylo významně snížené poškození endotelu rohovky a zabránění zvýšené hydratace vedoucí k zamlženému vidění. Yang a kol. (2013) sledovali po dobu 2 týdnů pomocí šterbinové lampy vývoj uměle vyvolané katarakty u potkanů. Velikost zakalení čočky se po podání H<sub>2</sub> fyziologického roztoku zmenšila ve srovnání s kontrolní skupinou.

Studie (Kubota a kol. 2021) se zaměřila na vliv H<sub>2</sub> na slzný film. Molekulární vodík byl podáván formou hydrogenové vody. Na malé skupině dobrovolníků byla měřena doba rozpadu SF a výška slzného menisku. U laboratorních potkanů byla zkoumána sekrece slz. Výzkum uvádí změny u obou případů. Molekulární vodík významně a zároveň bezpečně zlepšil stabilitu slz a zmírnil symptomy syndromu suchého oka, které budou více rozebrány v kap. 3.5.1. U potkanů se díky H<sub>2</sub> zvýšila tvorba slz a snížilo se množství vyskytujících se ROS.

## 3 SLZNÝ FILM

Třetí kapitola je věnována vrstvě, která působí jako bariéra mezi okem a vnějším prostředím a nazývá se slzný film. Nejprve bude charakterizována funkce této vrstvy. Poté se tato kapitola bude zabývat funkční jednotkou slzného aparátu a samotnou strukturou slzného filmu. Na závěr bude popsán vliv oxidačního stresu na přední segment oka.

### 3.1 Funkce slzného filmu

Slzný film (SF) je zodpovědný za zdraví, pohodlí, mechanickou, environmentální a imunitní ochranu povrchu oka. Charakteristická tloušťka SF měřená interferometrií je  $6,0 \mu\text{m} \pm 2,4 \mu\text{m}$  a objem se pohybuje v rozmezí 4–13  $\mu\text{l}$ . Jednou z jeho nejdůležitějších funkcí je poskytování hladkého refrakčního povrchu o indexu lomu 1,357. Je tedy zřejmé, že vysychání a nestabilita SF může vést k degradaci zraku a symptomům kolísání vidění, snížené kontrastní citlivosti, zvýšeným optickým aberacím a nepohodlí. SF musí reagovat na neustálý příval mechanických a chemických dráždivých látek, patogenních „vetřelců“, extrémních podmínek prostředí a musí být schopen rychle zahájit hojivou reakci. (Foster & Lee 2013, Pflugfelder & Stern 2020)

Další funkcí je ochrana očního povrchového epitelu rohovky a spojivky. SF funguje tak, že poskytuje trofické prostředí epiteliálním tkáním očního povrchu. Toho je dosaženo regulovanou sekrecí tekutin obsahujících ochranné faktory, včetně hydratačních glykoproteinů a antimikrobiálních látek. (Pflugfelder & Stern 2020, Masoudi 2022)

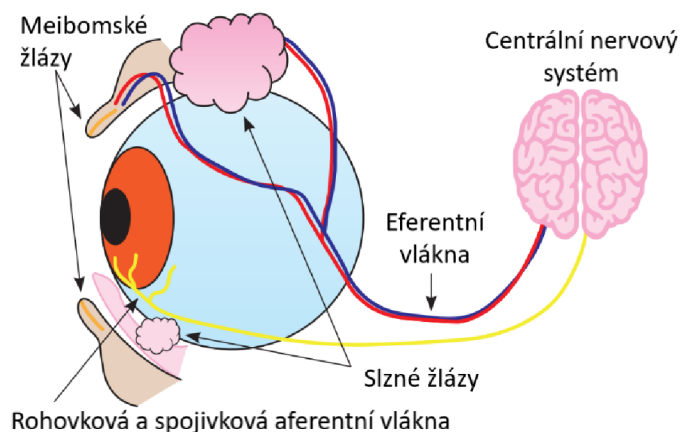
Úloha SF je také poskytnutí transportu kyslíku k jednotlivým vrstvám rohovky. Molekula  $\text{O}_2$  přijímaného ze vzduchu má parciální tlak 155 mmHg. Naopak při zavření víček odpadá přísun kyslíku z atmosféry a vyskytující se  $\text{O}_2$  v SF o tlaku 55 mmHg pochází ze spojivkových cév. (Kayal 2021, Papas & Sweeney 2016) Komorovou vodou je kyslík dodáván primárně endotelovým a stromálním buňkám. Míra spotřeby  $\text{O}_2$  se mezi jednotlivými vrstvami liší, přičemž nejvyšší je u epitelu (40 %), poté u stromatu (39 %) a nejnižší u endotelu (21 %). Nedostatek ale také nadměra kyslíku v této avaskulární tkáni může vést ke škodlivým účinkům. (Yazdani 2023)

### 3.2 Funkční jednotka slzného aparátu

Funkční jednotka slzného aparátu reguluje produkci, dodávání a odvádění slz za účelem udržení homeostatického prostředí na povrchu oka. Z anatomického hlediska zahrnuje slzotvorné orgány (hlavní a přídatné slzné žlázy, Krauseho žlázy a Wolfringovy

žlásky), slzovodné orgány (slzné body, slzné kanálky, slzný vak a slzovod), Meibomské žlázy, spojivkové pohárkové buňky, povrchový epitel rohovky, oční víčka, žlázový a slizniční imunitní systém a vzájemně propojenou inervaci. (Pflugfelder & Stern 2020, Foster & Lee 2013, Rozsíval 2006)

Sekrece slz je z velké části regulována nervovými reflexy, jak je znázorněno na obr. 3. Trojklanný nerv se upíná na povrchu rohovky, spojivky a očních víčkách, odkud přenáší informace do centrálního nervového systému. Aferentní nervová vlákna reagují na změny teploty a škodlivých podnětů prostřednictvím mechanických, polymodálních a chladových receptorů. Eferentní dráhy, jež končí v hlavních a přídatných slzných žlázách, spojivkových pohárkových buňkách a Meibomských žlázách, jsou zodpovědné za produkci slz. Podněty řídící tvorbu slz zahrnují nejen trigeminální zakončení na povrchu oka, ale také stimuly z nosní dutiny, sítnice a kůže. Když je tento podnět přerušen lokální nebo celkovou anestezií, transekcí rohovkového nervu nebo neurotrofickou infekcí, produkce slz se snižuje. Motorická vlákna lícního nervu inervují kruhový sval oční a stimulují mrkací reflex, který jednak rovnoměrně rozvádí slzy po povrchu oka a také dopravuje slzy do slzného jezírka, kde jsou nasávány slznými body. (Pflugfelder & Stern 2020, Foster & Lee 2013, Maggio 2019, Chang & Purt 2023)



Obr. 3: Nervové reflexy (upraveno). (Maggio 2019)

Malé množství slzné tekutiny, jež se ztratí odpařováním či absorpcí, je nahrazeno nově vyprodukovaným slzným sekretem. Nejnížší vypařování slz bylo zaznamenáno neprodleně po probuzení, pravděpodobně z důvodu rozdílného složení SF mezi otevřenou a uzavřenou oční štěrbinou. Po zavření oka se výrazně snižuje či dokonce ustává reflexní sekrece slz, přičemž je udržována konstitutivní sekrece, jejíž proteinový obsah tvoří téměř výhradně imunoglobulin A. Bylo pozorováno, že při zavřeném oku



nabývá lipidová vrstva větší tloušťky. Dlouhodobé zavření víček také vede k hromadění oxidu uhličitého, a tím ke snížení pH. (Chang & Purt 2023, Korb a kol. 2002)

Fyziologická tvorba slz se pohybuje v rozmezí 0,9 až 2,2  $\mu\text{l}/\text{min}$ . (Foster & Lee 2013) Lze rozlišit tři typy slz, a to bazální, reflexní a tzv. „flush“ slzy. Bazální (nestimulované) slzy jsou nepřetržitě produkovány slznými žlázami a jsou udržovány na povrchu oka. (Schnetler a kol. 2012, Masoudi 2022) Naopak reflexní (stimulované) slzy jsou vyvolány podnětem, jako je zívání, reakce na bolest či na jakékoli fyzikální a chemické látky. Reflexní slzení může pomoci vyplavit patogeny a dráždivé látky z povrchu oka. (Foster & Lee 2013) „Flush“ slzy se uměle shromažďují tehdy, když je odběr slz komplikovaný nebo pokud nelze odebrat žádný vzorek slz. Do očí je nakapán sterilní fyziologický roztok a odběr slz je proveden pomocí mikrokapilárních trubiček. (Masoudi 2022)

### 3.3 Struktura slzného filmu

Po desetiletí byl přijímán diskrétní třívrstvý model SF, který se rozděloval na vnější lipidovou vrstvu, střední vodnou složku a vnitřní mucinovou vrstvu. (Willcox a kol. 2017) V současné době se všeobecně uznává, že vodní a mucinová vrstva jsou spojeny do jedné mukovodné gelovité vrstvy s postupně klesajícím hlenovým gradientem od epitelu rohovky k vnější ochranné lipidové vrstvě. Struktura, umístění a význam lipidové vrstvy s přechodem na tento nový model zůstávají nezměněny. Cílem dvoufázového modelu je zdůraznit, že mucinová a vodná vrstva nejsou anatomicky ani funkčně odlišné. (Cohen a kol. 2020, Pflugfelder & Stern 2020, Foster & Lee 2013)

#### 3.3.1 Lipidová vrstva

Lipidová vrstva o tloušťce 40–160 nm se nachází na povrchu SF. (Masoudi 2022) Její hlavní funkcí je zpomalování odpařování slz a poskytnutí transportu pro molekuly kyslíku, viz kapitola 3.5. (Pflugfelder & Stern 2020) Nízké povrchové napětí lipidové vrstvy umožňuje rovnoměrné rozprostření SF, a tak poskytuje opticky hladký povrch oka. (Foster & Lee 2013)

Primárním zdrojem lipidů je olejový sekret označován jako „*meibum*“ vylučovaný Meibomskými žlázami, které se nacházejí za linií řas v horních a dolních víčkách. K dalším zdrojům, jež mohou také přispívat k produkci a interakci některých lipidů slz, se řadí buněčné membrány a proteiny vázající lipidy. (Foster & Lee 2013, Masoudi 2022) Publikace (Chang & Purt 2023, Dartt & Willcox 2013, Lam a kol. 2014) identifikovali

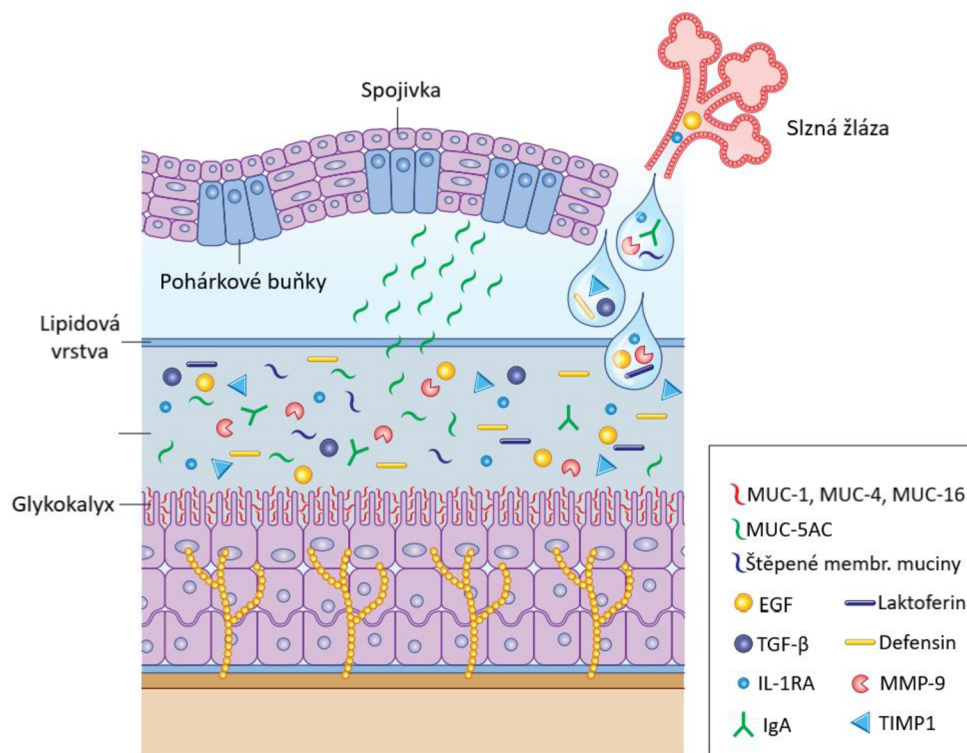
v SF více než 600 jedinečných lipidů ze 17 různých tříd. Lze je rozdělit na tenké vrstvy polárních lipidů propojených s vrstvou sekrečního hlenu a silnější vrstvy nepolárních lipidů na rozhraní se vzduchem. (Pflugfelder & Stern 2020) Přítomnost dostatečného množství každého z lipidů se správnou chemickou strukturou a distribucí je nezbytná pro efektivní funkci této vrstvy. (Masoudi 2022)

Nepolární vrstva tvoří cca 82 % lipidů v slzách a je tak hlavní složkou lipidové vrstvy. Má zásadní význam pro zabránění odpařování slz, protože se jedná o nejpovrchnější vrstvu, která je v kontaktu s atmosférou. (Glasgow & Abduragimov 2018) Vyskytují se zde směsi voskových esterů, estery cholesterolu, diestery, triacylglyceroly, volné cholesterolu a skvalen. (Ivanova a kol. 2015) Směsi voskových esterů vznikají kondenzací mezi mastnou kyselinou a mastným alkoholem. Mají schopnost vytvářet dlouhé uhlíkové řetězce, díky kterým jsou hydrofobní. Délka řetězce a stupeň nasycení určují tekutost a integritu lipidové vrstvy. (Masoudi 2022)

Polární vrstva tvoří menší frakci lipidů slz a to cca 8–18 %. Skládá se z fosfolipidů, ceramidů, cerebrosidů, volných mastných kyselin, sfingomyelinu a (O-Acyl)- $\omega$ -hydroxy mastné kyseliny. (Brown a kol. 2013) Polární povaha fosfolipidů pomáhá s rozpouštěním a transportem látek ve vodné části mukovodné vrstvy. Fosfolipidy ve spojení s jinými polárními lipidy působí jako povrchově aktivní látky a pomáhají udržovat nízké povrchové napětí snížením volné energie očního povrchu. (Masoudi 2022, Foster & Lee 2013)

### 3.3.2 Mukovodná gelová vrstva

Vodná část mukovodné gelové vrstvy tvoří většinu objemu slzného filmu a je nezbytná pro udržení lubrikace, ochrany očního povrchu před patogeny a pro odplavování nečistot. Objem vodné složky SF je neustále doplňován hlavními a vedlejšími slznými žlázami. Většina nestimulovaných slz pochází z Wolfringových a Krauseho žlázek. Tato vrstva obsahuje proteiny, peptidy, mediátory zánětu, sacharidy, močovinu, glukózu, kyslík a elektrolyty, jak lze vidět na obr. 4, str. 23. (Foster & Lee 2013, Chang & Purt 2023, Masoudi 2022)



Obr. 4: Složky SF produkované površovým epitelem, slznými žlázami a pohárkovými buňkami spojivky. Obsažené složky zajišťují lubrikaci (MUC-1, -4, -16), snižují povrchové napětí (MUC-5AC), chrání před zánětem (TGF-β, IL-1RA, TIMP1), bojují s infekcí (IgA, laktoferin, defensin) a podporují hojení (EGF) (upraveno). (Foster & Lee 2013)

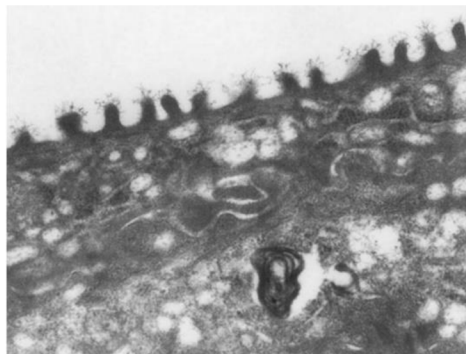
Normální osmolarita je udržována především elektrolyty jako je  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ . Je nezbytná pro udržení buněčného objemu, enzymatické aktivity a buněčné homeostázy. Její hodnota je 296–336 mOsm/dm<sup>3</sup> pro vzorky odebrané z dolního slzného menisku. Poměr dvojmocných a monovalentních kationtů udržují pH prostředí (7 – 7,3), řídí tok vody a určující tonicitu slz. (Stahl a kol. 2012)

Lidské slzy obsahují více než 1800 bílkovin. Za zdroje slzných proteinů je považována slzná žláza, epitel rohovky a spojivkové krevní cévy. Mezi hlavní proteiny se řadí laktoferin, lysozym, albumin, lipokalin a sekreční imunoglobulin A. (McDermott 2013, Masoudi 2022) Proteiny, jež fungují jako biologické katalyzátory, jsou označovány jako enzymy. (Robinson 2015) Aktivně se podílejí na rozkladu buněčných mikroorganismů a deskvamaci epiteliálních buněk. Nejhojnějším enzymem v lidském SF je lysozym. Peptidy hrají důležitou roli v biologických procesech, jako je mezibuněčná signalizace. Řada malých kationtových peptidů v slzách, jako jsou katecidiny, lakritiny a defensiny, mají široké spektrum antimikrobiální ochrany očního povrchu (Lee a kol. 2020). Mezi mediátory zánětu patří cytokiny a chemokiny. Jejich hladinové změny odrážejí stav zánětu, poškození očního povrchu a závažnost onemocnění. (Huang a kol. 2012)

Převládajícím sacharidem v SF je glukóza. Koncentrace glukózy v slzách koreluje s koncentracemi v krvi. (Baca a kol. 2007) Ve zdravých lidských slzách byla ve vysoké koncentraci detekována kyselina askorbová. Má důležitou roli při ochraně očního povrchu před škodlivými účinky záření a toxicity kyslíku. Hlavní látkou obsahující dusík v SF je močovina, která je vylučována spojivkou. Je jedním z faktorů, které udržují povrchovou vlhkost oka, proto ji lze použít v rámci potenciálního diagnostického testu pro zhodnocení suchosti povrchu oka. (Velamakanni a kol. 2021)

Mucinová složka této vrstvy je tvořena heterogenními skupiny glykoproteinů, které se skládají z bílkovinných struktur spojených širokou škálou oligosacharidových postranních řetězců obsahujících také močovinu a soli. (Foster & Lee 2013, Masoudi 2022) Povrchové epitelální buňky rohovky a spojivky produkují transmembránové muciny MUC-1, MUC-4 a MUC-16, jež zajišťují ukotvení glykokalyxu k buněčnému povrchu. Buňky slzné žlázy a spojivkové pohárkové buňky vylučují gelotvorné muciny MUC-5AC, MUC-5B a MUC-2. Muciny stabilizují vodnou vrstvu snížením povrchového napětí a hrají tak důležitou roli ve smáčivosti a lubrikaci očního povrchu. Poskytují viskozitu, která chrání epitel rohovky před opakujícím se tlakem způsobeným mrkáním. Gelotvorné muciny tvoří velmi velké struktury chránící povrch oka před patogeny tím, že je zachycují a přesouvají do nasolakrimálního vývodu pomocí mrkání. (Hodges & Dartt 2013, Foster & Lee 2013)

Apikální povrch rohovky je tvořen dlaždicovým epitelem s drobnými buněčnými výběžky tzv. mikroklky (viz obr. 5). Vlákná mikroklků interagují s muciny a vytváří glykokalyxový gel. Povrch mikroklků poskytuje silnou kotvu, která stabilizuje SF a chrání rohovku. Epitelální buňky rohovky žijí přibližně 7 až 10 dní a poté podléhají organizované apoptóze a deskvamaci, která je vysoce regulována metaloproteinázami a jinými signálními molekulami. (DelMonte & Kim 2011, Foster & Lee 2013)



Obr. 5: Mikroklky epitelu rohovky s transmembránovými muciny, které zasahují do mukovodné gelové vrstvy. (Foster & Lee 2013)

### 3.4 Stabilita a dynamika slzného filmu

Povrch oka vyžaduje dynamický a zároveň stabilní SF, aby mohl čelit environmentálním, imunologickým a optickým výzvám. (Foster & Lee 2013) Udržení stability slz je nezbytné pro zachování pohodlí a kvalitního vidění. Stabilita slz vyžaduje dynamickou interakci mezi hlavními složkami slz popsány výše. Nestabilní SF je charakteristickým znakem dysfunkce/deficitu slz a udržení stability je hlavním cílem terapie. (Pflugfelder & Stern 2020) Nyní je k dispozici celá řada metod pro posouzení aspektů SF, které poskytují pohled na jeho stabilitu. Vývoj směřoval k technikám, které jsou neinvazivní, hodnotí širokou oblast očního povrchu a umožňují zachytit a analyzovat dynamickou povahu a časovou nestabilitu slzného filmu. (Sweeney a kol. 2013)

Nejčastěji používaným diagnostickým testem pro stanovení nestability SF je *Fluorescein break-up time test* (FBUT). (Smith a kol. 2008, Korb 2000) Tato technika zahrnuje instilaci fluoresceinu sodného na oční povrch pomocí navlhčeného proužku nebo pipety. SF je pozorován biomikroskopem s využitím kobaltově modrého světla a žlutého filtru. Po dobu měření se pacient vyhýbá mrkání. Časový interval v sekundách následující po mrknutí do první trhliny, diskontinuity nebo suché skvrny pozorované v SF je definován jako FBUT. Hodnoty FBUT nižší než 10 s naznačují abnormální SF (Mengher a kol. 1985), přičemž hodnoty 5 s až 10 s jsou považovány za hraniční a hodnoty menší než 5 s svědčí o příznacích suchého oka. (Pflugfelder a kol. 1998)

Neinvazivní techniky zvané *Non-invasive break-up time* (NIBUT) obecně využívají mřížku nebo jiný obrazec namířený na prekorneální SF pro pozorování zkreslení a/nebo abnormalit ve výsledném obraze. Zaznamenává se opět časový interval. Tato metoda eliminuje fyzikální narušení SF při aplikaci fluoresceinu spolu s možností vyvolání reflexního slzení. Měření NIBUT se proto jeví jako ideální teoretická i realističtější metoda hodnocení stability slzného filmu než FBUT, u které lze očekávat, že poskytne spolehlivější a reprodukovatelnější výsledky. (Korb a kol. 2002)

K dalším obecně uznávaným metodám hodnocení objemu slzného filmu patří měření výšky slzného menisku (TMH). Tento parametr může být ovlivněn časem uplynulým po mrknutí, denními změnami, místem měření podél víček, přítomností spojivkových záhybů, klimatem a technickým osvětlením. Předpokládá se, že TMH o velikosti 0,2 mm a nižší je indikátorem nedostatku vodné části SF či abnormality lipidů. Množství slz má zásadní význam pro udržení normálního očního povrchu. Tuto produkci slz lze diagnostikovat různými testy. K těm nejčastěji používaným patří Schirmerův test.

Jedná se o proužek filtračního papíru, jenž se na jednom konci ohne a umístí do dolního temporálního spojivkového vaku. Zásadním negativem tohoto testu je, že dochází k podráždění spojivky a tím ke zvýšené tvorbě slz, která ovlivní zaznamenané výsledky. Z tohoto důvodu se na trhu objevují nové alternativní testy jako například meniskometrické proužky nazývané SMTube® (viz kap. 4.1.3). (Niedernolte a kol. 2021, Korb a kol. 2002)

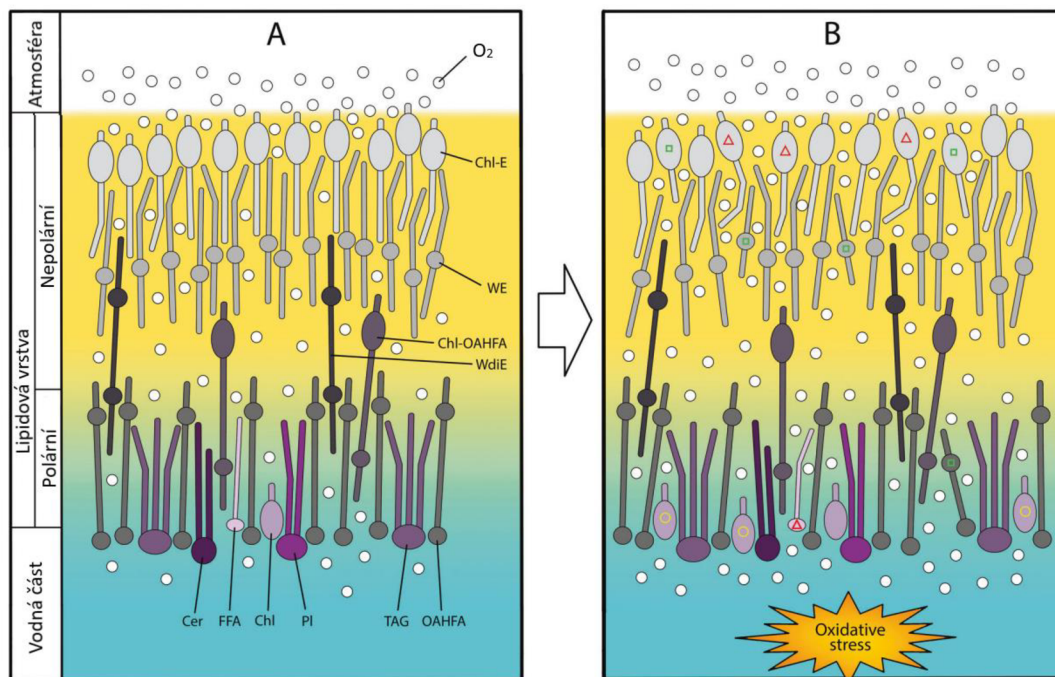
### 3.5 Vznik oxidačního stresu

Jak již bylo uvedeno, rohovka získává potřebný přísun kyslíku z různých cest, avšak při otevřených očích je primárním zdrojem atmosféra. (Kayal 2021) Aby byly molekuly  $O_2$  snadno dostupné pro povrch rohovky, musí být převedeny z plynné fáze (atmosférické prostředí) do fáze kapalně (slzný film) prostřednictvím lipidové vrstvy. Propustnost lipidové dvojvrstvy závisí na difúzi a rozpustnosti molekuly kyslíku, dále na jejím fyzikálním stavu a složení, zejména obsahu cholesterolu a nenasycených mastných kyselin. (Möller a kol. 2016, Yazdani 2023)

Nedávná experimentální studie (Al-Samir a kol. 2021) naznačila, že čím více je přítomen cholesterol v membránách, tím je dvojitá lipidová vrstva propustnější. Protože jsou buňky rohovky přizpůsobeny mnohem nižším hladinám kyslíku, musí být obsah cholesterolu ve fosfolipidových membránách dobře uzpůsoben k tomu, aby dodával dostatečné, nikoli nadměrné, množství  $O_2$  pro fyziologické potřeby. (Yazdani 2023)

Zdroje volných radikálů ve zrakovém aparátu mohou být vnější a vnitřní, viz kapitola 1.2.1. Avšak dalším důležitým aspektem je vyšší permeabilita lipidové dvojvrstvy pro molekuly kyslíku. (Zuniga-Hertz & Patel 2019) Různorodost délek a nasycení lipidů v povrchové vrstvě SF může podléhat kvalitativním nebo kvantitativním změnám vedoucím k nežádoucím účinkům, jak ukazuje obr. 6, str. 27. (Butovich 2013, Yazdani 2023) Na základě těchto změn fosfolipidová vrstva propustí do oka větší množství  $O_2$ . Důsledkem zvýšené hladiny kyslíku je nadprodukce volných radikálů, což vede k již dříve zmíněnému oxidačnímu stresu v buňkách, a tím k několika zánětlivým onemocněním povrchu oka. Lze tedy říci, že zdraví předního segmentu oka částečně závisí na existenci normálního slzného filmu. (Yazdani 2023)





Obr. 6: Normální lipidová vrstva SF (A) a její ekvivalentní narušená forma (B) v důsledku změn délky mastných kyselin (zelený čtverec), počtu jednotek cholesterolu (žluté kolečko) a nenasycených mastných kyselin (červený trojúhelník), což vede k nadměrné difuzi  $O_2$  a následnému vzniku oxidačního stresu. Barevné spektrum na pozadí představuje gradient polarity lipidů v lipidové vrstvě SF. Zkratky: cholesterol estery (Chl-E), voskové estery (WE), voskové diestery (WdiE), (O-Acyl)- $\omega$ -hydroxy mastné kyseliny (Chl-OAHFA), triacylglyceroly (TAG), fosfolipidy (PI), cholesterol (Chl), volné mastné kyseliny (FFA), ceramidy (Cer) (upraveno). (Yazdani 2023)

### 3.5.1 Syndrom suchého oka

Chronický stav oxidačního stresu je spojen se zánětlivými změnami na povrchu oka, které jsou zodpovědné za onemocnění, jako je syndrom suchého oka (SSO). (Perez-Garmendia a kol. 2020) SSO je považován za jeden z nejrozšířenějších očních syndromů. V posledních letech se celosvětově zvýšil dopad této poruchy až na 50 %, a to zejména u mladší populace. (Stapleton a kol. 2017) Společnost The Tear Film & Ocular Surface Society definovala toto onemocnění jako: „Multifaktoriální onemocnění očního povrchu charakterizované ztrátou homeostázy slzného filmu doprovázené očními příznaky. Etiologickou roli zde hraje nestabilita a hyperosmolarita slzného filmu, zánět, poškození povrchu oka a neurosenzorické abnormality.“ To má za následek příznaky diskomfortu, poruchy vidění a nestabilitu SF s možným poškozením očního povrchu. (Craig a kol. 2017, Seen & Tong 2018)

Klinické hodnocení tohoto onemocnění je kvůli rozmanitým příznakům a neexistenci jediného spolehlivého klinického testu náročné. (Bartlett a kol. 2015) V současné době představují umělé slzy první volbu terapie SSO. Tato léčba nemusí být nutně adekvátní či účinná, přestože je cílem konstrukce výrobků na bázi lipidů napodobit SF, počet inkorporovaných lipidů je omezený a není tak jisté, zda jsou lipidy plně

doplněny. (Garrigue a kol. 2017) Léčbu narušené lipidové vrstvy vyvolané oxidačním stresem (a tak i SSO) lze zlepšit zhodnocením funkce Meibomských žláz, identifikací dotčených lipidových složek a jejich dodáváním do SF. Pro dosažení uspokojivých výsledků lze složení slzných náhrad kombinovat s dalšími složkami, jako jsou antioxidanty, elektrolyty a osmoochranné látky. Malý počet intervenčních studií (Macri a kol. 2015, Horwath-Winter a kol. 2005, Rieger a kol. 2010, Jee a kol. 2015) naznačuje, že terapii suchého oka lze přímo zaměřit na oxidační stres. Pro další výzkum tohoto tématu je nezbytný vývoj přístrojové techniky. (Labetoulle a kol. 2022)

Cílem studie Kubota a kol. (2021), Lékařská fakulta Keio University, bylo vyhodnotit změny koncentrace molekuly  $H_2$  obsažené ve vydechnutém vzduchu a následné změny v SF. Příjem  $H_2$  byl zajištěn vodou nasycenou vodíkem pomocí speciálních tablet SUPER  $H_2$ . Kontrolní skupině byla podávána minerální voda. Výzkumu se zúčastnilo 10 dospělých japonských dobrovolníků ve věku 20–50 let. Pro měření doby rozpadu SF byla využita invazivní metoda FBUT (podrobněji popsána v kap. 3.4) a TMH byla měřena standardně dle doporučení výrobce. FBUT a TMH byly zaznamenány 10 min před aplikací  $H_2$ , následně po vypití hydrogenové vody, a to v časech 0 min, 10 min, 30 min a 60 min.

Po 30 minutách od aplikace  $H_2$  byla zjištěna významně vyšší koncentrace vydechovaného vodíku ve srovnání při podání minerální vody ( $p = 0,006$ ). FBUT byl po podání vodíku v čase 30 min významně delší než po podání minerální vody ( $p = 0,00041$ ), navíc byl významně prodloužen oproti době před podáním vodíku ( $p = 0,00000000006$ ). TMH byl v časech 30 min a 60 min významně vyšší po podání SUPER  $H_2$  ve srovnání s kontrolní skupinou (v obou případech  $p = 0,042$ ). Účastníci udávali významný rozdíl pocitu suchého oka a oční únavy před a po podání vodíku, a to významně nižší. Nebyly pozorovány ani hlášeny žádné nežádoucí účinky.

Závěr tohoto výzkumu říká, že  $H_2$  významně a bezpečně zlepšil stabilitu slz, příznaky suchého oka a zlepšil sekreci slz. Tato studie ukazuje, že vodík pravděpodobně ovlivňuje obě patologie SSO současně, a to nedostatek sekrece slz a dysfunkci lipidové vrstvy. Vzhledem k tomu, že  $H_2$  je bezpečný a levný, mělo by být jeho klinické použití u symptomů SSO dále zkoumáno v rámci rozsáhlých studií.



## 4 EXPERIMENTÁLNÍ OVĚŘENÍ VLIVU INHALACE H<sub>2</sub> NA SLZNÝ FILM

Mimo celkových účinků molekulárního vodíku na organismus některé studie (Oharazawa a kol. 2010, Wei a kol. 2012, Tian a kol. 2013, Feng a kol. 2012, Yokota a kol. 2015, Sun a kol. 2014, Tao a kol. 2016, Huang a kol. 2012, Kubota a kol. 2011, Igarashi a kol. 2016) poukazují i na vliv na zrakový aparát, viz kapitola 2.2.2. Zdraví předního segmentu oka také částečně závisí na existenci normálního slzného filmu, uvádí ve svém závěru práce Yazdani (2023). Na základě diskuzí ve studiích (Macri a kol. 2015, Horwath-Winter a kol. 2005, Rieger a kol. 2010, Jee a kol. 2015) lze předpokládat i vliv H<sub>2</sub> při terapii syndromu suchého oka. Přímo vlivem na slzný film se však zabývala jediná studie (Kubota a kol. 2021), která hodnotila změny SF po příjmu hydrogenované vody.

Cílem naší studie je sledovat okamžitý dopad inhalace molekulárního vodíku na SF. Přitom jsme se zaměřili na inhalaci H<sub>2</sub> do plic a inhalaci speciálními brýlemi. Sledovanými parametry byly doba rozpadu SF (dále ozn. jako NIKBUT), TMH a objemová složka slzného menisku [dále ozn. jako SMTV (Strip Meniscometry Tear Volume)]. Na základě výsledků předchozí studie (Kubota a kol. 2021) předpokládáme, že dojde k významně delší době rozpadu SF a statisticky větším hodnotám výšky slzného menisku po podání H<sub>2</sub> oproti kontrolní skupině.

### 4.1 Metodika a subjekty

#### 4.1.1 Subjekty

Pro účast v této studii byly zahrnuty pouze osoby, které měly při úvodním měření (není zahrnuto do práce) NIKBUT na alespoň jednom oku pod 15 s (hodnota prvního roztržení). Do výzkumu bylo celkem zařazeno 10 probandů ve věku od 20 do 24 let ženského pohlaví. Průměrný věk probandů byl 22,3 let se směrodatnou odchylkou (SD) 1,4 let. Uživatelé kontaktních čoček byli požádáni, aby nejméně 24 hodin před každým sezením neměli kontaktní čočky nasazené. Kontraindikací účasti v této studii bylo akutní oční onemocnění, které ovlivňuje SF.

Před začátkem prvního měření byl každý proband podrobně seznámen s cíli výzkumu, s jeho jednotlivými částmi, s případnými riziky a s časovou náročností měření. Na základě těchto informací následně svůj souhlas s účastí ve studii stvrdil podpisem informovaného souhlasu.

#### 4.1.2 Popis experimentu

Všechna měření probíhala od října 2023 do února 2024 v odborné laboratoři katedry optiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Celá studie se skládala ze dvou částí, první část představovala inhalaci molekulárního vodíku do plic, druhá část inhalaci brýlemi. Obou částí studie se zúčastnili všichni probandi. Každá z částí zahrnovala inhalaci placebo (tj. vzduchu, kontrolní měření) a inhalaci směsi s molekulárním vodíkem (experimentální měření). V případě inhalace do plic byla studie koncipována jako jedenkrát zaslepená (proband nevěděl, jaké měření probíhá – placebo x směs s H<sub>2</sub>), experimentátor ano. Inhalace brýlemi byla dvojité zaslepenou studií, kdy ani proband ani experimentátor nevěděli, zda je inhalováno placebo nebo směs s H<sub>2</sub>.

Kompletní měření tedy probíhalo celkem ve čtyřech sezeních (inhalace do plic x inhalace brýlemi, placebo x směs s H<sub>2</sub>). Na prvním setkání byli probandi požádáni o vyplnění dotazníku Ocular Surface Disease Index<sup>®</sup> (dále ozn. jako OSDI<sup>®</sup>). Jednotlivá sezení zahrnovala 5minutovou úvodní adaptaci na podmínky laboratoře následované půlhodinovou (první část experimentu) nebo hodinovou (druhá část experimentu) inhalací směsi (placebo nebo směs s H<sub>2</sub>) (inhalací fáze), která byla následována půlhodinovou fází bez inhalace. Pořadí obou částí experimentu bylo náhodné, stejně tak pořadí inhalace placebo nebo směsi s H<sub>2</sub> v dané části experimentu.

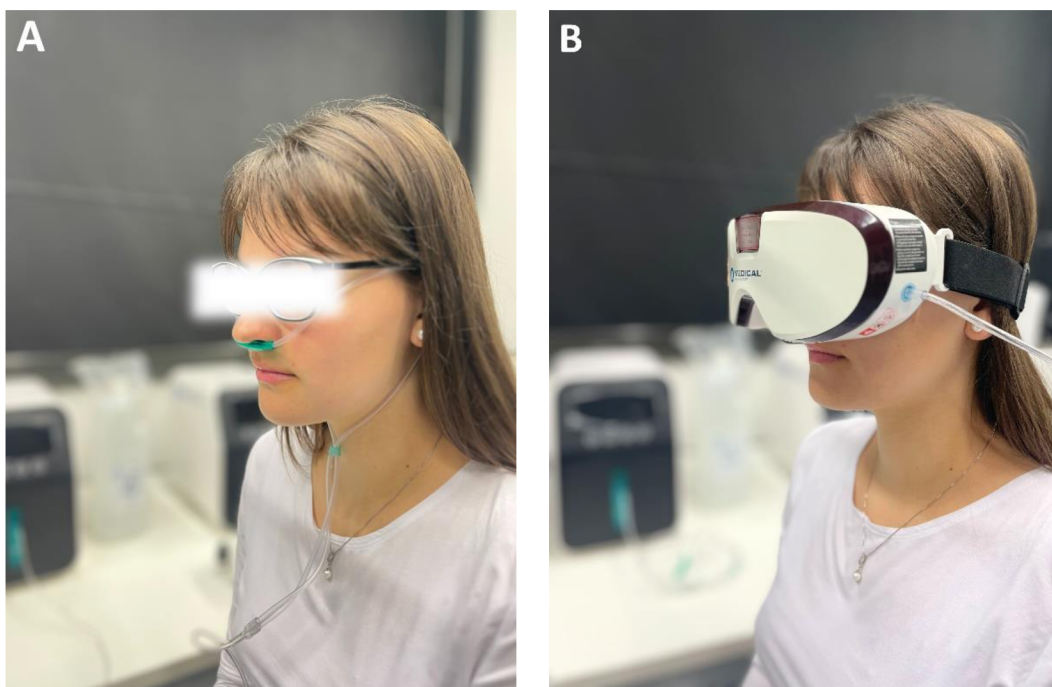
Před zahájením každého sezení byla v laboratoři vždy změřena vlhkost a teplota vzduchu. Jejich průměrné hodnoty a SD během experimentu byly 34 %, SD = 10 % a 22,9 °C, SD = 1,4 °C v první části a 24,9 %, SD = 8,6 % a 23,2 °C, SD = 1,1 °C ve druhé části. Přitom maximální změny vlhkosti během jednoho sezení dosahovaly hodnot  $\pm 3$  % a maximální změny teploty  $\pm 3,4$  °C.

Inhalace a měření parametrů SF proběhla v sedě, aniž by byl zatěžován zrak pohledem do blízka. Během každého sezení probíhalo neinvazivní měření parametrů SF pravého i levého oka, zahrnující jeho kvalitu, výšku a objem slzného menisku. Měření NIKBUT a TMH byla provedena na Keratografu 5M OCULUS (dále ozn. jako K5M, bližší informace o přístroji a měření viz kap. 4.1.3). SMTV byl hodnocen pomocí meniskometrických proužků Strip Meniscometry Tube<sup>®</sup> (dále ozn. jako SMTube<sup>®</sup>, viz kapitola 4.1.3), a to celkem dvakrát během každého sezení, a to vždy na začátku a na konci u obou očí v náhodném pořadí.

K inhalaci do plic byl použit komerčně dostupný H<sub>2</sub> generátor i600 (bližší popsání v odstavci 4.1.3). Inhalovaná směs (placebo nebo téměř čistý vodík o koncentraci > 99,99 %) byla inhalována nosem pomocí speciální jednorázové nosní

inhalální kanyly s vydatností toku 600 ml/min po dobu 30 min, znázorněno na obr. 7-A. Dílčí měření NIKBUT proběhla pětkrát pro každé oko, a to na začátku experimentu (0 min) a dále v časech 15 min (v průběhu inhalace), 30 min (v okamžiku ukončení inhalace), 45 min a 60 min (tj. již bez inhalace) od zahájení experimentu. Přitom u každého oka byl vždy třikrát po sobě měřen NIKBUT (jako výsledek byl uvažován průměr) a jednou TMH. Sledována byla doba prvního i průměrného NIKBUT. Jedno dílčí měření (tj. 3x levé oko NIKBUT, 1x levé oko TMH, 3x pravé oko NIKBUT, 1x pravé oko TMH) trvalo maximálně 6 min.

K inhalaci brýlemi byly použity speciální inhalální brýle ve spojení s inhalátorem H<sub>2</sub> generátor i300 (viz 4.1.3), jak lze vidět na obr. 7-B, který díky speciální výrobní úpravě generuje vodík v bezpečné koncentraci 3,82 % (zbytek směsi s vodíkem tvořil vzduch). Inhalace směsi (placebo nebo směs s H<sub>2</sub>) s vydatností toku 60 ml/min trvala 1 h. Jednotlivá měření NIKBUT proběhla čtyřikrát pro každé oko, a to na začátku experimentu (0 min) a dále v časech 60 min (v okamžiku ukončení inhalace), 75 min a 90 min (tj. již bez inhalace) od zahájení experimentu. Přitom u každého oka byl vždy třikrát po sobě měřen NIKBUT (jako výsledek byl uvažován průměr) a jednou TMH. Sledována byla doba prvního i průměrného NIKBUT. Jedno dílčí měření (tj. 3x levé oko NIKBUT, 1x levé oko TMH, 3x pravé oko NIKBUT, 1x pravé oko TMH) trvalo maximálně 6 min.



Obr. 7: Inhalace pomocí nosní kanyly (A), inhalace pomocí speciálních brýlí (B).

#### 4.1.3 Použitá zařízení a metody měření

Uspořádání experimentálního pracoviště s jednotlivými použitými přístroji zachycuje obrázek 8.



Obr. 8: Jednotlivé uspořádání použitých přístrojů v laboratoři. Zleva – Keratograf 5M OCULUS, vodíkový generátor i600 a vodíkový generátor i300.

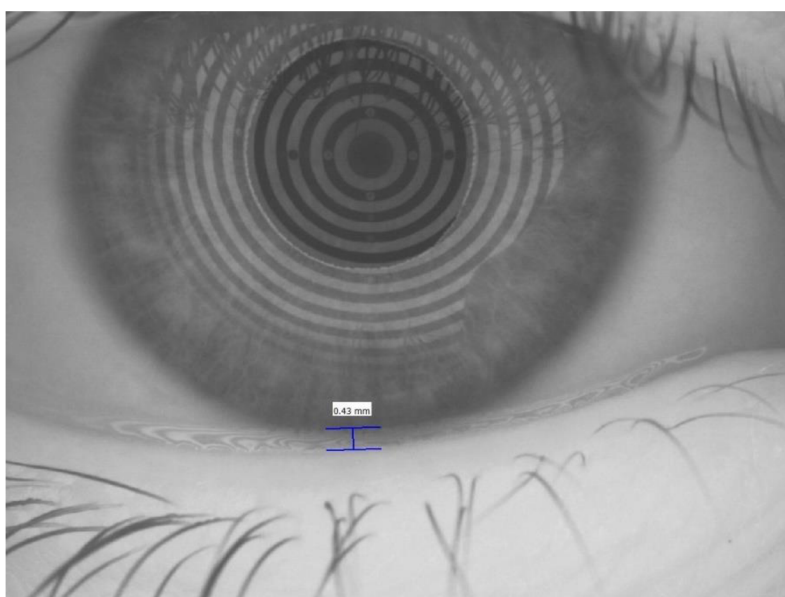
#### **Vodíkové generátory**

Generátory, nosní kanyly i brýle byly dodány firmou H2 MEDICAL® TECHNOLOGIES (Ostrava, Česká republika; h2medical.com). Podle návodu k obsluze vzniká  $H_2$  v generátoru elektrolýzou demineralizované vody pomocí membránové elektrody. Pro inhalaci do plic byl použit vodíkový generátor i600, pro inhalaci pomocí brýlí vodíkový generátor i300, avšak technicky upravené pro výzkumná použití. Rozdíl mezi těmito dvěma generátory je v koncentraci vodíku. Koncentrace  $H_2$  u vodíkového generátoru i600 je 99,99 % (uvedená koncentrace je dodržena při všech možných volbách vydatnosti toku směsi). U vodíkového generátoru i300 je koncentrace  $H_2$  bezpečně snížena na 3,82 % (uvedená koncentrace je dodržena pouze při vydatnosti toku směsi 60 ml/min, při vyšších hodnotách klesá). Speciální inhalační brýle Hydrogen Eye Massager od stejného výrobce jako generátory přiléhají na obličej „pěnovým“ vypolstrováním, skrz které inhalovaná směs uniká do okolí. Tyto brýle mimo jiné lze využít jako masážní přístroj, který podporuje prokrvení okolí očí, případně umožňují během inhalace

generovat vodní mlhu – tyto funkce nebyly v experimentu využity. (H2 Medical Technologies s.r.o. 2023a, H2 Medical Technologies s.r.o. 2023b)

### **Keratograf 5M OCULUS**

Keratograf K5M je více účelový videotopograf společnosti OCULUS GmbH (Wetzlar, Německo). Bílé osvětlení se využívá k měření tisíců bodů na celém povrchu rohovky. K dispozici je také infračervené kruhové osvětlení (880 nm) pro analýzu SF, které zabraňuje tepelným změnám a reflexnímu vylučování slz způsobenému oslněním. Software K5M obsahuje screeningový balíček pro detekci onemocnění rohovky, refrakční chirurgii a přizpůsobení kontaktních čoček, včetně vizualizace propustnosti kyslíku. Komplexní struktura povrchu rohovky je měřena pomocí matematických analýz, které slouží jako základ pro přesné odhalení nepravidlostí, jako je keratokonus. Přístroj K5M umožňuje automatické, neinvazivní a objektivní vyšetření parametrů SF, jako NIKBUT, TMH, interferenční vzorce lipidové vrstvy, zarudnutí oka nebo stav Meibomských žláz. Měření NIKBUT a TMH probíhalo standardně dle doporučení výrobce. Při vyšetření NIKBUT se několik sekund na přední plochu rohovky promítá obrazec černých a bílých koncentrických kružnic tzv. Placidův disk. Ten je následně zpětně analyzován a jeho narušení je registrováno jako rozpad SF. Díky barevné kameře s vysokým rozlišením jsou viditelné i ty nejmenší struktury. To umožňuje měřit TMH a vyhodnocovat lipidovou vrstvu. V tomto experimentu byla TMH měřena ve středu okraje dolního víčka, jak je znázorněno na obr. 9. (García-Marqués a kol. 2021, OCULUS 2024)



*Obr. 9: Výška slzného menisku pravého oka.*

### **Meniskometrické proužky SMTube®**

Diagnostický zdravotnický prostředek SMTube®, vyvinutý společností Echo Electricity Co., Ltd. (Tokio, Japonsko), je určen pro jednoduché, přesné, rychlé a minimálně invazivní hodnocení objemu slz. SMTube® je vyroben ze směsi polyuretanu a polyesteru. Meniskometrické proužky jsou z obou stran potaženy hydrofobní izolační membránou s centrální rýhou. Adsorbent, na němž je nanesena tenká vrstva modrého barviva, je tvořen propletenými vlákny z hedvábí a celulózy. Na obou stranách absorbéru je vytištěna stupnice pro měření objemu slz. SMTube® je přiložen na laterální meniskus dolního víčka, aniž by se dotýkal povrchu oka. Slzy jsou vstřebávány kapilárním působením středu proužku. Modré barvivo je následně rozpuštěno v absorbovaných slzách. Po 5 sekundách je zaznamenána délka obarveného slzného sloupce v milimetrech. Tato délka odpovídá kvantitě slzného menisku a je v této diplomové práci označována jako SMTV (Strip Meniscometry Tear Volume). Délka sloupce o přibližně 5 mm a více je považována za normální hodnoty, zatímco délka kratší než 5 mm je považována za nedostatečný objem slzného menisku. (Dogru a kol. 2006, Ibrahim a kol. 2011, Shinzawa a kol. 2018, Alshammeri a kol. 2020)

#### **4.1.4 Analýza dat**

Data byla charakterizována pomocí průměrných hodnot a směrodatných odchylek, v případě dat výrazně se odchylojících od normálního rozdělení též pomocí mediánu a 1. a 3. kvartilu. Normalita studovaných dat byla hodnocena pomocí Shapiro-Wilkova testu.

Jelikož v každé části experimentu mohly být u daného subjektu odlišné výchozí hodnoty, byla pro účely statistického testování každá část experimentu charakterizována rozdíly naměřených dat od příslušné výchozí hodnoty. Všechny statistické testy byly prováděny na hladině významnosti 0,05. Statistické hypotézy byly testovány v programu STATISTICA 13.4 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA), pomocné výpočty byly provedeny v programu MS Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

#### **Analýza OSDI®**

Data představující OSDI® skóre byla hodnocena na stupnici od 0 do 100, dle doporučeného postupu výrobce, přičemž čím vyšší hodnota tím větší postižení. Na základě tohoto skóre byla data rozdělena do 4 kategorií, a to normální, mírné, středně závažné nebo závažné onemocnění suchého oka.



## **Analýza NIKBUT**

Rozdílová data byla ve většině případů normální. V případě inhalace do plic se odchylovala pouze jedna hodnota v experimentálním měření ( $p = 0,034$ ) a jedna v kontrolním měření ( $p = 0,044$ ), u inhalace brýlemi byla všechna rozdělení normální. Proto byla pro vyhodnocení jejich časového průběhu a porovnání mezi oběma částmi experimentu zvolena metoda analýzy rozptylu (ANOVA) pro opakovaná měření. Mimo faktoru času a typu inhalované směsi byl též sledován vliv počáteční hodnoty, která pro tento účel byla u každého subjektu stanovena jako průměr z obou částí experimentu, přičemž byly uvažovány dvě úrovně: nízká pro NIKBUT < 10 s u prvního, resp. < 15 s u průměrného času roztržení a vysoká v ostatních případech. Uvedené hraniční hodnoty přibližně odpovídají mediánům ze všech příslušných počátečních hodnot (9,18 s a 14,99 s pro inhalaci do plic a 8,11 s a 14,21 s pro inhalaci brýlemi). Hodnota 10 s bývá také uvažována za hranici normálních hodnot BUT. (Rozsíval 2006)

## **Analýza TMH**

Ve většině případů neměla rozdílová data normální rozdělení, proto byly rozdíly mezi jednotlivými měřeními (v čase i v obou částech experimentu) souhrnně vyhodnoceny pomocí jediného Friedmanova neparametrického testu.

## **Analýza SMTV**

Pro srovnání hodnot v obou částech experimentu byl využit párový t-test, jelikož rozdílová data byla normální. Významnost odchylek rozdílů od nuly byla hodnocena jednovýběrovým t-testem na střední hodnotu.

## **4.2 Výsledky**

### **OSDI<sup>®</sup>**

Tab. 2 zobrazuje seřazená data představující OSDI<sup>®</sup> skóre. Každému OSDI<sup>®</sup> skóre byl přiřazen jeden za čtyř stupňů závažnosti onemocnění SSO, a to normální (a), mírný (b), středně závažný (c) nebo závažný (d). Z tabulky je vidět, že všichni dobrovolníci, až na jednoho, mají mírné onemocnění SSO.

*Tab. 2: Hodnoty OSDI<sup>®</sup> skóre s přiřazeným stupněm závažnosti onemocnění SSO – normální (a), mírný (b), středně závažný (c), závažný (d).*

<b>Proband</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>OSDI<sup>®</sup> skóre</b>	14,6	22,7	27,3	29,2	29,2	31,3	33,3	35,4	45,5	47,9
<b>Kategorie SSO</b>	b	b	b	b	b	b	b	b	b	c

#### 4.2.1 Inhalace do plic

##### NIKBUT

Souhrnnou statistickou charakteristiku naměřených hodnot NIKBUT v jednotlivých částech experimentu uvádí tab. 3 a 4 ve formě průměrů a směrodatných odchylek. Z tabulek je vidět, že mezi jednotlivými časy měření nedocházelo k podstatným odchylkám od výchozí hodnoty, a to ani v případě experimentálního ani kontrolního měření. Experimentální měření vykazuje v průměru mírně nižší hodnoty. Rozdílová data jsou ve formě průměrů a standardní chyby průměru vynesena do obr. 10 a 11, str. 37. Z obrázků je vidět, že v případě inhalace vodíku došlo k mírnému poklesu a následnému navýšení hodnot, u inhalace placebo tomu bylo obráceně, a to jak u prvního, tak průměrného NIKBUT. Uvedené průměrné změny jsou minimální a statistická analýza je nevyhodnotila jako statisticky významné. V případě prvního roztržení NIKBUT byl signifikantní pouze vliv výchozí hodnoty ( $p = 0,03$ ), při vyšší výchozí hodnotě času prvního roztržení NIKBUT byly průměrné rozdíly nižší než při nižší výchozí hodnotě, u které byly průměrné rozdíly zaznamenány naopak vyšší. Tato informace však nemá podstatný význam. V případě průměrného času roztržení nebyla ani tato hodnota významná ( $p = 0,21$ ). V obou případech pak nebyl zjištěn vliv typu inhalované směsi a vliv času měření nebyl signifikantní ( $p = 0,61$ ,  $p = 0,84$  pro první NIKBUT a  $p = 0,89$ ,  $p = 0,99$  pro průměrný NIKBUT). Stejně tak nebyla signifikantní ani jejich vzájemná interakce ( $p = 0,46$  první NIKBUT,  $p = 0,64$  průměrný NIKBUT) a interakce s výchozí hodnotou (ve všech případech  $p > 0,35$ ).

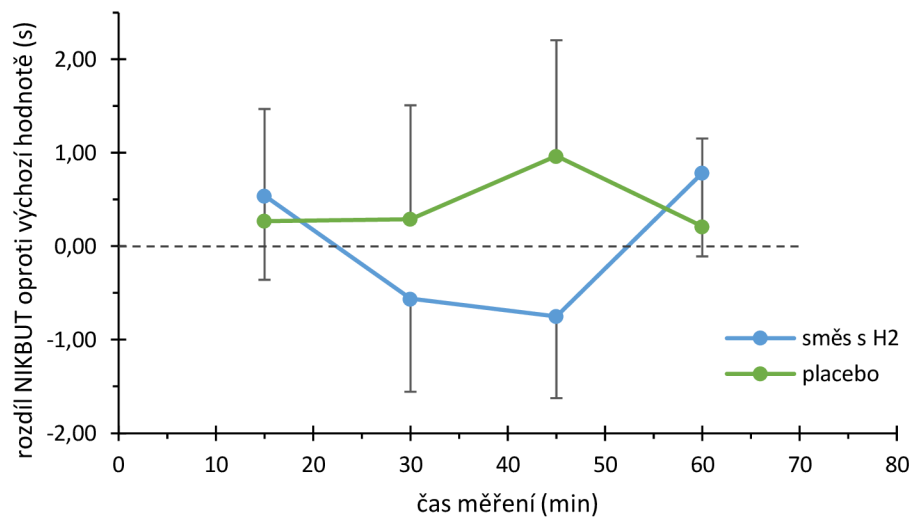
Tab. 3: Průměrné hodnoty (PRŮMĚR) a směrodatné odchylky (SD) původních dat v jednotlivých časech měření při inhalaci směsi s H<sub>2</sub> v případě prvního (NIKBUT 1st) a průměrného (NIKBUT avg) roztržení slzného filmu.

Čas (min)	0		15		30		45		60	
	PRŮMĚR	SD	PRŮMĚR	SD	PRŮMĚR	SD	PRŮMĚR	SD	PRŮMĚR	SD
<b>NIKBUT 1st (s)</b>	9,1	4,4	9,6	3,9	8,5	3,3	8,3	3,3	9,9	5,1
<b>NIKBUT avg (s)</b>	12,0	4,7	13,2	4,1	12,4	4,7	12,2	4,4	12,9	5,3

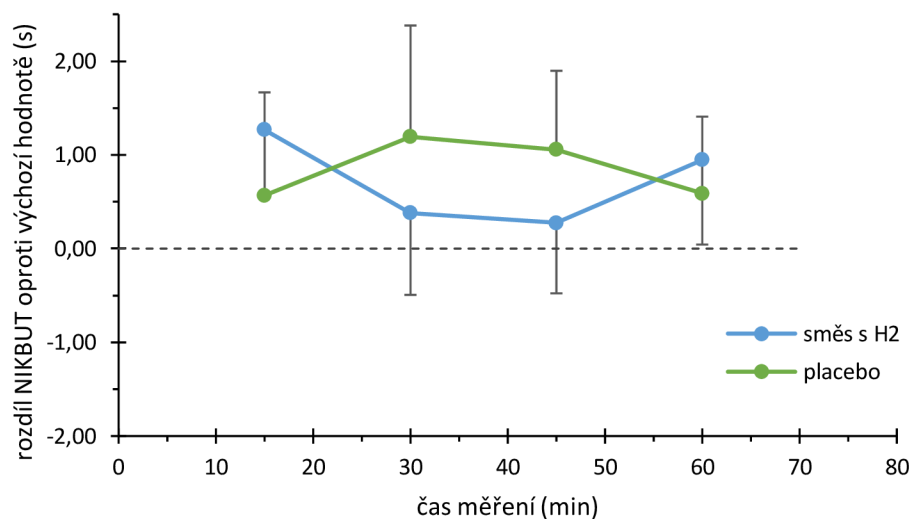
Tab. 4: Průměrné hodnoty (PRŮMĚR) a směrodatné odchylky (SD) původních dat v jednotlivých časech měření při inhalaci placebo v případě prvního (NIKBUT 1st) a průměrného (NIKBUT avg) roztržení slzného filmu.

Čas (min)	0		15		30		45		60	
	PRŮMĚR	SD	PRŮMĚR	SD	PRŮMĚR	SD	PRŮMĚR	SD	PRŮMĚR	SD
<b>NIKBUT 1st (s)</b>	10,3	4,9	10,5	6,3	10,5	5,8	11,2	7,3	10,5	5,0
<b>NIKBUT avg (s)</b>	13,3	5,1	13,9	5,8	14,5	5,9	14,3	6,7	13,9	5,3





Obr. 10: Rozdíly NIKBUT (první roztržení) od výchozí hodnoty v jednotlivých časech měření při inhalaci směsi s H<sub>2</sub> (modře) a placebo (zeleně). Kroužky představují průměrné rozdíly, přerušovaná čára vyznačuje nulový rozdíl, chybové úsečky reprezentují standardní chybu průměru.



Obr. 11: Rozdíly NIKBUT (průměrný čas roztržení) od výchozí hodnoty v jednotlivých časech měření při inhalaci směsi s H<sub>2</sub> (modře) a placebo (zeleně). Kroužky představují průměrné rozdíly, přerušovaná čára vyznačuje nulový rozdíl, chybové úsečky reprezentují standardní chybu průměru.

## TMH

Naměřená data jsou ve formě mediánů a kvartilů uvedena v tab. 5 a 6 pro inhalaci směsi s H<sub>2</sub> a placebo. Rozdíly od výchozí hodnoty podávají tab. 7 a 8. Statistická analýza nezjistila mezi hodnotami statisticky významné rozdíly ( $p = 0,51$ ).

Tab. 5: Mediány, 1. a 3. kvartily původních dat v jednotlivých časech měření při inhalaci směsi s H<sub>2</sub> u hodnocení TMH.

Čas (min)	0	15	30	45	60
Medián (mm)	0,40	0,35	0,38	0,34	0,43
1. kvartil (mm)	0,31	0,29	0,33	0,31	0,31
3. kvartil (mm)	0,46	0,50	0,57	0,61	0,61

Tab. 6: Mediány, 1. a 3. kvartily původních dat v jednotlivých časech měření při inhalaci placebo u hodnocení TMH.

Čas (min)	0	15	30	45	60
Medián (mm)	0,38	0,34	0,39	0,33	0,39
1. kvartil (mm)	0,27	0,30	0,33	0,28	0,32
3. kvartil (mm)	0,54	0,57	0,55	0,52	0,53

Tab. 7: Mediány, 1. a 3. kvartily rozdílových dat v jednotlivých časech měření při inhalaci směsi s H<sub>2</sub> u hodnocení TMH.

Čas (min)	15	30	45	60
Medián (mm)	-0,03	0,05	0,03	0
1. kvartil (mm)	-0,10	-0,08	-0,07	-0,07
3. kvartil (mm)	0,06	0,11	0,13	0,15

Tab. 8: Mediány, 1. a 3. kvartily rozdílových dat v jednotlivých časech měření při inhalaci placebo u hodnocení TMH.

Čas (min)	15	30	45	60
Medián (mm)	0,01	0	0,01	0,03
1. kvartil (mm)	-0,05	-0,07	-0,10	-0,04
3. kvartil (mm)	0,04	0,09	0,04	0,12

## SMTV

Původní naměřená data jsou ve formě průměrů a směrodatných odchylek uvedena v tab. 9, str. 39 (společně pro inhalaci směsi H<sub>2</sub> i placebo). V případě rozdílových dat byl zjištěn u inhalace vodíku průměrný rozdíl -1,2 mm se SD 3,7 mm, v případě placebo 0,6 mm a SD 2,1 mm. Párový t-test zjistil, že rozdílová data se mezi oběma částmi experimentu liší ( $p = 0,014$ ), přičemž po inhalaci vodíku došlo k poklesu hodnoty.

Následná analýza jednovýběrovým t-testem na střední hodnotu však nevykázala, že by se rozdíly v některé části experimentu významně lišily od nuly ( $p = 0,16$  a  $p = 0,21$  pro vodík a placebo).

Tab. 9: Průměrné hodnoty (PRŮMĚR) a směrodatné odchylky (SD) původních dat SMTV v jednotlivých časech měření při inhalaci směsi s  $H_2$  a placebo.

Čas (min)	0		60	
	PRŮMĚR	SD	PRŮMĚR	SD
Směs s $H_2$ (mm)	8,7	4,0	7,5	3,9
Placebo (mm)	6,6	3,4	7,2	3,7

#### 4.2.2 Inhalace pomocí brýlí

Studie byla dvojitě zaslepená, kontrolní a experimentální měření bylo označeno hodnotou pozice přepínací páky mezi placebem a směsí s vodíkem (pozice 1 a pozice 2). Toto označení je dodrženo i v následujícím textu.

#### NIKBUT

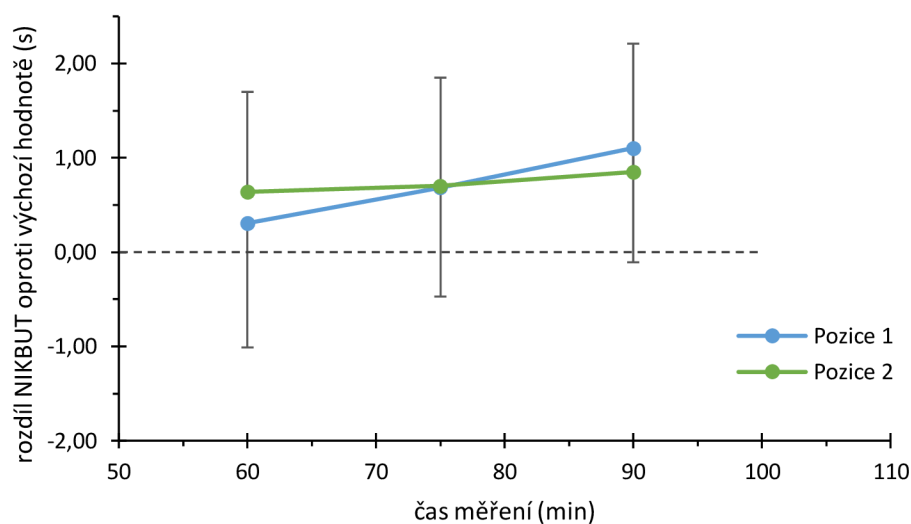
Tab. 10 a 11, str. 40 uvádí ve formě průměrů a směrodatných odchylek souhrnnou statistickou charakteristiku naměřených hodnot NIKBUT v jednotlivých časech a částech experimentu. Z tabulek je vidět, že mezi jednotlivými časy měření nedocházelo k podstatným odchylkám od výchozí hodnoty, a to ani v případě experimentálního ani kontrolního měření. Inhalace brýlemi při pozici 1 vykazuje v průměru mírně nižší hodnoty. Rozdílová data jsou ve formě průměrů a standardní chyby průměru vynesena na obr. 12, str. 40 a obr. 13, str. 41. Z obrázků je vidět, že v případě pozice 1 i 2 došlo k mírnému navýšení hodnot u prvního NIKBUT, u průměrného NIKBUT bylo mírné navýšení hodnot u pozice 1, avšak u pozice 2 došlo k mírnému poklesu. Rozdíly jsou opět malé, v případě prvního roztržení NIKBUT, ani v případě průměrného času roztržení statistická analýza nenašla signifikantní vliv výchozí hodnoty ( $p = 0,58$  a  $p = 0,20$ ). V žádném z případů nebyl zjištěn vliv typu inhalované směsi a vliv času měření nebyl signifikantní ( $p = 0,85$ ,  $p = 0,56$  pro první NIKBUT a  $p = 0,40$ ,  $p = 0,65$  pro průměrný NIKBUT). Stejně tak nebyla signifikantní ani jejich vzájemná interakce ( $p = 0,86$  první NIKBUT,  $p = 0,59$  průměrný NIKBUT) a interakce s výchozí hodnotou (ve všech případech  $p > 0,34$ ).

Tab. 10: Průměrné hodnoty (PRŮMĚR) a směrodatné odchylky (SD) původních dat v jednotlivých časech měření při inhalaci pomocí brýlí (pozice 1) v případě prvního (NIK BUT 1st) a průměrného (NIK BUT avg) roztržení slzného filmu.

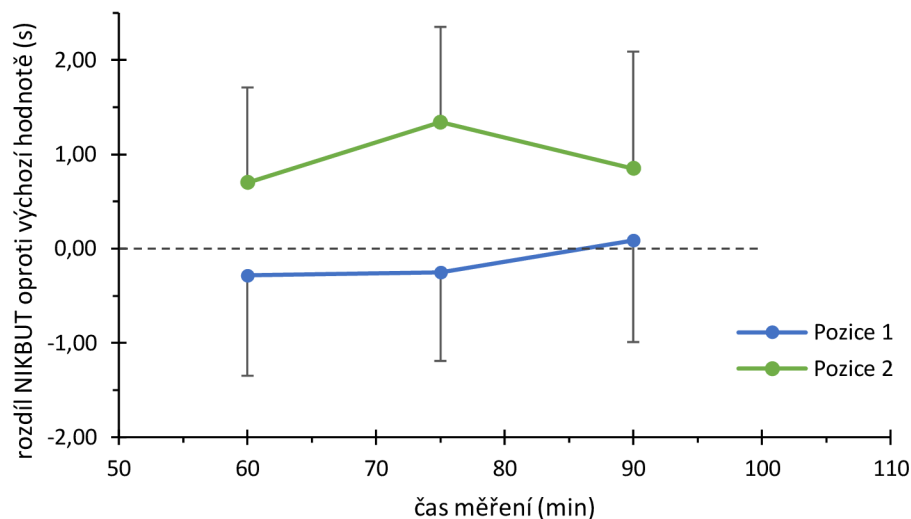
Čas (min)	0		60		75		90	
	PRŮMĚR	SD	PRŮMĚR	SD	PRŮMĚR	SD	PRŮMĚR	SD
NIK BUT 1st (s)	7,9	4,9	8,2	5,2	8,6	5,0	9,0	5,6
NIK BUT avg (s)	12,2	4,5	12,0	5,1	12,0	5,2	12,3	6,0

Tab. 11: Průměrné hodnoty (PRŮMĚR) a směrodatné odchylky (SD) původních dat v jednotlivých časech měření při inhalaci pomocí brýlí (pozice 2) v případě prvního (NIK BUT 1st) a průměrného (NIK BUT avg) roztržení slzného filmu.

Čas (min)	0		60		75		90	
	PRŮMĚR	SD	PRŮMĚR	SD	PRŮMĚR	SD	PRŮMĚR	SD
NIK BUT 1st (s)	9,2	3,8	9,8	4,6	9,9	5,6	10,0	5,9
NIK BUT avg (s)	12,1	5,0	12,8	4,5	13,5	5,7	13,0	6,0



Obr. 12: Rozdíly NIK BUT (první roztržení) od výchozí hodnoty v jednotlivých časech měření při pozici 1 (modře) a pozici 2 (zeleně). Kroužky představují průměrné rozdíly, přerušovaná čára vyznačuje nulový rozdíl, chybové úsečky reprezentují standardní chybu průměru.



Obr. 13: Rozdíly NIKBUT (průměrný čas roztržení) od výchozí hodnoty v jednotlivých časech měření při pozici 1 (modře) a pozici 2 (zeleně). Kroužky představují průměrné rozdíly, přerušovaná čára vyznačuje nulový rozdíl, chybové úsečky reprezentují standardní chybu průměru.

## TMH

Tab. 12 a 13 podávají naměřená data ve formě mediánů a kvartilů pro inhalaci při pozici 1 a 2. Rozdíly od výchozí hodnoty jsou uvedena v tab. 14 a tab. 15, str. 42. Statistická analýza nezjistila mezi hodnotami statisticky významné rozdíly ( $p = 0,94$ ).

Tab. 12: Mediány, 1. a 3. kvartily původních dat v jednotlivých časech měření při pozici 1 u hodnocení TMH.

Čas (min)	0	60	75	90
Medián (mm)	0,38	0,40	0,40	0,37
1. kvartil (mm)	0,30	0,31	0,29	0,30
3. kvartil (mm)	0,48	0,55	0,49	0,53

Tab. 13: Mediány, 1. a 3. kvartily původních dat v jednotlivých časech měření při pozici 2 u hodnocení TMH.

Čas (min)	0	60	75	90
Medián (mm)	0,36	0,37	0,33	0,38
1. kvartil (mm)	0,27	0,26	0,26	0,30
3. kvartil (mm)	0,45	0,44	0,40	0,42

Tab. 14: Mediány, 1. a 3. kvartily rozdílových dat v jednotlivých časech měření při pozici 1 u hodnocení TMH.

Čas (min)	60	75	90
Medián (mm)	0,03	-0,01	-0,03
1. kvartil (mm)	-0,07	-0,07	-0,07
3. kvartil (mm)	0,05	0,06	0,06

Tab. 15: Mediány, 1. a 3. kvartily rozdílových dat v jednotlivých časech měření při pozici 2 u hodnocení TMH.

Čas (min)	60	75	90
Medián (mm)	-0,05	-0,04	-0,01
1. kvartil (mm)	-0,07	-0,06	-0,06
3. kvartil (mm)	0,06	0,03	0,03

## SMTV

Původní naměřená data jsou ve formě průměrů a směrodatných odchylek uvedena v tab. 16 (společně pro obě pozice). V případě rozdílových dat byl zjištěn u pozice 1 průměrný rozdíl 0,7 mm se SD 4,2 mm, v případě druhé pozice 1,3 mm a SD 5,1 mm. Párový t-test zjistil, že rozdílová data se mezi oběma částmi experimentu neliší ( $p = 0,18$ ).

Tab. 16: Průměrné hodnoty (PRŮMĚR) a směrodatné odchylky (SD) původních dat SMTV v jednotlivých časech měření při inhalaci obou směsí.

Čas (min)	0		90	
	PRŮMĚR	SD	PRŮMĚR	SD
Pozice 1 (mm)	7,5	8,2	3,3	3,3
Pozice 2 (mm)	8,4	4,8	7,1	3,6

## 4.3 Diskuze

Cílem tohoto experimentu bylo sledovat okamžitý dopad inhalace molekulárního vodíku na SF. Jako aplikace H<sub>2</sub> byla zvolena inhalace do plic a inhalace pomocí speciálních brýlí. Byla hodnocena doba rozpadu SF (NIK BUT), výška slzného menisku (TMH) a objemová složka slzného menisku (SMTV). Provedená studie neprokázala, že by u sledovaných parametrů slzného filmu došlo vlivem inhalace molekulárního vodíku k významným změnám v SF.

Byla dohledána jediná podobná studie (Kubota a kol. 2021), která je zaměřená na problematiku SF a příjmu H<sub>2</sub>. Příjem vodíku zde byl zajištěn vypitím vody nasycené vodíkem pomocí speciálních tablet oproti placebo. Studie došla k odlišným výsledkům oproti této diplomové práci. FBUT a TMH byly zaznamenány 10 min před aplikací H<sub>2</sub>, následně po vypití hydrogenové vody, a to v časech 0 min, 10 min, 30 min a 60 min. Signifikantní vyšší hodnoty FBUT ( $p = 0,00041$ ) byly po podání hydrogenové vody v čase 30 min ve srovnání s kontrolní skupinou, a zároveň byly významně vyšší ( $p = 0,00000000006$ ) oproti FBUT měřenému 10 min před aplikací H<sub>2</sub>. V časech 30 min

a 60 min po podání H<sub>2</sub> udávala významně vyšší hodnoty i TMH oproti kontrolní skupině (v obou případech  $p = 0,042$ ).

Příčinou odlišných výsledků mezi experimentálním měření této diplomové práce a studií Kubota a kol. (2021) mohou být některé z níže uvedených rozdílů. Stěžejním rozdílem byl zvolený typ aplikace molekulárního vodíku do lidského organismu. V provedené studii na Univerzitě Palackého v Olomouci byla v první části experimentu zvolena inhalace H<sub>2</sub> do plic, u které lze předpokládat, že se molekulární vodík do těla vstřebá rychleji. Studie (Sano a kol. 2020) uvádí, že inhalace 99,99 % H<sub>2</sub>, a to i při nízkém průtoku (250 ml/min), může zvýšit koncentraci molekulárního vodíku v krvi na hodnoty, které se prokázaly jako terapeuticky účinné. Ve druhé části experimentu byla u inhalace brýlemi nastavena nízká koncentrace H<sub>2</sub>, což může být jednou z příčin, proč tato diplomová práce neprokázala významné změny u sledovaných parametrů SF. V japonské studii (Kubota a kol. 2021) byla použita invazivní metoda vyšetření SF (FBUT), zatímco v této diplomové práci byla doba rozpadu SF měřena neinvazivně (NIKBUT). Věk ve sledovaném vzorku byl v průměru vyšší (35,3 let, SD ± 4,2) oproti této diplomové práci. Také lze očekávat možný vliv odlišné rasy ve sledované skupině. U probandů studie Kubota a kol. (2021) byly zaznamenány v průměru nižší vstupní hodnoty FBUT. Tyto nižší vstupní hodnoty vykazují výraznější změny, jež mohou být rovněž jedním z předpokládaných faktorů ovlivňující výsledné rozdíly. Dobrovolníkům byl přikázán půst alespoň 12 h před podáním hydrogenové vody, aby se tak vyloučil možný vliv stravy, na rozdíl od tohoto experimentu.

Jedním z limitů experimentálního měření této diplomové práce byl nízký počet probandů, který vznikl z důvodu obtížného shánění dobrovolníků s požadovanými hodnotami SF. Některé studie (Brzuchanská 2024) naznačují, že měření objemové složky SF pomocí SMTube® může významně ovlivnit stav SF. Nicméně toto měření bylo provedeno jak u kontrolního, tak experimentálního měření, a tedy by mělo mít stejný dopad. Ve studii (Vodičková a kol. 2023) se prokázala omezená opakovatelnost měření NIKBUT, a to lepší u nižších hodnot. Proto by bylo dobré provést tuto studii na vzorku s ještě nižšími hodnotami NIKBUT, nejlépe významně nižšími než 10 s.

Inhalace vodíku jak do plic, tak brýlemi, v daném časovém rozmezí a při dané intenzitě sice neprokázala pozitivní vliv na slzný film, nicméně výsledky ani nenaznačují opak. Jednorázová inhalace vodíku oběma způsoby se tedy jeví jako bezpečná s ohledem na parametry SF. Vzhledem k tomu, že nebyla nalezena významná interakce mezi výchozí hodnotou NIKBUT a časovým průběhem jak v případě experimentálním, tak kontrolním,

lze bezpečnost inhalace vodíku uvažovat i u osob s nízkými parametry SF, tj. u osob trpících SSO.



## ZÁVĚR

Tato diplomová práce pojednává o vlivu inhalace vodíku na slzný film. Je rozdělena na část teoretickou, která se skládá ze tří hlavních kapitol, a část experimentální. První kapitola teoretické části popisuje molekulární vodík jako účinný antioxidant a jeho funkce v lidském organismu. Ve druhé kapitole teoretické části díky studiím, které jsou na toto téma zpracovány, jsou uvedeny konkrétní protizánětlivé, protialergické a antiapoptotické účinky molekulárního vodíku téměř ve všech orgánech, včetně zrakového aparátu. Třetí kapitola teoretické části je věnována slznému filmu, konkrétně jeho funkci, struktuře, stabilitě a možného vzniku oxidačního stresu v lipidové dvojvrstvě se zaměřením na problematiku syndromu suchého oka.

Cílem experimentální části této práce bylo sledovat okamžitý dopad inhalace molekulárního vodíku na SF. Jako aplikace  $H_2$  byla zvolena inhalace do plic a také inhalace pomocí speciálních brýlí. Byla hodnocena doba rozpadu SF, výška a objemová složka slzného menisku. V daném časovém rozmezí a při dané intenzitě inhalace vodíku jak do plic, tak brýlemi sice nebyl prokázán pozitivní vliv na SF, nicméně výsledky ani nenaznačovaly opak. Lze tedy říct, že jednorázová inhalace vodíku oběma způsoby se jeví jako bezpečná.

Inhalaci vodíku lze označit za bezproblémovou i u osob s nízkými parametry SF, vzhledem k tomu, že nebyly nalezeny žádné významné interakce mezi výchozí hodnotou roztržení SF a časovým průběhem jak u experimentálního, tak ani u kontrolního měření. Pro další pozorování okamžitého dopadu inhalace molekulárního vodíku, lze navýšit počet subjektů, prodloužit délku jednotlivých inhalací  $H_2$ , popřípadě kombinovat inhalaci s další aplikací vodíku (např. pitím hydrogenové vody). Dopady dlouhodobé inhalace na slzný film je však nutné ověřit dalšími studiemi.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Al-Samir S, Itel F, Hegermann J, Gros G, Tsiavaliaris G, Endeward V. O<sub>2</sub> permeability of lipid bilayers is low, but increases with membrane cholesterol. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(23):e7649-7662. doi:10.1007/s00018-021-03974-9
- Alshammeri S, Madden L, Hagan S, Pearce EI. Strip meniscometry tube: a rapid method for assessing aqueous deficient dry eye. *Clin Exp Optom.* 2020;103(4):e469-473. doi:10.1111/cxo.12941
- Asada R, Tazawa K, Sato S, Miwa N. Effects of hydrogen-rich water prepared by alternating-current-electrolysis on antioxidant activity, DNA oxidative injuries, and diabetes-related markers. *Med Gas Res.* 2020;10(3):e114-121. doi:10.4103/2045-9912.296041
- Baca JT, Taormina CR, Feingold E, Finegold DN, Grabowski JJ, Asher SA. Mass spectral determination of fasting tear glucose concentrations in nondiabetic volunteers. *Clin Chem.* 2007;53(7):e1370-1372. doi:10.1373/clinchem.2006.078543
- Bartlett JD, Keith MS, Sudharshan L, Snedecor SJ. Associations between signs and symptoms of dry eye disease: a systematic review. *Clin Ophthalmol.* 2015;9:e1719-1730. doi:10.2147/OPTH.S89700
- Brown SH, Kunnen CM, Duchoslav E, et al. A comparison of patient matched meibum and tear lipidomes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(12):e7417-7424. doi:10.1167/iovs.13-12916
- Brzuchanská E. Opakovatelnost měření slzného filmu pomocí proužkové meniskometrie [diplomová práce]. Olomouc: Univerzita Palackého;2024.
- Butovich IA. Tear film lipids. *Exp Eye Res.* 2013;117:e4-27. doi:10.1016/j.exer.2013.05.010
- Cejka C, Kossl J, Hermankova B, Holan V, Cejkova J. Molecular Hydrogen Effectively Heals Alkali-Injured Cornea via Suppression of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:e8906027. doi:10.1155/2017/8906027
- Cohen Y, Trokel S, Arieli Y, Epshtien S, Gefen R, Harris A. Mapping the Lipid Layer of the Human Tear Film. *Cornea.* 2020;39(1):e132-135. doi:10.1097/ICO.0000000000002101
- Craig JP, Nelson JD, Azar DT, et al. TFOS DEWS II Report Executive Summary. *Ocul Surf.* 2017;15(4):e802-812. doi:10.1016/j.jtos.2017.08.003

- Cwiklik L. Tear film lipid layer: A molecular level view. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1858(10):e2421-2430. doi:10.1016/j.bbamem.2016.02.020
- Daenen K, Andries A, Mekahli D, Van Schepdael A, Jouret F, Bammens B. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2019;34(6):e975-991. doi:10.1007/s00467-018-4005-4
- Dartt DA, Willcox MD. Complexity of the tear film: importance in homeostasis and dysfunction during disease. *Exp Eye Res*. 2013;117:e1-3. doi:10.1016/j.exer.2013.10.008
- DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg*. 2011;37(3):e588-598. doi:10.1016/j.jcrs.2010.12.037
- Dogru M, Ishida K, Matsumoto Y, et al. Strip meniscometry: a new and simple method of tear meniscus evaluation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(5):e1895-1901. doi:10.1167/iovs.05-0802
- Feng M, Wang XH, Yang XB, Xiao Q, Jiang FG. Protective effect of saturated hydrogen saline against blue light-induced retinal damage in rats. *Int J Ophthalmol*. 2012;5(2):e151-157. doi:10.3980/j.issn.2222-3959.2012.02.07
- Foster J, Lee W. The Tear Film: Anatomy, Structure and Function. *Ocular Surface Disease: Cornea, Conjunctiva and Tear Film*. 2013; e17-21. doi:10.1016/b978-1-4557-2876-3.00003-1
- Fu Y, Ito M, Fujita Y, et al. Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2009;453(2):e81-85. doi:10.1016/j.neulet.2009.02.016
- Gaffron H. Reduction of Carbon Dioxide with Molecular Hydrogen in Green Algae. *Nature*. 1939;143(3614):e204-205. doi:10.1038/143204a0
- García-Marqués JV, Martínez-Albert N, Talens-Estarellles C, García-Lázaro S, Cerviño A. Repeatability of Non-invasive Keratograph Break-Up Time measurements obtained using Oculus Keratograph 5M. *Int Ophthalmol*. 2021;41(7):e2473-2483. doi:10.1007/s10792-021-01802-4
- Garrigue JS, Amrane M, Faure MO, Holopainen JM, Tong L. Relevance of Lipid-Based Products in the Management of Dry Eye Disease. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2017;33(9):647-661. doi:10.1089/jop.2017.0052
- Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal*. 2007;19(9):e1807-1819. doi:10.1016/j.cellsig.2007.04.009

- Gharib B, Hanna S, Abdallahi OM, Lepidi H, Gardette B, De Reggi M. Antiinflammatory properties of molecular hydrogen: investigation on parasite-induced liver inflammation. *C R Acad Sci III*. 2001;324(8):719–24.
- Glasgow BJ, Abduragimov AR. Interaction of ceramides and tear lipocalin. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2018;1863(4):e399-408. doi:10.1016/j.bbalip.2018.01.004
- H2 Medical Technologies s.r.o. Generátor Molekulárního Vodíku® H2 Generátor i600. Uživatelská příručka. Ostrava, Česká republika: H2 MEDICAL® TECHNOLOGIES; 2023a.
- H2 Medical Technologies s.r.o. Generátor Molekulárního Vodíku® H2 Generátor i300. Pokyny k obsluze. Ostrava, Česká republika: H2 MEDICAL® TECHNOLOGIES; 2023b.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*, 3rd ed. Oxford: Oxford University Press; 1998.
- Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, et al. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;373(1):e30-35. doi:10.1016/j.bbrc.2008.05.165
- Hodges RR, Dartt DA. Tear film mucins: front line defenders of the ocular surface; comparison with airway and gastrointestinal tract mucins. *Exp Eye Res*. 2013;117:e62-78. doi:10.1016/j.exer.2013.07.027
- Horwath-Winter J, Schmut O, Haller-Schober EM, Gruber A, Rieger G. Iodide iontophoresis as a treatment for dry eye syndrome. *Br J Ophthalmol*. 2005;89(1):e40-44. doi:10.1136/bjo.2004.048314
- Housecroft CE, Sharpe AG. *Inorganic Chemistry*, 4th ed. Harlow: Pearson; 2012
- Huang JF, Zhang Y, Rittenhouse KD, Pickering EH, McDowell MT. Evaluations of tear protein markers in dry eye disease: repeatability of measurement and correlation with disease. *Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(8):e4556-4564. doi:10.1167/iovs.11-9054
- Huang L, Zhao S, Zhang JH, Sun X. Hydrogen saline treatment attenuates hyperoxia-induced retinopathy by inhibition of oxidative stress and reduction of VEGF expression. *Ophthalmic Res*. 2012;47(3):e122-127. doi:10.1159/000329600
- Chang AY, Purt B. *Biochemistry, Tear Film*. New York, NY: StatPearls; 2023.

- Chen H, Mao X, Meng X, et al. Hydrogen alleviates mitochondrial dysfunction and organ damage via autophagy-mediated NLRP3 inflammasome inactivation in sepsis. *Int J Mol Med*. 2019;44(4):e1309-1324. doi:10.3892/ijmm.2019.4311
- Choy CK, Cho P, Chung WY, Benzie IF. Water-soluble antioxidants in human tears: effect of the collection method. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(13):3130-3134.
- Christensen H, Sehested K. Reaction of Hydroxyl Radicals with Hydrogen at Elevated Temperature: Determination of the Activation Energy. *J. Phys. Chem*. 1983;87:118-120.
- Chu X, Cao L, Yu Z, et al. Hydrogen-rich saline promotes microglia M2 polarization and complement-mediated synapse loss to restore behavioral deficits following hypoxia-ischemic in neonatal mice via AMPK activation. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):e104. doi:10.1186/s12974-019-1488-2
- Ibrahim OM, Dogru M, Ward SK, et al. The efficacy, sensitivity, and specificity of strip meniscometry in conjunction with tear function tests in the assessment of tear meniscus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(5):e2194-2198. doi:10.1167/iovs.10-5986
- Igarashi T, Ohsawa I, Kobayashi M, et al. Hydrogen prevents corneal endothelial damage in phacoemulsification cataract surgery. *Sci Rep*. 2016;6:e31190. doi:10.1038/srep31190
- Ivanova S, Tonchev V, Yokoi N, Yappert MC, Borchman D, Georgiev GA. Surface Properties of Squalene/Meibum Films and NMR Confirmation of Squalene in Tears. *Int J Mol Sci*. 2015;16(9):e21813-21831. doi:10.3390/ijms160921813
- Jee D, Park M, Lee HJ, Kim MS, Kim EC. Comparison of treatment with preservative-free versus preserved sodium hyaluronate 0.1% and fluorometholone 0.1% eyedrops after cataract surgery in patients with preexisting dry-eye syndrome. *J Cataract Refract Surg*. 2015;41(4):e756-763. doi:10.1016/j.jcrs.2014.11.034
- Jiang B, Li Y, Dai W, Wu A, Wu H, Mao D. Hydrogen-rich saline alleviates early brain injury through regulating of ER stress and autophagy after experimental subarachnoid hemorrhage. *Acta Cir Bras*. 2021;36(8):e360804. doi:10.1590/ACB360804
- Kajimura M, Fukuda R, Bateman RM, Yamamoto T, Suematsu M. Interactions of multiple gas-transducing systems: hallmarks and uncertainties of CO, NO, and H<sub>2</sub>S gas biology. *Antioxid Redox Signal*. 2010;13(2):e157-192. doi:10.1089/ars.2009.2657

- Kajiyama S, Hasegawa G, Asano M, et al. Supplementation of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. *Nutr Res.* 2008;28(3):e137-143. doi:10.1016/j.nutres.2008.01.008
- Kamimura N, Nishimaki K, Ohsawa I, Ohta S. Molecular hydrogen improves obesity and diabetes by inducing hepatic FGF21 and stimulating energy metabolism in db/db mice. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19(7):e1396-1403. doi:10.1038/oby.2011.6
- Kato S, Saitoh Y, Iwai K, Miwa N. Hydrogen-rich electrolyzed warm water represses wrinkle formation against UVA ray together with type-I collagen production and oxidative-stress diminishment in fibroblasts and cell-injury prevention in keratinocytes. *J Photochem Photobiol B.* 2012;106:e24-33. doi:10.1016/j.jphotobiol.2011.09.006
- Katsumata Y, Sano F, Abe T et al. The effects of hydrogen gas inhalation on adverse left ventricular remodeling after percutaneous coronary intervention for ST-elevated myocardial infarction—first pilot study in humans. *Circ J.* 2017;81(7):e940–7. doi:10.1253/circj.CJ-17-0105
- Kayal A. *The Physiology of Tear Film. Dry Eye Syndrome-Modern Diagnostic Techniques and Advanced Treatments.* IntechOpen. 2021;e1–9. doi:10.5772/intechopen.98945
- Kolovou G, Anagnostopoulou K, Mikhailidis DP, Cokkinos DV. Apolipoprotein E knockout models. *Curr Pharm Des.* 2008;14(4):e338-351. doi:10.2174/138161208783497769
- Korb DR, Craig J, Doughty M, Guillon J, Smith G, Tomlinson A. *The tear film: structure, function and clinical examination.* Oxford: Butterworth-Heinemann; 2002.
- Korb DR. Survey of preferred tests for diagnosis of the tear film and dry eye. *Cornea.* 2000;19(4):e483-486. doi:10.1097/00003226-200007000-00016
- Kubota M, Kawashima M, Inoue S, et al. Randomized, crossover clinical efficacy trial in humans and mice on tear secretion promotion and lacrimal gland protection by molecular hydrogen. *Sci Rep.* 2021;11(1):e6434. doi:10.1038/s41598-021-85895-y
- Kubota M, Shimmura S, Kubota S, et al. Hydrogen and N-acetyl-L-cysteine rescue oxidative stress-induced angiogenesis in a mouse corneal alkali-burn model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(1):e427-433. doi:10.1167/iovs.10-6167

- Labetoulle M, Benitez-Del-Castillo JM, Barabino S, et al. Artificial Tears: Biological Role of Their Ingredients in the Management of Dry Eye Disease. *Int J Mol Sci.* 2022;23(5):e2434. doi:10.3390/ijms23052434
- Lafay V, Barthelemy P, Comet B, Frances Y, Jammes Y. ECG changes during the experimental human dive HYDRA 10 (71 atm/7,200 kPa). *Undersea & Hyperbaric Medicine.* 1995;22:51–60.
- Lam SM, Tong L, Duan X, Petznick A, Wenk MR, Shui G. Extensive characterization of human tear fluid collected using different techniques unravels the presence of novel lipid amphiphiles. *J Lipid Res.* 2014;55(2):e289-298. doi:10.1194/jlr.M044826
- Lee C, Edman MC, Laurie GW, Hamm-Alvarez SF, MacKay JA. Biosynthesized Multivalent Lacritin Peptides Stimulate Exosome Production in Human Corneal Epithelium. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17):e6157. doi:10.3390/ijms21176157
- Macri A, Scanarotti C, Bassi AM, et al. Evaluation of oxidative stress levels in the conjunctival epithelium of patients with or without dry eye, and dry eye patients treated with preservative-free hyaluronic acid 0.15 % and vitamin B12 eye drops. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2015;253(3):e425-430. doi:10.1007/s00417-014-2853-6
- Maggio F. Ocular surface disease in dogs part 1: aetiopathogenesis and clinical signs. *Companion Animal.* 2019;24:e240-245. doi:10.12968/coan.2019.24.5.240
- Masoudi S. Biochemistry of human tear film: A review. *Exp Eye Res.* 2022;220:e109101. doi:10.1016/j.exer.2022.109101
- McDermott AM. Antimicrobial compounds in tears. *Exp Eye Res.* 2013;117:e53-61. doi:10.1016/j.exer.2013.07.014
- Mengher LS, Bron AJ, Tonge SR, Gilbert DJ. Effect of fluorescein instillation on the pre-corneal tear film stability. *Curr Eye Res.* 1985;4(1):e9-12. doi:10.3109/02713688508999961
- Möller MN, Li Q, Chinnaraj M, Cheung HC, Lancaster JR Jr, Denicola A. Solubility and diffusion of oxygen in phospholipid membranes. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1858(11):e2923-2930. doi:10.1016/j.bbmem.2016.09.003
- Nakao A, Toyoda Y, Sharma P, Evans M, Guthrie N. Effectiveness of hydrogen rich water on antioxidant status of subjects with potential metabolic syndrome-an open label pilot study. *J Clin Biochem Nutr.* 2010;46(2):e140-149. doi:10.3164/jcbtn.09-100
- Nakashima-Kamimura N, Mori T, Ohsawa I, Asoh S, Ohta S. Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without

- compromising anti-tumor activity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009;64(4):e753-761. doi:10.1007/s00280-008-0924-2
- Nicolson GL, de Mattos GF, Settineri R et al. Clinical Effects of Hydrogen Administration: From Animal and Human Diseases to Exercise Medicine. *Int. J. Clin. Med.* 2016; 7: e32-76. doi:10.4236/ijcm.2016.71005
- Niedernolte B, Trunk L, Wolffsohn JS, Pult H, Bandlitz S. Evaluation of tear meniscus height using different clinical methods. *Clin Exp Optom.* 2021;104(5):e583-588. doi:10.1080/08164622.2021.1878854
- Niu Y, Nie Q, Dong L, et al. Hydrogen Attenuates Allergic Inflammation by Reversing Energy Metabolic Pathway Switch. *Sci Rep.* 2020;10(1):e1962. doi:10.1038/s41598-020-58999-0
- Nordberg J, Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(11):e1287-1312. doi:10.1016/s0891-5849(01)00724-9
- OCULUS Keratograph 5M Topographer. Oculus Keratograph 5M Full Brochure. <https://www.birminghamoptical.co.uk/content/uploads/2017/08/Oculus-Keratograph-5M-Full-Brochure.pdf>. [online 03.02.2024]
- Oharazawa H, Igarashi T, Yokota T, et al. Protection of the retina by rapid diffusion of hydrogen: administration of hydrogen-loaded eye drops in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(1):e487-492. doi:10.1167/iovs.09-4089
- Ohno K, Ito M, Ichihara M, Ito M. Molecular hydrogen as an emerging therapeutic medical gas for neurodegenerative and other diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;353152:e1-11. doi:10.1155/2012/353152
- Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med.* 2007;13(6):e688-694. doi:10.1038/nm1577
- Ohta S. Direct Targets and Subsequent Pathways for Molecular Hydrogen to Exert Multiple Functions: Focusing on Interventions in Radical Reactions. *Curr Pharm Des.* 2021;27(5):e595-609. doi:10.2174/1381612826666200806101137
- Ohta S. Molecular hydrogen as a novel antioxidant: overview of the advantages of hydrogen for medical applications. *Methods Enzymol.* 2015;555:e289-317. doi:10.1016/bs.mie.2014.11.038



- Ohta S. Molecular hydrogen is a novel antioxidant to efficiently reduce oxidative stress with potential for the improvement of mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(5):e586-594. doi:10.1016/j.bbagen.2011.05.006
- Ono H, Nishijima Y, Adachi N, et al. A basic study on molecular hydrogen (H<sub>2</sub>) inhalation in acute cerebral ischemia patients for safety check with physiological parameters and measurement of blood H<sub>2</sub> level. *Med Gas Res*. 2012;2(1):e21. doi:10.1186/2045-9912-2-21
- Ostojic SM. Inadequate Production of H<sub>2</sub> by Gut Microbiota and Parkinson Disease. *Trends Endocrinol Metab*. 2018;29(5):e286-288. doi:10.1016/j.tem.2018.02.006
- Papas EB, Sweeney DF. Interpreting the corneal response to oxygen: Is there a basis for re-evaluating data from gas-goggle studies? *Exp Eye Res*. 2016;151:e222-226. doi:10.1016/j.exer.2016.08.019
- Perez-Garmendia R, Lopez de Eguileta Rodriguez A, Ramos-Martinez I, et al. Interplay between Oxidative Stress, Inflammation, and Amyloidosis in the Anterior Segment of the Eye; Its Pathological Implications. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:e6286105. doi:10.1155/2020/6286105
- Pflugfelder SC, Stern ME. Biological functions of tear film. *Exp Eye Res*. 2020;197:e108-115. doi:10.1016/j.exer.2020.108115
- Pflugfelder SC, Tseng SC, Sanabria O, et al. Evaluation of subjective assessments and objective diagnostic tests for diagnosing tear-film disorders known to cause ocular irritation. *Cornea*. 1998;17(1):e38-56. doi:10.1097/00003226-199801000-00007
- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem*. 2015;30(1):e11-26. doi:10.1007/s12291-014-0446-0
- Pilcher JE. On the Diagnosis of Gastrointestinal Perforation by the Rectal Insufflation of Hydrogen Gas. *Annals of Surgery*. 1888;8:190-204.
- Pláteník J. Volné radikály, antioxidanty a stárnutí. *Interní Med*. 2009; 11(1): 30–33.
- Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. 2011;82(4):e513-523. doi:10.1016/j.fitote.2011.01.018
- Rieger G, Klieber M, Schimetta W, et al. The effect of iodide iontophoresis on the antioxidative capacity of the tear fluid. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2010;248(11):e1639-1646. doi:10.1007/s00417-010-1416-8

- Robinson PK. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem.* 2015;59:e1-41. doi:10.1042/bse0590001
- Rozsival P. *Oční Lékařství*. Praha: Galén; 2006.
- Sano M, Shirakawa K, Katsumata Y, Ichihara G, Kobayashi E. Low-Flow Nasal Cannula Hydrogen Therapy. *J Clin Med Res.* 2020;12(10):e674-680. doi:10.14740/jocmr4323
- Scarpellini C, Ramos Llorca A, Lanthier C, Klejborowska G, Augustyns K. The Potential Role of Regulated Cell Death in Dry Eye Diseases and Ocular Surface Dysfunction. *Int J Mol Sci.* 2023;24(1):e731. doi:10.3390/ijms24010731
- Seen S, Tong L. Dry eye disease and oxidative stress. *Acta Ophthalmol.* 2018;96(4):e412-420. doi:10.1111/aos.13526
- Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K, Majima HJ, Nagano T. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J Biol Chem.* 2003;278(5):e3170-3175. doi:10.1074/jbc.M209264200
- Shen M, Zhang H, Yu C, Wang F, Sun X. A review of experimental studies of hydrogen as a new therapeutic agent in emergency and critical care medicine. *Med Gas Res.* 2014;4:e17. doi:10.1186/2045-9912-4-17
- Shimouchi A, Nose K, Shirai M, Kondo T. Estimation of molecular hydrogen consumption in the human whole body after the ingestion of hydrogen-rich water. *Adv Exp Med Biol.* 2012;737:e245-250. doi:10.1007/978-1-4614-1566-4\_36
- Shinzawa M, Dogru M, Miyasaka K, Shimazaki J, Sekiryu T. Application of CASIA SS-1000 Optical Coherence Tomography Tear Meniscus Imaging in Testing the Efficacy of New Strip Meniscometry in Dry Eye Diagnosis. *Eye Contact Lens.* 2018;44(1):e44-49. doi:10.1097/ICL.0000000000000312
- Schnetler R, Gillan WDH, Koorsen G. Immunological and antimicrobial molecules in human tears: a review and preliminary report. *S Afr Optom.* 2012;71(3):e123-132. doi:10.4102/aveh.v71i3.79
- Smith J, Nichols KK, Baldwin EK. Current patterns in the use of diagnostic tests in dry eye evaluation. *Cornea.* 2008;27(6):e656-662. doi:10.1097/QAI.0b013e3181605b95
- Stahl U, Willcox M, Stapleton F. Osmolality and tear film dynamics. *Clin Exp Optom.* 2012;95(1):e3-11. doi:10.1111/j.1444-0938.2011.00634.x

- Stapleton F, Alves M, Bunya VY, et al. TFOS DEWS II Epidemiology Report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):e334-365. doi:10.1016/j.jtos.2017.05.003
- Sun JC, Xu T, Zuo Q, et al. Hydrogen-rich saline promotes survival of retinal ganglion cells in a rat model of optic nerve crush. *PLoS One.* 2014;9(6):e99299. doi:10.1371/journal.pone.0099299
- Sun X, Ohta S, Nakao A. *Hydrogen Molecular Biology and Medicine.* China and Japan: Springer; 2015.
- Sweeney DF, Millar TJ, Raju SR. Tear film stability: a review. *Exp Eye Res.* 2013;117:e28-38. doi:10.1016/j.exer.2013.08.010
- Tao Y, Geng L, Wang L, et al. Use of Hydrogen as a Novel Therapeutic Strategy Against Photoreceptor Degeneration in Retinitis Pigmentosa Patients. *Med Sci Monit.* 2016;22:e776-779. doi:10.12659/msm.897107
- Tian L, Zhang L, Xia F, An J, Sugita Y, Zhang Z. Hydrogen-rich saline ameliorates the retina against light-induced damage in rats. *Med Gas Res.* 2013;3(1):e19. doi:10.1186/2045-9912-3-19
- Tian Y, Zhang Y, Wang Y, et al. Hydrogen, a Novel Therapeutic Molecule, Regulates Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis. *Front Physiol.* 2021;12:e789507. doi:10.3389/fphys.2021.789507
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):e44-84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001
- Velamakanni GS, Sharma A, Batra HS, Velamakanni SM, Khan M, Gupta S. Evaluation of Tear Film Urea Level as a Diagnostic Marker of Dry Eye Disease: A Pilot Study. *J Lab Physicians.* 2021;14(1):e43-46. doi:10.1055/s-0041-1739537
- Vodičková A, Musilová L, Pluháček F. Opakovatelnost neinvazivního měření break-up time keratografem Oculus 3. *Česká a slovenská oftalmologie*, v tisku.
- Wang ST, Bao C, He Y, et al. Hydrogen gas (XEN) inhalation ameliorates airway inflammation in asthma and COPD patients. *QJM.* 2020;113(12):e870-875. doi:10.1093/qjmed/hcaa164
- Wei L, Ge L, Qin S, et al. Hydrogen-rich saline protects retina against glutamate-induced excitotoxic injury in guinea pig. *Exp Eye Res.* 2012;94(1):e117-127. doi:10.1016/j.exer.2011.11.016
- Willcox MDP, Argüeso P, Georgiev GA, et al. TFOS DEWS II Tear Film Report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):e366-403. doi:10.1016/j.jtos.2017.03.006

- Wu C, Zou P, Feng S, et al. Molecular Hydrogen: an Emerging Therapeutic Medical Gas for Brain Disorders. *Mol Neurobiol.* 2023;60(4):e1749-1765. doi:10.1007/s12035-022-03175-w
- Yang CX, Yan H, Ding TB. Hydrogen saline prevents selenite-induced cataract in rats. *Mol Vis.* 2013;19:e1684-1693.
- Yazdani M. Tear film lipid layer and corneal oxygenation: a new function? *Eye (Lond).* 2023;37(17):e3534-3541. doi:10.1038/s41433-023-02557-1
- Yokota T, Kamimura N, Igarashi T, Takahashi H, Ohta S, Oharazawa H. Protective effect of molecular hydrogen against oxidative stress caused by peroxynitrite derived from nitric oxide in rat retina. *Clin Exp Ophthalmol.* 2015;43(6):e568-577. doi:10.1111/ceo.12525
- Zhang Y, Zhang J, Fu Z. Molecular hydrogen is a potential protective agent in the management of acute lung injury. *Mol Med.* 2022;28(1):e27. doi:10.1186/s10020-022-00455-y
- Zheng ZG, Sun WZ, Hu JY et al. Hydrogen/oxygen therapy for the treatment of an acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: results of a multicenter, randomized, double-blind, parallel-group controlled trial. *Respir Res.* 2021;22(1):e149. doi:10.1186/s12931-021-01740-w
- Zuniga-Hertz JP, Patel HH. The Evolution of Cholesterol-Rich Membrane in Oxygen Adaption: The Respiratory System as a Model. *Front Physiol.* 2019;10:e1340. doi:10.3389/fphys.2019.01340